

OCHRONA ZDROWIA W GOSPODARCE RYBACKIEJ

MONOGRAFIA

pod redakcją naukową
Jana Żelaznego

Puławy 2007

RADA WYDAWNICTW:

prof. dr hab. Zygmunt Pejsak - przewodniczący
doc. dr hab. Dariusz Bednarek
prof. dr hab. Bogna Borkowska-Opacka
doc. dr hab. Tomasz Cencek
prof. dr hab. Bogdan Kowalski
doc. dr hab. Krzysztof Kwiatek
prof. dr hab. Jacek Osek
doc. dr hab. Michał Reichert
dr Hanna Różańska
prof. dr hab. Jan F. Żmudziński
prof. dr hab. Jan Żmudzki

RECENZENT

prof. dr hab. Antonina Sopińska

REDAKTOR WYDANIA:

dr Krystyna Wilczyńska-Ciemiega

Skład tekstu:

Grażyna Lenartowicz, Elżbieta Kąkiel

©Copyright by Państwowy Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy

ISBN 978-83-89946-11-9

Wydawca:

Państwowy Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB)
Druk: Zakład Organizacji i Upowszechniania
Badań Naukowych PIWet-PIB
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
Nakład 150 egz.; Ark. wyd.: 9,6

*Monografia poświęcona pamięci
prof. dr. Bronisława Kocyłowskiego*

SPIIS TREŚCI

Profesor Bronisław Kocyłowski	7
--	----------

CHOROBY RYB I RAKÓW

Występowanie i patogeniza infekcji herpeswirusa koi karpia (KHV) <i>Marek Matras, Jerzy Antychowicz, Michał Reichert</i>	13
Propozycja zwalczania infekcji KHV <i>Jerzy Antychowicz</i>	23
Choroby skóry i skrzelii o objawach podobnych do infekcji KHV <i>Jerzy Antychowicz.....</i>	33
Najważniejsze zakażenia bakteryjne u karpia – aktualny stan wiedzy o etiologii i epizootiologii oraz problemy diagnostyczne i terapeutyczne <i>Alicja Kosińska.....</i>	47
Nowe zagrożenia infekcji bakteryjnych u karpia <i>Agnieszka Pękala.....</i>	59
Możliwość wykorzystania polimorfizmu genów zgodności tkankowej (MH) w podnoszeniu naturalnej odporności ryb <i>Krzysztof Ł. Rakus, Andrzej Pilarczyk, Ilgiz Imazarow</i>	65
Analiza przyczyn śmiertelności raków <i>Teresa Własow i Alicja Bernad.....</i>	73
Dżuma (crayfish plague) – największe zagrożenie raków <i>Alicja Bernad, Teresa Własow.....</i>	83

BEZPIECZEŃSTWO PRODUKTÓW ŻYWNOŚCIOWYCH POCHODZENIA RYBNEGO

Znaczenie jakości w chowie i hodowli ryb słodkowodnych z uwzględnieniem ich dobrostanu <i>Andrzej Lirski, Henryk Białowąs.....</i>	93
Zasady systemu HACCP w przetwórstwie rybnym <i>Mirosław Michalski.....</i>	105
Wpływ warunków hodowli na bezpieczeństwo zdrowotne ryb przeznaczonych do konsumpcji <i>Jan Żelazny.....</i>	115

Wpływ zanieczyszczenia wód powierzchniowych pestycydami na patologię narządów i tkanek ryb słodkowodnych <i>Hanna Lutnicka</i>	129
Występowanie pozostałości zieleni malachitowej u ryb słodkowodnych <i>Kamila Mitrowska</i>	139
Ptasia grypa – światowe zagrożenie zdrowia publicznego z uwzględnieniem gospodarki rybackiej <i>Elżbieta Samorek-Salomonowicz</i>	143

„Czyn mija, jego pomniki pozostają”

- Owidiusz

Profesor Bronisław Kocyłowski
(1907-1989)
twórca Zakładu Chorób Ryb
w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym
w Puławach

W 2007 roku minęło 70 lat od powołania w dniu 1 kwietnia 1937 roku w Puławach Zakładu Chorób Ryb, który obecnie stanowi jeden z zakładów naukowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego. Założycielem Zakładu był prof. dr Bronisław Kocyłowski, którego 100. rocznica urodzin mija w tym roku. Biorąc pod uwagę powyższe rocznice, pragnę przywołać pamięć o Panu Profesorze, dedykując Jemu tę monografię.

Prof. dr Bronisław Kocyłowski był wybitnym ichtiopatologiem, założycielem i wieloletnim (do 31 grudnia 1977 roku) kierownikiem Działu, następnie Pracowni, a potem Zakładu Chorób Ryb w Puławach. Profesor był nauczycielem wielu ichtiopatologów i ichtiologów oraz wykładowcą dla wielu roczników studentów Wydziału Weterynaryjnego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz studentów Wydziału Rolnego Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Miałem zaszczyt współpracować przez 9 lat z Profesorem i pod Jego kierunkiem zdobywać wiedzę z zakresu patologii ryb słodkowodnych oraz wykonywać pierwsze swoje prace badawcze. Osobę Profesora wspominam zawsze z ogromnym szacunkiem i sentymentem. Obecnie dostrzegam, jeszcze wyraźniej niż 30 lat temu, Jego oddanie sprawom nie tylko patologii, ale i hodowli ryb, w tym szczególnie problemom całej gospodarki rybackiej w Polsce.

Profesor urodził się 29 sierpnia 1907 roku w Sanoku, w ówczesnym województwie krakowskim. W Sanoku również ukończył szkołę powszechną i gimnazjum. W 1932 roku zdobył dyplom lekarza weterynarii na Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie i po odbyciu praktyk i stażu podjął pracę w Zakładzie Ichtiologii i Rybactwa Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie jako asystent, a następnie z dniem 1 kwietnia 1937 roku jako

kierownik Działu Chorób Ryb w ówczesnym Wydziale Weterynaryjnym Państwowego Instytutu Naukowego Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach. W roku 1939 (czerwiec) uzyskał stopień doktora medycyny weterynaryjnej w Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie. Następne stopnie naukowe zdobył pracując w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach, a mianowicie w 1954 roku stanowisko docenta, w 1966 roku tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 1974 roku - profesora zwyczajnego.

W okresie międzywojennym zarówno w Polsce jak i na świecie, wielkim problemem w hodowli stawowej karpia stały się masowe śnięcia powodowane przez bliżej nieznaną przyczynę, którą wstępnie określano epizootią, podejrzewając zakaźny charakter czynnika etiologicznego. W Polsce chorobę tę nazwano chorobą lubelską, ponieważ pierwsze duże śnięcia karpia i największe w związku z tym straty wystąpiły na Lubelszczyźnie. W wyniku przeprowadzonych na początku lat trzydziestych badań ukazała się praca (Spiczakow, Bory-Międzyński, 1933), w której po raz pierwszy stwierdzono infekcyjne tło tej choroby, opisano morfologiczne i biologiczne cechy zarazka oraz charakterystyczne objawy kliniczne i zmiany anatomo-patologiczne. Chorobę tę nazwano posocznicą karpia. Profesor Bronisław Kocyłowski podjął swoją pierwszą pracę naukową nad tą jednostką chorobową pod kierunkiem profesora Teodora Spiczakowa, cenionego specjalisty w zakresie ichtiopatologii. W oparciu o zdobytą wiedzę profesor Kocyłowski opracował projekt pierwszego w Polsce rozporządzenia ministra rolnictwa i reform rolnych o włączeniu posocznicy karpia do chorób podlegających obowiązkowi zgłaszania i o zwalczaniu tej choroby (Dz. M. Rz.P. Nr 57, poz. 455 z dnia 29.07.1937 r.) oraz opracował zasady zwalczania tej choroby. W wyniku przeprowadzonych badań doświadczalnych wykazano dużą różnorodność szczepów bakterii powodujących posocznicę (Śnieszko, Kocyłowski, Marek, Piotrowska, 1938.). Stwierdzenie to pozwoliło na wydanie opinii o nieskuteczności stosowania szczepionek w zwalczaniu posocznicy karpia, co się potwierdziło w dalszych pracach doświadczalnych i jest niestety aktualne do obecnych czasów.

W następnych latach Profesor kontynuował badania nad posocznicą karpia, które wykazały, że środowisko wodne jest jednym ze źródeł infekcji bakterii *Pseudomonas*, a czynniki usposabiające takie jak: transport ryb, wahania temperatury wody, złe warunki zimowania oraz inwazje pasożytów mają bardzo duże znaczenie w występowaniu posocznicy karpia (Kocyłowski, 1946). W okresie kolejnych lat Profesor wspólnie ze swoimi współpracownikami uzyskał interesujące wyniki w dalszych badaniach nad posocznicą karpia, a także nad innymi wówczas ważnymi chorobami ryb słodkowodnych takimi jak: kokcydioza, ichtiofarioza, zapalenie pęcherza pławnego, botriocefaloza, kawioza i inne.

Istotnym wkładem profesora Kocyłowskiego w rozwój polskiej ichtiopatologii jest działalność szkoleniowa na rzecz wielu rybaków, ichtiologów i ichtiopatologów na licznych kursach i konferencjach naukowych.

Pod koniec pracy zawodowej Profesora istniało w Polsce 21 specjalistycznych pracowni chorób ryb prowadzonych przez ichtiopatologów wyszkolonych w Zakładzie Chorób Ryb.

Ważnym elementem popularyzacji wiedzy z zakresu ichtiopatologii było opracowanie przez Profesora pierwszych w Polsce podręczników z tej dziedziny, a mianowicie monografii: „Najważniejsze choroby ryb w stawach polskich” (Lwów, 1938) oraz „Choroby ryb i raków” napisanej wspólnie z doc. dr. Tadeuszem Bory-Międzyńskim, wydanej przez PWRiL w Warszawie w 1960 roku. Podręcznik „Choroby ryb i raków” został przetłumaczony na język węgierski i wydany w 1965 roku.

Profesor Kocyłowski, ma w swoim dorobku jeszcze wiele innych dokonań w zakresie zwalczania chorób ryb, przez co na trwale przeszedł do historii polskiej ichtiopatologii oraz pozostał na zawsze w pamięci wielu rybaków, ichtiologów i ichtiopatologów. Uprawiając dziedzinę wiedzy, która ma wielkie powiązanie z praktyką, starał się zarówno tej praktyce służyć, jak i czerpać z niej inspiracje do badań naukowych. Ta więź nauki z praktyką pomagała wykorzystywać ten znaczny zasób wiedzy także interdyscyplinarnej Profesora, do rozwiązywania licznych problemów, zarówno w poszczególnych obiektach hodowli ryb jak i globalnie, w całej gospodarce rybackiej Polski.

Początki pracy naukowej Profesora przypadły na okres bardzo trudny w historii naszego kraju; wybuch II wojny światowej, okupacja, lata powojenne. Mimo warunków, jakie te wydarzenia niosły, profesor Bronisław Kocyłowski był postacią niezwykle szlachetną i prawą. Z ogromnym zaangażowaniem budował dziedzinę wiedzy, której do ostatnich lat swojego życia był bardzo oddany. Mimo, że był filarem polskiej ichtiopatologii był człowiekiem bardzo skromnym, życzliwym i bezpośrednim w kontaktach z innymi ludźmi.

Profesor Bronisław Kocyłowski zmarł 9 lutego 1989 r. w wieku 81 lat i jest pochowany na cmentarzu parafialnym w Puławach.

Dla wszystkich, którzy Go znali pozostanie na zawsze wzorem człowieka oddanego swojej dziedzinie nauki, znakomitego nauczyciela akademickiego i szlachetnego człowieka.

Jan Żelazny

WYSTĘPOWANIE I PATOGENEZA INFEKCJI HERPESWIRUSA KOI KARPIA (KHV)

MAREK MATRAS, JERZY ANTYCHOWICZ, MICHAŁ REICHERT¹

Zakład Chorób Ryb,¹Zakład Anatomii Patologicznej
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Chorobą, która od kilku lat przysparza hodowcom ryb karpiowatych duże problemy, jest nowa choroba wirusowa, której czynnikiem etiologicznym jest herpeswirus. Infekcja tego wirusa powoduje śnięcia u karpi jak i koi karpi w różnym wieku, dochodzące do 90% obsady danego stawu. Ze względu na to, że wirus ten został po raz pierwszy wyizolowany od koi karpia, nosi nazwę herpeswirusa koi karpia (KHV). Od czasu wykrycia pierwszych przypadków KHV w 1998 roku w Izraelu i w Stanach Zjednoczonych, (których źródłem był import koi karpia z Azji) infekcja rozprzestrzeniła się na terenie Europy. W krajach o klimacie umiarkowanym optymalne warunki termiczne dla rozwoju wirusa występują w obiektach rybackich zasilanych podgrzaną wodą np. wodą zrzutową z elektrowni. W sprzyjających dla wirusa warunkach termicznych, ryby zarażają się łatwo poprzez wzajemny kontakt, a infekcja rozprzestrzenia się niezwykle szybko.

Zakład Chorób Ryb (ZCHR) i Zakład Anatomii Patologicznej stwierdziły po raz pierwszy infekcję KHV w Polsce w roku 2004, przy użyciu metody PCR w modyfikacji Gilad (Gilad, 2002). Od tego momentu ZCHR prowadzi stały monitoring obecności herpeswirusa koi karpia w tradycyjnych gospodarstwach stawowych oraz gospodarstwach sadzowych usytuowanych w podgrzanych wodach zrzutowych z elektrowni. Wykaz badań w kierunku KHV oraz liczba przypadków dodatnich ilustrują tabele 1, 2, 3. Z danych tych wynika, że w latach 2004-2005 stwierdzono 6 przypadków infekcji KHV, a w roku 2007 stwierdzono obecność wirusa KHV w 14 gospodarstwach rybackich. Znaczny wzrost przypadków dodatnich w roku 2006, przy stosunkowo nieznacznym wzroście liczby badań w stosunku do roku 2005 świadczy o tym, że infekcja KHV rozprzestrzeniła się na terenie Polski.

Herpeswirus koi karpia odznacza się dużą infekcyjnością porównywalną do infekcyjności wirusa pryszczycy, który wywołuje u przeżuwaczy, głównie u bydła, ogromne straty. Źródłem zarażania karpi hodowanych do konsumpcji jest często ozdobny koi karp

używany do zarybiania sadzawek ogrodowych. Karp zwykły jak i koi karp przetrzymywane są często w tych samych stawach, a przebieg choroby u obu odmian jest podobny. Koi karpie są prezentowane na licznych wystawach międzynarodowych oraz aukcjach organizowanych w różnych częściach świata, co stwarza idealne warunki do rozprzestrzeniania się infekcji. Obrót rybami ozdobnymi takimi, jak koi karpie nie jest dotychczas regulowany przez żadne przepisy weterynaryjne, co stanowi korzystne warunki do szerzenia się epizoocji.

Duża patogenność i infekcyjność wirusa oraz ogromne straty, jakie powoduje w hodowli karpia doprowadziły, między innymi dzięki wnioskom zgłaszanym ze strony Polski, do tego że choroba została zamieszczona na liście chorób objętych obowiązkiem zgłaszania w najnowszej dyrektywie 2006/88/WE z dnia 24 października 2006r. „w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczaniu tych chorób”. Wykaz chorób egzotycznych i nieegzotycznych dotyczących ryb przedstawiają tabele 4 i 5. Jedynie brak regulacji prawnych w przepisach polskich dotyczących KHV powoduje, że na razie nie ma jeszcze obowiązku zgłaszania choroby, a powiatowi lekarze weterynarii nie mogą ingerować w przypadku jej stwierdzenia. Pobieranie i dostarczanie prób do badań w kierunku infekcji KHV jest przeprowadzane dobrowolnie przez zainteresowanych hodowców ryb karpiowatych.

Poza prowadzeniem monitoringu ZCHR i Zakład Anatomii Patologicznej prowadzą badania nad patogenezą KHV oraz doskonaleniem diagnostyki infekcji KHV. Ostatnio przeprowadzone doświadczenia wykazały miejsca występowania wirusa w narządach i tkankach karpia. Dane te, są niezbędne do określenia rodzaju prób do badań diagnostycznych i do zrozumienia patogenezы choroby.

Badania wykazały, że w okresie inkubacji wirus występował w około 80% przypadków w skrzelach i w nerkach, oprócz tego w skórze i mózgu.

W celu przeprowadzenia diagnostyki infekcji KHV należy brać pod uwagę dwa czynniki takie, jak odpowiednia temperatura wody i właściwy wybór ryb do badania. Wiarygodne badanie może być przeprowadzone dopiero wówczas, gdy temperatura wody w przedziale 18-28°C, utrzymuje się w obiekcie przez minimum 3 tygodnie, zanim rozpocznie się badanie. W próbce zbiorczej ryb powinno się znaleźć przynajmniej kilka osobników wykazujących objawy chorobowe, a łączna liczba ryb powinna wynieść minimum 30. Do badania należy przeznaczyć w pierwszym rzędzie ryby wykazujące charakterystyczne objawy w obrębie skóry, płetw i skrzeli, wychudzone z zapadniętymi gałkami ocznymi (fot 1, 2 i 3). W przypadku braku powyższych zmian, do badania przeznaczamy ryby, których zachowanie odbiega od normy. Do badań diagnostycznych najlepiej jest dostarczyć ryby żywe,

ewentualnie ryby uśmiercone natychmiast po odłowieniu ze stawu i umieszczone w pojemniku termoizolacyjnym w temperaturze 4 - 10°C. Do badania nie nadają się ryby, które usnęły w stawie. Badanie diagnostyczne jest najbardziej wiarygodne wówczas, kiedy powyższe wskazówki zostaną dokładnie wypełnione.

Metoda PCR jest aktualnie najbardziej czułą metodą rozpoznawania KHV w sytuacji gdy u ryb występują objawy kliniczne lub zmiany anatomopatologiczne, jak również u ryb niewykazujących objawów chorobowych, ale pochodzących ze stawów, gdzie występuje ta choroba w formie klinicznej (przynajmniej część ryb wykazuje objawy kliniczne). Metoda PCR jest natomiast mało przydatna w monitorowaniu bezobjawowego nosicielstwa, gdy wirus znajduje się w stanie latencji (uśpienia) w organizmie ryby.

W październiku 2006 r. do laboratorium w Puławach dostarczono dwie próbki ryb A i B (po 30 sztuk karpia K1). Ryby pochodziły ze stawów, w których w tym czasie temperatura wody wynosiła około 14-15°C, a u ryb nie występowały żadne objawy wskazujące na obecność wirusa KHV. W próbce B stwierdzona została obecność kwasów nukleinowych koiherpeswirusa. Ze względu na niską temperaturę wody jaka panowała w danym czasie, została podjęta decyzja o powtórzeniu badania w temperaturach wyższych. Ryby przetrzymywano w akwariach doświadczalnych. W tym celu, ryby z obiektów A i B zostały umieszczone w dwóch oddzielnych akwariach. Przez pierwsze dwa tygodnie w celu adaptacji utrzymywano temperaturę 14-15°C, a następnie, stopniowo temperatura została podniesiona do 23°C (o 1°C na dobę). W tej temperaturze ryby były przetrzymywane i obserwowane przez okres trzech tygodni. W grupie ryb z obiektu A nie stwierdzono obecności kwasów nukleinowych koi herpeswirusa, natomiast w grupie ryb z obiektu B, wystąpiły ponadnormatywne śnięcia, u kilku osobników wystąpiły zmiany w skrzelach, a wynik badania potwierdził obecność wirusa KHV. Wyniki powyższego doświadczenia potwierdzają, że przeniesienie ryb z temp. 14-15°C do temp. 21-23°C i przetrzymanie ich w tych warunkach przez 3 tygodnie może spowodować ujawnienie się infekcji KHV.

Badania własne potwierdziły dużą infekcyjność i patogenność wirusa KHV. W jednym z eksperymentów przeprowadzono doświadczalne zakażenie karpia w akwarium przez dodanie 1 ml zawiesiny wirusa o TCID₅₀ wynoszącym 4×10^3 do wody z rybami (w temperaturze 24°C). Po 5-10 dniach od zakażenia, ryby zaczynały wykazywać charakterystyczne objawy chorobowe, tj. zmiany martwicze w skrzelach, zapadnięcie gałek ocznych, zmiany na skórze, jak i szereg objawów niespecyficznych - gromadzenie się przy powierzchni wody i dziubkowanie. Śnięcia wyniosły około 90%. Wiadomo, że charakterystycznymi zmianami dla infekcji KHV są zmiany w obrębie skóry powstające w

przebiegu choroby. Wyrażają się one złuszczeniem naskórka, spod którego wyłania się szorstka skóra (pozbawiona komórek śluzowych) oraz pojawienie się ciemnych plam. W badaniach własnych, stwierdzaliśmy najczęściej, u około 80% ryb, złuszczenie się naskórka, rzadziej zmiany w skrzelach. Opisane objawy z przypadków terenowych (Tab. 1, 2, 3) wskazują na to, że nie zawsze zmiany w skrzelach były spowodowane przez herpeswirus koi karpia. Stąd wniosek, że na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych można jedynie podejrzewać obecność infekcji KHV. Ostateczne rozpoznanie można postawić jedynie po przeprowadzeniu badań w referencyjnym laboratorium chorób ryb.

W ramach poszukiwań metody pozwalającej na wykluczenie bezobjawowego nosicielstwa herpeswirusa koi karpia w Zakładzie Chorób Ryb PIWet – PIB prowadzone są obecnie badania nad wprowadzeniem metody serologicznej. Rozważane jest również poddawanie ryb różnym czynnikom stresowym w celu aktywacji infekcji latentnych KHV przed pobraniem tkanek ryb celem przeprowadzenia badań diagnostycznych.

Nadmienić również należy, że metody serologiczne nie znalazły dotąd szerszego zastosowania w rutynowej diagnostyce chorób wirusowych ryb zimnolubnych, ponieważ u tych ryb przeciwciała pojawiają się w okresie dłuższym niż 1 miesiąc od momentu wniknięcia wirusa. W odróżnieniu od wirusa SVC, infekcja wirusa KHV przebiega zwykle w temperaturach wysokich tj. 20-28°C, w których przeciwciała powstają w krótkim czasie po infekcji. Odpowiedź humoralna u karpia w tej temperaturze jest bardziej regularna i obejmuje zwykle całą populację zakażonych ryb. Według Ariel Ronen i wsp. (2003) w temperaturze 23°C niewielki wzrost poziomu przeciwciał można zaobserwować w 14. dniu od momentu eksperymentalnej infekcji karpia wirusem KHV. W 21. dniu od momentu infekcji można już zaobserwować znaczny wzrost poziomu przeciwciał, który w eksperymencie przeprowadzonym przez powyższych autorów utrzymywał się na takim poziomie do końca doświadczenia, czyli do 51. dnia. Znaczny wzrost poziomu przeciwciał po infekcji wirusa KHV może być wykorzystany w diagnostyce jako wskaźnik, czy ryby przechorowały naturalną infekcję, lub też uzyskały taki poziom przeciwciał poprzez szczepionkę. Badanie poziomu przeciwciał można wykorzystać jako badanie dodatkowe w przypadku diagnostyki wirusa KHV, która ze względu na występowanie zjawiska latencji przysparza wielu trudności.

Zespół Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego zajmujący się infekcją KHV w roku 2006 wziął udział w międzylaboratoryjnym badaniu biegłości w zakresie diagnostyki koiherpeswirusa. Badanie biegłości zostało zorganizowane przez laboratorium CEFAS, Weymouth w Wielkiej Brytanii. Do testu

przystąpiło 20 laboratoriów z 19 krajów, do których organizator rozesłał po 5 próbek (A, B, C, D, E z liofilizowanymi narządami). Próbki zawierały zhomogenizowane i poddane procesowi liofilizacji narządy: nerkę, śledzionę, skrzela w różnych konfiguracjach. Każda z dostarczonych do uczestników próbek została opracowana techniką PCR w trzech modyfikacjach. W podsumowaniu wyników przez organizatora PIWet – PIB znalazł się spośród 20 laboratoriów wśród 8, które prawidłowo zdiagnozowały dostarczone im próbki.

Uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości daje możliwość porównania swoich rezultatów z wynikami otrzymanymi przez inne laboratoria, jak i pozwala na regularną kontrolę jakości wykonywanych badań przez niezależne źródło. To daje możliwość udowodnienia swoich kompetencji jednostkom kontrolnym oraz osobom fizycznym i prawnym zlecającym badanie.

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Gilad O., Yun S., Andree K.B., Adkison M. A., Zlotkin A., Bercovier H., Eldar A., Hedrick R. P.: Initial characteristics of polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. Dis Aquat Org 2002, **48**, 101-108.
3. Ronen A., Perelberg A., Abramowitz J., Hutoran M., Tinman S., Bejerano I., Steinitz M., Kotler M.: Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. Vaccine 2003, **21**, 4677-4684.

Tabela 1. Występowanie wirusa KHV w 2004 r. w Polsce

Numer gospodarstwa	Rok produkcyjny	Objawy	Wynik
I	2	Martwica skrzeli, duże śnięcia	ujemny
II	2	Martwica skrzeli, duże śnięcia	ujemny
III	2	Martwica skrzeli, duże śnięcia	ujemny
IV	2	Martwica skrzeli, duże śnięcia	ujemny
V	3	Intensywna martwica skrzeli, zwiększone wydzielanie śluzu na skórze, bardzo duża śmiertelność	dodatni
VI	1	Ogniskowa martwica skrzeli, mała śmiertelność	ujemny
VII	3	Intensywna martwica skrzeli, zwiększone wydzielanie śluzu na skórze, bardzo duża śmiertelność	dodatni
VIII	1	Martwica skrzeli	ujemny
IX	1	Bładość skrzeli, martwica końców łuków skrzelowych	ujemny
X	1	Bładość skrzeli, zwiększone wydzielanie śluzu	ujemny
XI	1	Martwica skrzeli, wysoka śmiertelność	dodatni

Tabela 2. Występowanie wirusa KHV w 2005 r. w Polsce

Numer gospodarstwa	Rok produkcyjny	Objawy	Wynik badania
I	1	zmiany na skórze – ciemne plamy	dodatni
II	wylęg	badanie kontrolne	ujemny
III	3.	śnięcia wiosną	ujemny
IV	3	badanie kontrolne	ujemny
V	3	badanie kontrolne	ujemny
VI	2	śnięcia	dodatni
VII	2	badanie kontrolne	ujemny
VIII	2	badanie kontrolne	ujemny
IX	3	śnięcie; martwica, błądź skrzeli, ubytki, skóra szorstka,	dodatni
X	3	badanie kontrolne	ujemny
XI	3	badanie kontrolne	ujemny
XII	2	badanie kontrolne	ujemny
XIII	1	ogniska martwicze w skrzelach (w części oddechowej)	ujemny
XIV	2	badanie kontrolne	ujemny
XV	3	badanie kontrolne	ujemny
XVI	3	badanie kontrolne	dodatni
XVII	3	zwiększone wydzielanie śluzu na skórze, u poszczególnych sztuk martwica skrzeli	ujemny
XVIII	3	zwiększone wydzielanie śluzu na skórze	ujemny
XIX	3	badanie kontrolne	ujemny
XX	3	badanie kontrolne	dodatni
XXI	3	badanie kontrolne	ujemny
XXII	2	badanie kontrolne	ujemny
XXIII	1	śnięcie ryb	dodatni
XXIV	1	obrzęk skrzeli, martwica końców listków skrzelowych	ujemny

XXV	1	śnięcie ryb	ujemny
-----	---	-------------	--------

Tabela 3. Występowanie wirusa KHV W 2006r. w Polsce

Numer gospodarstwa	Rok produkcyjny	Objawy	Wynik badania
I	1	śnięcie	ujemny
II	2	śnięcie	ujemny
III	KOI	śnięcie	ujemny
IV	1	Badanie kontrolne	ujemny
V	2	śnięcie	ujemny
VI	2	Badanie kontrolne	ujemny
VII	KOI	Badanie kontrolne	ujemny
VIII	KOI	Badanie kontrolne	ujemny
IX	1	śnięcie	dodatni
X	3	śnięcie	dodatni
XI	3	śnięcie	dodatni
XII	2	śnięcie	ujemny
XIII	3	śnięcie	dodatni
XVI	1	śnięcie	dodatni
XV	1, 3	Badanie kontrolne	ujemny
XVI	3	śnięcie	dodatni
XVII	KOI	Badanie kontrolne	ujemny
XVIII	1, 3	śnięcie	dodatni
XIX	1, 2	śnięcie	ujemny
XX	1, 3	Badanie kontrolne	ujemny
XXI	2, 3	śnięcie	dodatni
XXII	3	śnięcie	ujemny
XXIII	3	śnięcie	ujemny
XXIV	2	Badanie kontrolne	ujemny
XXV	1	śnięcie	dodatni
XXVI	2	Badanie kontrolne	ujemny
XXVII	1	Badanie kontrolne	dodatni
XXVIII	1	Badanie kontrolne	dodatni
XXIX	1	Badanie kontrolne	dodatni
XXX	1	Badanie kontrolne	dodatni
XXXI	1	Badanie kontrolne	ujemny
XXXII	2	Badanie kontrolne	ujemny
XXXIII	1	Badanie kontrolne	ujemny

XXXIV	1	Badanie kontrolne	dodatni
XXXV	2	Badanie kontrolne	ujemny
XXXVI	2	Badanie kontrolne	ujemny
XXXVII	2	Badanie kontrolne	ujemny

Tabela 4. Choroby występujące w Europie objęte obowiązkiem zgłaszania

Choroba	Ryby należące do wrażliwych gatunków
Wiosenna wiremia karpia	karp pospolity i koi karp (<i>Cyprinus carpio</i>), amur biały (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>), tołpyga biała (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>), tołpyga pstra (<i>Aristichthys nobilis</i>), karaś srebrzysty (<i>Carassius carassius</i>), karaś złocisty (<i>Carassius auratus</i>), lin (<i>Tinca tinca</i>), sum (<i>Silurus glanis</i>)
Wirusowa posocznica krwotoczna	ryby należące do rodziny łososiowate (<i>Salmonidae</i>), lipień (<i>Thymallus thymallus</i>), korygonidy (<i>Coregonus</i> sp.), szczupak (<i>Esox lucius</i>), turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>), śledź, szprot (<i>Clupea</i> sp.), łosoś pacyficzny (<i>Oncorhynchus</i> sp.), dorsz atlantycki (<i>Gadus morhua</i>), dorsz pacyficzny (<i>Gadus macrocephalus</i>), plamiak (<i>Gadus aeglefinus</i>), onos (<i>Onos mustelus</i>).
Zakaźna martwica układu krwiotwórczego	ryby należące do rodziny <i>Salmonidae</i> , szczupak (<i>Esox lucius</i>)
Infekcja herpeswirusa koi	karp pospolity i koi karp (<i>Cyprinus carpio</i>).
Zakaźna anemia łososia	łosoś atlantycki (<i>Salmo salar</i>), pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), pstrąg potokowy (<i>Salmo trutta</i>),

Tabela 5. Choroby niewystępujące w Europie objęte obowiązkiem zgłaszania

Choroba	Ryby należące do wrażliwych gatunków
Epizootyczna martwica układu krwiotwórczego	okoń (<i>Perca fluviatilis</i>), inne okoniowate, pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), sum (<i>Silurus glanis</i>), sumik (<i>Ictalurus melas</i>), gambuzja (<i>Gambusia affinis</i>) <i>Poeciliidae</i>

**Wrzodowy syndrom
epizootyczny**

ryby azjatyckie należące do następujących gatunków:
Channa, Mastacembelus, Puntius, Trichogaster, Catla,
Mugil, Labeo.



Fot.1. Zmiany skórne w postaci złuszczającego się naskórka.



Fot. 2. Zmiany martwicze w skrzelach spowodowane infekcją KHV.



Fot.3. Widoczna martwica obwodowych części płetw, złuszczenie naskórka , ciemne przebarwienia skóry oraz zapadnięcie gałek ocznych w przebiegu infekcji KHV.

PROPOZYCJA ZWALCZANIA INFEKCJI KHV

JERZY ANTYCHOWICZ

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

Badania monitoringowe infekcji KHV prowadzone przez zespół Antychowicz, Matras, Reichert (Antychowicz, 2005, Antychowicz i wsp., 2005 a,b) wykazały, że choroba ta rozszerza się w Polsce z roku na rok, powodując duże straty we wszystkich kategoriach wiekowych karpia. Biorąc pod uwagę dużą zaraźliwość wirusa i jego zdolność do przeżycia w organizmie karpia podczas całego okresu zimowo-wiosennego (bez wywołania jakichkolwiek objawów u ryb) należy przewidywać, że choroba utrzymać się będzie we Europie w ciągu wielu lat, o ile nie wprowadzi się do praktyki zasad postępowania epizootycznego. Dzięki prowadzonemu przez wyżej wymieniony zespół monitoringowi, możliwe było, nie tylko poznanie skali zagrożenia hodowli ryb infekcją KHV, ale również szybkie likwidowanie ognisk zarażenia zapobiegające dalszemu rozprzestrzenianiu tej choroby.

Odkrycie w Polsce szeregu ognisk infekcji herpeswirusa koi karpia i stwierdzenie związku przyczynowego pomiędzy tą infekcją a masowymi śnięciami karpia było podstawą do opracowania przeze mnie opinii o konieczności umieszczenia KHV na liście chorób objętych obowiązkiem zgłaszania. Opinia ta wraz z opiniami pochodzącymi z innych krajów europejskich, doprowadziła do umieszczenia KHV na liście chorób ryb nieegzotycznych, objętych obowiązkiem zgłaszania (Council Directive 2006/88/EC) (Tab. 1 i 2). Niezależnie od obowiązku zgłaszania o każdym przypadku podejrzenia choroby z tej listy do organów inspekcji weterynaryjnej, kraje Unii Europejskiej mają również prawo realizacji programów zwalczania tych chorób i uzyskiwania statusu: (gospodarstwo, dorzecze, kraj) wolny od tych chorób.

Programy uwalniania gospodarstw i dorzeczy od wirusowej krwotocznej posocznicy (VHS) i zakaźnej martwicy trzustki (IHN) są od wielu lat realizowane w gospodarstwach prowadzących hodowlę ryb łososiowatych w wielu krajach europejskich (Ryc. 1). W Polsce, pierwszy eksperymentalny program uwalniania gospodarstw rybackich, położonych w dorzeczu rzeki Grabowa, realizował zespół PIWet-PIB, w składzie: Antychowicz, Matras,

Reichert przy współpracy Zakładu Higieny Weterynaryjnej Oddział Koszalin, w składzie: Mazur, Paszowska, (Antychowicz i wsp. 2006 a,b, Matras i wsp. 2006).

Głównym celem tego programu było ratowanie przed bankructwem szeregu obiektów hodowlanych spowodowanym ciągłymi śnięciami ryb z powodu VHS. Zespół liczył również na wykorzystanie praktycznego doświadczenia, które później można będzie zastosować do uwalniania następnych dorzeczy i uzyskiwanie przez nie statusu „wolny od VHS i IHN” potwierdzonego oficjalnie przez Komisję Unii Europejskiej. Wszyscy hodowcy ryb, których gospodarstwa rybackie znajdowały się w dorzeczu rzeki Grabowa, regionalny specjalista chorób ryb i kierownik Zakładu Chorób Ryb uzgodnili zasady realizacji programu zwalczania VHS opartego na odpowiednich wytycznych zawartych w Dyrektywach Unii Europejskiej korzystając przy tym szeroko z doświadczeń duńskich, gdzie podobne programy zaczęto stosować wcześniej.

Hodowle zasilane wodą źródlaną zostały wyznaczone jako źródło pozyskiwania ryb dla ponownego obsadzenia stawów po likwidacji ryb chorych na VHS. Każdego roku, począwszy od 1999, wiosną i jesienią przy temperaturze wody poniżej 15°C, specjalista chorób ryb wizytował każde z gospodarstw w dorzeczu rzeki Grabowa i pobierał 140-150 ryb do badań wirusologicznych.

W każdym przypadku podejrzenia infekcji VHS pobierano dodatkowo 30 ryb z objawami klinicznymi, a próbki natychmiast badano przy użyciu bezpośredniego testu ELISA w laboratorium ZHW, a następnie w Zakładzie Chorób Ryb w celu ewentualnego potwierdzenia infekcji VHS.

Gospodarstwa rybackie zamykano, gdy wystąpiło podejrzenie infekcji VHS, to znaczy, gdy stwierdzono wystąpienie objawów klinicznych u ryb lub efektu cytopatycznego w hodowli komórkowej.

Eradykację w gospodarstwie rybackim przeprowadzano w przypadku, gdy obecność wirusa VHS została potwierdzona w laboratorium w Puławach.

Natychmiastowa eradykacja w przypadku izolacji i identyfikacji wirusa VHS przez zespół, doprowadziły do stopniowego zmniejszenia liczby ognisk VHS w dorzeczu rzeki Grabowa. W latach 1999 – 2006 liczba wykrytych ognisk VHS przedstawiała się następująco: 6, 0, 7, 1, 6, 1, 1, 0 (Ryc. 2). Po pierwszych trzech latach realizacji programu straty ryb z powodu VHS zmniejszyły się w takim stopniu, że przestały zagrażać upadłości gospodarstw w tym dorzeczu.

Oprócz wyraźnych efektów ekonomicznych zespół zdobył cenne doświadczenia praktyczne. Doświadczenia, jakie zostały zgromadzone przez uczestników programu zwalczania VHS w dorzeczu rzeki Grabowa będą wykorzystywane do likwidacji tej choroby jak również KHV w innych dorzeczach, w gospodarstwach karpionych. Wyniki tego programu utwierdziły również hodowców i lekarzy weterynarii w przekonaniu, że eradykacja VHS w polskich gospodarstwach ryb łososiowatych, jakkolwiek trudna, to jednak jest możliwa do osiągnięcia, a oprócz tego przynosi po pewnym czasie zysk pod warunkiem, że wszyscy hodowcy ryb zastosują się do zasad przedstawionych w Dyrektywach UE, jak również do dodatkowych reguł uwzględniających specyficzność poszczególnych dorzeczy.

Realizacja stałych programów zwalczania KHV w gospodarstwach karpionych będzie znacznie bardziej skomplikowana niż realizacja programów zwalczania VHS i IHN w gospodarstwach hodujących ryby łososiowate. Należy jednak podkreślić, że jest to jedyna metoda opanowania tej choroby.

Podstawową przeszkodą w realizowaniu programów zwalczania infekcji KHV jest brak dostosowanych do specyfiki tradycyjnej hodowli karpia, kryteriów w tym zakresie. Zasady realizacji programów zwalczania VHS i IHN przedstawione w Dyrektywach UE, mogą być realizowane jedynie w gospodarstwach pstrągowych.

Nie jest możliwe, ze względu na technologię produkcji, jak również bardzo duży obszar większości obiektów karpionych, oraz wielkość typowych stawów karpionych, przeprowadzenie w ciągu krótkiego czasu odłowu ryb ze wszystkich stawów leżących w całym dorzeczu; chociaż jest to praktykowane podczas zwalczania VHS i IHN.

Jedyną metodą wyjścia z impasu jest przekonanie Komisji Unii Europejskiej o konieczności stworzenia innych kryteriów realizacji programów zwalczania wirusowych chorób karpia niż te, które przyjęto dla ryb łososiowatych. Pragnę tu zwrócić uwagę, że zupełnie inne kryteria stosuje się do realizacji programów zwalczania zakaźnej anemii łosia ISA w warunkach hodowli sadzowej na otwartym morzu, od tych, które stosuje się do zwalczania VHS i IHN w śródlądowych hodowlach ryb łososiowatych. Można więc przyjąć jeszcze inne kryteria dla programu zwalczania KHV. Dotychczas stosowane w krajach Europy programy przyczyniają się do skutecznego zwalczania zarówno VHS i IHN, jak i ISA, albo przynajmniej do ograniczenia przypadków tych chorób. Bez realizacji tych programów hodowla ryb w wielu rejonach Europy nie byłaby możliwa. W Danii, w latach sześćdziesiątych, 90% gospodarstw było zakażonych VHS i IHN; obecnie 1,5% jest jeszcze zakażone VHS, natomiast IHN udało się zwalczyć całkowicie. Wzbudza to nadzieję, że również programy zwalczania KHV w tradycyjnych gospodarstwach karpionych będą

skuteczne. Podkreślić przy tym pragnę, że powodzenie każdego programu zależy przede wszystkim od przekonania hodowców o jego celowości, a co za tym idzie, od ścisłego przestrzegania ustanowionych wspólnie reguł.

Wstępne moje rozmowy na temat indywidualnego podejścia do zwalczania KHV z czołowymi specjalistami chorób pochodzących z krajów zachodniej Europy, nie znalazły zrozumienia, natomiast przedstawiciele krajów, w których prowadzi się tradycyjną hodowlę karpia, a szczególnie, przedstawiciele Węgier, w pełni to poparli. W związku z tym w przyszłym roku być może uda się zorganizować w Polsce międzynarodową konferencję ichtiopatologiczną z udziałem krajów Środkowej i Wschodniej Europy, na której poruszany będzie ten temat. W oczekiwaniu na rezultaty dyskusji konferencyjnych proponuję od zaraz wypróbować w praktyce następujący sposób postępowania.

Każdego roku (raz w roku), z każdego stawu w okresie, gdy woda w stawie osiągnie temperaturę 22-26°C, do badań wirusologicznych w kierunku KHV, pobrane będą najsłabsze karpie lub koi karpie, lub te, które wykazują objawy chorobowe. W zależności od wieku, pobiera się następująco: 5 sztuk karpia lub koi karpia powyżej 2 roku życia, 10 szt. kroczków karpia od 1 do 2 roku życia, 15 szt. narybku karpia do 1 roku życia. Niezależnie od tego, próbki ryb będą dostarczane do laboratorium, gdy przy temperaturze powyżej 20°C, w gospodarstwie wystąpią u ryb objawy wskazujące na podejrzenie infekcji KHV. Próbką powinna zawierać minimum 10 sztuk ryb z objawami, celem zbadania w kierunku obecności wirusa KHV.

W realizacji programów powinno być zaangażowane polskie uznane laboratorium chorób ryb, które wykazało się pozytywnie zdaniem międzynarodowym testem biegłości z zakresu diagnostyki KHV. W realizacji tych programów, bardzo trudnym problemem, jest przyjęcie zasady postępowania w przypadku, jeżeli w jednym ze stawów określonego obiektu, stwierdzi się obecność infekcji KHV. Uważam, że w takim przypadku, należy przystąpić do natychmiastowej likwidacji ryb w tym stawie i w innych stawach tego obiektu, w których obsada jest tego samego pochodzenia (z tego samego zimochowu, z tego samego transportu, czy też obiektu), a oprócz tego należy zlikwidować ryby znajdujące się w stawach położonych w systemie paciorkowym poniżej zakażonego stawu. Likwidacja ryb, przeprowadzana jest więc na terenie jednego zakażonego obiektu i nie dotyczy innych, nawet jeżeli położone będą poniżej, na cieku rzeki, jeżeli w tych obiektach nie występuje KHV.

Właściciele obiektów leżących poniżej zarażonego obiektu powinni być powiadomieni o wystąpieniu infekcji KHV w gospodarstwie powyżej oraz o okresie, w którym będzie spuszczana woda z zakażonych stawów, aby w tym okresie nie pobierali wody z rzeki. Po

otrzymaniu przez zainteresowanych hodowców informacji o zamierzonej eradykacji KHV w gospodarstwie powyżej, woda z zakażonych wyżej położonych stawów, może być już spuszczana, a ryby odławiane i sortowane. Ryby bez objawów mogą być przeznaczone do konsumpcji lub przetwórstwa, a ryby z objawami, powinny być utylizowane. Stawy powinny być osuszone i wydezynfekowane przy użyciu wapna palonego na wilgotne dno. Po upływie minimum 1 miesiąca, stawy można ponownie zalać wodą i obsadzić nową partią ryb.

Ryby w pozostałych stawach w danym obiekcie należy poddać specjalnej obserwacji. Przynajmniej dwa razy w ciągu najbliższego miesiąca po stwierdzeniu infekcji KHV w obiekcie powinna być przeprowadzona inspekcja lekarza weterynarii - specjalisty chorób ryb (działającego z upoważnienia powiatowego lekarza weterynarii) lub bezpośrednio przez powiatowego lekarza weterynarii. Podczas tego przeglądu, z każdego stawu powinno być przesłane po minimum 10 najsłabszych ryb lub ryb wykazujących objawy chorobowe do uznanego laboratorium, wyspecjalizowanego w diagnostyce wirusowych chorób ryb.

Każdy obiekt karpiowy, czyli grupa stawów zasilanych wodą z określonego dorzecza, powinien mieć prawo indywidualnego przystępowania do realizacji programu zwalczania infekcji KHV. A nie jak to jest w przypadku gospodarstw pstrągowych, gdzie program realizuje się dla całego dorzecza, a indywidualnie mogą go realizować tylko gospodarstwa zasilane ze źródeł lub studni.

Wyżej zaproponowany system, należy sprawdzić w praktyce w ciągu 2-3 lat, a następnie w przypadku pozytywnych rezultatów, zaproponować go drogą oficjalną do Komisji Unii Europejskiej.

Niezależnie od tego, już teraz, zaleca się ograniczyć do minimum przewóz ryb między gospodarstwami oraz zrezygnować z importu żywych karp i koi karp. Jeżeli jednak zdarzy się sporadyczny przypadek importu żywych karp czy też koi karp lub zakupu ryb z innego gospodarstwa, zakupione ryby powinny być obsadzone w oddzielnym stawie. Konieczne jest to, aby w przypadku wystąpienia KHV nie było możliwości przeniesienia infekcji ryb do innych stawów; natomiast ewentualna likwidacja ogniska infekcji mogłaby być wówczas ograniczona tylko do tego jednego stawu.

Ryby należy nabywać tylko z wylęgarni, która jest pod kontrolą uznanego laboratorium. W przypadku braku takiej możliwości, należy powrócić do tarła naturalnego w oparciu o własne tarlaki wolne od KHV.

Uważam, że nawet przy niedoskonałości przedstawionej przeze mnie schematycznej propozycji zwalczania infekcji KHV, realizacja programu nawet w tradycyjnych obiektach

hodowli karpia przyczyni się niewątpliwie do ograniczenia występowania infekcji KHV w Polsce, a może nawet do zwalczania tej choroby.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J. (2005): Infekcja herpeswirusa koi karpia. *Med. Wet.* 61 (7), 735-738.
2. Antychowicz J., Reichert M., Matras M., Bergmann S.M. Haenen O.: Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolate in Poland, *Bull Vet Inst Pulawy*, Vol. 49, no. 4, 367-373, 2005.
3. Antychowicz J., Matras M., Reichert M., Kramer I.: Preliminary observation on epizootiology and pathogenesis of *Thelohanellus nikolskii* infection in carp in Poland, *Bull Vet Inst Pulawy*, Vol. 49, no. 4, 403-409, 2005.
4. Antychowicz J., Mazur M., Reichert M., Paszowska K., Matras M.: Study on the of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in Poland, 10th Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases, May 22-24, 2006, Copenhagen, Denmark.
5. Antychowicz J., Mazur W., Reichert M., Paszowska K., Matras M. (2006a): Study on the of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, Vol. 50, 293-297, 2006.
6. Council Directive 2006/88/EC (CNS) on animal health requirements for aquaculture animals and products there of, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals OI No. L 328/14.
7. Matras M., Antychowicz J., Mazur W., Reichert M.: Występowanie wirusowej krwotocznej posocznicy (VHS) w Polsce i jej zwalczanie. W: *Pstrągarstwo. Hodowla, manipulacje genetyczne, zagadnienia prawne, ochrona zdrowia.* IRS, Olsztyn 2006, s.171 – 178.

Tabela 1. Choroby występujące w Europie* objęte obowiązkiem zgłaszania
Aneks III dyrektywy 2006/88/EC

Choroba	Ryby należące do wrażliwych gatunków
wiosenna wiremia karpia	karp pospolity i koi karp (<i>Cyprinus carpio</i>), amur biały (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>), tołpyga biała (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>), tołpyga pstra (<i>Aristichthys nobilis</i>), karaś srebrzysty (<i>Carassius carassius</i>), karaś złocisty (<i>Carassius auratus</i>), lin (<i>Tinca tinca</i>), sum (<i>Silurus glanis</i>)
wirusowa posocznica krwotoczna	ryby należące do rodziny łośoiowate (<i>Salmonidae</i>), lipień (<i>Thymallus thymallus</i>), korygonidy (<i>Coregonus</i> sp.), szczupak (<i>Esox lucius</i>), turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>), śledź, szprot (<i>Clupea</i> sp.), łoś pacyficzny (<i>Oncorhynchus</i> sp.), dorsz atlantycki (<i>Gadus morhua</i>), dorsz pacyficzny (<i>Gadus macrocephalus</i>), plamiak (<i>Gadus aeglefinus</i>), onos (<i>Onos mustelus</i>)
zakaźna martwica układu krwiotwórczego	ryby należące do rodziny <i>Salmonidae</i> , szczupak (<i>Esox lucius</i>)
infekcja herpeswirusa koi	karp pospolity i koi karp (<i>Cyprinus carpio</i>)
zakaźna anemia łośosia	łoś atlantycki (<i>Salmo salar</i>), pstrąg tęczkowy (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), pstrąg potokowy (<i>Salmo trutta</i>)

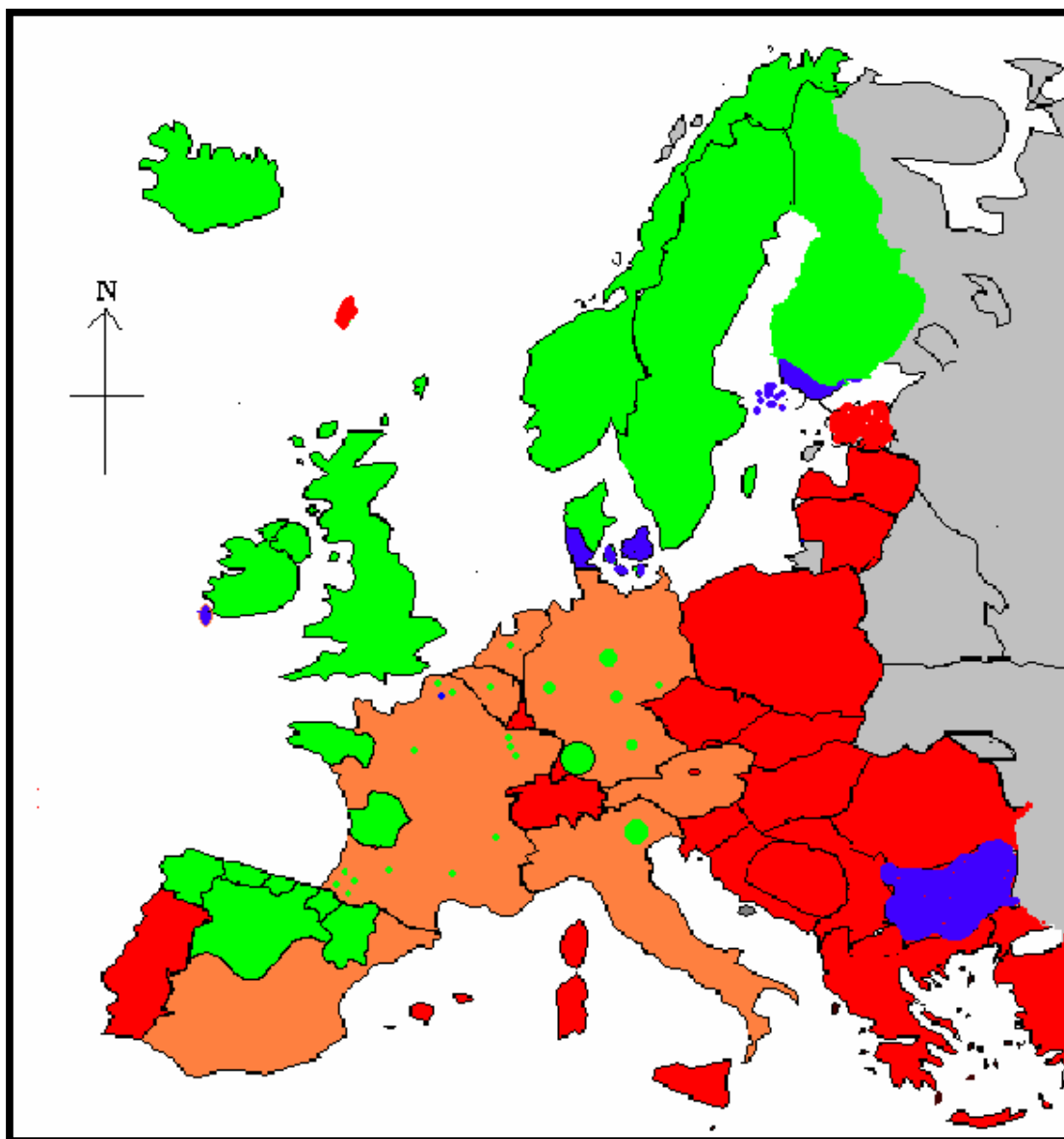
* autor wymienia tylko choroby ryb pomijając choroby mięczaków i skorupiaków

Tabela 2. Choroby* egzotyczne objęte obowiązkiem zgłaszania
Aneks III dyrektywy 2006/88/EC

Choroba	Ryby należące do wrażliwych gatunków
Epizootyczna martwica układu krwiotwórczego	okoń (<i>Perca fluviatilis</i>), inne okoniowate, pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), sum (<i>Silurus glanis</i>), sumik (<i>Ictalurus melas</i>), gambuzja (<i>Gambusia affinis</i>), <i>Poeciliidae</i>
Wrzodowy syndrom epizootyczny	ryby azjatyckie należące do następujących gatunków: <i>Channa</i> , <i>Mastacembelus</i> , <i>Puntius</i> , <i>Trichogaster</i> , <i>Catla</i> , <i>Mugil</i> , <i>Labeo</i>

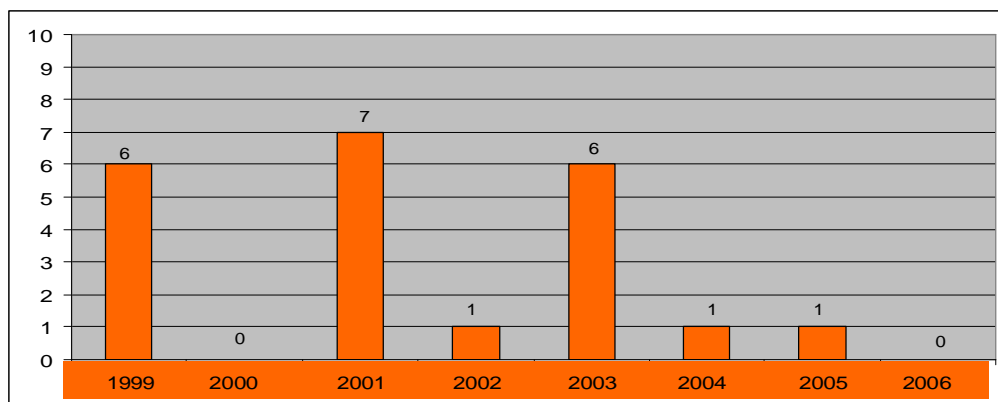
*autor wymienia tylko choroby ryb pomijając choroby mięczaków i skorupiaków

Ryc. 1 Mapa Europy z zaznaczeniem krajów, rejonów wolnych i zakażonych VHS i IHN według Ellen Ariel - Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej Chorób Ryb (Community Reference Laboratory for Fish Diseases DFVF, Arhus, Denmark)



kolor zielony - rejony wolne od VHS i IHN ,
kolor niebieski – rejony wolne od IHN,
kolor czerwony i łososiowy - kraje zakażone VHS i IHN

Ryc. 2 Wyniki realizacji kontrolnego programu uwalniania dorzecza rzeki Grabowa



Liczba gospodarstw zakażonych wirusem VHS w dorzeczu rzeki Grabowa w latach 1999 - 2006

CHOROBY SKÓRY I SKRZELI KARPI O OBJAWACH PODOBNYCH DO INFЕКCJI KHV

JERZY ANTYCHOWICZ

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

W roku 1963, pan Tadeusz Miączyński, znany polski ichtiopatolog, opracował oryginalną, świetnie zilustrowaną pracę doktorską p.t. „Obumieranie skrzeli karpia - nowa postać chorobowa”. Zwrócił on w ten sposób uwagę hodowców i lekarzy weterynarii, że patologiczne zmiany w skrzelach towarzyszą stale hodowli karpia, powodując zahamowanie wzrostu ryb, a w niektórych przypadkach śnięcia. Badania współczesne, nie potwierdziły istnienia tej jednostki chorobowej, określonej przez Miączyńskiego, jako obumieranie skrzeli, natomiast obecnie znanych jest wiele czynników fizykochemicznych i biologicznych wywołujących różne zmiany w skrzelach. Okazało się, że nie wszystkie patologiczne zmiany, które stwierdzamy w tym narządzie, można zawsze wyjaśnić przez określenie czynnika, który je wywołał. Nie możemy więc wciąż wykluczyć, że choroba opisana przez Miączyńskiego nie istnieje. W ostatnim punkcie swojej pracy Miączyński napisał: „Znaczenie gospodarcze tej choroby (obumierania skrzeli karpia) jest duże, czy to ze względu na możliwość upadków ryb, czy też słabszego ich przyrostu w okresie przechodzenia przez nie tej choroby. Ponadto, ważną kwestią dla gospodarstw produkujących materiał obsadowy jest również obniżenie przydatności chorych ryb (jako mniej odpornych) w obrocie rybą obsadową”.

Skrzela ryby są narządem wielofunkcyjnym. Przez nabłonek skrzelowy, (częściowo przez naskórek skóry) zachodzi ciągła wymiana gazów i jonów między krwią ryb a zewnętrznym środowiskiem wodnym. Uważa się, że mechanizm pobierania niektórych jonów i wydalanie innych jonów, polega na ich wymianie, a mianowicie Na^+ na NH_4^+ , Na^+ na H^+ i Cl^- na HCO_3^- .

Przez skrzela odbywa się również wydalanie amoniaku i mocznika.

Na uwagę zasługuje fakt, że w przypadku zatrucia zbiornika wodnego, toksyczne związki chemiczne działają przede wszystkim na skrzela i skórę. Zmiany w skrzelach powodowane są nie tylko przez toksyczne związki chemiczne, ale również przez zawiesiny,

bardzo wysokie lub bardzo niskie pH, a oprócz tego bakterie i pasożyty. W przypadku, gdy zmiany patologiczne obejmą znaczną powierzchnię skrzelii, wówczas dochodzi do upośledzenia funkcji wielu narządów, a nawet do śmierci ryby.

Podstawowym warunkiem skutecznego zapobiegania śnięciom ryb jest właściwe rozpoznanie czynników (pierwotnych i wtórnych), które je wywołują. Wieloletnie obserwacje terenowe wskazują, że bezpośrednią przyczyną śmierci karpia w wielu przypadkach, są przede wszystkim zmiany w skrzelach, w mniejszym stopniu zmiany w skórze. Stąd badanie skrzelii jest podstawowym i równocześnie niezbędnym elementem diagnostyki przyczyn zaburzeń w hodowli ryb. Badanie skrzelii wymaga dokładnej znajomości budowy, funkcji i patologii tego narządu.

W skrzelach odróżnia się następujące elementy morfotyczne: komórki nabłonkowe, charakteryzujące się posiadaniem mikrobruzd (utrudniających przyleganie bakterii), podwójnie wklęsłe komórki podporowe blaszki oddechowej, komórki śluzowe oraz komórki chlorkowe z towarzyszącymi im komórkami dodatkowymi.

Wśród komórek nabłonkowych, głównie listka skrzelowego, występują również limfocyty, makrofagi, kwasochłonne komórki ziarniste, komórki neuroepitelialne i komórki kolbkowe, o niewyjaśnionym całkowicie znaczeniu. W cytoplazmie komórek kolbkowych, występują często eozynofilne, łamiące światło, wydłużone twory. Podejrzewa się, że komórki kolbkowe, wytwarzają substancję alarmową, ostrzegającą ryby przed niebezpieczeństwem. U nasady blaszek oddechowych, pod komórkami nabłonka, mogą występować komórki macierzyste, z których stopniowo powstają następne komórki nabłonkowe.

Komórki chlorkowe zawierają dużą liczbę mitochondrii niezbędnych do intensywnych procesów energetycznych zachodzących w związku z osmoregulacją. W warunkach chorobowych, komórki chlorkowe, występują w zwiększonych ilościach w obwodowych rejonach blaszek oddechowych; niektórzy uważają, że komórki z załamującymi światło ziarnistościami, to słodkowodne ameby (Fot.1)

W trakcie oglądania skrzelii gołym okiem, możemy stwierdzić różne makroskopowe zmiany, takie jak: obrzęk, zwiększone wydzielanie śluzu, anemia i martwica, które są charakterystyczne dla zaawansowanego procesu patologicznego, wywoływanego przez różne czynniki fizykochemiczne i biologiczne.

Badania przeprowadzane przeze mnie w ostatnich latach wykazały, że w wielu przypadkach przy braku zmian makroskopowych w skrzelach oraz mało wyraźnych zmianach stwierdzonych w świeżych preparatach gniecionych, dopiero w preparatach histologicznych

stwierdza się zmiany patologiczne, które wskazują wyraźnie na związek uszkodzenia skrzelii z wystąpieniem objawów chorobowych u ryb i ich śnięciem.

W przebiegu chorób chronicznych w preparatach histologicznych, stwierdza się wzrost liczby komórek kwasochłonnych z licznymi ziarnistościami. Przy obrzeku skrzelii, hipertrofii lub hyperplazji, im grubsza warstwa śluzu i nacieku komórek kwasochłonnych pokrywa blaszki oddechowe, tym trudniej zachodzi wymiana gazów i wydalanie metabolitów. Poważne upośledzenie osmoregulacji i wydalania następuje wówczas, gdy znaczna część skrzelii ulegnie uszkodzeniu. Z kolei hyperplazja nabłonka (komórek Malpighiego) blaszek oddechowych, powoduje zmniejszoną zdolność do wydalania dwutlenku węgla, co może doprowadzić do kwasicy organizmu, a następnie do upośledzenia oddychania. Zakwaszenie krwi powoduje zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu, co może powodować duszenie się ryby i jej śmierć, nawet w dobrych warunkach tlenowych.

Substancje toksyczne

Liczba komórek śluzowych i produkcja śluzu w skrzelach zwiększa się, gdy skrzelia zostaną podrażnione przez substancje toksyczne (ścieki) lub pasożyty. Ujemny ładunek kwasu krzemowego występującego w śluzie ryb, wiąże rozpuszczalne w wodzie kationy, takie jak rtęć, cynk i miedź, w związku z tym metale ciężkie kumulują się w śluzie skrzelii w znacznie większym stopniu, niż w innych narządach.

Przy ostrych zatruciach, w skrzelach pojawiają się obrzęki i wakuolizacja komórek nabłonka skrzelowego oraz zwiększone wydzielanie śluzu. Może wystąpić również martwica nabłonka, przy której obserwuje się rozpad jąder komórkowych (*karioreksis*) i kurczenie się jąder (*pyknosis*). Z komórek nabłonkowych pokrywających blaszki oddechowe wyrastać mogą niekiedy cytoplazmatyczne wypustki, sięgające do sąsiednich blaszek oddechowych, tworząc zrosty, a następnie doprowadzając do całkowitego zlewania się blaszek. Zjawisko to jest charakterystyczne dla zatruc metalami ciężkimi.

Po pewnym czasie, komórki nabłonkowe mogą ulegać złuszczeniu, a następnie zalegać między blaszkami oddechowymi. Zjawisko takie następuje wówczas, gdy poprzedza je нефизjologiczny, masowy rozplam komórek nabłonkowych (hyperplazja).

Wynikiem ostrego działania czynników chemicznych, jak i fizycznych na skrzelia, może być powstawanie tak zwanych „aneuryzmów” blaszek oddechowych. „Aneuryzmy” powstają po pęknięciu komórek podporowych i powstaniu bańkowego rozszerzenia blaszki oddechowej z powodu wypełnienia jej krwią (Fot.2). Makroskopowo (gołym okiem), widoczne są wówczas punkcikowate wybroczyny.

W procesach chronicznych, występuje zwykle hyperplazja komórek kolbkowych i chlorkowych.

Przy zatruciu ryb jonami miedzi lub cynku, obserwuje się u ryb zaburzenie w oddychaniu. Błede, anemiczne skrzela mogą być oblepione zwiększoną ilością śluzu. Toksyczność tych metali potęguje się w wodzie miękkiej.

Zatrucie amoniakiem

Najbardziej znanym procesem powodującym zmiany w skrzelach, jest samozatrucie ryb amoniakiem lub zatrucie egzogennym amoniakiem przy podwyższonym pH wody (Schreckenbach i wsp. 1975).

Przy zatruciu amoniakiem, ryby przestają żerować, podpływają pod dopływ i zbierają się tam w duże gromady. W okresie tym obserwuje się u nich zwiększone wydzielanie śluzu. Poszczególne sztuki wykazują ponadto objawy nerwowe, a mianowicie wyskakują w pozycji pionowej ponad powierzchnię wody. W dalszym przebiegu choroby, ryby wykazują osłabioną reakcję na bodźce zewnętrzne. Często poza niewielkimi zmianami w skrzelach, karpie mają normalny wygląd zewnętrzny, a nawet wykazują dobry stan odżywienia. Po umieszczeniu takich ryb na przepływie czystej, dobrze natlenionej wody, znaczna ich część zwykle wraca do normy, a zmiany w skrzelach cofają się.

W zaawansowanym stadium choroby obserwuje się ubytki listków skrzelowych oraz zwiększone wydzielanie śluzu w skrzelach. Niektórzy uważają, że ryby chore charakteryzuje zwiększona skłonność do krwawienia skrzeli, którą można zaobserwować przy niewielkim nawet ucisku na wieczko skrzelowe. W dalszym przebiegu choroby w skrzelach ukazują się wybroczyny, zwykle dobrze widoczne na tle bladej tkanki skrzelowej. Niekiedy stwierdza się jedynie błądź (anemizację) skrzeli.

Okres regeneracji tkanki skrzelowej po przebyciu zaawansowanego procesu chorobowego (ubytki, nekroza) trwa zwykle kilka tygodni. Przy przewlekłej formie choroby ryby chudną, pomimo pobierania pokarmu, a szybkość tego procesu jest zwykle proporcjonalna do intensywności patologicznych zmian w skrzelach.

Nawet niewielkie, podprogowe stężenia amoniaku mogą wywołać zmiany histologiczne w tkankach ryb. Na początku choroby u podstawy listków skrzelowych, w tkance łącznej, obserwuje się obecność komórek kwasochłonnych, natomiast w okolicy dużych naczyń krwionośnych występuje obrzęk oraz wybroczyny. Komórki kwasochłonne wędrują w późniejszym okresie do wielowarstwowego nabłonka listków skrzelowych. W okresie dużego nagromadzenia się komórek kwasochłonnych wokół listków skrzelowych

obserwuje się obumieranie blaszek oddechowych i rozwój tkanki łącznej w ich miejsce. Rozrastająca się tkanka łączna powoduje sklejanie się sąsiednich blaszek, a następnie listków. W przypadku zaawansowanej branchioneurozy stwierdza się intensywny naciek granulocytów, który razem ze śluzem i złuszcającym się nabłonkiem tworzy wokół listków skrzelowych gruby nalot. U ryb, które przeżyły tkanka martwicowa skrzelii odpada, naciek leukocytny zanika, wydzielanie śluzu normalizuje się i następuje stopniowa regeneracja blaszek oddechowych.

Rozpoznawanie branchioneurozy przeprowadza się przede wszystkim na podstawie obserwacji zachowania ryb w stawie, oglądania skrzelii oraz badania fizykochemicznych właściwości wody. Pamiętać przy tym należy, że widoczne gołym okiem zmiany w skrzelach, stwierdza się u karpia jedynie w zaawansowanej formie branchioneurozy i to zwykle w okresie, gdy czynniki wywołujące tę chorobę już ustąpiły.

Uszkodzenie komórek skrzelii manifestuje się ich hipertrofią, hyperplazją oraz powstaniem zmian martwiczych. Oprócz tego może wystąpić przerost komórek śluzowych z towarzyszącym zwiększeniem ilości śluzu w skrzelach; proliferacji mogą ulegać również komórki chlorkowe.

Hyperplazja komórek nabłonka skrzelowego, po pewnym czasie, doprowadza do zrostów między blaszkami oddechowymi, często przy zgrubieniu końców tych blaszek. Dojść może przy tym do przepełnienia naczyń krwionośnych blaszek oddechowych erytrocytami, a następnie do powstawania bańkowatych rozszerzeń, zwanych aneuryzmami (Fot.2). Należy jednak pamiętać, że niektóre patologiczne zmiany w skrzelach, takie jak hipertrofia nabłonka skrzelowego i oddzielanie się jego od blaszki skrzelowej, mogą powstawać również pod wpływem stresu manipulacyjnego, np. odłowu sieciami ciągnionymi. Kontakt ryby z jonami metali, a mianowicie Cd, Cu i Zn, powoduje natomiast, wzrost komórek chlorkowych.

Nawet niewielkie zmiany w skrzelach, które nie doprowadzają jeszcze do śmierci ryby, upośledzają oddychanie ryb oraz powodują utratę przez nią apetytu. Martwicze zmiany lokalne w tym narządzie, które nie są zwykle śmiertelne, mogą jednak usposabiać do infekcji bakterii i grzybów, które pogłębiają uszkodzenie skrzelii czynnikami chemicznymi i w ten sposób doprowadzają do śmierci ryb. Tego typu wtórne infekcje są szczególnie groźne dla ryb hodowanych na wodach podgrzanych. U ryb hodowanych w zatrutych ściekami wodach podgrzanych może dojść do całkowitej lizy tkanki skrzelowej i obumierania chrząstki listków skrzelowych (Fot. 3).

Infekcja herpeswirusa koi karpia (KHV)

W przebiegu infekcji KHV, w skrzelach obserwuje się obrzęk końców listów skrzelowych oraz oddzielanie nabłonka pokrywającego listki skrzelowe od błony podstawowej. Jednym z bardziej charakterystycznych zmian jest lokalne zrastanie się międzyblaszkowych przestrzeni. W blaszkach oddechowych u zakażonych wirusem KHV ryb obserwuje się silny naciek limfocytów. W dalszym przebiegu choroby w skrzelach dochodzi do rozwoju stanu zapalnego, a następnie do rozległej martwicy skrzeli. Po pewnym czasie, proces martwiczy obejmuje wszystkie listki skrzelowe należące do jednego łuku skrzelowego.

W przypadku, jeżeli przebieg procesu chorobowego ma charakter ostry, występują tam granulocyty kwasochłonne. W naskórku stwierdza się zanik komórek śluzowych, a komórki Leidiga przybierają kształt kulisty; ich liczba w trakcie choroby zmniejsza się.

Granulocyty gromadzą się nie tylko w nabłonku blaszek oddechowych, ale również w nabłonku listków skrzelowych. Zakończenia blaszek oddechowych zrastają się po pewnym czasie całkowicie, albo zostają zniszczone przez występujące tam w dużych ilościach bakterie.

Badanie wycinków skrzeli za pomocą mikroskopu elektronowego, wykazuje niekiedy w blaszkach oddechowych obecność kwasochłonnych ciałek wtrętowych, będących skupiskami herpeswirusów, zarówno wewnątrz jąder komórkowych, jak i poza jądrem w cytoplazmie komórkowej.

W przebiegu infekcji herpeswirusa koi karpia występują patologiczne zmiany w skrzelach, również w skórze i w nerkach. Ogniska martwicze w skrzelach oraz złuszczenie się płatów martwego naskórka, przy wystąpieniu masowych śnięć ryb, są głównymi objawami chorobowymi, które nasuwają podejrzenie KHV. Po pewnym czasie dochodzi do martwicy i całkowitego złuszczenia wszystkich warstw naskórka. Odsłonięta warstwa skóry właściwej, również może wykazywać patologiczne zmiany (Fot. 4, 5). Śmierć ryb, następuje głównie z powodu zaburzenia w wymianie jonowej i gazowej, między organizmem ryby a środowiskiem wodnym, jak również z powodu upośledzenia oddychania. Powodem powstającego na tym tle zaburzenia w równowadze osmotycznej płynów ustrojowych ryby jest nie tylko uszkodzenie skrzeli i skóry przez wirus KHV i wtórne rozwijające się bakterie, ale również zmiany zwyrodnieniowe w nerkach.

Flavobacterium sp.

Zmiany skórne występują najczęściej na głowie lub grzbiecie ryby oraz w jej skrzelach. Na początku mają one wygląd białych plamek otoczonych strefą przekrwienia. Po

pewnym czasie tworzą się wrzody skórne (podobne do tych, które powstają przy erythrodermatitis) otoczone strefą, w której rozwijają się flawobakterie doprowadzające do martwicy tkanek. W miejscach skupisk tych bakterii, skóra może przybierać żółty lub pomarańczowy kolor.

Infekcja *F. columnaris* dotyczy często płetw, głównie płetwy ogonowej. Tkanka między promieniami płetw ulega w trakcie choroby zniszczeniu, podczas gdy promienie płetw pozostają jakiś czas nienaruszone; płetwy wyglądają jak gdyby zostały postrzępione.

Infekcja rozpoczyna się często od końców listków skrzelowych. Bakterie przywierają do śluzu pokrywającego skrzela ryby i namnażają się intensywnie. Rozwijające się bakterie, doprowadzają do złuszczenia się komórek nabłonka blaszek oddechowych lub do ich przerostu. W wyniku przerostu komórek, dochodzi do zrastania się końców blaszek oddechowych i wypełnienia przestrzeni między blaszkami oddechowymi, w której oprócz proliferujących komórek, stwierdza się obecność bakterii i zniszczonej tkanki.

Choroba ma często długotrwały (chroniczny) przebieg. Wskutek działania bakterii dochodzi do zmniejszenia efektywności oddychania oraz regulacji ciśnienia osmotycznego warunkowanego właściwą cyrkulacją jonów między organizmem ryby a wodą. Śnięcia nie przewyższają zwykle 25% obsady (Speare i wsp. 1991).

Branchiomyces sanguinis

W oddechowej części skrzeli stwierdza się intensywną wybroczynowość oraz postępującą, od nasady końców listków skrzelowych, martwicę. U ryb, które przechorowały branchiomykozę może wystąpić błądź skrzeli lub ubytki listków skrzelowych. Listki skrzelowe wyglądają, jak gdyby zostały poucinane nożyczkami.

Badanie histologiczne wykazuje hiperplazję tkanki skrzelowej, zrastanie się blaszek oddechowych oraz występowanie ognisk martwiczych. Oprócz tego stwierdza się zakrzepy w naczyniach krwionośnych i lokalne rozszerzenie ich światła. W kapilarach blaszek oddechowych stwierdza się obecność ciemnych spor grzyba *Branchiomyces sanguinis*.

***Chilodonella* sp.**

U ryb o osłabionym układzie immunologicznym, np. przez stres środowiskowy lub, gdy woda zanieczyszczona jest związkami organicznymi pasożyty te mogą się intensywnie namnażać, powodując zwiększone wydzielanie śluzu w skórze i w skrzelach. W

sporadycznych przypadkach obserwowanych przez autora, w końcowym okresie zimowania karpia, pasożyty mogą osiągnąć tak duże ilości, że nieprzerwaną warstwą pokrywają skrzela tych ryb, wówczas skutek uduszenia mogą snąć nawet duże ryby o wadze 1-2 kg. Są to jednak bardzo rzadkie przypadki.

Ichthyophthirius multifiliis

Przy masowej inwazji może dojść do odklejania się naskórka (skóry) lub nabłonka skrzelowego, a następnie do zniszczenia listków oddechowych aparatu skrzelowego (Fot. 6).

Sphaerospora molnari

Molnar (1979) uważa, że *S. molnari* nie powoduje samoistnie ubytków listków skrzelowych, czy też uszkodzeń blaszek oddechowych. Natomiast Lom i Dykova (1992) uważają, że podczas sferosporozy dojść może do dystrofii i martwicy listków skrzelowych (Fot. 7, 8).

Wielojądrowe pansporoblasty i rozwijające się spory powodują deformację nieodróżnionych komórek warstwy rozrodczej. W wyniku nacisku pasożytów, jądra tych komórek przybierają kształt półksiężycowaty, trójkątny lub wielokątny. Wokół pansporoblastów i spor, utrzymuje się jedynie cienkie pasemko tkanki skrzelowej, które tworzy jak gdyby siatkę podtrzymującą sporoblasty i spory (Fot. 7, 8). W związku z narastającym naporem pasożytów, tkanka gospodarza pomiędzy niektórymi sporami ulega martwicy i zanikowi, w wyniku czego powstają zgrupowania liczące 15-30 spor. Pomimo napierających z głębi licznych spor, powierzchniowa warstwa nabłonka lub naskórka stanowi jeszcze wciąż ciągłą warstwę. Po pewnym czasie spory rozrywają w pewnych miejscach powierzchniową warstwę komórek i wydostają się na zewnątrz (Molnar, 1979). W następstwie wydobywania się spor w skrzelach powstają ogniska nekrotyczne. Wydobywanie się spor odbywa się zwykle w przestrzeniach pomiędzy kubkami smakowymi, gdzie są one uwalniane w grupach (od 8 do 10) po miejscowym pęknięciu warstwy komórek.

Dactylogyrus sp.

W przebiegu inwazji przywr rodzaju *Dactylogyrus* u kilkumiesięcznych karpia w skrzelach obserwuje się objawy anemii, obrzęk, zwiększone wydzielanie śluzu. Występujące

niekiedy śnięcia, trwają zwykle od 5-10 dni do 1-2 tygodni. Po tym okresie śnięcia ustają (Spiczakow, 1930).

Wskutek uszkodzenia przez skrzelowce komórek podporowych, blaszki skrzelowe są zdeformowane, a ich krawędzie zgrubiałe (na przekroju przybierają maczugowaty kształt). Naczynia krwionośne blaszek są silnie przekrwione (rozszerzone). Niekiedy dochodzi do pęknięcia naczyń włosowatych i tworzenia się wybroczyn. Przy masowej inwazji dochodzi do rozległych ubytków tkanki skrzelowej.

Sanguinicola inermis

Powszechnie uważa się, że najpoważniejsze zmiany patologiczne powstają w okresie, gdy jaja *S.inermis*, dostaną się do skrzelu ryby. Z powodu ucisku nagromadzonych jaj, skrzela ulegają uszkodzeniu, co powoduje pojawienie się lokalnych ognisk martwicy, którym towarzyszy niedotlenienie organizmu ryby. Nabłonkowa tkanka naczyń krwionośnych wykazuje hyperplazję, a w skrzelach pojawia się naciek leukocytów i tkanka włóknisto-ziarnista, wypierający normalną tkankę skrzelu. Wydobywające się miracidia powodują uszkodzenie naczyń krwionośnych, powstawanie wybroczyn i wtórnych infekcji bakteryjnych (Lee, 1990). Niekiedy na 1 mm² skrzelu stwierdza się 15 tys. jaj pasożyta. Sangwinikoloza skrzelu może być przyczyną poważnych śnięć narybku. Obecnie sangwinikoloza występuje w Polsce bardzo rzadko.

Zawiesiny

Zawiesiny – to pływające w toni wodnej, nierozpuszczalne substancje organiczne i mineralne oraz żywe i martwe drobne zwierzęta i rośliny wodne. Duże ilości zawiesin w stawach karpionych występują najczęściej przy gęstych obsadach dużych ryb żerujących w torfowym gliniastym lub mulistym dnie i poruszających przy tym osady denne. Zawiesiny pojawiają się również przy spływach wody z okolicznych gruntów po obfitych deszczach lub roztopach.

Najgroźniejsze ujemne działanie zawiesin to zatykanie skrzelu ryb oraz podrażnienie tkanki skrzelowej, w następstwie której dochodzi do obrzęku blaszek oddechowych, a niekiedy do wtórnych infekcji bakterii i grzybów. Działanie zawiesiny mułu i szlamu, w okresie kiedy temperatura wody jest niska, nie objawia się od razu. Ryby zaczynają wykazywać objawy związane z zatkaniami i podrażnieniem skrzelu, dopiero po dłuższym czasie, gdy temperatura wody wzrośnie, a koncentracja tlenu zmniejszy się.

Duże ilości zawiesin w stawach karpowych w dni słoneczne powodują silniejsze nagrzewanie się powierzchniowej warstwy wody w stosunku do warstw głębszych, a równocześnie szybszy spadek temperatury wraz z głębokością wody w stawie. W nocy, w stawach z większą ilością zawiesiny następuje szybsze wypromieniowywanie ciepła z wody niż w stawach, gdzie jest jej mniej.

Szczególony rodzaj zawiesiny stanowi żywy i obumierający fitoplankton i zooplankton należący do różnych gatunków. W okresie obfitych zakwitów glonów w wodzie stawowej w skrzelach stwierdza się zalegający, obumarły fitoplankton i zooplankton. Patogenne działanie złożeń fitoplanktonu, jak również obumarłych komórek tych glonów występujących w różnych stadiach rozkładu w skrzelach karp, nie jest jasne. Przypuszczać należy, że glony występujące w skrzelach ryb hamują przepływ wody przez skrzela, przez co odcinają dostęp tlenu do blaszek oddechowych. Jest również wysoce prawdopodobne, że efekt zatkania skrzeli przez glony i inne zawiesiny oraz efekt deficytu tlenu w wodzie (np. nad ranem) sumują się, doprowadzając do śmierci ryby. Na granicy zalegających zawiesin i tkanki skrzelowej, często rozwijają się różne nitkowate bakterie, między innymi rodzaju *Flavobacterium*.

Uważa się, że nawet niewielkie ilości zawiesin, mogą wyrządzać szkody w postaci zmniejszenia przyrostów ryb. W mętnej bowiem, z powodu zawiesin, wodzie ryby mają trudność w chwytaniu karmy. W przypadku zatkania skrzeli przez zawiesinę zapotrzebowanie ryb na tlen jest większe niż u ryb żyjących w wodzie nie zawierającej dużych ilości zawiesin. Podobne problemy w oddychaniu występują u młodych ryb łososiowatych w okresie, gdy w wodzie pojawiają się pyłki roślin (zwłaszcza pyłki sosny). Mogą one doprowadzić nawet do redukcji wzrostu ryby i zwiększenia współczynnika pobierania pokarmu.

Regeneracja skrzeli

Po usunięciu czynnika powodującego zmiany w skrzelach, może dojść do regeneracji tkanki skrzelowej. Na przykład w przypadku odklejenia nabłonka, czas regeneracji może wynosić kilka tygodni.

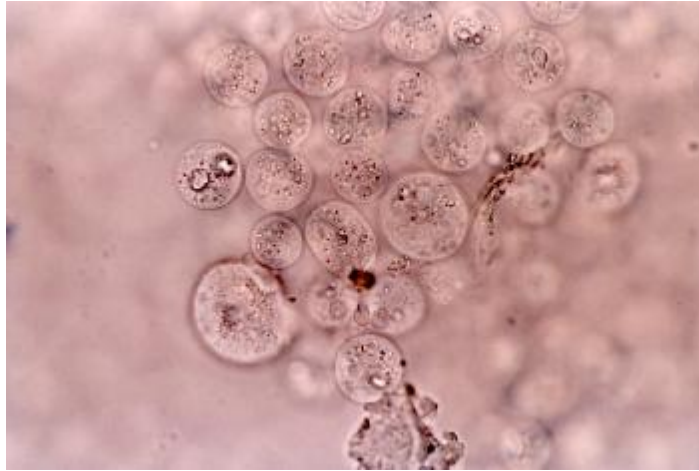
Ciągłe działanie na skrzela dużych koncentracji produktów przemiany materii lub innych czynników nieswoistych, mogą poprzez drażnienie skrzeli stwarzać korzystne warunki do osiedlenia się różnych bakterii i pasożytów.

Analiza zmian powstających wskutek działania wirusa KHV i niektórych innych czynników, wskazuje na duże ich podobieństwo i w związku z tym, w każdym przypadku

wystąpienia martwicy skrzeli czy też złuszczenia naskórka, również martwicy płetw, ryby powinny być badane metodami wirusologicznymi. Nie można również wykluczyć, że w niektórych przypadkach chorobowych, bierze udział kilka czynników. Bez badania wirusologicznego, hodowca nie może nigdy być pewien, czy w jego gospodarstwie wystąpiła infekcja herpeswirusa czy też nie.

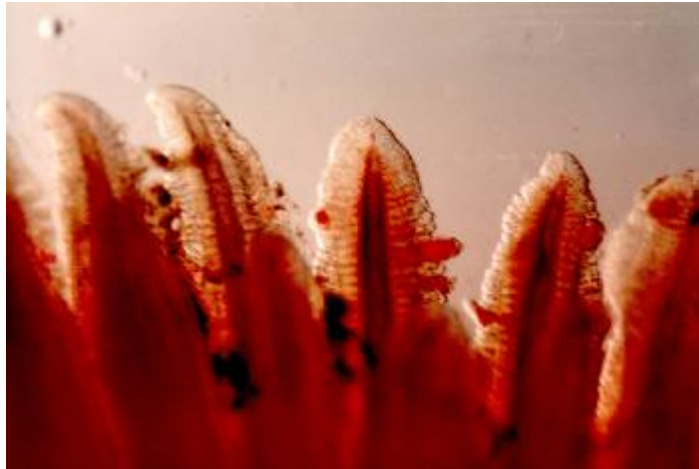
Piśmiennictwo

1. Speare D.J., Ferguson H.W., Beamish E.W.M., Tager J.A., Yamashiro S. (1991): Pathology of bacterial gill disease: sequential development of lesions during natural outbreaks of the disease. *J. Fish Dis.* 14, 21-32.
2. Międzyński T. (1963): Obumieranie skrzeli karpia – nowa postać chorobowa, Instytut Zootechniki w Krakowie, Zakład Biologii i Hodowli Ryb w Zatorze, Instytut Weterynarii w Puławach.
3. Molnar, K. (1979). Gill sphaerosporosis in the common carp and grasscarp. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 27, 99-113.
4. Spiczakow T. (1930): Obserwacje i badania doświadczalne nad *Gyrodactylus* i *Dactylogyrus*; *Archiwum Hydrobiologii i Rybactwa* 5,1-52.
5. Lee R. S. (1990): The development of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (*Digenea: Sanguinicolidae*) in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). PhD thesis, University of London.
6. Schreckenbach K., Spangenberg R. (1975): Die Ursache der Kiemennekrose. *Z. Binnenfisch. DDR* XXII 9, 257-288.
7. Lom, J. and Dykova, I (1992): Protozoan parasites of fishes: development in aquaculture and fisheries science, vol 26, New York, Elsevier, 315 pp.

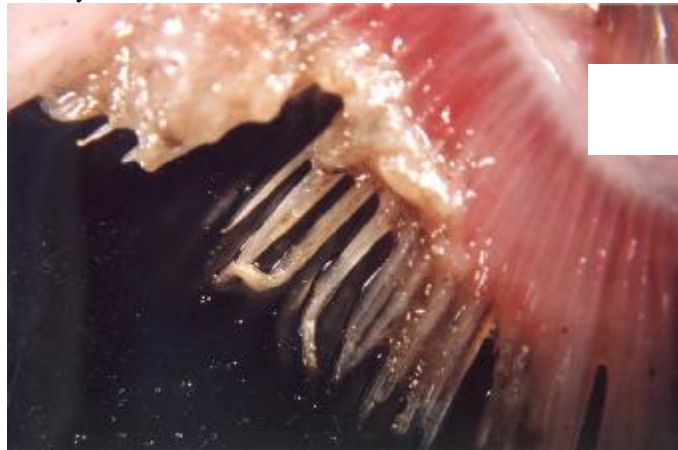


Fot. 1. Ameba słodkowodna lub naciek komórek chlorkowych skrzelu narybku pstrąga tęczowego wykazującego intensywne zmiany anatomopatologiczne w skrzelach i śnięcie.

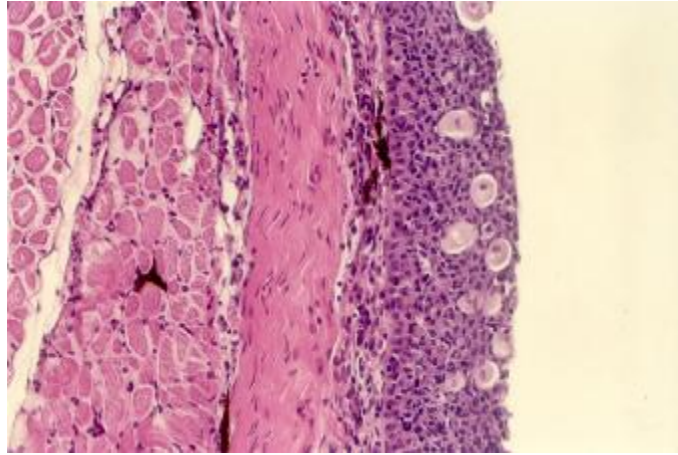
44



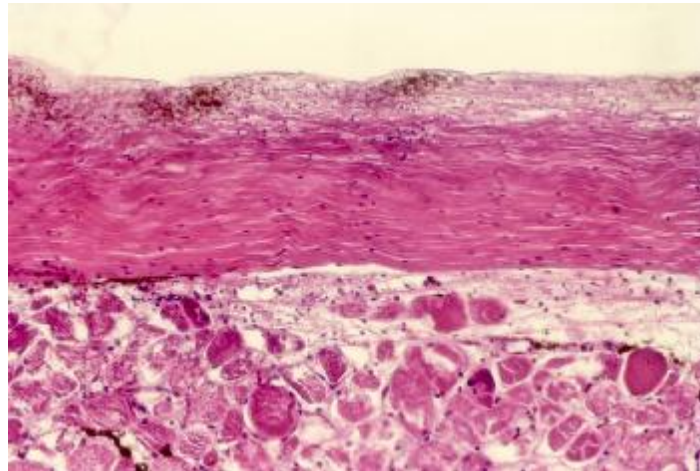
Fot. 2. Wybroczyny w skrzelach karpia, spowodowane pęknięciem komórek podporowych i wylewem krwi do niektórych blaszek oddechowych.



Fot. 3. Obnażone chrząstki listków skrzelowych karpia hodowanego w wodach podgrzanych, po rozpadzie tkanek miękkich, blaszek oddechowych i listków skrzelowych.

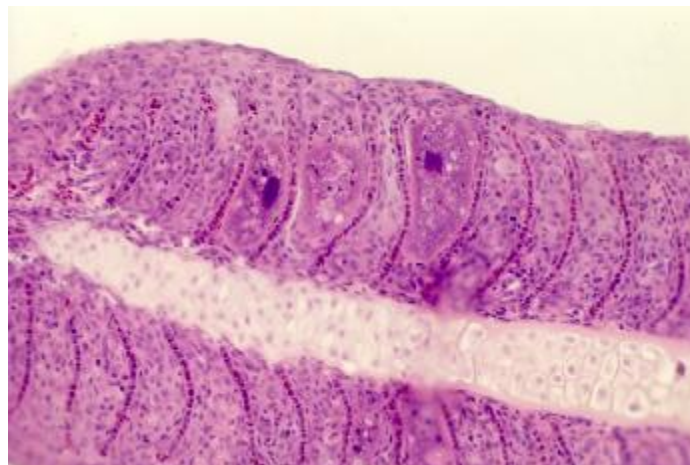


Fot. 4. Przekrój przez normalną skórę karpia; od góry naskórek z komórkami śluzowymi, warstwa melanomakrofagów, włóknista skóra właściwa i dwie warstwy mięśni. Preparat histologiczny barwiony hematoksyliną i eozyną.

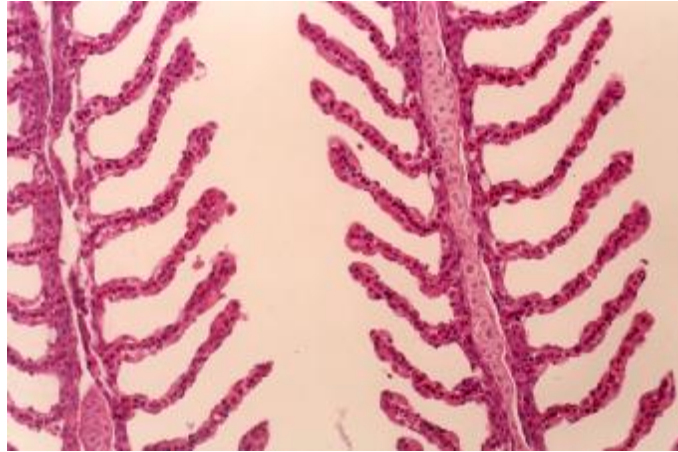


Fot. 5. Przekrój przez skórę karpia zniszczoną przez wirus KHV: brak naskórka, martwica zewnętrznej warstwy skóry właściwej, obrzęk i przekrwienie mięśni. Preparat histologiczny barwiony hematoksyliną i eozyną.

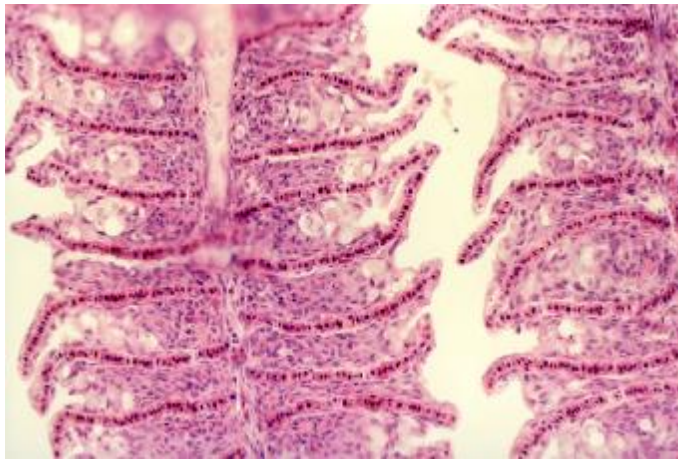
45



Fot. 6. Inwazja kulożęska (*Ichthyophthirius multifiliis*) w skrzelach karpia. Preparat histologiczny barwiony hematoksyliną i eozyną.



Fot. 7. Skrzela klinicznie zdrowego karpia; niewielki obrzęk komórek nabłonkowych. Preparat histologiczny hematoksylina i eozyną.



Fot. 8. Inwazja *Sphaerospora Molnari* w skrzelach karpia: stadia rozwojowe pasożyta w nabłonku listków skrzelowych, proliferacja i zwyrodnienie nabłonka wypełniającego przestrzeń między blaszkami oddechowymi. Preparat histologiczny hematoksylina i eozyną. Badanie przeprowadzono z powodu podejrzenia infekcji herpeswirusa koi karpia KHV.

NAJWAŻNIEJSZE ZAKAŻENIA BAKTERYJNE U KARPI – AKTUALNY STAN WIEDZY O ETIOLOGII I EPIZOOTIOLOGII ORAZ PROBLEMY DIAGNOSTYCZNE I TERAPEUTYCZNE

ALICJA KOZIŃSKA

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
- Państwowego Instytutu Badawczego
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wstęp

Woda, szczególnie bogata w substancje organiczne jest korzystnym środowiskiem dla życia bakterii, naturalnie zasiedlających to środowisko. Dlatego też, flora bakteryjna ryb jest odbiciem populacji drobnoustrojów żyjących w wodzie.

Większość bakterii potencjalnie chorobotwórczych dla ryb żyje normalnie jako saprofity związane z gospodarzem lub różnego rodzaju zawiesinami wodnymi. Różne gatunki bakterii towarzyszą rybam przez całe życie, nie tylko szkodząc ale i pomagając, np. w procesie trawienia. Do rozwoju choroby najczęściej przyczynia się obniżenie odporności, które następuje w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Dlatego bakterie te są powszechnie nazywane jako warunkowo chorobotwórcze.

W ichtiopatologii trudno jest przeprowadzić wyraźny podział, które gatunki bakterii są tylko organizmami saprofitycznymi, a które patogennymi dla ryb. Opisano ponad 80 gatunków i rodzajów bakterii chorobotwórczych dla ryb słodkowodnych, ale w wielu przypadkach były to zakażenia sporadyczne lub występujące endemicznie na określonym obszarze geograficznym (Austin i Austin, 1999).

W warunkach hodowlanych, znacznie częściej notowane są infekcje bakterii warunkowo chorobotwórczych niż obligatoryjnych patogenów. Prawdopodobnie jest to związane ze stałą obecnością tych bakterii w środowisku wodnym, na powłokach zewnętrznych albo w przewodzie pokarmowym ryb. Organizmy te są więc jak gdyby "w pogotowiu" do zaatakowania ryb, jeżeli tylko zaistnieją sprzyjające temu warunki.

Niektóre saprofity, współżyjąc z makroorganizmem, nabywają stopniowo umiejętności wykorzystywania tkanek gospodarza (Larski i Truszczyński, 1992) i stają się organizmami chorobotwórczymi. Niektóre bakterie chorobotwórcze żyją w przewodach

pokarmowych ryb, żywiąc się substancjami z treści jelitowej, ale w określonych warunkach mogą przedostawać się do innych tkanek wywołując infekcję. Do zakażenia może dochodzić także za pośrednictwem wody, w której żyją chorobotwórcze mikroorganizmy

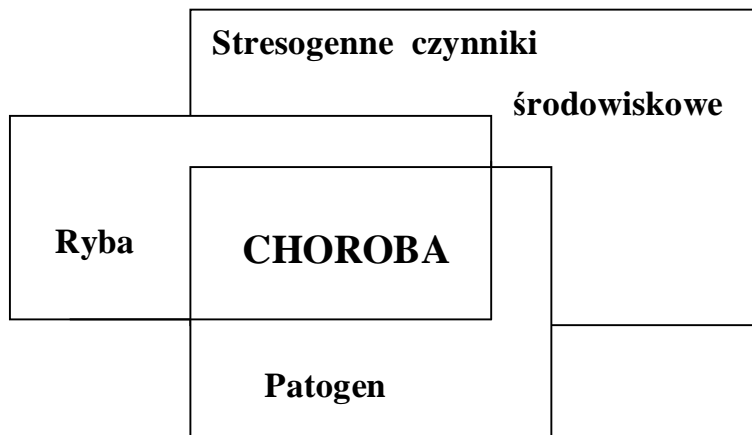
Powszechnie wiadomo, że ryby żyjące w warunkach naturalnych chorują znacznie rzadziej niż ryby w warunkach hodowlanych. Ponadto, przebieg chorób ryb w warunkach naturalnych jest zazwyczaj bardziej łagodny w porównaniu z nasileniem objawów chorobowych u ryb hodowlanych.

Wynika to z kilku przyczyn, z których najważniejsze to:

- ✓ Wzmoczona siła działania obecnych w środowisku w warunkach hodowlanych, czynników chorobowych (głównie bakterii i grzybów), spowodowana jest prawdopodobnie brakiem procesu adaptacji ryb w stosunku do potencjalnych patogenów, co skutkuje słabszą odpornością na te patogeny.
- ✓ Ryby w warunkach hodowlanych narażone są na ingerencję człowieka, na przebywanie w dużym zagęszczeniu, co sprzyja powstawaniu stresu obniżającego odporność ryb na choroby.
- ✓ Konieczność nawożenia stawów hodowlanych, wprowadzania karmy sztucznej, przeprowadzanie zabiegów związanych z dezynfekcją, regulacją składu fauny i flory, wreszcie stosowanie leków w celach profilaktycznych i terapeutycznych, ogranicza, a nawet uniemożliwia zachowanie równowagi biologicznej w środowisku.

Najważniejsze czynniki sprzyjające chorobom bakteryjnym

Zrozumienie występowania chorób bakteryjnych u ryb musi być powiązane nie tylko z poznaniem i zrozumieniem inwazyjnych mikroorganizmów, ale także ich wzajemnych relacji ze środowiskiem i żywicielem (Austin i Austin, 1999). Choroba zakaźna u ryb występuje zwykle wówczas, kiedy wrażliwa ryba i zjadliwy patogen spotkają się w odpowiednich warunkach środowiskowych, sprzyjających do wystąpienia choroby. Czynniki biotyczne (ryba, patogen) i abiotyczne (środowiskowe czynniki stresogenne) są bardzo ściśle ze sobą powiązane (Ryc. 1).



Ryc. 1. Interakcje prowadzące do wystąpienia choroby

A. Stresogenne czynniki środowiskowe:

- Zanieczyszczenie środowiska poprzez napływ znacznych ilości substancji organicznych lub nieorganicznych
- Niewłaściwa higiena stawów
- Gwałtowne zmiany temperatury, pH
- Wahania zawartości tlenu w wodzie
- Długotrwałe deficyty tlenu w wodzie
- Zbyt gęste obsady ryb
- Niekontrolowane stosowanie środków dezynfekcyjnych lub antybiotyków
- Stres manipulacyjny powodowany niewłaściwym obchodzeniem się z rybami podczas odłowów, transportu, sortowania, przerzutów itp.

B. Patogen

- Obecność określonego patogenu/patogenów w środowisku
- Warunki środowiskowe sprzyjające rozwojowi patogenu (warunki fizyko-chemiczne, pokarmowe, mała konkurencja ze strony mikroorganizmów konkurencyjnych), zjadliwość patogenu

C. Ryba

- Obniżona odporność ogólna lub na określony patogen
- Zaburzenia genetyczne
- Niewłaściwe żywienie

- Uszkodzenia mechaniczne
- Inwazje pasożytów uszkadzających powłoki zewnętrzne ciała, płetwy, tkankę skrzelową lub ściany przewodu pokarmowego

Najważniejsze zakażenia bakteryjne u karpia

W rutynowych badaniach ryb diagnozujemy wiele różnych zakażeń bakteryjnych u ryb. Jednak niektóre zakażenia występują znacznie częściej niż inne. Ze względu na częstość występowania, obraz kliniczny zakażeń oraz stosunkowo wysoką śmiertelność ryb, uważa się je za najważniejsze, przynajmniej w warunkach hodowli karpia w naszym kraju. Są to następujące choroby/zakażenia:

- Zakażenia pałeczkami mezofilnych *Aeromonas* sp. (występująca w ostrej formie ogólnoustrojowej, w przewlekłej formie skórnej lub też w formie utajonej),
- Flawobakteriozy ryb (choroba kolumnowa i bakteryjna choroba skrzeli, choroba zimnej wody),
- Infekcje wywołane przez bakterie *Pseudomonas fluorescens/Ps.putida* (pseudomonadoza)

Aktualny stan wiedzy o etiologii i epizootiologii

A. Choroby wywoływane przez mezofilne i wykazujące ruch bakterie *Aeromonas* sp.

Czynniki etiologiczne tych zakażeń to różne gatunki mezofilnych *Aeromonas*. Bakterie z rodzaju *Aeromonas* mają komórki w kształcie kokopaleczek lub prostych pałeczek z zaokrąglonymi końcami, 1,0 – 4,4 µm długości. W preparatach układają się pojedynczo, parami, w krótkich łańcuszkach lub grupach. Są Gram-ujemne, oksydazo-dodatnie, wykazują zdolność ruchu dzięki umieszczonej na biegunie pojedynczej wici.

Na przestrzeni lat, mezofilne *Aeromonas* sp. uważane były jako czynniki etiologiczne infekcyjnej puchliny brzusznej, posocznicy krwotocznej, erythrodermatitis lub choroby płetw. Na początku lat 70-tych ubiegłego wieku okazało się, że w wielu przypadkach posocznicy karpia, z których izolowano mezofilne i wykazujące ruch pałeczki *Aeromonas*, pierwotnym czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus (*Rhabdovirus carpio*), natomiast bakterie stanowiły wtórny czynnik zakaźny. Jednak obecnie wiadomo jest, że mezofilne *Aeromonas* są

zdolne do samodzielnego wywoływania choroby, która w niektórych przypadkach może przybierać postać posocznicy z objawami podobnymi do zakażeń wirusowych lub uogólnionych infekcji innych bakterii Gram-ujemnych. Wobec takiej sytuacji, zakażenia wywołane przez mezofilne *Aeromonas* zaczęto określać w literaturze światowej jako MAS (motile aeromonad septicemia), czyli posocznica wywołana przez ruchliwe *Aeromonas* spp. Nazwa ta znacznie bardziej precyzyjnie określa czynnik etiologiczny. Nie zawsze jest jednak słuszna, ponieważ w wielu przypadkach zmiany chorobowe ograniczają się do powłok skórnych i/lub płetw przy braku objawów posocznicowych. Wobec tego, zakażenia mezofilnymi *Aeromonas* są czasami określane jako MAI (motile aeromonad infection) czyli infekcja wywołana przez ruchliwe *Aeromonas* sp., a ostatnio także jako MAD (motile aeromonad disease) czyli, po prostu, choroba wywołana przez ruchliwe *Aeromonas* sp. Poza tym, u ryb karpiovatych wyróżnia się różne stany chorobowe powstające w wyniku infekcji *Aeromonas* sp.: formę podostrą z niewielkimi, ale widocznymi zmianami, formę ostrą z typowym dla posocznicy zespołem zmian i masowymi śnięciami ryb oraz formę chroniczną z owrzodzeniami utrzymującymi się przez dłuższy czas przy niewielkich śnięciach lub kiedy występują niewielkie śnięcia przy braku zmian zewnętrznych (Roberts, 1993). W badaniach laboratoryjnych prowadzonych w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB spotykana bywa także utajona forma zakażeń, kiedy nie występują żadne objawy kliniczne, a z narządów wewnętrznych izoluje się liczne bakterie rodzaju *Aeromonas*. Dotyczy to głównie narybku karpia.

Według najnowszej, obecnie obowiązującej klasyfikacji, rodzaj *Aeromonas* obejmuje 14 gatunków (Janda 1991; Martinez-Murcia i wsp., 1992; Joseph and Carnahan, 1994; Esteve i wsp., 1995b; Ali i wsp., 1996; Huys i wsp., 1997). Najnowsze badania wykazały, że dla ryb chorobotwórcze są tylko niektóre gatunki. Karpie wrażliwe są na zakażenia *A.hydrophila*, *A.bestiarum*, *A.salmonicida*, *A.veronii* bt. *sobria* i niektóre szczepy *A.sobria* (Kościńska i wsp., 2002). Badania eksperymentalne wykazały, że wszystkie wymienione wyżej gatunki są zdolne do wywoływania infekcji skórnej, przebiegającej zwykle w sposób chroniczny i objawiającej się początkowo zmianami zapalnymi, a następnie martwicą skóry i tworzeniem wrzodów skórnych. Uogólnioną formę choroby, czyli posocznicę (MAS) wywołują u karpia tylko 2 gatunki; *A.hydrophila* i *A.veronii* bt.*sobria* (badania własne, nieopublikowane).

Mezofilne i wykazujące ruch bakterie *Aeromonas* są szeroko rozpowszechnione we wszystkich typach wód śródlądowych, osadach dennych (Allen i wsp., 1983; Noterdaeme i wsp., 1991) i u zwierząt wodnych. Stąd przenoszone są na ryby i w sprzyjających warunkach wywołują chorobę. Szczególnie wysokie miano tych bakterii stwierdzano w wodach

zanieczyszczonych ściekami komunalnymi (Schubert, 1967). Jedną z głównych przyczyn tego stanu są sprzyjające warunki do masowego rozwoju w wodach zawierających dużo substancji organicznych. Różne gatunki bakterii *Aeromonas* mogą też dostawać się do ścieków z gospodarstw domowych, ponieważ występują one często w różnych produktach żywnościowych (Nishikawa i Kishi, 1988; Kirov i wsp., 1990; Krovacek i wsp., 1992), jak też i w wodzie pitnej (Clark i wsp., 1982; Van der Kooij, 1987; Huys i wsp., 1997). Z drugiej strony, w wodach bogatych w substancje organiczne zwiększa się koncentracja związków azotowych oraz spada koncentracja tlenu, co osłabia układ odpornościowy ryb i stają się one bardziej podatne na zakażenia bakteriami znajdującymi się w wodzie. Źródłem zakażenia tkanek może być przewód pokarmowy ryb, w którym niektóre gatunki (m.in. potencjalnie chorobotwórcze) stanowią naturalny składnik biorący udział w trawieniu.

Udoskonalone w ostatnich latach metody diagnostyczne pozwalają na poprawną identyfikację szczepów chorobotwórczych, co ma istotne znaczenie w diagnostyce, leczeniu i zapobieganiu infekcjom. Szczególnie duże znaczenie ma to w wykrywaniu patogennych bakterii w przypadkach utajonej lub chronicznej formy choroby, kiedy ryby nie wykazują objawów klinicznych choroby, a sną. Badaniem bakteriologicznym stwierdza się jedynie bakterie *Aeromonas*. Ważne jest wówczas poprawne zidentyfikowanie gatunku celem określenia chorobotwórczości izolowanych szczepów. Tylko w przypadkach nosicielstwa szczepów należących do gatunków patogennych dla karpia uzasadnione będzie stosowanie antybiotyków.

B. Flawobakteriozy

Flawobakteriozy ryb wywoływane są przez drobnoustroje z rodzaju *Flavobacterium*, które wcześniej zaliczano do rodzajów *Flexibacter* lub *Cytophaga*. Uważa się, że tzw. chorobę kolumnową wywołuje *Flavobacterium columnare* (wcześniej *Flexibacter columnaris*), bakteryjną chorobę skrzeli (BGD – bacterial gill disease) wywołuje *Fl.branchiophilum*, a tzw. chorobę zimnej wody (CWD – cold water disease) wywołuje *Fl.psychrophilum* (wcześniej *Flexibacter psychrophilus*, *Cytophaga psychrophila*) (Shotts i Starliper, 1999). Każda z tych chorób może mieć ostry przebieg i, jeżeli ryby nie są leczone, zachorowalność dochodzi czasem do 100%, a śmiertelność od 50 do 80%. Z chorobami ryb związane są także inne gatunki *Flavobacterium*, takie jak *Fl.hydatiis* (wcześniej *Cytophaga*

aquatilis), *Fl.johnsoniae* i *Flavobacterium* sp. Ich znaczenie w patogenezie nie jest dotychczas dokładnie wyjaśnione.

Flawobakterie są to Gram-ujemne cienkie pałeczki, często osiągające długość 4 – 8 µm z występującymi formami nitkowatymi dochodzącymi do 100 µm. Polimorfizm komórkowy występuje nawet w obrębie tego samego gatunku i zależy od czasu hodowli i użytego podłoża. Drobnoustroje tego rodzaju opisywane są jako niezarodnikujące i nie wytwarzające owocników. Najlepiej rozwijają się na podłożach ubogich w substancje odżywcze np. na agarze Cytophaga, a żółta lub pomarańczowa barwa kolonii jest charakterystyczna niemal dla wszystkich flavobakterii. Inną cechą charakterystyczną dla niektórych gatunków jest zdolność do wykonywania tzw. ślizgowego ruchu poprzez wyginanie komórki.

Drobnoustroje z rodzaju *Flavobacterium* występują powszechnie w różnego rodzaju wodach słodkich, a także morskich. Wchodzą także w skład normalnej mikroflory skrzeli i śluzu zdrowych ryb. *F.columnare* szczególnie licznie występują w wodzie stawowej i jeziorowej w czasie trwania epizoocji. Zjadliwe szczepy tego gatunku izolowano także z wody rzecznej. Organizmy te długo zachowują żywotność w środowisku o szerokim zakresie wartości pH i twardości wody. Miano bakterii w wodzie zwiększa się wraz ze zwiększaniem stopnia eutrofizacji. *F.columnaris* łatwo rozwija się na cząstkach zalegającej karmy, które stanowią rezerwuar tych bakterii. Przypuszcza się, że *F.branchiophilum* jest także przenoszona za pośrednictwem wody i zakażonych ryb, ale przy braku objawów klinicznych choroby, trudno jest wyizolować ten patogen. Nie znane są dokładnie naturalne rezerwuary *F.psychrophilum*. Bakterie trudno jest wyizolować ze śluzu i skrzeli ryb, które mogą być ewentualnymi nosicielami. Patogen izolowano z różnych narządów oraz z płynu jajnikowego od dojrzałych samic oraz z powierzchni zapłodnionej ikry.

Temperatura wody ma duży wpływ na zakażenia ryb i rozwój choroby kolumnowej i choroby zimnej wody. Choroba kolumnowa rozwija się słabo w temperaturze poniżej 15°C. Przy 15°C mogą występować niewielkie śnięcia, ale nie występują one w ogóle w temp. 9,4°C lub niższej. Przy temp. 20–35°C śnięcia dochodzą do 100%. Największe śnięcia przy zakażeniu *Fl.psychrophilum* występują w temperaturze 3–5°C. Choroba ma znacznie łagodniejszy przebieg w temperaturze powyżej 15°C. Bakteryjna choroba skrzeli nie jest specjalnie zależna od temperatury wody. Chorobę stwierdzano u karpia przy 5°C (Farkas, 1985), u ryb łososiowatych przy 19,7°C (Heo i wsp.,1990), a u węgorzy przy ponad 20°C.

C. Zakażenia ryb wywoływane przez bakterie *Pseudomonas*

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie i stanowią jedną z najbardziej licznych grup mikroorganizmów. W patologii ryb karpiowatych największe znaczenie ma *Pseudomonas fluorescens* i *Ps.putida*. Bakterie te, wcześniej opisywane jako organizmy gnilne, są zdolne do wywoływania zakażeń u różnych gatunków ryb, między innymi u karpia. Choroba przybiera różne formy kliniczne, zależnie od gatunku ryb oraz od zjadliwości szczepu i warunków środowiska. Rumienica była najwcześniej opisaną chorobą wywoływaną przez bakterie *Pseudomonas putida*. Głównym objawem tej choroby jest intensywne zaczerwienienie skóry, szczególnie w dolnych partiach, oraz płetw. Towarzyszy temu zapalenie krwotoczne przewodu pokarmowego, zapalenie mięśnia sercowego i puchlina wodna (Kocylowski, 1960). Bakterie *Pseudomonas fluorescens* są najczęściej kojarzone z chorobą płetw („fin rot” lub „tail rot”), podczas której płetwy ulegają postępującej martwicy i mogą zostać całkowicie zniszczone (Prost, 1994). Choroba występuje u wielu gatunków ryb, między innymi u karpiowatych. Dotychczas jednak nie wiadomo, czy *Pseudomonas fluorescens* jest pierwotnym czynnikiem etiologicznym tej choroby ponieważ, oprócz tych drobnoustrojów, z chorych tkanek izoluje się także bakterie z rodzajów *Aeromonas* i *Flavobacterium*. Obecnie wiadomo jest, że *Pseudomonas fluorescens* mogą samodzielnie wywoływać choroby o różnym obrazie klinicznym. Izolowano je w czystej postaci z przypadków posocznicowych u linów, tołpygi, karasi (Ahne i wsp., 1982; Csaba i wsp., 1981, Kozińska, 1999) oraz od karpia wykazujących stan zapalny i martwicę powłok skórnych (Kozińska, 1999).

Głównym rezerwuarem bakterii *Pseudomonas fluorescens* i *Ps. putida* jest woda, z której następuje zakażenie ryb. Drobnoustroje te są organizmami psychrofilnymi – optymalny wzrost wykazują w temperaturze 15–20°C, a temperatura minimalna, w której mogą się rozwijać wynosi 0°C. Niskie temperatury wody są bardzo ważnym czynnikiem predysponującym do wystąpienia choroby ryb wywołanej przez bakterie *Ps.fluorescens* lub/i *Ps.putida*. Do zakażeń ryb tymi bakteriami dochodzi najczęściej w temperaturze wody 0°C–10°C, ponieważ w wyższej temperaturze bakterie *Pseudomonas* wypierane są szybko przez konkurencyjne, mezofilne mikroorganizmy szybko rosnące, które podczas swego rozwoju wykorzystują znajdujące się w wodzie składniki odżywcze. Bakterie *Pseudomonas* nie są bardzo wymagające pod względem odżywczym, ale mają zdolność rozkładu wielu związków organicznych i nieorganicznych, stąd też duże możliwości przystosowawcze do różnych środowisk wodnych. Mogą się one rozwijać w wodach mało zasobnych w związki odżywcze,

ale pod warunkiem, że w środowisku nie ma silnej konkurencji ze strony innych mikroorganizmów.

Problemy diagnostyczne i terapeutyczne bakteryjnych chorób ryb

Znaczenie bakterii w patologii ryb stale wzrasta. Zaburzenia zdrowotne związane z różnymi bakteriami stanowią poważny problem, szczególnie w warunkach hodowli ryb. Doświadczenia ostatnich lat wskazują, że choroby bakteryjne skutkujące dużymi stratami mogą występować praktycznie w ciągu całego roku, a zmienia się tylko nasilenie choroby i/lub rodzaj patogenu

W praktyce ichtiopatologicznej diagnozowanie chorób ryb jest niekiedy bardzo trudne. Po pierwsze, dużym utrudnieniem diagnostycznym jest często brak charakterystycznych objawów klinicznych w przebiegu chorób bakteryjnych. Różne patogeny mogą wywoływać bardzo podobne objawy, lub też ten sam gatunek bakterii wywołuje czasem różne objawy zależne od zjadliwości szczepu, wieku ryby i/lub warunków środowiska. Objawy mogą być różne w zależności od stadium choroby oraz jej postaci (ostra, podostra, przewlekła, utajona). W niektórych przypadkach, przy ostrej postaci choroby, jedynym widocznym objawem są śnięcia ryb. Po drugie, trzeba podkreślić, że choroba niekoniecznie jest wynikiem infekcji jednego gatunku bakterii. Często zdarzają się wzajemne interakcje pomiędzy dwoma (lub więcej) gatunkami. Ponadto, niektóre bakterie wtórnie kolonizują uszkodzone tkanki ryb i są przyczyną powikłań choroby wywołanej przez inny patogen. Po trzecie, utrudnieniem w postawieniu prawidłowej diagnozy jest duże zróżnicowanie szczepów bakteryjnych jednego gatunku pod względem ich zjadliwości. Na przykład, w obrębie gatunków *A. salmonicida* (szczepy mezofilne), *A. sobria* i *A. veronii* bt. *sobria* występują szczepy zjadliwe i niezjadliwe. Zarówno jedne jak i drugie występują często w infekcjach mieszanych.

Poprawna diagnoza w ichtiopatologii może więc często napotykać wiele problemów, niemniej jednak jest ona konieczna do podejmowania odpowiednich kroków w postępowaniu terapeutycznym. Niestety, hodowcy nie zawsze są zainteresowani dokładną diagnostyką bakteriologiczną zlecając tylko badanie podstawowe, które może dać odpowiedź na pytanie czy bakterie są obecne, czy nie. Jest to uzasadnione tylko w przypadkach, kiedy ryby wykazują ewidentne objawy choroby bakteryjnej, a badanie bakteriologiczne wykazuje jednolity wzrost bakterii jednego gatunku. Można wówczas dokładnie określić wrażliwość tej bakterii na określone antybiotyki i zastosować lek najbardziej optymalny pod względem skuteczności jak i ceny. W innych przypadkach, kiedy zmiany chorobowe nie są

charakterystyczne, albo jedynym objawem choroby są śnięcia ryb, a badanie bakteriologiczne wykazuje obecność różnych bakterii, powinna być przeprowadzona dokładna identyfikacja tych bakterii celem określenia, które z nich są chorobotwórcze. Tylko wówczas możliwe jest podjęcie optymalnych czynności terapeutycznych.

Innego typu problemy związane są z możliwością zastosowania zalecanych środków terapeutycznych. Przy chorobach bakteryjnych najczęściej stosowane są antybiotyki podawane drogą doustną razem z paszą. Niestety karpie, jako ryby ciepłolubne, najczęściej nie pobierają paszy przy niskich temperaturach (poniżej 12°C). Poza tym, nawet w optymalnych warunkach termicznych, sztuki najbardziej dotknięte chorobą są osłabione i zwykle nie pobierają paszy. Dlatego też wskazane jest, aby ryby dostarczone były do badania natychmiast po zauważeniu pierwszych objawów klinicznych choroby, czy też pierwszych, nawet niewielkich śnięć. Tylko wówczas można ograniczyć straty do minimum.

Bardzo poważnym problemem jest stosunkowo długi (trwający od 3-6 dni) czas potrzebny do wykonania dokładnych badań w przypadkach, kiedy choroba ma przebieg ostry a śnięcia ryb są masowe. Celowe są więc systematyczne kontrolne badania ryb (przynajmniej 2 razy w roku), podczas których można wykazać nosicielstwo chorobotwórczych bakterii, co daje możliwość prognozowania ewentualnego wystąpienia określonej choroby, a w przypadku jej rozwoju szybkiego i dobrze ukierunkowanego postępowania terapeutycznego.

Piśmiennictwo

1. Ahne W., Popp W., Hoffmann R. (1982). *Pseudomonas fluorescens* as a pathogen of tench (*Tinca tinca*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 4, 56 – 57.
2. Ali A., Carnahan A.M., Altwegg M., Lüthy-Hottenstein J., Joseph S.W. (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. Medical Microbiological Letters 5, 156 – 165.
3. Allen D.A., Austin B., Colwell R.R. (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. International Journal of Systematic Bacteriology 33, 599 – 604.
4. Austin B. and Austin D.A. (1999). Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish, 3th edn.: Springer-Praxis, Chichester, UK.
5. Clark J.A., Burger G.A., Sabatino L.E. (1982). Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water and new main water samples. Canadian Journal of Microbiology 28, 1002 – 1013.
6. Csaba Gy., Prigli M., Békési L., Kovács-Gayer E., Bajmócy E., Fazekas B. (1981). Septicemia in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.) and bighead (*Aristichthys nobilis* Rich.) caused by *Pseudomonas fluorescens*. W: Oláh J., Molnár K. Jeney S., eds. Fish, pathogens and environment in European Polyculture, Szarvas, ss. 111 – 123.
7. Esteve C., Gutiérrez M.C., Ventosa, A. (1995b). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 462 – 466.
8. Farkas J. (1985). Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill disease in cold water. Aquaculture, 44, 1 – 10.
9. Heo G.J., Kasai K. (1990). Wakabayashi H.: Occurrence of *Flavobacterium branchiophila* associated with bacterial gill disease at a trout hatchery. Fish Pathology, 25, 99 – 105
10. Huys G., Kämpfer P., Altwegg M., Kersters I., Lamb A., Coopman R., Lüthy-Hottenstein J., Vancanneyt M., Janssen P. and Kersters K. (1997). *Aeromonas popoffi* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. International Journal of Systematic Bacteriology 47, 1165 – 1171.

11. Janda J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 397 – 410.
12. Kirov S.M., Anderson M.J., McMeekin T.A. (1990) A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible foot-borne pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 327 – 334.
13. Kocylowski B., Miączyński T. (1960). Choroby ryb i raków. PWRiL, Warszawa, ss. 164 – 166.
14. Kozińska A. (1999). Atypical cases of disorders in cyprinid wintering caused by *Pseudomonas fluorescens* infection. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19, 216-220.
15. Kozińska A., Figueras M.J., Chacon M.R., Soler, L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology* 93, 1034 – 1041.
16. Krovacek K., Faris A., Baloda S.B., Peterz M., Lindeberg T., Månsson I. (1992). Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. *Food Microbiology* 9, 29 – 36.
17. Larski Z., Truszczyński M. (1992). Zarys mikrobiologii Weterynaryjnej. ART Olsztyn, ss. 63 – 73.
18. Martinez-Murcia A.J., Esteve C., Garay E., Collins M.D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* 91, 199 – 206.
19. Nishikawa Y., Kishi T. (1988). Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiology and Infection* 101, 213 – 223.
20. Noterdaeme L., Bigawa S., Willams K.A., Ollevier F. (1991). Biochemical and physiological characteristics and plasmid profiles of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from freshwater fish and from fresh water. *Journal of Fish Diseases* 14, 313 – 321.
21. Prost M. (1994). Choroby ryb. PTNW, Lublin, ss.115 – 117.
22. Roberts R.J. (1993). Motile aeromonad septicemia. W: Inglis V., Roberts R.J., Bromage N.R. ed. *Bacterial diseases of fish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, ss.143 – 155.
23. Shotts E.B., Jr, Starliper C.E.: Flavobacterial diseases: columnaris disease, cold-water disease and bacterial gill disease. W: Woo P.T.K., Bruno D.W. *Fish diseases and disorders, t.3 viral, bacterial and fungal infections*. CABI Publishing, Wallingford, UK, ss. 559 – 576.
24. Van der Kooij D. (1987). Vermeerdering van *Aeromonas* in drinkwater. *Aeromonas* in drinkwater. KIWA-VWN-RIVM. Reehorst/Nederland, ss. 48 – 66.

NOWE ZAGROŻENIA INFEKCJI BAKTERYJNYCH U KARPI

AGNIESZKA PĘKALA

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

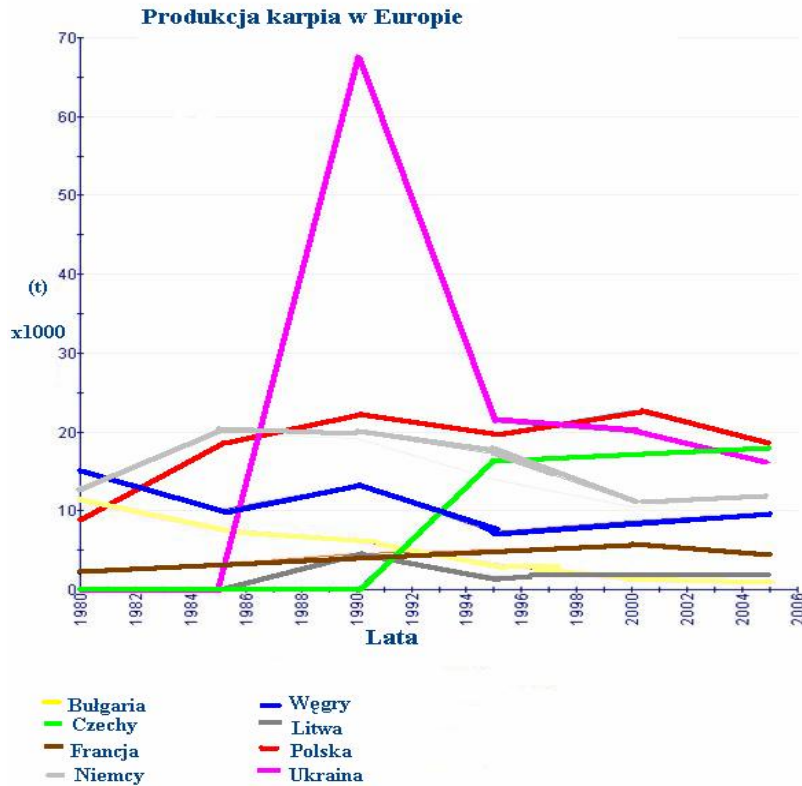
Tradycja spożywania ryb sięga początków istnienia państwa polskiego, kiedy po wprowadzeniu chrześcijaństwa koniecznym stało się przestrzeganie postów. Początkowo obyczaj ten dotyczył duchowieństwa i możnowładców, którzy świecąc przykładem religijności oddziaływali na coraz szersze kręgi społeczne doprowadzając do popularyzacji chrześcijaństwa, a przez to i postów. W wyniku tego, a także za przyczyną wzrostu demograficznego i rozwoju miast sukcesywnie zwiększało się zapotrzebowanie na konsumpcję ryb. Liczne rzeki i jeziora znajdujące się na terenie naszego kraju posiadały bogaty i zróżnicowany rybostan, który w średniowieczu zachęcał do niczym nieograniczonej eksploatacji wód otwartych. Do najbardziej atrakcyjnych ryb w tamtych czasach zaliczano jesiotry, łososie, węgorze. Zjawisko nieograniczonej eksploatacji zasobów rybnych doprowadziło do poważnego wrybienia rzek i jezior, przez co zmniejszyła się liczba cenniejszych gatunków. Zjawisko to było motorem do intensywnego rozwoju sztucznej gospodarki stawowej. Początkowo chów ryb odbywał się w warunkach naturalnych, tyle tylko, że w sztucznie utrzymywanych zbiornikach wodnych, w których jednocześnie odbywało się tarło i wzrost narybku aż do rozmiarów ryby konsumpcyjnej. Hodowcy zwracając uwagę na walory hodowlane karpia wprowadzili w XVI w. zabiegi typu przesadkowego doprowadzając do wielkiego rozwoju gospodarki stawowej. Zabiegi te pozwoliły na masową produkcję materiału zarybieniowego poza środowiskiem stawu pod ścisłą kontrolą hodowcy. Masowo produkowany narybek umożliwił zorganizowanie specjalistycznych gospodarstw typu karpiego oraz ogólną intensyfikację produkcji rybnej poprzez np. dorybianie stawów. Średnia roczna wydajność stawów wahała się w granicach 40 – 60 kg/ha. Ryby przestały być typową potrawą postną, stały się delikatesowym produktem konsumpcyjnym spożywanym przy różnego rodzaju okazjach ze świętami i największymi uroczystościami włącznie. Wytworzyła się swoista moda na spożywanie karpia. Zainteresowanych nie przerażała cena, chociaż ryby w tamtym okresie były bardzo drogie. (Szczygielski, 1967).

Obecnie Polska należy do liderów produkcji karpia. Dane FAOstat-u z 2005 r. plasują nas na pierwszym miejscu w Europie z łączną produkcją wielkości 18 600 ton, przed Czechami – 17 814 ton i Ukrainą – 16 200 ton (Tab.1), (Ryc.1) (FAOstat). Wyniki te są niezmiernie imponujące, jednak paradoksalnie, sytuacja polskiej hodowli karpia nie jest łatwa. Trudności i przeszkód jest wiele, a do jednej z nich należą zagrożenia, jakie niosą ze sobą infekcje bakteryjne wywołane przez drobnoustroje dotąd uważane za niepatogenne dla tego gatunku ryb.

W diagnostyce bakteryjnych chorób ryb bardzo ważne jest, aby zwracać uwagę nie tylko na bakterie, które powszechnie znane są jako patogenne dla ryb, ale także na wszystkie inne, które występują u ryb wykazujących objawy chorobowe. Jak powszechnie wiadomo, u ryb choroba nie zawsze wywołana jest tylko przez jedną bakterię. Często mamy do czynienia z występowaniem wzajemnych interakcji pomiędzy kilkoma gatunkami bakterii, w wyniku których powstają objawy chorobowe (Austin i Austin, 1999).

Tab. 1. Wielkość produkcji karpia (*Cyprinus carpio*) w wybranych krajach Europy na przestrzeni 25 lat

Państwo	Gatunek	Nazwa łac.	1980	1985	1990	1995	2000	2005
Europa			(t)					
Bułgaria	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	11 274	8 202	6 189	3 219	1 393	926
Rep. Czech	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	0	0	19 219	20 664	17 814
Estonia	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	0	385	30	47	44
France	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	2 130	3 270	4 500	5 000	5 650	4 230
Germany	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	13 120	19 739	20 145	14 386	10 886	11 999
Węgry	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	15 000	10 113	23 057	10 211	11 868	9 739
Łotwa	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	0	2 235	525	271	514
Litwa	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	0	4 611	1 741	1 937	1 932
Polska	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	8 793	18 189	22 000	19 720	22 645	18 600
Ukraina	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	0	67 800	21 488	20 044	16 200
Wielka Brytania	Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	0	150	50	13	0	0
Ogółem			216 879	327 775	418 963	149 352	151 064	152 777



Ryc. 1. Wielkość produkcji karpia w wybranych krajach Europy na przestrzeni 25 lat.

Większość bakteryjnych patogenów ryb to organizmy warunkowo chorobotwórcze, wywołujące zakażenia w niekorzystnych dla ryb warunkach środowiskowych. W ostatnich latach zaobserwowano pojawienie się bakterii, które powodowały zaburzenia stanu zdrowotnego karpia, chociaż wcześniej nie były znane w Polsce jako chorobotwórcze dla ryb. Izolowano je sporadycznie i stanowiły zwykle bardzo mały odsetek ogólnej flory bakteryjnej obecnej u ryb.

W okresie ostatnich 5 lat naszą uwagę zwróciły następujące gatunki bakterii izolowane od karpia: *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter* sp. W porównaniu do lat poprzednich były one izolowane stosunkowo często od ryb z zaburzeniami zdrowotnymi i stanowiły znaczny odsetek flory bakteryjnej skóry, skrzelu lub narządów wewnętrznych.

Shewanella putrefaciens (= *Pseudomonas putrefaciens* = *Alteromonas putrefaciens*)

Bakterie te znane są dobrze jako organizmy halofilne występujące w wodach morskich lub przyujściowych oraz u ryb morskich (Lee, 1977; Gillespie, 1981; Grawiński, 1982). Izolowane są często z odpadów rybich i stanowią jeden z głównych składników flory bakteryjnej biorącej udział w procesach gnilnych, powodując psucie się ryb nawet w temp. bliskiej 0°C (Swaminathan; Sparling, 1988).

Na świecie znany jest jeden przypadek choroby wywołanej przez *Shew. putrefaciens*. Chorobę stwierdzono u ryb z gatunku *Siganus rivulatus*, hodowanych w sadzach Morza Czerwonego (Saeed 1987). Choroba miała przebieg ostry, występowały liczne śnięcia. Obecnie bakterie *Shew. putrefaciens* występują także u ryb słodkowodnych. W Polsce po raz pierwszy drobnoustrój ten wyizolowano wiosną 2002 roku z nerek od chorych karpki podczas rutynowych badań w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB w Puławach. Chore ryby miały uszkodzony naskórek, osłabioną kondycję, wykazywały nerwowe ruchy. Występowały niewielkie śnięcia. Początkowo trudno było ocenić związek pomiędzy wyizolowanymi bakteriami, a obserwowanymi objawami klinicznymi, ponieważ oprócz *Shew. putrefaciens* obecne były także inne drobnoustroje, głównie *Aeromonas sobria*. Wprawdzie stanowiły one nieco mniejszy niż *Shew. putrefaciens* odsetek ogólnej flory bakteryjnej, ale powszechnie uznaje się je jako potencjalne patogeny ryb. Ponadto w mózgu tych samych ryb stwierdzono obecność pasożyta *Myxobolus encephalicus*, który mógł powodować wystąpienie objawów nerwowych u karpki. Wkrótce jednak okazało się, że obecność *Shew. putrefaciens* nie była przypadkiem odosobnionym. Od tego czasu drobnoustrój ten stwierdzano łącznie w 13 obiektach, zarówno karpkiowych, jak i pstrągowych. W niektórych przypadkach *Shew. putrefaciens* zdecydowanie dominowały nad pozostałą florą bakteryjną w badanych narządach i/lub tkankach. Obecności tej bakterii towarzyszyły zwykle następujące objawy: osłabiona kondycja ryb, pociemnienie skóry, wychudzenie, podpływanie pod dopływ, bladeść skrzel, powiększenie śledziony, wilgotność narządów wewnętrznych, nieliczne śnięcia. Ryby wykazywały jeden lub kilka wymienionych objawów. W jednym przypadku (wiosną 2004 roku) uzyskano jednolity wzrost tych bakterii z nerki, krwi i skrzel karpki. Chore ryby podpływały pod dopływ, były osłabione i snęły. Przeprowadzone badania eksperymentalne wykazały właściwości chorobotwórcze *Shew. putrefaciens* (Kościńska; Pękala, 2004).

Sphingomonas paucimobilis (= *Pseudomonas paucimobilis*)

Bakteria jest Gram-ujemną tlenową pałeczką. Jej zdolności do rozkładu wielu substancji organicznych oraz wzrost i rozwój w warunkach ubogich w substancje odżywcze

powoduje, że jest szeroko rozpowszechniona w środowisku. *Sph. paucimobilis* znajdowana jest w glebie, osadach rzecznych, szpitalach i znajdującym się tam sprzęcie, szczególnie tym służącym do tlenoterapii. Izolowana była również od ludzi, u których powodowała bakterie, zapalenie otrzewnej, obrzęk mózgu, owrzodzenie płuc. (Balkwill i wsp., 2006). W 1995 roku bakteria ta wywołała chorobę rafy koralowej na Florydzie, powodując jej zniszczenie w tempie 2 cm na dzień. Bardzo szybko choroba rozprzestrzeniła się i po 4 miesiącach objawy degeneracji odnotowywano w odległości 200 km od pierwotnego ogniska choroby (Richardson i wsp., 1998). Brak jest jakichkolwiek danych o chorobotwórczości *Sph. paucimobilis* dla ryb, jednak sporadycznie izolowano te bakterie. W okresie ostatnich 4 lat zaczęliśmy izolować stosunkowo dużą ilość *Sph. paucimobilis* szczególnie w przypadkach, gdy u ryb obserwowano objawy kliniczne takie jak bladeść skrzel, rozległe zmiany martwicze skóry, zwiększone wydzielanie śluzu. W większości przypadków bakterie te izolowano właśnie ze zmienionej skóry i skrzel karpia, w których stanowiły 40 – 60% obfitej flory bakteryjnej.

***Acinetobacter* sp.**

Są to Gram-ujemne niereaktywne kokopalczki powszechnie występujące w wodach słodkich (Allen i wsp., 1983) i ekosystemach morskich (Austin, 1982). Dotychczas opisano jeden przypadek choroby wywołanej przez *Acinetobacter* sp. u tarlaków łososi atlantyckich żyjących w rzece Surma w Norwegii. Podczas trwającej 5 tygodni choroby, łączne śnięcia sięgały 92% populacji, ale tylko 40% populacji wykazywało objawy kliniczne (Roald; Hastein, 1980). W 2004 i 2005 roku w okresie jesiennym stwierdzono 2 przypadki choroby karpia związanej z *Acinetobacter* sp. Oba dotyczyły karpia handlowych. W posiewach ze skóry i skrzel *Acinetobacter* sp. stanowił 60 - 80% obfitej flory bakteryjnej. Ryby wykazywały przebarwienia skóry, obrzęk skrzel, zwiększone wydzielanie śluzu. Występowały liczne śnięcia. Objawy były podobne do infekcji wirusa KHV, ale wyniki badań wirusologicznych w obu przypadkach były ujemne.

Różnorodność flory bakteryjnej środowiska wodnego jest tak duża, że niemożliwym staje się wyznaczenie wyraźnej granicy pomiędzy bakteriami saprofitycznymi, a patogennymi dla ryb. Bakterie naturalnie zasiedlające środowisko wodne lub wprowadzone do niego np. wraz ze ściekami, czy też te, które stanowią element naturalnej flory bakteryjnej przewodów pokarmowych ryb, w korzystnych dla siebie warunkach mogą nadmiernie się rozwijać, zdominować środowisko wodne i stać się niebezpiecznymi dla zdrowia żyjących w nich ryb. Przypadki izolacji wyżej wymienionych, rzadko występujących i nietypowych dla ryb

słodkowodnych bakterii świadczą o zaistnieniu odpowiednich dla ich rozwoju warunków środowiskowych, dostosowaniu się do nich oraz zdominowaniu przez nie tego środowiska. Wraz ze spadkiem odporności ryb i działaniem czynników stresogennych mogły one w istotny sposób wpłynąć na stan zdrowia ryb i spowodować zachorowania. Dlatego też tak ważna jest świadomość i stałe poszerzanie wiedzy, tak hodowców jak i ichtiopatologów, co do zagrożeń, jakie niosą ze sobą zakażenia wywołane przez potencjalnie niechorobotwórcze dla ryb bakterie. Mogą się one bowiem przyczynić do powstania poważnych problemów zdrowotnych i strat w hodowli ryb.

Pismiennictwo

1. Austin B. (1982). Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. *Journal of Applied Bacteriology* 53, 253 - 268
2. Allen D.A., Austin B., Colwell R.R. (1983). Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *Journal of General Microbiology* 129, 2043 - 2062
3. Balkwill D.L., Fredrickson J.K., Romine M.F. (2006). "*Sphingomonas* and related genera" in M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, Springer New York, ss. 605-629
4. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=fisheries>
5. Gillespie N.C. (1981). A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like bacteria isolated from fish in southeastern Queensland and their association with spoilage. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 29 - 44
6. Grawiński E. (1982). Badania nad patologią ryb i środowiska wodnego polskiej strefy połowowej Bałtyku. *Morski Instytut Rybactwa*, Gdynia, ss. 4 - 43
7. Kozińska A., Pekala A. (2004). First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish – a potential new pathogen of fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* Vol. 24 (4), 189 – 193
8. Lee J.V., Gibson D.M., Shewan J.M. (1977). A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria. *Journal of General Microbiology* 98, 439 – 451
9. Richardson L.L., Goldberg W.M., Kuta K.G., Aronson R.B., Smith G.W., Ritchie K.B., Halas J.C., Feingold J.S., Miller S. L. (1998). Florida's mystery coral-killer identified. *Nature* 392, 557-558
10. Roald S.O., Hastein T. (1980). Infection with an acinetobacter-like bacterium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) broodfish. In: Ahne W. (ed.). *Fish Diseases*, third Copraq Session. Springer-Verlag, Berlin. ss. 154 - 156
11. Saeed M.O., Alamoudi M.M, Al-Harbi A.H. (1987). A *Pseudomonas* associated with disease in cultured rabbitfish *Siganus rivulatus* in the Red Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 3, 177 – 180
12. Swaminathan B. and Sparling P.H. (1988). *The bacteriology of food excluding dairy products*: W: Topley & Wilsons: Microbiology and microbial infections, Vol. 2, (Balows A. and Duerden B.I., Sds) Arnold, London, ss. 395 – 416
13. Szczygielski W. (1967). *Zarys dziejów rybactwa śródlądowego*. PWRiL, Warszawa, ss. 7 - 36

MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA POLIMORFIZMU GENÓW ZGODNOŚCI TKANKOWEJ (MH) W PODNOŚNIENIU NATURALNEJ ODPORNOŚCI RYB

KRZYSZTOF Ł. RAKUS¹, ANDRZEJ PILARCZYK^{1,2}, ILGIZ IRNAZAROW¹

¹ Polska Akademia Nauk, Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszcu,
ul. Kalinowa 2, 43-520 Chybie. e-mail: krzysztof.rakus@fish.com.pl

² Katedra Inżynierii Produkcji, AT-H Bielsko-Biała, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała

Wprowadzenie

Jednym z głównych problemów, z jakimi boryka się dzisiejsze rybactwo karpiove, to straty wynikające z niskiej przeżywalności obsad. W Polsce hodowla karpia charakteryzuje się trzyletnim okresem wychowu, podczas którego ryby przenoszone są do różnych rodzajów stawów. Największe straty obserwuje się w pierwszym roku chowu (przy obsadzie wylęgiem) i sięgają one ponad 50% obsady wyjściowej. W drugim roku chowu (przy obsadzie narybkiem) mogą stanowić około 30% obsady wyjściowej, zaś w trzecim roku (przy obsadzie krocza na handlówkę) mogą stanowić od kilku do kilkunastu procent obsady (Pilarczyk, 1998). Główne przyczyny strat to choroby, niekorzystne warunki środowiska oraz błędy hodowlane. O ile osiągnięto niewątpliwy postęp w selekcji takich cech karpia, jak pokrój, typ ułuszczenia czy tempo wzrostu, to odporność na choroby i związana z nią przeżywalność jest cechą, która ciągle wymaga dalszego i to znacznego ulepszenia.

Ryby stanowią pierwszą grupę zwierząt posiadających w pełni wykształcony i funkcjonujący układ immunologiczny. Chroni on organizm przed infekcjami różnymi drobnoustrojami zakaźnymi (wirusy, bakterie, pierwotniaki, grzyby), a także inwazjami wielokomórkowymi organizmami pasożytniczymi. Główną rolą tego układu jest szybkie wykrywanie i rozpoznawanie obecnych w organizmie patogenów oraz wytworzenie odpowiedzi immunologicznej w celu uniemożliwienia rozwoju infekcji i zwalczania rozwijającego się zakażenia. Sprawnie działający system odpornościowy jest szczególnie ważny w sytuacji, kiedy organizm narażony jest na obecność licznych czynników patogennych w środowisku. Praktycznie niemożliwe jest wyeliminowanie ze zbiornika wodnego patogenów odpowiedzialnych za infekcyjne i inwazyjne choroby ryb. W mniejszym bądź większym stopniu są one zawsze obecne w wodzie, w dnie, na roślinach, w faunie dennej, planktonie, wreszcie na lub w samych rybach (Jara i Chodyniecki, 1999). W takich warunkach niska odporność ryb, bądź jej obniżenie (sezonowe lub wynikające z zaburzenia

równowagi pomiędzy organizmem a środowiskiem), może spowodować rozwój schorzenia, które z reguły ma charakter masowy, co wynika z dużego zagęszczenia ryb w warunkach hodowli. Problem ten staje się jeszcze bardziej złożony w warunkach hodowli karpia, którego produkcja prowadzona jest w środowisku naturalnym w stawach ziemnych. W przypadku wystąpienia zagrożenia infekcją, hodowca nie ma praktycznie możliwości podjęcia działań profilaktycznych takich jak np. oddzielenie populacji hodowlanej od środowiska, w którym pojawił się czynnik chorobotwórczy, czy szybkie wykrycie pierwszych objawów choroby i odizolowanie ryb zdrowych od chorych. W tym sensie gospodarka stawowa będzie zawsze zależna od sytuacji epidemiologicznej w terenie (Irnazarow i Pilarczyk, 2005). Dlatego też tak ważne jest ciągłe doskonalenie cech związanych z odpornością, a co za tym idzie z przeżywalnością ryb.

Jedną z metod zmierzających do otrzymania bardziej odpornego materiału obsadowego jest odpowiednio prowadzona selekcja umożliwiająca wykorzystanie potencjału genetycznego tkwiącego w populacjach hodowlanych ryb. Istnieje szereg danych wskazujących na możliwość występowania u ryb genetycznie uwarunkowanych różnic w odporności na choroby. Różnice te mogą być uwarunkowane zarówno pojedynczym genem (mogą mieć charakter cechy jakościowej), jak i szeregiem współdziałających genów (mogą mieć charakter cechy ilościowej). Obecnie prowadzi się intensywne prace zmierzające do wytypowania markerów genetycznych związanych z odpornością/podatnością ryb na czynniki patogenne. Jako przykład można podać identyfikację markerów mikrosatelitarnych sprzężonych z wyższą odpornością na wirusa IPNV u pstrąga tęczowego- *Oncorhynchus mykiss* (Ozaki i wsp., 2001). Inną grupę markerów stanowią geny kodujące białka biorące udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Poszczególne allele (odmiany) tych genów mogą w znaczny sposób wpływać na zmienność względem takiej cechy, jak odporność/podatność na choroby. Geny te mogą, zatem posłużyć jako „kandydaci” na markery genetyczne lepszej lub gorszej odporności ryb. Wśród genów-markerów szczególną rolę odgrywają geny **Głównego Kompleksu Zgodności Tkankowej** (ang. *Major Histocompatibility Complex- MHC*).

Główny Kompleks Zgodności Tkankowej (MHC)

Geny MHC odgrywają kluczową rolę w systemie immunologicznym kręgowców. Kodują one dwa typy (klasa I i klasa II) funkcjonalnie i strukturalnie różniących się białek, których zadaniem jest prezentacja peptydów pochodzenia antygenowego limfocytom typu T. W ten sposób zachodzi inicjacja specyficznej odpowiedzi immunologicznej.

Jedną z charakterystycznych cech genów MHC jest ich olbrzymi polimorfizm (różnorodność), czyli występowanie wielu różnych alleli (odmian) w obrębie populacji. Polimorfizm alleliczny w obrębie genów MHC charakteryzuje się dużą liczbą alleli w populacji oraz dużą liczbą mutacji punktowych typu zmiany sensu powodujących zmiany aminokwasowe w cząsteczce MHC. Każdy allel MHC posiada zdolność przyłączania i prezentowania różnorodnych peptydów w sposób bardziej lub mniej efektywny. Wynika z tego, że odpowiedź organizmu na zakażenie patogenem może być genetycznie warunkowana przez posiadany zestaw genów MHC, co z kolei może determinować dziedziczne zróżnicowanie się odporności na patogeny. Osobniki posiadające odpowiedni genotyp mogą szybciej reagować na zakażenia i tym samym mieć większą możliwość obrony przeciwko specyficznym patogenom (Wegner i wsp., 2004).

Cząsteczki MHC klasy I znajdują się na wszystkich komórkach jądrazstych. Biorą one udział w odpowiedzi immunologicznej przeciwko infekcjom wewnątrzkomórkowym (np. zakażeniom wirusowym) oraz w odrzucaniu przeszczepów. Prezentują peptydy pochodzenia wewnątrzkomórkowego limfocytom T cytotoksycznym (CD8+). Z kolei cząsteczki MHC klasy II występują na powierzchni tylko wyspecjalizowanych komórek układu odpornościowego (makrofagów, komórek dendrytycznych, limfocytów B) i biorą udział w odpowiedzi immunologicznej przeciwko infekcjom zewnątrzkomórkowym (np. infekcjom bakteryjnym czy inwazjom pasożytniczym). Prezentują one peptydy pochodzenia zewnątrzkomórkowego, pochłonięte i przetworzone przez wyspecjalizowane komórki układu odpornościowego (tzw. komórki prezentujące antygeny), limfocytom T pomocniczym (CD4+) (Klein, 1986).

Szczegółowe badania organizacji genów MHC u ryb doskonałokostnych (*Teleostei*) wykazały różnice w ich strukturze i umiejscowieniu w genomie, w porównaniu ze zwierzętami wyższymi. U ryb doskonałokostnych, geny MHC klasy I i klasy II nie tworzą jednego kompleksu jak ma to miejsce u ssaków, ptaków, płazów, gadów, ale także rekinów, i dodatkowo zlokalizowane są na różnych chromosomach (Bingulac-Popovic i wsp., 1997; Phillips i wsp., 2003). Odkrycie to sprawiło, że niektórzy z autorów zaproponowali nazwę **genów zgodności tkankowej** (ang. *Major Histocompatibility- MH*), jako trafniejsze określenie dla genów MHC u ryb doskonałokostnych (Dixon i Stet, 2001; Stet i wsp., 2003).

Rola genów MH w odporności na choroby u ryb

Liczne badania wskazują, że odpowiedź immunologiczna organizmu może zależeć od posiadanego zestawu genów MHC. Najbardziej jednoznaczny związek między odpornością na chorobę infekcyjną a genami MHC opisano w hodowli drobiu (Briles i wsp., 1977). Okazuje się, iż istnieje ścisła korelacja pomiędzy jednym haplotypem, określonym jako *B21*, a odpornością drobiu na zakażenie herpeswirusem (MDV) wywołującym chorobę Mareck'a. Osobniki posiadające ten haplotyp wykazują wysoką odporność na zakażenie wirusem MDV, podczas gdy osobniki posiadające inny haplotyp (*B19*) charakteryzują się niską odpornością i wysoką śmiertelnością podczas zakażenia wirusem MDV.

Podobne badania, aczkolwiek na mniejszą skalę, prowadzone są również na rybach. Literatura na temat związku genów MH z odpornością u ryb z roku na rok staje się coraz bardziej obszerna. Prowadzone są liczne badania, w których autorzy wykazują związek pomiędzy określonymi allelami genów MH klasy I i II a odpornością na różne choroby infekcyjne i inwazyjne. Uwaga naukowców skupia się na wyodrębnieniu takich kombinacji genów MH, które gwarantowałyby rybom jak najlepszą przeżywalność w środowisku, w którym istnieje ryzyko zakażenia różnego rodzaju patogenami.

Najwięcej przykładów dotyczy badania korelacji pomiędzy genami MH a odpornością u ryb łososiowatych. Szereg badań wskazuje na istotny związek pomiędzy poszczególnymi allelami genów MH klasy I i II a odpornością zarówno na zakażenie wirusowe (wirus ISA powodujący zakaźną anemię ryb łososiowatych ang. *Infectious Salmon Anemia*) jak i bakteryjne (*Aeromonas salmonicida*) u łososia atlantyckiego. Wykazano, iż ryby posiadające odpowiednie kombinacje alleli MH klasy I i II charakteryzowały się wyższą odpornością na infekcję wirusową oraz bakteryjną w porównaniu z rybami o innym genotypie (Grimholt i wsp., 2003). Ponadto, wykazano związek pomiędzy pojedynczym allelem MH klasy I (*Sasa-B-04*) a odpornością łososia atlantyckiego na zakażenie wirusem IHN powodującym zakaźną martwicę układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (Miller i wsp., 2004). Ryby posiadające ten allel charakteryzowały się większą odpornością podczas zakażenia wirusem i wykazywały mniejszą śmiertelność. W innym eksperymencie z zakażeniem ryb wirusem IHN wykazano także wyższą przeżywalność heterozygot dla genów MH klasy II *B* w porównaniu z homozygotami (Arkush i wsp., 2002).

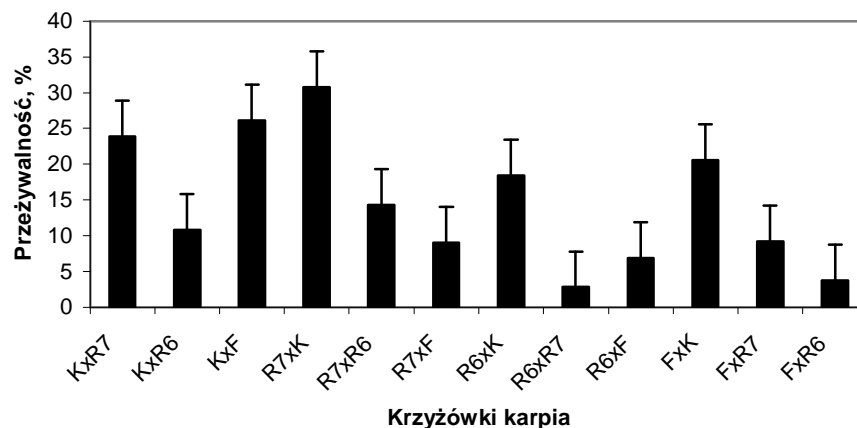
Jeden z pierwszych programów selekcyjnych z wykorzystaniem genów MH jako markerów wyższej odporności u ryb realizowany jest aktualnie w Norwegii przez firmę Aqua Gen AS, zajmującą się hodowlą łososia atlantyckiego i pstrąga tęczowego. W połowie lat 90tych minionego wieku, Aqua Gen AS, jako pierwsza firma zajmująca się produkcją ryb, wprowadziła program selekcyjny opierający się na przeprowadzonych licznych testach

ostrzych z zakażeniem ryb wybranymi patogenami (wirus ISA i IPN oraz bakteria *Aeromonas salmonicida*) i analizie markerów genetycznych związanych z wyższą bądź niższą odpornością. Na podstawie przeprowadzonych testów ostrzych do dalszej selekcji wybierano rodziny charakteryzujące się wyższą odpornością, a równocześnie przeprowadzano genotypowanie ryb w kierunku posiadanych alleli MH.

W Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN w Gołyszcu prowadzone są obecnie badania nad wykorzystaniem genów MH jako genetycznych markerów odporności u karpia. Ze względu na materiał badawczy są to pierwsze tego typu badania prowadzone w Europie. W badaniach tych wykorzystuje się wybrane linie hodowlane karpia pochodzące z różnych regionów świata i w znacznym stopniu różniące się genetycznie między sobą (Irnazarow, 2000). Linie te wchodziły w skład „żywego banku genów” ZIGR PAN w Gołyszcu i są szeroko wykorzystywane w praktyce karpiarskiej. Wieloletnie obserwacje wykazały, że linie hodowlane karpia różnią się między sobą pod względem przeżywalności w warunkach stawowych (Pilarczyk, 1998). Obecnie prowadzi się prace nad genetycznymi uwarunkowaniami odporności karpia na zakażenia wybranymi pasożytami w warunkach laboratoryjnych: (i) pasożytem krwi - *Trypanoplasma borreli*, (ii) bakterią - *Aeromonas hydrophila* oraz (iii) wirusem - koi herpeswirus (KHV). W wyniku tych prac wykazano różnice w odporności badanych linii karpia na zakażenie *A. hydrophila* (Bekh i wsp., 2004) oraz genetycznie uwarunkowane różnice w poziomie naturalnych przeciwciał (Kachamakova i wsp., 2006). Opisano także polimorfizm w obrębie genów MH klasy II B karpia (Rakus i wsp., 2003). Dodatkowo, wstępna analiza przeżywalności linii i krzyżówek międzyliniowych karpia zakażonych wirusem KHV w warunkach laboratoryjnych (Zakład Patologii i Immunologii Ryb IRS w Żabieńcu) wskazuje, iż istnieje zróżnicowanie w przeżywalności poszczególnych grup karpia. Po przeprowadzeniu analizy statystycznej można stwierdzić, że zaobserwowana zmienność w odporności na eksperymentalne zakażenie wirusem KHV ma najprawdopodobniej podłoże genetyczne. Krzyżówki z udziałem linii polskiej knyszyńskiej (K) wykazywały wyższą przeżywalność w stosunku do innych krzyżówek (Rys. 1). Daje to podstawy do przyjęcia założeń, że wśród linii karpia pochodzących z różnych regionów Europy i wykazujących zróżnicowanie na poziomie genetycznym, można wyodrębnić także genotypy o podwyższonej odporności na KHV. Ujawnienie sprzężenia pomiędzy genami MH a wyższą odpornością ryb na zakażenie wirusem KHV powinno umożliwić uzyskanie genetycznie udoskonalonego materiału obsadowego charakteryzującego się większą odpornością, co w konsekwencji powinno wpłynąć na uzyskanie lepszych wyników produkcyjnych.

Podsumowanie

Efektywny system naturalnej obrony przed patogenami ma ogromne znaczenie w hodowli ryb, gdzie straty spowodowane chorobami są głównym czynnikiem wpływającym na wyniki produkcyjne gospodarstw rybackich oraz na jakość produktów. Selekcja genetyczna z wykorzystaniem genów-markerów związanych z podatnością/odpornością ryb na czynniki patogenne jest jednym ze sposobów działania mających na celu poprawę naturalnej odporności ryb. Szczególnie zastosowanie mają tutaj geny zgodności tkankowej (MH). Geny te charakteryzują się wysokim polimorfizmem (różnorodnością) w obrębie populacji, oraz bezpośrednio wpływają na większą bądź mniejszą odporność organizmu na zakażenie patogenem. Obecnie pierwszy program selekcyjny z wykorzystaniem genów MH jako markerów odporności u łososia atlantyckiego prowadzony jest przez firmę Aqua Gen AS w Norwegii. Uważa się, iż dzięki ujawnieniu pozytywnej korelacji pomiędzy określonymi allelami MH a wyższą przeżywalnością ryb możliwe jest uzyskanie genetycznie udoskonalonego materiału obsadowego.



Rys. 1. Sumaryczna przeżywalność krzyżówek karpia podczas eksperymentów z zakażeniem wirusem KHV w warunkach laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

1. Arkush K.D., Giese A.R., Mendonca H.L., McBride A.M., Marty G.D., Hedrick P.W. 2002. Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effect of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 966-975.
2. Bekh V., Irnazarow I., Onara D., Rakus K., Jurecka P., Pilarczyk A. 2004. - Wyniki eksperymentalnego zakażenia karpia (*Cyprinus carpio* L.) bakterią *Aeromonas hydrophila* - W: Ochrona zdrowia ryb- aktualne problemy (Red.) Siwicki A.K., Antychowicz J., Szweda W. Wyd. IRS Olsztyn: 143-150.
3. Bingulac-Popovic J., Figueroa F., Sato A., Talbot W.S., Johnson S.L., Gates M., Postlethwait J.H., Klein J. 1997. Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* 46: 129-134.
4. Briles W.E., Stone H.A., Cole R.K. 1977. Marek's Disease: Effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science*, 195: 193-195.
5. Dixon B., Stet R.J.M. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 25: 683-699.
6. Grimholt U., Larsen S., Nordmo R., Midtlyng P., Kjoeglum S., Storset A., Saebo S., Stet R.J.M. 2003. MHC Polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 55: 210-219.
7. Irnazarow I. 2000. Polimorfizm sekwencji mitochondrialnego DNA europejskich i azjatyckich populacji karpia (*Cyprinus carpio* L.). *Działalność Naukowa PAN, Wybrane Zagadnienia* 9: 79-81.
8. Irnazarow I., Pilarczyk A. 2005. Identyfikacja u karpia genetycznie warunkowanych różnic odporności na czynniki patogenne. - W: Ochrona zdrowia ryb- aktualne problemy profilaktyki i terapii. Red: Siwicki A.K., Szwedo W. Wyd. IRS Olsztyn, 83-87.
9. Jara Z., Chodyniecki A. 1999. Ichtiopatologia. Wyd. AR we Wrocławiu.
10. Kachamakova N.M., Irnazarow I., Parmentier H.K., Savelkoul H.F.J., Pilarczyk A., Wiegertjes G.F. 2006. Genetic differences in natural antibody levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 21: 404-413.
11. Klein J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. Wyd. John Wiley and Sons Press, New York, USA.
12. Miller K.M., Winton J.R., Schulze A.D., Purcell M.K., Ming T.J. 2004. Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environmental Biology of Fishes*, 69: 307-316.
13. Ozaki A., Sakamoto T., Khoo S., Nakamura K., Coimbra M.R.M., Akutsu T., Okamoto N. 2001. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics* 265: 23-31.
14. Pilarczyk A. 1998. Wpływ czynników genetycznych i pokarmowych na odpowiedź immunologiczną karpia. - Rozprawy nr 181, Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Szczecin: 1-62.
15. Phillips R.B., Zimmerman A., Noakes M.A., Palti Y., Morasch M.R.W., Eiben L., Ristow S.S., Thorgaard G.H., Hansen J.D. 2003. Physical and genetic mapping of the rainbow trout major histocompatibility regions: evidence for duplication of class I region. *Immunogenetics* 55: 561-569.
16. Rakus K.L., Wiegertjes G.F., Stet R.J.M., Savelkoul H.F.J., Pilarczyk A., Irnazarow I. 2003. Polymorphism of MHC class II B genes in different lines of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Living Resources* 16: 432-437.
17. Stet R.J.M., Kruiswijk C.P., Dixon B. 2003. Major histocompatibility lineages and immune gene function in Teleost fish: The road not taken. *Critical Reviews in Immunology* 23: 441-471.
18. Wegner K.M., Kalbe M., Schaschl H., Reusch T.B. 2004. Parasites and individual major histocompatibility complex diversity-an optimal choice? *Microbes Infect.* 6(12):1110-1116.

ANALIZA PRZYCZYN ŚMIERTELNOŚCI RAKÓW

TERESA WŁASOW, ALICJA BERNAD¹

Katedra Ichtiologii, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, UWM,
ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn

¹Pracownia Chorób Ryb, Zakład Higieny Weterynaryjnej,
ul. Warszawska 109, 10-702 Olsztyn

Rozpoznawanie problemów zdrowotnych raków w zbiornikach naturalnych, w różnego typu obiektach zajmujących się chowem czy bardziej skomplikowaną hodowlą opiera się nie tylko na znajomości poszczególnych jednostek chorobowych, lecz także – biologii i charakterystycznych wymagań poszczególnych gatunków. Ważne jest także analityczne spojrzenia na środowisko. Badając raki możemy spotkać niejednokrotnie wiele organizmów, które nie są zaliczane do wywołujących określone schorzenia. Wiele wykrytych „obektów”, a zwłaszcza ich rola pozostają niezupełnie jasne; stąd cenna jest współpraca z hydrobiologami.

Określone systemy produkcji raków, stopień ich intensyfikacji, sposób żywienia, a nawet nie do końca przez hodowcę ujawniane źródło pochodzenia materiału obsadowego, to dodatkowy problem do podjęcia przy badaniu raków. Oceniając kondycję i stan zdrowotny raków zwłaszcza z większych zbiorników należy też zainteresować się w jaki sposób raki pozyskano. Ma to związek z odmiennym zachowaniem się zwierząt chorych i zdrowych; zdrowotność raków odłowionych stawianym sprzętem pułapkowym może nie odzwierciedlać stanu faktycznego.

Na jednostki chorobowe raków można spojrzeć pod kątem wywołującego je czynnika etiologicznego. Tutaj sytuacja ulega zmianom wraz z czasem. W pierwszym wydanym w Polsce po II wojnie światowej podręczniku nt. chorób ryb i raków najwięcej uwagi poświęcono dżumie i innym grzybicom (Kocyłowski, 1960). Vey (1981) wskazywał na wieloczynnikowe tło etiologiczne zaniku raków w wodach naturalnych uznając, że infekcje grzybicze są częstsze niż bakteryjne, czy obecność pierwotniaków. Edgerton (2002) zwrócił uwagę na wirusy, riketsje, bakterie, grzyby, pasożytnicze *Protozoa* i *Metazoa*, ponadto – na różnorodne organizmy epibiotyczne opanowujące raki słodkowodne. Nie ma w tym ujęciu innych przyczyn, takich jak: niedobory żywieniowe (na przykład przy szkorbcie krewetek), kumulacja metabolitów i feromonów, niewłaściwe zasolenie, czy odczyn wody. Te elementy

zostały docenione w pracy Sindermanna (1988), poświęconej diagnostyce i zwalczaniu chorób w akwakulturach morskich.

U raków słodkowodnych nadal najbardziej znana i ciągle stanowiąca zagrożenie jest dżuma raków (crayfish plague) przedstawiona w jednym z rozdziałów niniejszej monografii. Według podręcznika diagnostyki chorób zwierząt wodnych wydanego przez międzynarodowe Biuro do spraw Epizootii OIE (Diagnostic Manual OIE, 2000) poza dżumą raków nie ma innej jednostki chorobowej, która powoduje masową śmierć raków pozostawiając przy życiu inne organizmy z tego samego zbiornika wodnego. Jednakże zbyt często, zdaniem Kossakowskiego (1973), zanik raków w różnych akwenach Polski przypisywano dżumie rzadko ustalając definitywną przyczynę śmiertelności. Tymczasem istnieją także inne przyczyny śmiertelności raków.

Plamica raków (burn spot disease, shell disease)

Może powodować duże straty raków w warunkach sprzyjających temu schorzeniu. Zgodnie z polskimi przepisami regulującymi wymagania dotyczące rodzimych raków – rak szlachetny *Astacus astacus* L. i rak błotny *A. leptodactylus* Esch. – materiał obsadowy, czyli raki do obsadzania (zaraczania) można pozyskiwać ze zbiorników wodnych, w których od co najmniej trzech lat nie występowały: dżuma raków, plamica raków, choroba porcelanowa (BN-73). Dowodzi to dużego znaczenia omawianego schorzenia w naszym kraju chociaż na ogół śmiertelność raków sięga tylko kilku procent obsady. Jednak straty hodowcy/właściciela zbiornika związane są z obniżeniem atrakcyjności towarowej raków; występujące na pancerzu plamy są szczególnie dobrze widoczne po ugotowaniu raków.

Plamica raków, a ściślej plamica pancerza – „*mycosis astacorum*”, co sugeruje jej tło etiologiczne, jest też określana jako choroba Happicha od nazwiska badacza, który na początku XX wieku określił czynnik grzybiczy jako *Oidium astaci* (Kocyłowski, 1960). Tło etiologiczne tej choroby jest złożone. Rozwija się w środowisku niestwarzającym dobrych warunków do budowy mocnego pancerza. Oznacza to zbiorniki ubogie w związki mineralne, zwłaszcza wapń i brak odpowiednich substancji mineralnych w diecie naturalnej. Pewne niedobory związane są z żywieniem raków niewłaściwymi paszami. Oidtmann (2000) wyodrębnia „plamicę I” spowodowaną działaniem chitynolitycznych bakterii na zewnętrzny szkielet i „plamicę II” wywoływaną przez grzyby.

Pierwotnym czynnikiem plamicy podobnie jak przy zewnętrznych grzybicach ryb są urazy mechaniczne podczas długiego przetrzymywania raków przed obsadzeniem zbiornika, uszkodzenia podczas transportu i sortowania. Należy tu pamiętać o agresywnym zachowaniu

raków aż do kanibalizmu włącznie; przy mieszanej obsadzie gatunki agresywne takie jak rak sygnałowy mogą atakować inne. Niektóre uszkodzenia pancerza mogą być wynikiem działania takich organizmów jak *Branchiobdella* i epibionty.

Trudno ocenić czy inicjatorem zmian podczas plamicy raków są bakterie powodujące lizę chityny zewnętrznego szkieletu, a potem pojawiają się grzyby, czy jest to proces równoległy. W ogniskach zaatakowanych przez grzyby *Ramularia astaci* i *Didymaria cambari* (*Hyphomycetes*), czy przez grzyby glonowe *Fusarium* sp., *Fusarium tabacinum* (*Phycomycetes*) najczęściej stwierdza się Gram – ujemne bakterie *Pseudomonas* sp. oraz inne bakterie: *Citrobacter freundii*, *Aeromonas liquefaciens*, *Enterobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alkaligenes* (Edgerton, 2002).

Obserwuje się występowanie odmiennych gatunków grzybów u określonych raków (Kocyłowski, 1960). U raka szlachetnego (rzecznego) pasożytuje *Ramularia astaci*, którego konidia powstają na odgałęzieniach strzępek. Konidia po oddzieleniu się kielkują na podłożu na obu końcach. Na pożywkach grzybnia jest biała. Rak błotny (stawowy) jest atakowany przez *Acremonium leptodactyli* (dawna nazwa *Cephalosporium*) o konidiach powstających na szczycie krótkich podstawek. Konidia te nie posiadają otoczki śluzowej i dlatego utrzymywanie się razem nie jest trwałe. Atakujący amerykańskiego raka pręgowatego grzyb *Didymaria cambari* wytwarza konidia na szczycie długiej, cienkiej podstawki (szerokość strzępek jest większa). Są pokryte warstwą śluzu i utrzymują się razem w skupisku.

Plamica raków spotykana jest u gatunków europejskich: szlachetnego, błotnego, raka białoszczypcego *Austropotamobius pallipes*, u australijskich: *Cherax albidus*, *Cherax destructor*, *Ch. tenuimanus*, u raków amerykańskich: pręgowatego, Luizjańskiego *Procambarus clarkii*. Odsetek opanowanych zwierząt i śmiertelność są zróżnicowane od kilku procent do ponad 80%, na przykład w Estonii. W Australii plamica pancerza występuje u hodowanego tam raka *Cherax quadricarinatus* u kilku do prawie 40% obsady (Edgerton, 1999). W Polsce plamicę pancerza stwierdzano u 6% raków błotnych (Bernad, 2001). U raka błotnego po okresie linienia nie stwierdzano objawów plamicy na nowym pancerzu (Diler, 2001).

Przyżyciowo u raków opanowanych przez chorobotwórcze grzyby obserwuje się na pancerzu okrągłe plamy barwy ciemnej brązowej lub czarnej. Na zewnątrz występuje obwódka jaśniejsza, czerwona. Średnica plam wynosi od kilku milimetrów do 3 cm. Mniejsze plamy występują u raka pręgowatego. U raka szlachetnego plamy występują na grzbietowej i bocznych częściach pancerza, a u raka pręgowatego na spodniej stronie odwłoka, uropodiach, płytkach telsonu. W środkowej części zmian podczas plamicy pancerz jest bardzo delikatny,

łatwo się kruszy odsłaniając leżące pod nim tkanki. Po wylince w miejscu infekcji pozostają ubytki i deformacje pancerza. Plamy stwierdza się również w skrzelach. Plamy na pancerzu raka błotnego pojawiają się przy nasileniu śmiertelnej dla raków płamicy skrzeli wywoływanej przez *Fusarium* (Vey, 1981).

Grzyby często równolegle z bakteriami atakują pancerz odnóży, odwłoka. Rozwijając się, silnie osłabiają pancerz, powodując jego kruchość, zmiany martwicze, odsłonięcie mięśni odwłoka i innych narządów. Plamica jako schorzenie pierwotne może usposabiać do wtórnych infekcji grzybów pleśniowych z rodzaju *Achlya* i *Saprolegnia*. Osłabione raki gorzej znoszą transport i sną. W zbiornikach wodnych, jako osłabione padają łupem drapieżników.

W diagnostyce bierze się pod uwagę obecność brązowych, brunatnych plam na pancerzu. Jednak należy pamiętać, że podobne plamy mogą wystąpić u odpornych raków amerykańskich nosicieli czynnika dżumy. Dlatego niezbędna jest obserwacja podejrzanego materiału pod mikroskopem świetlnym i wykazanie obecności strzępek grzyba w nabłonku. Identyfikacja grzyba jest możliwa na podstawie oceny kształtu i wielkości wyprodukowanych konidiów. Grzyby można hodować na podłożu glukozo-agarowym.

Rozwojowi płamicy pancerza sprzyja duże zagęszczenie raków w hodowlach i uszkodzenia mechaniczne pancerza, nieodpowiednie warunki środowiskowe, zaburzenia metabolizmu związane również ze środowiskiem. Wiele, silnie opanowanych raków ginie podczas zmiany pancerza. Plamica może się rozwijać silnie u raków, u których zmiana pancerza jest rzadsza, co może mieć związek z wiekiem zwierząt (rzadsze linienia) lub ze zbiorników o niskiej zasobności pokarmowej. Podczas linienia raki pozbywają się pancerza wraz z plamami. W nowym pancerzu pozostają jednak ślady dawnej infekcji w postaci deformacji pancerza, co pogarsza wygląd estetyczny i wartość rynkową.

U raków słodkowodnych brak opracowanych metod zwalczania płamicy; u hodowanych krewetek stosowano zanurzanie w roztworach antybiotyków. Niekiedy hodowcy stosują cięcia przy obecności wyraźnych plam na kończynach osiągając później zregenerowanie odnóży.

Działania profilaktyczne obejmują:

- ∅ Przegląd raków obsadowych i eliminację osobników z widocznymi plamami
- ∅ Zachowanie optymalnych obsad raków w basenach i stawach
- ∅ Właściwe żywienie
- ∅ Unikanie warunków, w których dochodzi do uszkodzeń mechanicznych pancerza
- ∅ Typowanie do hodowli wód czystych również pod względem mikologicznym

i bakteriologicznym (bez nadmiaru grzybów i bakterii).

Plamica skrzeli raków

Jest grzybicą groźniejszą niż plamica pancerza szczególnie dla wrażliwych gatunków w tym dla raka błotnego (Vey, 1981). Nazwa związana jest z obecnością brązowych plam na skrzelach. Jednostka ta jest niedoceniana podczas „przeгляdu raków”, gdy zwraca się uwagę na plamy na pancerzu. Plamica skrzeli wywoływana jest przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*: *F. tabacinum*, *F. solani*, *F. oxysporum* występujące na roślinach, w glebie i środowisku wodnym. U raka błotnego ciemne plamy na skrzelach związane z odczynem melaninowym wywołane przez *Acremonium* sp. nie wiązały się ze śmiertelnością (Diler, 2001). *Fusarium* obserwuje się w mokrych świeżych preparatach ze skrzeli lub izoluje z materiału z hodowli (podłoże Sabouraud lub inne). Grzyb posiada charakterystyczne rogalikowate konidiospory, tworzy makrokonidia i mikrokonidia.

Plamica skrzeli raków jest chorobą o złożonym tle. Sama obecność *Fusarium* nie powoduje plamicy. Choroba rozwija się w nieodpowiednim środowisku (zanieczyszczenia metabolitami, resztkami paszy), po stresie, uszkodzeniach tkanek przez różne abiotyczne i biotyczne czynniki drażniące. Do śmierci raków dochodzi też, gdy występują wtórne infekcje bakteryjne (Edgerton, 2002). Schorzenie nie zawsze rozwija się szybko i kończy śmiercią raków. Okresem krytycznym jest linienie raków, podczas którego rak zmienia również warstwę zewnętrzną skrzeli. Można założyć, że częsta zmiana pancerza typowa dla młodych raków sprzyja plamicy skrzeli. Wzrost śmiertelności notowano również podczas linienia krewetek japońskich, których skrzela były zainfekowane przez *Fusarium oxysporum*, grzyba wywołującego zatrucie i zaburzenia osmoregulacji (Souheil, 1999).

Śmierć raków może wystąpić w dość odległym okresie od zarażenia przez *Fusarium*, nawet po kilku miesiącach. Wielkość strat zależy od warunków środowiskowych, gatunku grzyba i obecności wtórnych infekcji bakteryjnych. Śmiertelność może sięgać do 100% obsady (Edgerton, 2002). Nie ma opracowanych metod zwalczania choroby. Pozostają działania profilaktyczne mające na celu ochronę skrzeli raka przez zapewnienie odpowiednich warunków środowiskowych.

Choroba porcelanowa, „porcelanka”, telohanioza

Jest kolejną chorobą, która może powodować śmierć raków szlachetnych i błotnych. Jest trudna do zwalczania, ponieważ wywołujący ją czynnik pasożytuje tak, jak wirus wewnątrz komórek atakując mięśnie. Łatwiejsze do opanowania są mikrosporidiozy jelita. Mikrosporidiozy raków z różnych kontynentów wywoływane są przez microsporidia z

rodzajów: *Agmasoma*, *Ameson*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Vavraia*, *Thelohania* (Edgerton, 2002).

Nazwa telohanioza pochodzi od nazwy *Thelohania* (microsporidia - obecnie zaliczane do grzybów). Inne nazwy: choroba białego ogona, choroba bawelniana, choroba porcelanowa, choroba mleczna sugerują, że charakterystycznym objawem tego schorzenia u żyjącego raka jest porcelanowa barwa mięśni. Tutaj trzeba zachować ostrożność w ocenie, ponieważ zmiana barwy z naturalnej szklisto-różowawej na porcelanową występuje dopiero przy silnej infekcji pasożyta a podobny obraz zmian – mleczne zabarwienie mięśni, stwierdza się u raków podczas infekcji drożdżaków (Vey, 1981).

Charakterystyczną cechą mikrosporidiów z rodzaju *Thelohania* jest obecność ośmiu spor w „pakiecie”(pansporoblaście). Spory *Thelohania contejaeni* - pasożyta występującego u raka szlachetnego, błotnego i raka białoszczypcego *Austropotamobius pallipes* mają wymiary 2 µm x 4 µm.

Objawami choroby są: widoczna od strony brzusznej poprzez delikatny pancerz zmiana barwy mięśni odwłoka(dopiero przy zaawansowanej infekcji), osłabienie raków, powolne poruszanie się i słaby odruch obronny w postaci unoszenia szczypiec. Przy silnej infekcji - brak aktywności seksualnej i raki nie przystępują do parzenia się. U zarażonych samic gonady nie dojrzewają (Mazyliś, 1978). *Thelohania contejaeni* atakuje mięśnie prążkowane odwłoka, szczypiec, ścian jelita, bloku szkieletowego, słupków ocznych. Pasożyt powoduje zniszczenie miofibryli; włókna kolagenowe pozostają. Spory stwierdza się też w tkance łącznej i nerwowej, gonadach, w sercu i w hemolimfie. Zarażone przez *Thelohania* raki szlachetne są bardziej podatne na infekcję innych grzybów i bakterii w mięśniach oraz w wątrobotrzustce (Własow, 2002). Choroba niejednokrotnie doprowadza do śmierci raków.

Procent zarażonych raków jest trudny do oceny, ponieważ zarażone raki są mniej aktywne i nie trafiają do sprzętu pułapkowego, natomiast przy odłowieniu ręcznym można zebrać więcej zarażonych skorupiaków (Unestam, 1973). W Finlandii *Thelohania* występuje u około 1% raków, w Anglii u kilkunastu, a w Niemczech - u 30%. W badaniach własnych stwierdziłyśmy ogniska, w których było zarażonych 38% raków szlachetnych, zyskanych bez stosowania sprzętu pułapkowego (Własow, 2002).

Właściwa diagnoza powinna być oparta na obserwacjach mikroskopowych materiału świeżego lub wcześniej utrwalonego w formalinie przy użyciu dużych powiększeń, pod immersją. Konieczne jest sporządzenie preparatów bardzo dobrze spłaszczonych. Bardziej pracochłonne jest przygotowanie preparatów histologicznych.

Brak opracowanych metod zwalczania mikrosporidioz mięśni raków. Wiadomo, że spory mikrosporidialne są wytrzymałe na niskie temperatury; *Microsporidia* pasożytujące u krabów pozostawały żywe nawet po zamrożeniu w temperaturze minus 20°C przez 67 dni. Do dezynfekcji wykorzystuje się preparaty zawierające jod (Edgerton, 2002). Właściwa profilaktyka to: pozyskiwanie materiału z obiektów bez mikrosporidiozy, kwarantanna nowych raków w osobnym zbiorniku, przegląd raków, eliminację podejrzanych skorupiaków.

Psorospermium

Jest organizmem odkrytym 150 lat temu, a jego znaczenie jako czynnika powodującego straty raków jest mało znane, a nawet niedoceniane. Zaliczany był do pierwotniaków, robaków (jako jajo nicieni), a nawet do grzybów. Obecnie został zaliczony do *Ichthyosporea* na pograniczu świata zwierząt i grzybów do grupy DRIPs (Vogt, 1999), która obejmuje:

- *Dermocystidium* (groźny pasożyt skrzeli i skóry ryb)
- **Rozetowy czynnik** (wewnątrzkomórkowy pasożyt śmiertelny dla europejskich ryb, sprowadzony spoza Europy)
- *Ichthyophonus* (trudny do zwalczenia „grzyb” atakujący różne narządy ryb)
- *Psorospermium*.

Raki silniej opanowane przez *Psorospermium* są osłabione i gorzej znoszą transport (Kocylowski, 1960). Są też bardziej podatne na infekcję *Aphanomyces astaci* czynnika dżumy raków; dotyczy to nawet raka sygnałowego uznanego za bardziej odporny gatunek (Thörnquist, 1993). Krytycznym okresem dla silnie opanowanych przez *Psorospermium* raków jest poza transportem okres linienia, podczas którego sną (Vey, 1978).

Nie wiadomo, czy rodzime europejskie gatunki raków wykazują większą wrażliwość na „obce” morfotypy/gatunki *Psorospermium*. Zaskakujący jest natomiast przypadek choroby człowieka związany z obecnością w jego przewodzie pokarmowym, spor *Psorospermium* (Bouckenooghe, 2001).

Psorospermium występuje w różnych narządach raków europejskich, australijskich, amerykańskich. Znane są różnego kształtu spory od owalnych krótkich do smukłych i wydłużonych. Występują też inne postacie np. lekko zakrzywione lub nietypowe trójkątne. Wymiary spor różnią się w zależności od typu i wynoszą dla krótszych form: 40-60x60-90 µm a dla dłuższych form: 40-60x120-200 µm. Wewnątrz spory widoczne są liczne kuleczki materiału zapasowego i podwójne jądro położone w centrum. Spory posiadają grube otoczki złożone z warstw o różnej grubości. W organizmie raków zdarzają się też formy „nagie” bez

otoczek. Formy ameboidalne pasożyta (wolno żyjące) uwalniają się ze spor i docierają drogą układu krwionośnego do różnych miejsc w organizmie raka. Mają tendencję do infiltrowania tkanki łącznej, w której rozwijają się do postaci dojrzałych spor (Vogt, 1999).

Poza osłabieniem brak objawów chorobowych u raków zarażonych przez *Psorospermium*. U silnie opanowanych raków błotnych mogą występować pomarańczowej barwy plamy na pancerzu (Vey, 1978). Obecność pasożyta wyzwała niekiedy w organizmie raków reakcje obronne w postaci skupisk pigmentu pomarańczowego, brązowego lub czarnego.

Do celów diagnostycznych pobiera się materiał świeży lub utrwalony w formalinie z tkanki łącznej i nabłonkowej z następujących miejsc: mięśnie żuwaczek, tkanka otaczająca żołądek, jelito, tkanki pod pancerzem okryw skrzelowych, skrzela, mięśnie odwłoka, gruczoł zielony, trzustka.

Nie ma metod leczenia raków opanowanych przez *Psorospermium*.

Choroby o znaczeniu podrzędnym

Do tak określonej grupy chorób raków zaliczyła Oidtmann (2000) te, które wywoływane są przez omawiane wyżej *Psorospermium*, nicienie, wirusy i epibionty. W przypadku tych ostatnich – występujących w środowisku bogatym w materię organiczną osiadłe na skrzelach epibiotyczne bakterie, glony, pierwotniaki i inne organizmy mogą stanowić zagrożenie życia raków przy silnym opanowaniu utrudniającym oddychanie i osmoregulacji. Powinny, więc być analizowane i rozpatrywane przy ocenie przyczyn śmiertelności raków. Kolejna przyczyna strat raków to śnięcia spowodowane niewłaściwymi warunkami transportu, niezgodnymi z zalecanymi normami (N-73). Szczególny problem stwarzający zagrożenie to hodowla młodych raków czy chów intensywny. Te zagadnienia wymagają osobnego przedstawienia.

Piśmiennictwo

1. Bernad A., Własow T., Sobczak J. (2001). Ocena stanu zdrowotnego raków słodkowodnych w odniesieniu do normy BN-73/ 9147-17. Materiały na VIII konferencję Lepsza żywność, Olsztyn, 27.06.2001. Biul. Nauk. UWM 13, 157– 158.
2. BN-73.(1973). Norma branżowa. Raki hodowlane. Materiał obsadowy raków. BN-73/9147. Dz. Norm. i Miar nr 31/1973, poz. 98.
3. Bouckennooghe A.R., Marino B.J. (2001). *Psorospermium haeckeli*: a cause of pseudoparasitosis. South. Med. J. 94, 233– 234.
4. Diagnostic Manual OIE (2000). Diagnostic manual for aquatic animal diseases, 4.2.4. Crayfish plague. OIE Paris, pp. 227 – 230.
5. Diler O., Bolat Y. (2001). Isolation of *Acremonium* species from crayfish *Astacus leptodactylus* in Egirdir Lake. Bull. Europ. Ass. Fish Pathol. 121, 164 – 168.
6. Edgerton B. F., Evans L. H., Stephens F. J., Overstreet R. M. (2002). Synopsis of freshwater crayfish

- diseases and commensal organisms. *Aquaculture* 206, 57 – 135.
7. Edgerton B. F., Owens L. (1999). Histopathological surveys of the redclaw freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in Australia. *Aquaculture* 180, 23 – 40.
 8. Kocyłowski B., Miączyński T. (1960). Choroby ryb i raków. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa. s. 378 – 393.
 9. Kossakowski J. (1973). The freshwater crayfish in Poland. A short review of economic and research activities. In: *Freshwater crayfish*. S. Abrahamsson, ed., Lund, pp.18 – 26.
 10. Mazyliś A. (1978). On crayfish infected with *Thelohania contejaeni* Henneguy. Fourth International Symposium IAS, Thonon France, 28 – 31 Aug. 1978. Abstracts.
 11. Oidtmann B. (2000). Krankheiten einheimischer Flusskrebse – ein Überblick. Teil II: Weitere bei Krebsen vorkommende Krankheiten. *Fisch. Teichwirt* 11, 428 – 431.
 12. Sindermann C.J., Lightner D.V. (1988). Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. *Dev. Aquaculture Fish. Sci.* 17, 1– 431.
 13. Souheil H., Vey A., Thuet P., Trilles J.P. (1999). Pathogenic and toxic effects of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) on survival and osmoregulatory capacity of *Penaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture* 178, 209 – 224.
 14. Thörnquist P. O., Söderhäll K. (1993). *Psorospermium haeckeli* and its interaction with the crayfish defence system. *Aquaculture* 117, 205 – 213.
 15. Unestam T. (1973). Significance of diseases on freshwater crayfish. In: *Freshwater crayfish*. S. Abrahamsson, ed., Lund, pp.136 – 150.
 16. Vey A. (1978). Researches on a crayfish disease caused by an enigmatic parasite *Psorospermium haeckeli*. Fourth International Symposium IAS, Thonon France, 28 – 31 Aug. 1978. Abstracts.
 17. Vey A. (1981). Les maladies des écrevisses, leur reconnaissance et la surveillance sanitaire des populations astacicoles. *Bull. Fr. Piscic.* 281, 223-226.
 18. Vogt G., Rug M. (1999). Life stages and tentative life cycle of *Psorospermium haeckeli*, a species of the novel DRIPs clade from the animal-fungal dichotomy. *J. Exp. Zool.* 283, 31– 42.
 19. Własow T., Bernad A., Krzywosz T. (2002). White – tail disease in noble crayfish and mycotic and bacterial infection. *European Aquaculture Soc. Spec. Publ.* 31(1), 95 – 98.

DŻUMA (CRAYFISH PLAGUE) - NAJWIĘKSZE ZAGROŻENIE RAKÓW

ALICJA BERNAD, TERESA WŁASOW

Pracownia Chorób Ryb, Zakład Higieny Weterynaryjnej,
ul. Warszawska 109, 10-702 Olsztyn
Katedra Ichtiologii, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, UWM,
ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn

Zarys historyczny

Do najgroźniejszych schorzeń raków należy dżuma raków (crayfish plague) wywoływana przez grzyb *Aphanomyces astaci* (Schikora 1906). Patogena wywołującego dżumę raków zidentyfikował zespół badaczy niemieckich i szwedzkich w 1936 r. Choroba została przywleczona na kontynent europejski przez gatunki raków pochodzących z Ameryki Północnej tj. raka pręgowatego (*Orconectes limosus* Raf.), raka sygnałowego (*Pacifastacus leniusculus* Dana) oraz raka luizjańskiego (*Procambarus clarkii* Girard).

Grzyb dotarł do Europy najprawdopodobniej w zainfekowanych wodach, w których przewożono raki z Ameryki Północnej (Unestam, 1969). Po raz pierwszy chorobę zaobserwowano w północnych Włoszech w 1859 r. We Francji masowe śnięcia raków spowodowane dżumą miały miejsce w latach 1874-1875, a wkrótce po tym choroba dotarła do Niemiec. Stamtąd rozprzestrzeniła się po całym europejskim kontynencie. W 1884 r. dżuma przekroczyła linię Wisły. Raki na Litwie zostały zaatakowane dżumą w 1886 r., w Finlandii w 1893, a w Estonii w 1896 r. (Skurdal, 1999). Do Szwecji dżuma zawędrowała wraz z transportem raków z Finlandii w 1907 r. W Norwegii pierwsze masowe śnięcia raków spowodowane dżumą stwierdzono dopiero w 1971 r. w wodach rzeki wpływającej do Norwegii ze Szwecji.

Pierwszy opisany po II wojnie światowej przypadek dżumy raków (1962 r.) w Polsce dotyczył rzeki Czarnej w województwie kieleckim (Kozłowski, 1968). W Polsce północno-wschodniej dżuma stwierdzona była tylko lokalnie i to jedynie u raków błotnych pochodzących z hodowli (Bernad, 2001; Własow, 2004a,b); w jednym przypadku śnięcia raków wystąpiły po niekontrolowanym sprowadzeniu materiału obsadowego z Białorusi.

Wrażliwość raków na *Aphanomyces astaci*

Wszystkie obecne w Europie gatunki raków północnoamerykańskich wykazują wysoką odporność na chorobę i mogą służyć jako wektory w przenoszeniu grzyba. Raki te wykształciły odpowiednie mechanizmy obronne w stosunku do tego pasożyta, co może być dowodem koewolucji *Aphanomyces astaci* i raków północnoamerykańskich. Natomiast dla raków europejskich sprawca dżumy raków jest silnie patogenny (Oidtmann, 2002). Jest główną przyczyną katastrofalnej redukcji populacji raków rodzimych tj. raka szlachetnego *Astacus astacus* L. i raka błotnego *Astacus leptodactylus* Esch. Co roku rejestruje się nowe ogniska choroby, zarówno w dotychczas zdrowych obiektach, jak i wcześniej zarażonych. Dyrektywy Unii Europejskiej oraz Międzynarodowe Biuro do Spraw Epizootii OIE wymieniają dżumę raków jako istotnie ważne schorzenie raków (Dealman, 1996, Diagnostic Manual OIE, 2000).

Cykl rozwojowy

Aphanomyces astaci rozmnaża się bezpłciowo przez tworzenie zoospor. Zakażenie gospodarza rozpoczyna się poprzez ocystowanie zoospor na pancerzu raka. Zarówno podatne, jak i odporne na zakażenie grzybem raki, są infekowane w taki sam sposób, ale dopiero dalsza odpowiedź obronna organizmu gospodarza determinuje to, czy rak jest zabijany przez pasożyta czy jest jego stabilnym żywicielem, bez szkody dla siebie. Po usadowieniu się na pancerzu raka zoospora ocystowuje się i wytwarza tzw. rurkę rozrodczą. Rurka rozrodcza penetrując w głąb rozgałęzia się, tworząc w ten sposób strzępki wewnątrz pancerza. Penetrację strzępek wewnątrz pancerza ułatwiają produkowane przez nie lityczne enzymy takie jak proteazy, chitynazy i esterazy. U gatunków raków odpornych na dżumę następuje melanizacja wzrastających końcówek strzępek, co hamuje dalszą inwazję. Natomiast u raków podatnych na inwazję grzyba, strzępki penetrują głębsze tkanki i organy, prowadząc tym samym do śmierci raka. Reakcja taka może również nastąpić u gatunków raków odpornych na zakażenie *Aphanomyces astaci*, jednak osłabionych na skutek innych infekcji, urazów, czy stresu. Końcowa faza infekcji to sporulacja i rozsiewanie zoospor, co następuje w okresie agonalnym lub tuż po śmierci raka, kiedy to strzępki wyrastają na zewnątrz pancerza. Spory pierwotne są wyciskane przez końcówkę strzępki i przyklejają się do otworu tworząc charakterystyczną „kulę spor”. Pierwotne spory uwalniane są ze szczytów strzępek jako wtórne zoospory. Wykształcają one wici i odpływają w poszukiwaniu nowego raka. Zoospory zdolne są do życia tylko kilka dni, po czym albo ocystowują się na nowym żywicielu, żeby wytworzyć nowe zarodniki albo, jeśli warunki są niesprzyjające przekształcają się w nowe

zoospory. Taki proces powtórnych pojawień się nowych zoospor może powtórzyć się trzykrotnie, po czym zoospora w końcu ginie (Evans, 2002).

Drogi zakażenia

Zakażenie nowego zbiornika wodnego dżumą raków jest w większości wynikiem działalności ludzkiej poprzez wprowadzanie nowych gatunków raków północnoamerykańskich oraz ich nielegalny i niekontrolowany handel. Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie populacje raka sygnałowego są nosicielami *Aphanomyces astaci*, dlatego takie populacje mogą współbytować z wrażliwymi gatunkami rodzimymi (Fürst, 1978). Rybacy i wędkarze mogą przenosić grzyba do nowych zbiorników wodnych poprzez transport łodzi. Drogą rozprzestrzeniania się choroby może być również stosowanie jako przynęty zarażonych raków oraz używanie skażonych narzędzi połowowych. Wprowadzona do akwenu wodnego dżuma raków będzie rozprzestrzeniała się wraz z prądem wody poprzez przenoszone zoospory. Natomiast rozprzestrzenianie się choroby pod prąd wody związane jest z wędrówką chorych raków właśnie pod prąd wody lub z wędrówkami ryb. Ryby nie są odpowiednim gospodarzem *Aphanomyces astaci*, ale zoospory ocystowane na rybie mogą być przenoszone na daleki dystans zanim rozwiną się w nowe pływające zoospory poszukujące nowego raka (Häll, 1980). Istnieje również ryzyko transmisji dżumy raków poprzez odchody rybie. Wykazano, bowiem obecność żywych form grzyba w odchodach ryb karmionych pancerzem brzuszyn zainfekowanych raków (Oidtmann, 2002).

Drapieżniki takie jak, norka, wydra i niektóre ptaki mają również zdolność przenoszenia zakażonych raków z jednego środowiska do drugiego. Szybkość rozprzestrzeniania się choroby zależy od takich czynników jak, zagęszczenie raków, szybkość przepływu wody oraz obecność barier w poruszaniu się raków. U podatnych na chorobę gatunków raków, infekcja może przebiegać bardzo szybko, szczególnie w wodzie o podwyższonej temperaturze. Optymalne warunki do rozwoju grzyba istnieją przy temperaturze 20-25°C i pH 8,4. Wówczas śmierć raków następuje w przeciągu 8-9 dni. Przy temperaturze 7°C na obszarze 50 km raki mogą wyginąć w ciągu 21 dni (Cukerzis, 1970). Rozprzestrzenienie się choroby pod prąd wody zostało oszacowane na 1000 m w ciągu tygodnia i 17 km w przeciągu 10 miesięcy. Jednakże dowody eksperymentalne sugerują, że ekspozycja raka szlachetnego na tzw. subletalną ilość pasożytów może zwiększać jego odporność na chorobę (Unestam, 1970). Zanieczyszczenia wody ściekami przemysłowymi, bytowymi oraz intensywne nawożenie mineralne użytków rolnych wokół zbiorników

wodnych, stosowanie herbicydów, insektycydów wpływają na kondycję raków, powodując wzrost podatności na zakażenie *Aphanomyces astaci*. Należy wspomnieć, że epizootcja dżumy raków w zachodniej Europie w 70-tych latach XIX w. zbiegła się z początkiem stosowania na szeroką skalę nawozów mineralnych.

Objawy choroby

Chore na dżumę raki normalnie przejawiające aktywność nocną, zaczynają opuszczać kryjówki i wędrują w ciągu dnia, poruszają się na wyprostowanych kończynach. Zaatakowana przez grzybnię tkanka nabłonkowa uniemożliwia swobodne poruszanie się, dlatego też raki leżą nieruchomo na boku lub grzbiecie. Rak wyjęty z wody wykazuje słaby odruch obronny, odwłok jest podwinięty, szczypce ściśle zaciśnięte. W początkowej fazie choroby typowym objawem są ogniskowe białe plamki w muskulaturze pod pancerzem brzusznej części odwłoka i na błonach przegubowych stawów. W niektórych przypadkach może nastąpić brązowe zabarwienie pancerza i mięśni. Gdy grzyb zaatakuje miękkie części ciała raka, głównie połączenia stawowe, to przy intensywnym rozwoju choroby w miejscach tych widoczne są strzępki grzybni, jako welniste kłębki. Natomiast, gdy zaatakuje układ nerwowy (mózg lub zwój nerwowy), to strzępki zarodnikujące mogą przechodzić przez chitynową osłonkę oka i wówczas typowym objawem jest wykwit na oku, powodujący w konsekwencji lizę oka. Przy szybkim przebiegu choroby poszczególne stadia choroby można przeoczyć i nie zauważyć typowych objawów. U raka sygnałowego objawem klinicznym obecności *Aphanomyces astaci* mogą być ciemne plamki na błonach połączeń odnóży stawowych.

Diagnozowanie

Przy diagnozowaniu dżumy raków rodzimych zwracamy uwagę na muskulaturę pod pancerzem brzusznej części odwłoka, na błony przegubowe, obszar około odbytnicy i skrzela. Natomiast diagnozowanie infekcji u raka sygnałowego odbywa się poprzez badanie brązowych plamek (o średnicy 1-5 mm) na błonach przegubowych odnóży lub pancerzu (Nylund, 1983). W przypadku stwierdzenia jakichkolwiek zmian, należy zbadać pancerz na obecność strzępek grzyba. Najłatwiej można je znaleźć w miękkim brzuszonym pancerzu. Należy w tym celu odciąć ten pancerz i zeskrobać tkankę zaatakowanych obszarów i zbadać mikroskopowo mokre preparaty na obecność strzępek. Zeskrobiny z pancerza można również wysuszyć i zabarwić metodą Giemzy, po czym oglądać pod mikroskopem.

Wegetatywne strzępki są bez sept, często rozgałęziające się i raczej równej grubości (5-10 μm). Młode szybko rosnące strzępki mają cytoplazmę z licznymi ziarnistościami i globulkami oraz zaokrąglone końcówki. Starsze strzępki nie mają ziarnistości, a obficie rozgałęziające się odgałęzienia są węższe niż główna strzępka. Brak tworzenia się zarodników z wyjątkiem późnych stadiów infekcji. Zarodnie występują na końcu strzępki lub w środku i oddzielone są septami. W środku zarodni występują wydłużone pierwotne spory (dł. 16-25 μm i szer. 8 μm). W momencie oddzielania się od zarodni stają się okrągłe i wytwarzają ścianę stając się sporami pierwotnymi.

Diagnozowanie dzumy raków wymaga badań metodą hodowlaną przy użyciu mikologicznego podłoża. Izolacja *Aphanomyces astaci* jest udana, gdy przeprowadzona jest w przeciągu 12 h od śmierci zarażonego raka. Małe kawałki zainfekowanego pancerza lub mięśni należy przenieść na płytkę Petriego, oczyścić wodą destylowaną i pociąć na małe kawałki (1-2 mm^2), następnie umieścić na podłożu. Od raka bez objawów chorobowych, próbki do hodowli należy pobrać przynajmniej z trzech miejsc mięśni odwłoka i błon przegubowych odnóży. Inkubację należy przeprowadzić przez 15 dni w temperaturze 16°C. Wzrost *Aphanomyces astaci* następuje w obrębie posiewu, a wyrosłe kolonie są bezbarwne. Wytwarzanie zarodników nie występuje w hodowlach bogatych w składniki odżywcze. Przeniesienie grzybni z podłoża do wody destylowanej lub sterylnej wody jeziornej powoduje formowanie się zarodni w przeciągu 20-30 h (16°C) lub w przeciągu 12-15 h (20°C). Wygląd strzępek i zarodni podobny jest jak w tkankach chorych raków (Alderman, 1986).

Bardzo dokładną metodą diagnozowania dzumy raków jest PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy), polegająca na amplifikacji fragmentu DNA zawierającego geny *Aphanomyces astaci*. Zaletą tej metody jest to, że materiał kliniczny może być pobrany bezpośrednio z miejsca chorobowo zmienionego, co daje szansę rozpoznania miejscowego czynnika chorobotwórczego. Metodą tą można rozpoznać obecność grzyba na bardzo wczesnym etapie zakażenia, a wynik tej metody jest zawsze jednoznaczny. Raki do tej metody powinny być zabijane przy użyciu chloroformu. Materiał do badań pobierany jest z pancerza brzusznej części odwłoka. Jeżeli nie można dostarczyć raków do laboratorium w ciągu 2 dni, to można je zakonserwować w 70% etanolu (Oidtmann, 2004).

Metody zapobiegawcze

Aphanomyces astaci nie może żyć bez odpowiedniego organizmu, a jedynie raki północnoamerykańskie są naturalnie przystosowanymi żywicielami. Dlatego, jeśli w zbiorniku wodnym nie ma gatunków raków północnoamerykańskich, to przypuszcza się, że

dżuma raków zniknie po zabiciu wszystkich raków rodzimych (Smith, 1986). A więc jedynym sposobem eradykacji dżumy jest wyeliminowanie ze zbiornika wodnego wszystkich raków. Zdaje to tylko egzamin w małych odizolowanych zbiornikach. Możliwość dostania się grzyba przez skażony sprzęt rybacki można wyeliminować poprzez dokładne osuszenie. *Aphanomyces astaci* nie przeżywa bowiem w temperaturze 5°C więcej niż 24 h, przy temperaturze – 20°C przez 2 h, a przy 60°C-10 minut.

Istnieją doniesienia o mikotoksycznym działaniu MgCl₂. Stężenie 100 mM powoduje silną redukcję wzrostu grzybni, a 200 mM MgCl₂ – całkowite zahamowanie rozwoju (Rantamäki, 1992). W badaniach eksperymentalnych wykazano, że *Aphanomyces astaci* jest bardziej podatny niż inne rybie patogeny grzybicze, czy grzyby saprofityczne na działanie antybiotyków (penicyliny, streptomycyny, kwasu oksolinowego), fungicydów (zieleni malachitowej, nadtlenu wodoru, chlorku sodu) oraz środków dezynfekcyjnych (jodofory, podchloryn sodu) (Lilley, 1997). Podchloryn sodu i jodofory mogą być skuteczne w usuwaniu powierzchniowych skażeń *Aphanomyces astaci*, pod warunkiem, że powierzchnie pancerza są oczyszczone z błota i zanieczyszczeń organicznych, w których to z uwagi na wilgotność grzyb może przeżywać dłużej.

Wykazano, że trzy różne inhibitory proteinaz wyizolowane z krwi raków mogą zmniejszać proteolityczny proces w komórkach żywiciela wywołany przez proteiny grzyba (Diéguez-Uribeondo, 1993). W chwili obecnej nie ma skutecznego zwalczania dżumy raków, ale można ograniczyć rozwój choroby między innymi poprzez niszczenie i usuwanie śniętych i chorych raków. Należy pamiętać, że uzupełnianie zmniejszonej przez dżumę obsady będzie prowadziło do zakażenia nowych wprowadzonych raków. Próby reintrodukcji można przeprowadzić dopiero po kilkuletniej przerwie od ustąpienia zarazy. Możliwe jest ponowne zaraczanie rzek, w których wcześniej stwierdzono dżumę raków pod warunkiem, że nie ma już źródła zakażenia. Dżuma raków może przetrwać w systemie rzeczonym ponad rok (Diéguez-Uribeondo, 1997; Holdich, 2003). Raki przeznaczone do zaraczania powinny być przebadane pod kątem ich zdrowotności i pochodzić z wiarygodnych źródeł.

Piśmiennictwo

1. Alderman D.J., Polglase J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. J. Fish Dis. 9, 367 – 379.
2. Bernad A., Własow T., Sobczak J. (2001). Ocena stanu zdrowotnego raków słodkowodnych w odniesieniu do normy BN-73/ 9147-17. Materiały na VIII Konferencję Lepsza Żywność, Olsztyn, 27.06.2001. Biul. Nauk. UWM, 13, 157– 158.
3. Cukerzis J.M. (1970). Biologiã širokopalogo raka *Astacus astacus* L. ANLRS Vilnus, pp.206.
4. Dealmann W. (1996). Animal health and the trade in aquatic animals within and to the European Union. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15, 2, 711 – 712.

5. Diagnostic Manual OIE (2000). Diagnostic manual for aquatic animal diseases, 4.2.4. Crayfish plague. OIE Paris. pp. 227 – 230.
6. Diéguez-Uribeondo J., Rueda K.A., Castien E., Bascones K.C. (1997). A plan of restoration in Navarra for the native freshwater crayfish species of Spain, *Austropotamobius pallipes*. Bull. Fr. Peche Piscic. 347, 625-637.
7. Diéguez-Uribeondo J., Söderhäll K. (1993). *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. Aquacult. Fish. Management 24(6), 761-765.
8. Evans L.H., Edgerton B.F. (2002). Pathogens, parasites and commensals. In: Biology of freshwater crayfish. D.M. Holdich ed., Blackwell Science Ltd., London. Pp. 377– 438.
9. Fürst M., Boström U. (1978). Frequency of visible symptoms of crayfish plague in populations of *Pacifastacus leniusculus* (Dana). Information från Sötvattenslaboratoriet, Drottningholm, 1, 1 – 24.
10. Häll L., Unestam T. (1980). The effect of fungicides on survival of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, oomycetes, growing on fish scales. Mycopathologia 72, 131 – 134.
11. Holdich D. (2003). Ecology of the white-clawed crayfish. Conserving Nature 2000 Rivers Ecology Series No. 1.
12. Kozłowski F. (1968). Dżuma raków w woj. kieleckim. Med. Wet. 6, 353 – 355.
13. Lilley J. H., Inglis V. (1997). Comparative effects of various antibiotics, fungicides and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniaceous fungi. Aquaculture Res. 28(6), 461-469.
14. Nylund V., Westman K. (1983). Frequency of the visible symptoms of crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* on the American crayfish *Pacifastacus leniusculus* in natural populations in Finland 1979-1988. Freshwat. Crayfish 5, 277-283
15. Oidtmann B., Heitz E., Rogers D., Hoffmann R. (2002). Transmission of crayfish plague. Dis. Aquatic Org. 52, 159 – 167.
16. Oidtmann B., Schaefers N., Cerenius I., Söderhäll K., Hoffmann R.W. (2004). Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. Vet. Microbiol. 100, 269 – 282.
17. Rantamäki J., Cerenius L., Söderhäll K. (1992). Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with MgCl₂. Aquaculture 104, 11 – 18.
18. Skurdal J., Taugbot T., Burba A., Edsman L., Söderbäck B., Styrihave B., Tuusti J., Westman K. (1999). Crayfish introductions in the Nordic and Baltic countries. In: Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation. F. Gherardi, D. M. Holdich, eds, Balkema, Rotterdam. Pp. 193-219.
19. Smith V., Söderhäll K. (1986). Crayfish pathology: an overview. Freshwat. Crayfish 6, 199 – 211.
20. Unestam T., Weiss D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. J. General Microbiol. 60, 77 – 90.
21. Unestam T. (1969). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. Physiol. Plant. 22, 221-235.
22. Vogt G. (1999). Diseases of European freshwater crayfish, with particular emphasis on interspecific transmission of pathogens. In: Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation. F. Gherardi, D.M. Holdich, eds. Balkema, Rotterdam. Pp. 87 – 103.
23. Własow T., Bernad A. (2004 a). Badanie nosicielstwa dżumy raków realizowanego w ramach projektu badawczego „Wpływ raka sygnałowego *Pacifastacus leniusculus* (Dana) na krajową astakofaunę”. Raport.
24. Własow T., Bernad A., Krzywosz T., Hul M. (2004 b). Poznámky k výskytu račího moru v Polsku (Some notices on the incidence of crayfish plague in Poland). Bull. VURH Vodnany 40 (3): 95-100.

ZNACZENIE JAKOŚCI W CHOWIE I HODOWLI RYB SŁODKOWODNYCH Z UWZGLĘDNIENIEM ICH DOBROSTANU

ANDRZEJ LIRSKI¹, HENRYK BIAŁOWAŚ²

¹ Instytut Rybactwa Śródlądowego im. St. Sakowicza,
ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn
Zakład Rybactwa Stawowego w Żabieńcu
² Polska Akademia Nauk,
Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszcu,
43-520 Chybie

Na jakość finalnego produktu chowu i hodowli ryb, czyli jakość surowca mięsnego, wpływa szereg czynników, które można podzielić na kilka grup:

- środowiskowe: jakość wody i gleby, skład jakościowy i ilościowy pokarmu naturalnego, rodzaj i ilość skarmianej paszy, gęstość obsady w stawach, sadzach lub basenach
- fizjologiczne: wiek, płeć i stopień dojrzałości płciowej, aktywność metaboliczna zależna od pory roku, kondycja i stan zdrowotny
- genetyczne: przynależność do danej linii hodowlanej, krzyżówki lub odmiany lokalnej
- manipulacje w trakcie cyklu produkcyjnego i sprzedaży: odłowy, sortowanie, ważenie, transport, przetrzymywanie w basenach transportowych i stacjonarnych
- warunki i metody uśmiercania
- warunki i okres przechowywania surowca.

W Polsce podstawowym produktem hodowli ryb słodkowodnych jest karp, mimo występującej od kilku lat lekkiej spadkowej tendencji wielkości produkcji, i dlatego wpływ wymienionych powyżej czynników zostanie omówiony na przykładzie tego gatunku. Jednym z podstawowych czynników wpływających na jakość surowca mięsnego jest odżywianie się karpia, zarówno pokarmem naturalnym, jak i paszą podawaną na karmiska. W Polsce, tradycyjnie karp jest dokarmiany pszenicą i jęczmieniem, jednakże malejące ceny zbytu karpia, przyczyniły się do stosowania innych, tańszych pasz zbożowych – pszenżyta, żyta i kukurydzy. Należy podkreślić, że polscy hodowcy w zdecydowanej większości nie stosują

tanich pasz pochodzenia odpadowego tylko inne tańsze pasze zbożowe, co niewątpliwie ma pozytywny wpływ na jakość surowca mięsnego. Badania mięsa karpia dokarmianych różnymi paszami wykazały, że najwyższą zawartością suchej masy i tłuszczu charakteryzują się karpie dokarmiane kukurydzą, następnie pszenicą, a najniższą dokarmiane łubinem (Białowas, 2006). Najwyższą zawartość białka stwierdzono u karpia dokarmianych łubinem, czyli paszą o wysokiej zawartości białka.

Mięso ryb, będących organizmami zmiennocieplnymi, charakteryzuje się różną wartością odżywczą w różnych okresach roku. Najwyższą zawartość białka ogólnego w świeżym mięsie karpia stwierdzono w miesiącach letnich, a w przypadku tłuszczu w okresach październik – grudzień oraz czerwiec – lipiec (Białowas, dane niepublikowane). Najniższe zawartości białka i tłuszczu wystąpiły w okresie przedtarłowym i samego tarła, czyli wczesną wiosną.

Znaczący wpływ na wartość użytkową ryb ma stadium rozwoju biologicznego (Sikorski, 2004). W okresie intensywnego przyrostu gonad, organizm ryby musi sięgać do rezerw zmagazynowanych m.in. w mięśniach, co powoduje obniżenie jakości mięsa (Zamojski, 1993). W warunkach klimatycznych Polski oraz stosowanego trzyletniego cyklu produkcyjnego samce karpia, w przeciwieństwie do samic, mają w pełni wykształcone gonady i większość z nich osiąga dojrzałość płciową, a także rozplodową. Wykształcenie gonad jest procesem wymagającym znacznych nakładów materiałowych i energetycznych, co powoduje mniejsze przyrosty wagowe oraz znaczny wzrost udziału gonad w ciężarze samców. Przeprowadzone analizy wykazały istotne różnice pod względem zawartości tłuszczu ogólnego między mięsem samic i samców. Mięso samic towarowych karpia zawiera do 3 punktów procentowych tłuszczu ogólnego więcej (Białowas, 2006).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na jakość mięsa karpia jest czynnik genetyczny, tzn. przynależność do danej linii hodowlanej, krzyżówki lub też lokalnej odmiany. Analiza mięsa karpia należących do 5 linii hodowlanych chowanych w jednym stawie nie wykazała różnic pod względem zawartości suchej masy, mineralnej pozostałości i białka ogólnego (Białowas, dane niepublikowane). Istotne różnice wystąpiły w przypadku zawartości tłuszczu w filecie ze skórą (do 3%) i bez skóry (do 1%).

W czasie trwania trzyletniego cyklu produkcyjnego karpie kilkakrotnie narażone są na przebywanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych oraz stres, powodowany różnego rodzaju manipulacjami i zabiegami agrotechnicznymi wykonywanymi w trakcie i pomiędzy sezonami hodowlanymi. Największej ilości bodźców zewnętrznych dostarcza odłów ze

stawów, sortowanie, ważenie i transport. Czynniki oddziałujące na ryby podczas tych czynności można pogrupować na:

- mechaniczne
- fizyczne
- percepcyjne

przy czym zdecydowana większość z nich wpływa na fizjologię (procesy życiowe) zwierząt.

Do czynników mechanicznych należy zaliczyć bezpośredni kontakt ryb z narzędziami i urządzeniami technicznymi wykorzystywanymi podczas odłowu (kasary, sieci, sortownie, wanianki, wagi, baseny itp.). Manipulacje związane z zagęszczaniem ryb w łowisku, kilkukrotnym przenoszeniem w wannach, sortowaniem i ważeniem bez wody mogą skutkować uszkodzeniami mechanicznymi.

Najważniejsze czynniki fizyczne wpływające na fizjologię ryb, to temperatura, dostępność tlenu i stężenie substancji mineralnych w wodzie. Przenoszenie ryb na sortownie, do basenów transportowych i następnie do magazynów rybnych powoduje zmianę temperatury ciała. Intensywność tego efektu zależy od różnicy temperatur wody w stawie, basenach transportowych, magazynach i temperatury powietrza. Duże zagęszczenie ryb w łowisku może powodować spadek stężenia tlenu rozpuszczonego w wodzie i duszenie się ryb. Podczas przeprowadzania odłowów, sortowania, ważenia, załadunku i rozładunku ryby przebywają przez pewien czas poza swoim naturalnym środowiskiem, tzn. wodą. Długotrwały pobyt poza wodą prowadzi do anoksji, czyli braku dostatecznej ilości tlenu w tkankach, co uniemożliwia procesy życiowe na poziomie komórkowym. Anoksja wywołuje znaczny spadek odczynu mięsa spowodowany szeregiem przemian beztlenowych, w tym glikolizy, w efekcie których powstaje kwas mlekowy. W warunkach terenowych częste są sytuacje, że ryby transportuje się do innych stawów w wodzie pochodzącej z innego źródła niż staw, w którym przebywały. Nagła zmiana składu chemicznego wody, m.in. stężenia substancji mineralnych (zasolenia), powoduje konieczność zmiany aktywności mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi osmotycznej.

Dodatkowe bodźce wpływające na karpie są związane z subiektywnym postrzeganiem (percepcją) otoczenia przez zwierzęta. Karpie są przyzwyczajone do przebywania w wodzie o małej przezroczystości, a podczas odłowów są narażone na bezpośrednie światło słoneczne i nagłe zmiany jego natężenia. Nie bez znaczenia jest zmiana położenia ciała. Karpie są sortowane i ważone zazwyczaj bez wody. W trakcie tych czynności leżą na boku, próbując wyrównać swoje położenie do pionu. Objawia się to próbą kompensacji położenia przez obracanie gałek ocznych do poziomu. Karpie reagują również na hałas i wibracje podłoża.

Nagła zmiana natężenia dźwięku lub uderzenie w zbiornik z rybami lub sortownię jest bodźcem, na który ryby bardzo gwałtownie reagują. W efekcie oddziaływania szeregu czynników zewnętrznych organizm ryby zmuszony jest do dodatkowego wysiłku w celu zapewnienia równowagi fizjologicznej. Proces ten wymaga dostarczenia energii zgromadzonej w tkankach ryby, a dodatkowo w jego efekcie mogą powstawać niepożądane produkty wpływające na jakość mięsa ryb, np. kwas mlekowy. Innymi słowy każda sytuacja wywołująca stres u ryb oraz niekorzystne warunki środowiskowe, powodują zmiany jakości pozyskiwanego surowca mięsnego, w zdecydowanej większości niekorzystne z punktu widzenia jego wartości odżywczej, a także walorów smakowych. Należy jednak zaznaczyć, że stres, ewolucyjnie wykształcona reakcja organizmu na niesprzyjające warunki środowiskowe i czynniki patogenne, powoduje mobilizację organizmu do odpowiedniej, szybkiej reakcji na dany czynnik i z tego punktu widzenia jest on korzystny. Natomiast długotrwały stres powoduje wyczerpanie organizmu i należy go unikać.

Uśmiercanie karpia w warunkach domowych dokonywane jest poprzez uderzenie pałką w głowę, ogłuszenie i następnie wykrwawienie. Ta sama metoda stosowana jest w większości przetwórci oraz przez liczne punkty sprzedaży detalicznej. Inną metodą uśmiercania, sprawdzoną w przypadku innych gatunków ryb, jest ogłuszanie zmiennym prądem elektrycznym i następnie dekapitacja lub wykrwawienie.

Klasycznym wskaźnikiem siły stresu u ryb przed uśmierceniem jest odczyn mięsa (Morzel, 2003). Silny stres powoduje znaczne obniżenie wartości pH. Porównanie dwóch metod uśmiercania: tradycyjnej, czyli pałki oraz przemysłowej, wykorzystującej zmienny prąd elektryczny do ogłuszania, wykazała znacznie niższy odczyn mięsa w przypadku metody tradycyjnej (Białowas, 2004). Wartość pH w świeżych filetach wynosiła 6,44 dla metody tradycyjnej i 6,69 dla przemysłowej. Różnica ta utrzymuje się przynajmniej przez 7 dni od uboju. Przetrzywanie ryb bez wody przez 30 minut znacząco obniżało odczyn mięsa względem ryb ogłuszanych bezpośrednio po odłowieniu.

Na podstawie wyników zawartości w mięsie ATP i produktów jego rozpadu (ADP, AMP, IMP, Ino, Hx) można wyznaczyć indeks świeżości mięsa K (Saito, 1959). Jego wartość jest dobrym wyznacznikiem świeżości mięsa, aczkolwiek specyficznym dla gatunku, stąd też obserwowane zmiany w czasie mają odmienny charakter u różnych gatunków i krzyżówek (Grigorakis, 2004; Lougovoisa, 2003; Pilarczyk, 2005). Charakter i tempo przemian autolitycznych w mięsie po uśmierceniu zależą od nagromadzenia się produktów przemian biochemicznych, takich jak mleczany oraz wykorzystania substancji zapasowych (glikogen, wysokoenergetyczne związki fosforanowe) w żywym organizmie. Dlatego stan fizjologiczny,

w którym ryba znajduje się przed uśmierceniem, czynniki stresogenne oraz metoda uśmiercania wpływają na jakość otrzymywanego surowca mięsnego.

W trakcie przechowywania mięsa karpia w warunkach chłodniczych przez 7 dni wartość indeksu K wzrosła z 2 do 56% (Vis van de, 2006). Skrócenie czasu manipulacji przed uśmierceniem i 15-minutowe schłodzenie ryb na lodzie nie wpływa na wzrost indeksu. Obserwacja stężenia ATP i wybranych jego pochodnych wykazała jednak znaczący wpływ manipulacji przed uśmierceniem na stan fizjologiczny ryb. W mięsie ryb pozbawionych wody przez 30 min przed uśmierceniem odnotowano dużo niższe stężenie ATP, ADP i AMP. Świadczy to o wykorzystaniu zapasowych substancji wysokoenergetycznych w efekcie przyspieszonej respiracji spowodowanej stresem oraz złymi warunkami tlenowymi. Jednym ze skutków tych procesów jest znacznie szybsze akumulowanie się w przechowywanym mięsie hipoksantyny (Hx), która odpowiedzialna jest za powstawanie gorzkawego posmaku mięsa (Lindsay, 1994). Przechowywanie ryb bez wody spowodowało również szybszy wzrost stężenia inozyny w mięsie. Dłuższy czas przechowywania mięsa może doprowadzić do intensywniejszego procesu degradacji Ino do Hx, a przez to do pogorszenia walorów smakowych. Dlatego wskazane jest przeprowadzanie wszystkich manipulacji przed uśmiercaniem i samego uśmiercania w warunkach nie powodujących anoksji u ryb. Podsumowując należy stwierdzić, że jakość mięsa karpia zależy głównie od postępowania przed zabiciem a sama metoda uśmiercania ma na nią znacznie mniejszy wpływ.

W ostatnich kilku latach, od chwili akcesji Polski do Unii Europejskiej coraz częściej pojawia się aspekt dobrostanu zwierząt hodowlanych. Co prawda samo pojęcie „dobrostan” nie posiada jednoznacznej definicji, ale zawiera się ona w pięciu podstawowych pojęciach (zasada pięciu wolności, ang. *five freedoms*) i ma zastosowanie dla wszystkich zwierząt hodowlanych:

- wolność od głodu i pragnienia
- wolność od dyskomfortu
- wolność od bólu, obrażeń i chorób
- wolność do wyrażania normalnego zachowania
- wolność od strachu i cierpienia psychicznego

(podano za *Universal Declaration on Animal Welfare, WSPA*). Manipulacje związane z odłowem i transportem karpia mogą naruszać częściowo, ale przeważnie tylko na krótko, przytoczone zasady. Stosowane obecnie techniki produkcji ryb w stawach zostały wypracowane w wyniku wielowiekowych doświadczeń hodowców. Jak większość zawodów

związanych z rolnictwem również zawód rybaka stawowego wymaga ciągłej obserwacji wpływu środowiska na przebieg procesów produkcyjnych. Wymaga tego szczególna specyfika hodowli, która ogranicza możliwość obserwacji samych ryb. Informacje o tym co dzieje się w stawie, rybacy czerpią z obserwacji pośredniej. Bezpośredni kontakt z rybami możliwy jest tylko podczas odłowów stawów lub odłowów kontrolnych. Ta specyfika zawodu spowodowała również, że odłowy, sortowanie, transport i przetrzymywanie ryb w dużych zagęszczeniach są organizowane w sposób minimalizujący ich szkodliwy wpływ na ryby. Każdy stres, czy też pogorszenie warunków środowiskowych odbija się bezpośrednio nie tylko na kondycji ryb i jakości surowca mięsnego, ale także w dalszej konsekwencji na masie ryb, co wpływa na rentowność produkcji. Dlatego też, obserwując które czynniki wpływają niekorzystnie na ryby, a tym samym na zyski z hodowli, przez stulecia rybacy stawowi, w ramach dostępnych środków technicznych, udoskonalali techniki chowu, w tym odłowu, transportu i magazynowania tak, aby ograniczyć do minimum stres i niekorzystne warunki środowiskowe.

Przy stosowanej obecnie technologii produkcji stawowej dobrostan ryb najbardziej narażony jest podczas odłowu, transportu i sprzedaży. Przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu określenie wpływu odłowu, przetrzymywania w basenach i metod uśmiercania na jakość mięsa karpia. Celem pierwszego doświadczenia było określenie wpływu odłowu w łowisku przed mnichem, transportu i odpijania karpia w płuczce na jakość surowca mięsnego. Odłów i transport spowodował spadek zawartości suchej masy w mięsie karpia z 26,0 do 25,2%. Dwugodzinny pobyt ryb w płuczce zwiększył ją do 25,7%. Podobny przebieg miały zmiany odczynu mięsa. Po obniżeniu odczynu wskutek odłowu i transportu z 6,89 do 6,81 stwierdzono jego wzrost do 7,00 po odpiciu się ryb w płuczce, czyli znacznie przekraczający wartości z przed odłowu. Stwierdzono nieznaczny wzrost zawartości mleczanów w mięsie karpia po odłowu i transporcie z 2,10 do 2,14 mg/g. Odpicie się ryb w płuczce spowodowało obniżenie zawartości mleczanów do 1,78 mg/g. Zawartość glukozy obniżyła się po odłowu i transporcie z 0,20 do 0,17 mg/g, natomiast pobyt w płuczce nie zmienił jej zawartości. Odłów i transport spowodował obniżenie zawartości wysokoenergetycznych fosforanów organicznych (ryc. 1). Po dwugodzinnym pobycie w płuczce w świeżej, bieżącej wodzie zapasy energetyczne zostały całkowicie odbudowane.

Odłów i transport spowodował wzrost udziału nasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w całkowitej ilości kwasów tłuszczowych w świeżym mięsie oraz spadek udziału jednonienasyconych. Po pobycie ryb w płuczce nastąpił spadek udziału nasyconych oraz wzrost jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Taki przebieg

zmian sugeruje wykorzystanie, jako źródła energii w pierwszym rzędzie, jednonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Przeprowadzone badania wykazały bardzo pozytywny wpływ odpijania karpia w płucce na badane parametry jakościowe surowca mięsnego. W niektórych przypadkach ich wartość po pobycie w płucce była wyższa od wartości z przed odłowu, co sugeruje stosunkowo szybką regenerację karpia.

Celem kolejnego doświadczenia było określenie wpływu przetrzymywania karpia w basenach z wodą napowietrzaną i nienapowietrzaną. Okresowo karpie przetrzymywane są w dużych zagęszczeniach: podczas transportu i sprzedaży. Podczas transportu, nawet długotrwałego, rybacy zapewniają w miarę możliwości dobre warunki środowiskowe. Obecnie praktycznie wszystkie baseny służące do transportu żywych ryb zaopatrzone są w instalacje natleniające lub napowietrzające wodę. W większości przypadków sprzedaży detalicznej ryby przetrzymywane są w dużych zagęszczeniach w basenach nie posiadających instalacji do napowietrzania wody, co prowadzi do deficytu tlenowego w wodzie. W konsekwencji dochodzi do szeregu niekorzystnych zmian parametrów jakościowych mięsa karpia. W przeprowadzonych doświadczeniach w basenie z wodą nienapowietrzaną zastosowano obsadę 300 kg ryb na 1200 l wody, a w napowietrzonym 600 kg ryb na 1200 l wody. Po pięciu godzinach zakończono doświadczenie prowadzone w basenie nienapowietrzonym, ponieważ karpie leżały bezwładnie na dnie i znajdowały się w stanie agonalnym. W pierwszym wariacie stwierdzono sukcesywny spadek zawartości suchej masy, białka ogólnego i tłuszczu w świeżym mięsie. Zmiany te zostały spowodowane uwodnieniem mięsa w wyniku dzióbkowania ryb. W przypadku deficytu tlenowego karpie pobierają z powierzchni wodę wraz z powietrzem i tę mieszaninę przepuszczają przez skrzel. W trakcie dzióbkowania karpie połykają znaczne ilości wody. Zjawisko to jest znane i czasami wykorzystywane przez handlowców w celu zwiększenia wagi ryb. Do chwili obecnej uważano, że woda po połknięciu przebywa wyłącznie w przewodzie pokarmowym, z którego jest po pewnym czasie usuwana, i nie wpływa na cechy jakościowe mięsa. Przeprowadzone badania wykazały, że woda przechodzi do mięśni i obniża jakość mięsa. Inaczej zjawisko to przebiega przy zastosowaniu napowietrzania. Zmiany nie są tak radykalne, a po pierwszym okresie, po obniżeniu zawartości suchej masy, białka ogólnego i tłuszczu, następuje wzrost ich zawartości. Podobnie przebieg zmian wystąpił w przypadku odczynu mięsa. Mięso karpia przetrzymywanych w wodzie bez napowietrzania, charakteryzowało się coraz niższym pH (7,01-6,89). Zastosowanie napowietrzania spowodowało obniżenie odczynu w pierwszych godzinach, ale potem nastąpił jego wzrost powyżej wartości początkowej do 7,11. Zmiana odczynu w pierwszym okresie została spowodowana stresem, nowym środowiskiem i wzmożoną aktywnością motoryczną. Po zaadaptowaniu się do nowego środowiska, w dobrych warunkach tlenowych, nastąpiła regeneracja i wzrost odczynu. Istotny wpływ na odczyn mięsa ma zawartość mleczanów, będących produktem beztlenowych przemian glikogenu. U ryb w basenie bez napowietrzania ich zawartość systematycznie rosła (1,20-1,72 mg/g), a w basenie z napowietrzaniem wzrost wystąpił tylko w początkowym okresie. Po okresie adaptacji ich zawartość spadła poniżej wartości początkowej do 1,08 mg/g. Zawartość glukozy malała w ciągu całego okresu przetrzymywania w wodzie bez napowietrzania (0,10-0,06 mg/g). Stosowanie napowietrzania spowodowało, po początkowym spadku, wzrost jej zawartości do 0,08 mg/g. Jest to kolejny dowód na wysoką zdolność regeneracji karpia i znacznie korzystniejsze warunki środowiskowe w przypadku stosowania napowietrzania.

W mięsie karpia przetrzymywanych w wodzie bez napowietrzania zawartość organicznych fosforanów wzrosła w pierwszym okresie za wyjątkiem hipoksantyny (Hx) i

inozyny (Ino), a następnie obniżyła się poniżej wartości początkowych (ryc. 2). Napowietrzanie wody spowodowało w pierwszym okresie obniżenie zawartości ATP i jego produktów rozkładu, następnie wzrost i ponowne obniżenie w końcowym okresie.

Udziały poszczególnych frakcji kwasów tłuszczowych w całkowitej ilości kwasów tłuszczowych w świeżym mięsie karpia przytrzymywanych w wodzie bez napowietrzania nie uległy zmianie przez półtorej godziny. W okresie późniejszym udział nasyconych kwasów tłuszczowych wzrósł o 1,6%, a wielonienasyconych o 0,7%. Jednocześnie zmniejszył się udział jednonienasyconych kwasów tłuszczowych o 2,4%. W przypadku napowietrzania wody zmiany udziału miały inny przebieg. Udział nasyconych kwasów tłuszczowych wzrósł w początkowym okresie o 0,8%, następnie obniżył się o 0,2%. Udział jednonienasyconych kwasów tłuszczowych stopniowo obniżył się o 2,0% a wielonienasyconych wzrósł o 1,4%. Kwasy tłuszczowe są ważnym zapasowym materiałem energetycznym przechowywanym w postaci trójglicerydów w tkance tłuszczowej. W wyniku utleniania kwasów tłuszczowych powstaje energia potrzebna do procesów życiowych. Przebieg zmian udziału poszczególnych frakcji potwierdza wysuniętą wcześniej sugestię, że w przypadku zwiększonego zapotrzebowania na energię w pierwszej kolejności wykorzystywane są jednonienasycone kwasy tłuszczowe.

Przedstawione powyżej wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują wyższość przetrzymywania karpia w wodzie napowietrzanej nad przetrzymywaniem ich bez napowietrzania i to mimo zastosowania dwukrotnie większej gęstości ryb w przypadku napowietrzania. Większość analizowanych cech wykazała zbliżoną tendencję zmian w obu przypadkach z tym, że napowietrzanie powodowało znaczne rozciągnięcie ich w czasie i łagodniejszy przebieg. Pod względem odczynu i zawartości mleczanów w mięsie nastąpiła wręcz poprawa jego jakości.

Najczęściej stosowaną metodą ogłuszania i uśmiercania karpia jest metoda udarowa. Polega ona na uderzeniu pałką w głowę, w połowie odległości między linią oczu a krawędzią czaszki. Posiada ona kilka zalet, z których najważniejsze są prostota przeprowadzenia i krótki czas przebywania ryby poza wodą. Ponieważ w Polsce karpie sprzedawane są w postaci żywej, ta właśnie metoda dominuje. Stopniowo zwiększa się udział w sprzedaży karpia przynajmniej wstępnie przetworzonego. Przetwórczo zajmujące się przerobem ryb zainteresowane są przemysłowymi metodami uśmiercania. W krajach UE najczęściej stosowaną jest metoda wykorzystująca do ogłuszania zmienny prąd elektryczny. Przeprowadzono doświadczenie w którym do ogłuszania karpia zastosowano urządzenie komercyjne firmy Aqua Tech (49-50 V, czas ekspozycji 1 min.), urządzenie doświadczalne

(400 V, czas ekspozycji 1 s) oraz pałkę. Stwierdzono istotne różnice w odczynie mięsa. Najniższym odczynem charakteryzowało się mięso karpia ogłuszonych pałką - 6,62. W przypadku zastosowania urządzenia komercyjnego i doświadczalnego pH mięsa wynosiło 6,88 i 6,86. Przy użyciu pałki zawartość wysokoenergetycznych organicznych fosforanów była najwyższa, a najniższe zawartości wystąpiły w wyniku zastosowania urządzenia komercyjnego (ryc. 3). Nasuwa się przypuszczenie, że ich stężenie może być skorelowane z czasem jaki upływa od momentu wyjęcia ryby z wody do zakończenia procesu ogłuszania. Najkrótszy czas wystąpił w przypadku użycia pałki. Urządzenie laboratoryjne, mimo jednosekundowej ekspozycji, wymaga więcej czasu na włożenie ryby do pojemnika, zamknięcie pojemnika, ekspozycję i wyjęcie ryby. Urządzenie komercyjne, oprócz czasu na manipulacje, wymaga aż jednodominutowej ekspozycji.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, która z metod ogłuszania jest najlepsza. Pod względem części badanych cech lepsze jest urządzenie doświadczalne, pod względem innym - pałka. Wydaje się jednak, że najsłabiej wypada mięso karpia ogłuszanych urządzeniem komercyjnym. Prawdopodobnie jest to związane z czasem trwania samego ogłuszania. Według informacji ustnych, uzyskanych od unijnych specjalistów zajmujących się przemysłowym uśmiercaniem ryb, czas ekspozycji jest jednym z najważniejszych czynników uśmiercania wpływających na jakość surowca mięsnego. Rozpatrując uśmiercanie w aspekcie dobrostanu wydaje się, że decydujące znaczenie ma czas. Określenie odczuwania bólu przez ogłuszane i uśmiercane ryby wymaga przeprowadzenia specjalistycznych badań.

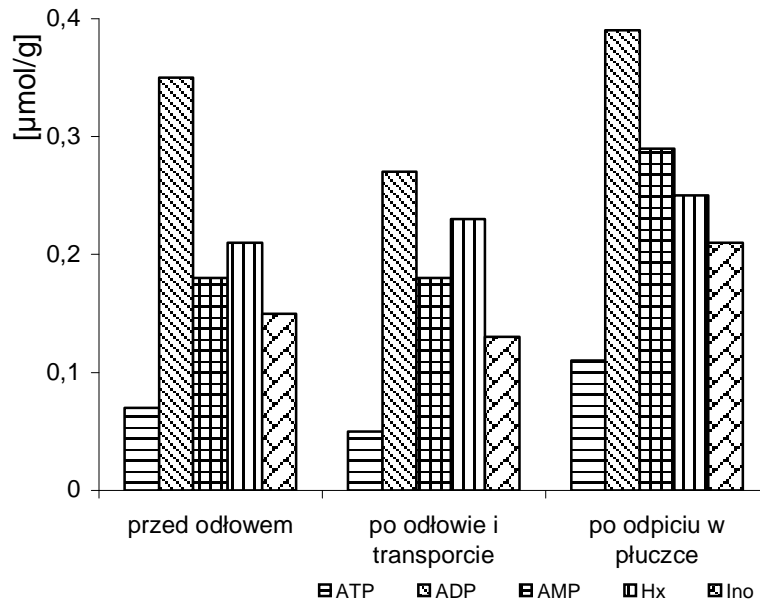
Niewątpliwie dobrostan ryb ma jednoznaczny wpływ na jakość pozyskiwanego surowca mięsnego, dlatego we wspólnym interesie hodowców i handlowców jest dbałość by nie ulegał on pogorszeniu, tak aby konsumenci otrzymywali produkt najwyższej jakości.

Badania wykonano w ramach „Programu innowacyjnego w zakresie badań, demonstracji wyników i szkoleń dotyczących opracowania i wdrażania technik i technologii poprawy jakości produktu chowu i hodowli ryb, ze szczególnym uwzględnieniem

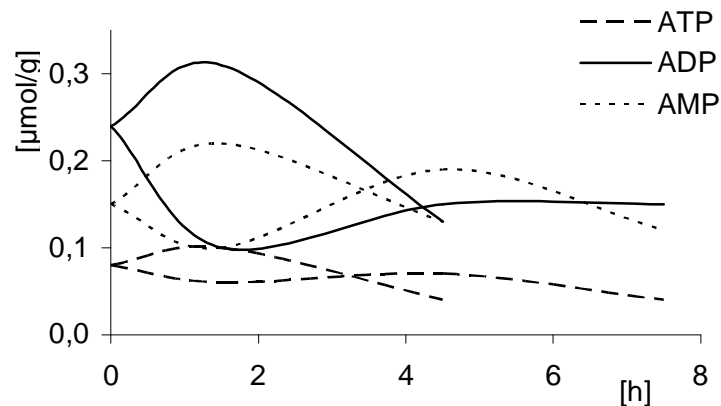
dobrostanu” nr 00001-61535-OR0700001/05. Projekt realizowany w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego „Rybołówstwo i Przetwórstwo Ryb 2004 – 2006”.

Piśmiennictwo

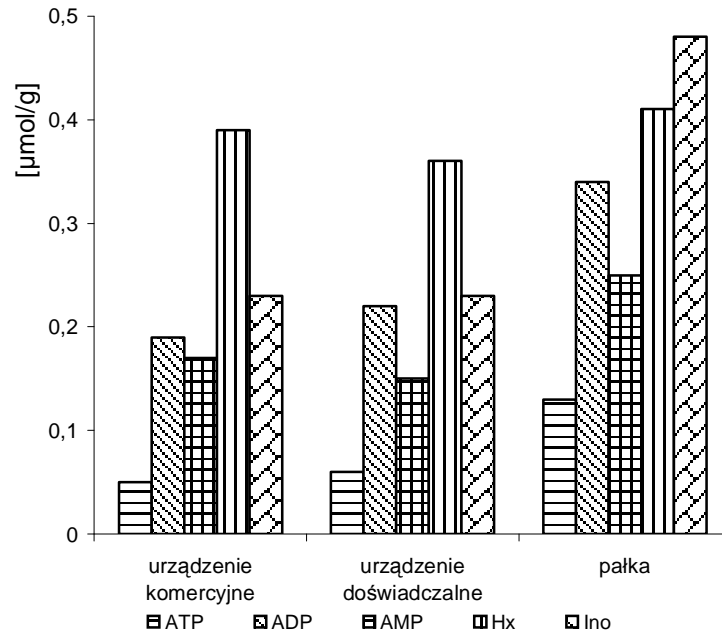
1. Białowas H., Pilarczyk M., Vis van de H., Lambooi B., Veldman M. (2004). Wpływ metod uboju karpia na pH mięsa karpiego. Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Seria Zootechnika 501, 25-30.
2. Białowas H. (2006). Ubój i wstępne przetwarzanie karpia. Przegląd Rybacki 4, 14-24.
3. Grigorakis K., Alexis M., Gialamas I., Nikolopoulou D. (2004). Sensory, microbiological, and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: a seasonal differentiation. Eur. Food Res. Technol. 219, 584–587.
4. Lougovoisa V., Kyranasb E., Kyrana V. (2003). Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Research International 36, 551–560.
5. Morzel M., Vis van de H. (2003). Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.). Aquaculture Research 34, 1-11.
6. Pilarczyk M., Adamek J., Białowas H. (2005). Porównanie parametrów technologicznych i jakościowych mięsa dwóch gatunków sumy afrykańskiego (*Clarias gariepinus* i *Heterobranchus longifilis*) oraz krzyżówki *C. gariepinus* x *H. Longifilis*. In: Rozród, podchów, profilaktyka ryb sumokształtnych i innych gatunków. Z. Zakęś, ed. IRŚ, Olsztyn. pp. 85-95.
7. Saito T., Arai K., Matsuyoshi M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 24, 749–750.
8. Vis van de H., Białowas H., Pilarczyk M., Machiels M., Reimert H., Veldman M., Lambooi B. (2006). Comparison of commercial and experimental slaughter of farmed carp (*Cyprinus carpio*) with respect to development of *rigor mortis* and flesh quality. In: Seafood research from fish to dish. J.B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Saebo, J. Oehlenschlager, eds. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. pp. 201-210.
9. Sikorski Z.E. (2004). Ryby i bezkręgowce morskie. Pozyskiwanie, właściwości i przetwarzanie. WNT, Warszawa. pp. 391.
10. Zamojski J. (1993). Magazynowanie, wstępne zabezpieczenie i transport ryb towarowych. In: Rybactwo Śródlądowe, J.A. Szczerbowski, ed. IRŚ, Olsztyn. pp. 479-503.



Ryc. 1. Wpływ odłowu, transportu i odpijania karpia w płucce na zawartość adenozynotrójfosforanu (ATP) i produktów rozkładu w świeżym mięsie.



Ryc. 2. Wpływ przetrzymywania karpia w wodzie napowietrzanej (do 7,5 h) i bez napowietrzania (do 4,5 h) na zawartość adenozynotrójfosforanu (ATP) i produktów rozkładu w świeżym mięsie.



Ryc. 3. Wpływ metody uśmiercania karpia przy pomocy urządzeń ogłuszających prądem zmiennym: komercyjnym i doświadczalnym oraz pałką na zawartość ATP i pochodnych w świeżym mięsie.

Zasady systemu HACCP w przetwórstwie rybnym

MIROŚLAW MICHALSKI

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego,
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Producent jest odpowiedzialny za wytwarzanie bezpiecznej żywności. Zgodnie z przepisami musi on prowadzić ciągłą kontrolę wewnętrzną i jest zobowiązany do:

- a) przeprowadzenia analizy zagrożeń, identyfikacji Krytycznych Punktów Kontroli (CCP), analizy ryzyka i kontroli w Krytycznych Punktach Kontroli, z uwzględnieniem granicznych wartości krytycznych. Każdy etap procesu przetwórstwa ryb może być potencjalnie przyczyną powstania zagrożenia, a więc wartości graniczne nie mogą być przekroczone, począwszy od miejsca pozyskania surowca, kończąc na ekspedycji towaru i jego dystrybucji;
- b) wprowadzenia monitorowania zidentyfikowanych punktów krytycznych oraz określenia działań korygujących. Metody i sposób postępowania muszą być opracowane przez producenta w porozumieniu z władzami, które będą regularnie sprawdzać zgodność opracowanego teoretycznie programu z postępowaniem w praktyce;
- c) pobierania prób do badań, które wykonane powinny być w odpowiednim (a najlepiej np. w akredytowanym) laboratorium, w celu oceny skuteczności wszelkich zabiegów które są monitorowane;
- d) posiadania dokumentów zawierających informacje dotyczące ww. zagadnień i przedkładania ich na żądanie organów nadzoru sanitarnego; dokumenty należy przechowywać co najmniej przez 2 lata;
- e) informowania właściwego organu nadzoru o zagrożeniach wykrytych w trakcie badań laboratoryjnych;
- f) natychmiastowego wycofania z obiegu produktów rybnych stanowiących zagrożenie dla zdrowia i przedstawienia ich organom nadzoru w celu wydania decyzji co do

- dalszego z nim postępowania oraz natychmiastowego przerwania procesu produkcyjnego do chwili usunięcia zagrożenia;
- g) przestrzegania, by magazynowane surowce i produkty były, dla celów inspekcji, oznaczone przez producenta w trwały i czytelny sposób ze wskazaniem temperatur, w których towary muszą być składowane i transportowane;
 - h) zwiększenia świadomości pracowników poprzez szkolenia, obejmujące wymagania higieniczne. Wszyscy pracownicy operujący żywnością muszą być przeszkoleni. Szkolenia powinny być dokumentowane. Właściwe władze sanitarne muszą być włączone w planowanie i wdrażanie tego programu;
 - i) opracowania i stosowania programu mycia i odkażania obszaru zakładu, obiektów, pomieszczeń, urządzeń, naczyń, sprzętu, wyposażenia i personelu zatrudnionego; taki sformalizowany harmonogram dla wszystkich części zakładu, urządzeń oraz ich otoczenia powinien ustalać częstotliwość przeprowadzanych zabiegów w zależności od stopnia ryzyka, rodzaju stosowanych środków i sposobu monitorowania ich skuteczności. Harmonogramy powinny określać odpowiedzialnych za te zabiegi i rejestrację procesów;
 - j) opracowania i stosowania programu dezynsekcji i deratyzacji oraz programu eliminowania innych szkodników (ptactwa, psów, kotów itp.) na podobnych zasadach;
 - k) opracowania i przestrzegania programu nadzoru nad wodą;
 - l) domagania się od krajowych organów nadzoru by okresowo dokonywały oceny i analizy stanu faktycznego i sporządzały na tę okoliczność odpowiednie dokumenty - protokoły (Bykowski i inni, 2000, Rozp. UE 852/2004, UE 853/2004, 854/2004).

HACCP jest systemem zabezpieczenia jakości zdrowotnej produkowanych przetworów m. in. rybnych. Jest to system producenta, a nie weterynaryjny. System HACCP składa się z siedmiu podstawowych zasad:

Zasada 1.

Przeprowadzenie analizy zagrożeń związanych z produkcją i przetwórstwem ryb na wszystkich jej etapach oraz określeniem prawdopodobieństwa wystąpienia zagrożeń i opracowanie środków zapobiegawczych celem ich kontroli.

Zasada 2.

Określenie punktów krytycznych (CCP, KPK) tj. takich etapów produkcji, które są kluczowe dla bezpieczeństwa oferowanego produktu.

Zasada 3.

Określenie granicznych wartości krytycznych, a więc wartości minimalnych, na przykład wysokości temperatury obróbki cieplnej, czasu procesu technologicznego itp. gwarantujących kontrolę zagrożeń w przyjętych punktach krytycznych.

Zasada 4.

Ustanowienie i uruchomienie systemu monitoringu w krytycznych punktach kontrolnych. Prowadzenie regularnych obserwacji i pomiarów przyjętych wartości krytycznych.

Zasada 5.

Określenie działań naprawczych (korygujących) niezbędnych w przypadku, gdy monitoring wykaże, że dany CCP przekracza założone wartości graniczne.

Zasada 6.

Założenie i prowadzenie dokumentacji oraz systemu rejestracji danych wynikających z przyjętych zasad zakładowego systemu HACCP.

Zasada 7.

Ustanowienie procedur sprawdzających (weryfikacyjnych), łącznie z określeniem dodatkowych testów i procedur, których przeprowadzenie pozwoli uzyskać pewność, że system HACCP działa poprawnie (Dzwolak W., 2000; Kołożyn-Krajewska, 1999).

Poszczególne zasady HACCP przekładają się na ściśle określone etapy, które przedstawiają się następująco:

1. Określenie zadań do realizacji

W pierwszej kolejności należy określić zakres i harmonogram wdrażania systemu. Należy określić, czy badane czynniki zagrożeń będą natury biologicznej (np. mikroflora chorobotwórcza, saprofityczna), czy też fizycznej (obecność zanieczyszczeń technicznych itp.) lub ich kombinacji. Określamy, czy czynniki bakteryjne będą miały charakter bezpieczeństwa zdrowotnego lub ogólnie pojętej jakości mikrobiologicznej. Warto ustalić, czy kwestia bezpieczeństwa zdrowotnego rozciąga się aż do stołu konsumenta, czy też kończy się na etapie przekazania towaru do obrotu.

2. Utworzenie zespołu do spraw HACCP

Typowy zespół w zakładzie powinien składać się z 2 - 6 osób posiadających dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu, który będzie przedmiotem analiz. Kierownik takiego zespołu powinien być przeszkolony z zagadnień HACCP i posiadać dużą znajomość z tego zakresu.

3. Opis produktu / linii technologicznej

Obowiązuje jak najbardziej szczegółowy opis produktu i linii produkcyjnej. Opis powinien zawierać dane dotyczące składu produktu, procesu technologicznego, sposobu przechowywania, pakowania i dystrybucji.

4. Określenie przeznaczenia konsumenckiego

Należy zaznaczyć dla jakiej grupy konsumentów/odbiorców dany wyrób jest przeznaczony.

5. Przygotowanie schematu technologicznego

W tym opracowaniu należy zawrzeć elementy niezbędne do analizy zagrożeń, a więc skład surowcowy, sposób obróbki termicznej, rodzaj opakowania itp. W schemacie trzeba uwzględnić każdy etap produkcji, przetwarzania i dystrybucji. Określenie „etap” oznacza wszystkie surowce, operacje i procedury.

6. Weryfikacja schematu technologicznego

Opracowany schemat należy sprawdzić pod względem zgodności z procesem technologicznym. Weryfikację przeprowadzamy na podstawie obserwacji celem naniesienia ewentualnych poprawek do przygotowanego schematu.

7. Wyszczególnienie zagrożeń na każdym etapie i ustalenie środków zapobiegawczych

W celu eliminacji czynników zagrażających, zespół wdrażający sporządza listę spodziewanych zagrożeń natury biologicznej, chemicznej i fizycznej i ustalone są środki zapobiegawcze. Jeden środek zapobiegawczy może być wystarczający do eliminacji kilku zagrożeń. Czasami trzeba zastosować kilka środków zapobiegawczych, ażeby wyeliminować lub zredukować jedno zagrożenie.

8. Zastosowanie algorytmu (schematu decyzyjnego) dla określenia punktów krytycznych.

Ustalenie punktów krytycznych w systemie samokontroli znacznie ułatwia zastosowanie algorytmu dla uzyskania odpowiedzi na pytanie, czy rzeczywiście dany etap jest punktem krytycznym dla zidentyfikowanego uprzednio zagrożenia. Zasadą jest, że liczba ustalonych punktów krytycznych nie powinna być zbyt duża. Podejmowanie decyzji przy analizie CCP wygląda następująco: odpowiedzieć należy na każde postawione pytanie indywidualnie dla każdego etapu i dla każdego zidentyfikowanego zagrożenia.

Pytanie 1. Czy są środki zapobiegawcze w miejscu zagrożenia?

Jeśli nie ma, to czy jest konieczna kontrola zagrożenia na tym etapie? Jeśli nie jest konieczna oznacza to, że nie jest to CCP. Jeśli tak stawiamy następne pytanie.

Pytanie 2. Czy ten etap eliminuje lub redukuje zagrożenie do akceptowanego poziomu?

Jeśli eliminuje, to jest to CCP. Fakt ten zaznaczamy. Jeśli nie, stawiamy trzecie pytanie.

Pytanie 3. Czy może wystąpić zakażenie do nieakceptowanego poziomu bądź może nastąpić wzrost do nieakceptowanego poziomu? Jeśli nie może, to nie jest to CCP. Jeśli tak, to stawiamy pytanie czwarte.

Pytanie 4. Czy następny etap eliminuje lub redukuje zagrożenie do akceptowanego poziomu?

Jeśli tak, to nie jest CCP. Jeśli nie, to jest to CCP. Fakt ten również zaznaczamy

9. Ustalenie granicznych wartości krytycznych dla CCP.

Dla każdego środka zapobiegawczego powinny być określone limity krytyczne. Niekiedy są one ustalone urzędowo dyrektywami, normami itp., niekiedy parametry określa sam producent. Trzeba podkreślić, że wartości te muszą być wymierne i łatwo mierzalne, na przykład czas i temperatura obróbki cieplnej, zawartość wody, miano drobnoustrojów, odczyn pH itp.

10. Ustalenie systemu monitorowania poszczególnych punktów

W określonych punktach trzeba wykonywać zaplanowane pomiary i obserwacje porównując wyniki z wartościami przyjętych limitów krytycznych. Stosowane metody monitoringu powinny być szybkie, tanie i miarodajne, co pozwoli wykorzystywać je do bieżącego sterowania produkcją. Mogą być one prowadzone na linii technologicznej (pomiar czasu i temperatury) lub też w laboratorium (pH, zawartość wody, białka itp.) Prowadzenie monitoringu mikrobiologicznego nie jest już takie proste, wymaga dłuższego czasu oraz prowadzenia interpretacji wyników w odniesieniu do początkowego stanu mikrobiologicznego zakażenia. Wymaga się, aby wszystkie wyniki badań oraz dokumenty związane z monitorowaniem były podpisywane przez osobę wykonującą testy oraz przez bezpośredniego przełożonego.

11. Ustalenie zakresu i formy działań korygujących i naprawczych

W sytuacji, gdy okaże się, że ustalone wartości graniczne zostaną w danych punktach przekroczone bądź zarysowuje się taka tendencja, zespół winien wyszczególnić działania korygujące lub naprawcze. Niezastosowanie się do tego grozić może utratą kontroli nad procesem. Na tym etapie podać należy sposób postępowania z tymi partiami produktu, któ-

rych limity krytyczne zostały przekroczone lub kiedy powstały podczas procesu niekontrolowanego (nagła awaria). Wszystkie czynności muszą być dokładnie opisane w prowadzonej dokumentacji.

12. Założenie dokumentacji

Jednym z ważniejszych zagadnień systemu HACCP jest należyta rejestracja wyników oraz prowadzenie dokumentacji związanej z prowadzonymi procedurami. Zapisy winny podawać dane dotyczące jakości, źródła pochodzenia i charakteru surowców. Ponadto powinno się podać charakterystykę procesów, dane na temat sposobu mycia i odkażania, decyzje wydawane w związku z bezpieczeństwem produktu, wprowadzone modyfikacje w systemie itp. (Dzwolak W., 2000).

13. Ustalenie procedur weryfikujących

Weryfikacja ma odpowiedzieć na pytanie, czy system HACCP działa poprawnie, czy dotychczasowy system wciąż jest odpowiedni dla istniejących zagrożeń i, czy zastosowane metody monitorujące i czynności naprawcze są właściwie stosowane. W procedurach można korzystać z metod stosowanych w monitoringu, szczegółowych badań mikrobiologicznych pobranych losowo próbek półproduktów i wyrobów gotowych, bardziej czułych niż stosowane dotychczas metod aparaturowych.

Zasadniczym celem systemu samokontroli jest skupienie się na kontroli zagrożeń w wyznaczonych punktach. Wdrożenie zasad wymaga wykonania w logicznej kolejności szeregu czynności, które w końcowym efekcie złożą się na program HACCP. Najważniejszy jest nadzór nad uprzednio wyznaczonymi punktami krytycznymi. Krytyczne Punkty Kontrolne rozpatruje się w czterech aspektach, a mianowicie:

- zapobieganie wystąpienia zagrożenia poprzez analizę zagrożeń i ocenę ryzyka,
- zapobieganie pogłębianiu się zagrożenia poprzez identyfikację CCP i ustalenie procedur monitorowania, redukcowanie zagrożenia działaniami korygującymi, eliminowanie zagrożenia.

Zagrożenia są czynnikami natury fizycznej, chemicznej lub mogącymi spowodować, że środek spożywczy będzie niebezpieczny dla konsumenta.

zagrożenia fizyczne: ciała obce, zanieczyszczenia techniczne, technologiczne, przypadkowe i temu podobne,

zagrożenia chemiczne: skażenie metalami ciężkimi, toksyny, pozostałości szkodliwych związków chemicznych, leków, substancji jonizujących i temu podobne,

zagrożenia biologiczne: bakterie, przetrwalniki, toksyny bakteryjne, pasożyty i produkty ich przemiany materii i temu podobne, z trzema rodzajami uwzględniającymi etapy zakażenia, rozwoju i przetrwania.

Zagrożenia fizyczne mogą być spowodowane przez maszyny, których konstrukcja umożliwia przedostawanie się do żywności, na przykład: smarów, rdzy, odłamków metalowych; pakowanie żywności do uszkodzonych materiałów pakunkowych; odłamki szklane; wprowadzone celowo lub przez nieuwagę przez człowieka zanieczyszczając produkty na przykład niedopałki, guma do żucia itp.; owady lub inne szkodniki, które mogą być obecne w surowcach lub trafiać do żywności w trakcie przetwórstwa; środki czyszczące i części sprzętu czyszczącego - włosie szczotek, kawałki gąbek, ścierek itp.; woda pozostawiająca plamy i osad, nie wspominając o celowym zanieczyszczeniu produktu w trakcie działań sabotażowych.

Zagrożenia chemiczne mogą powodować pozostałości po czynnościach mycia, a szczególnie odkazania; pestycydy obecne w surowcach; alergeny; histamina i tyramina; metale toksyczne dostające się do żywności bezpośrednio poprzez kontakt z niedozwolonymi powierzchniami lub pośrednio poprzez skażenie środowiska, gleby, sprzętu i wody przez związki chemiczne stosowane do gruntu w miejscach hodowli; pozostałości leków, hormonów stosowanych jako stymulatory wzrostu i wiele innych jeszcze czynników.

Źródłem zagrożeń mikrobiologicznych (biologicznych) może być bardzo wiele czynników: sam człowiek poprzez siewstwo drobnoustrojów chorobotwórczych przy jednoczesnym nie zachowywaniu elementarnych zasad higieny, zakażona odzież robocza pracowników, złe nawyki personelu; surowce pozyskiwane lub dostarczane do zakładu, które mogą być zakażone lub zawierać toksyny pochodzenia mikrobiologicznego; powierzchnie robocze sprzętu i narzędzi kontaktujące się z nieopakowaną żywnością; szkodniki roznoszące mikroorganizmy; woda niewłaściwej jakości; otoczenie, wadliwe systemy wentylacyjne lub źle rozwiązane ciągi transportowe; obecność drewna przy produkcji i uszkodzenia powierzchni dające możliwość rozwojowi bakterii i pleśni; zakażone powietrze przedostające się z „brudnych” części zakładu i wiele jeszcze innych czynników (Bykowski i inni, 2001, Kołożyn-Krajewska, 1999).

Analiza zagrożeń jest systemem zapobiegawczym składającym odpowiedzialność bezpiecznej produkcji żywności w ręce producenta.

Mimo uniwersalności systemu nadmienić trzeba, że krytyczne punkty kontroli odnoszą się wyłącznie do konkretnego procesu technologicznego w danym zakładzie. Każdy etap produkcji musi być badany i analizowany oddzielnie, jednakże w powiązaniu z całym procesem produkcyjnym. Ani systemu, ani samych punktów krytycznych nie można przenosić z jednego procesu na inny, nawet jeżeli wykazują one znaczne podobieństwo. Z tego też powodu również procedury kontroli i monitoringu CCP są specyficzne dla danego zakładu. Analizie tej powinna towarzyszyć ocena istotności (ważności) każdego ze wskazanych zagrożeń oraz przewidywanego ich wpływu na jakość zdrowotną produktu końcowego. Analizy sytuacji dokonuje się w sposób ciągły, nieprzerwanie ją dokumentując.

KORZYŚCI Z ZASTOSOWANIA SYSTEMU HACCP

HACCP obejmuje wszystkie etapy produkcji i obrotu rybami, przesuwa miejsce kontroli z produktu końcowego na wcześniejsze etapy produkcji. Umożliwia określenie wszystkich możliwych do przewidzenia zagrożeń tj. tych faktycznie występujących i tych, które mogą potencjalnie zaistnieć. System pozwala skoncentrować uwagę i środki na istotne punkty oraz eliminuje w bardzo dużym stopniu badania niszczące produkt gotowy. Gromadzone dane uzupełniają inne systemy kontroli jakości i pomagają lepiej analizować system produkcji. Jasno sprecyzowane zasady kontroli wewnętrznej zwiększają zaufanie do producenta i stanowią istotny element w walce o rynek zbytu (Kołożyn-Krajewska, 1999). System HACCP wpływa na polepszenie stosunków między producentem a nadzorem i w końcu, co najważniejsze, zapewnia uzyskanie większego poziomu bezpieczeństwa żywności. Kompetentni urzędnicy w trakcie wizyt, przed weryfikacją zakładów, będą zwracali szczególną uwagę na funkcjonowanie zakładowego systemu samokontroli, ze szczególnym uwzględnieniem krytycznych punktów kontroli, oraz na czytelność i skuteczność monitorowania CCP. Jeżeli w czasie kontroli, kompetentni urzędnicy państwowi stwierdzą, że występuje niezgodność z wymaganymi warunkami lub stan stwierdzony może stworzyć ryzyko dla bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych, zmuszeni będą przepisami, do przedsięwzięcia odpowiednich środków restrykcyjnych, które mogą obejmować zawieszenie lub cofnięcie uprawnień do handlu, nakaz zniszczenia artykułów kwestionowanych, a nawet zamknięcie zakładu lub jego części na ściśle określony czas.

Piśmiennictwo

- 1. Bykowski P.J., Kołodziej K., Hillar J.: Zasady dobrej praktyki produkcyjnej w przemyśle rybnym.”Fapa, Olsztyn 2001**

2. Dzwolak W., Ziajka S.: Dokumentowanie systemu HACCP w przemyśle spożywczym. Masterpress, Olsztyn 2000
3. Kołożyn-Krajewska D., Sikora T.: Koncepcja zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Wydawnictwo SIT NOT, Warszawa 1999
4. **ROZPORZĄDZENIE (WE) nr 852/2004 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY** z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych
5. **ROZPORZĄDZENIE (WE) nr 853/2004 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY** z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego
6. **ROZPORZĄDZENIE (WE) nr 854/2004 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY** z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi

WPLYW WARUNKÓW HODOWLI NA BEZPIECZEŃSTWO ZDROWOTNE RYB PRZEZNACZONYCH DO KONSUMPCJI

JAN ŻELAZNY

**Zakład Chorób Ryb
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu
Badawczego
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy**

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój akwakultury. Przyrost produkcji ryb, mięczaków i skorupiaków sięga 9% rocznie; dla porównania przyrost produkcji innych gatunków zwierząt wynosi 2,5% rocznie (Pejsak, Żmudziński, 2007). Według przewidywań, konsumpcja ryb hodowanych w warunkach kontrolowanych (akwakultury) przerośnie po 2010 roku spożycie ryb odławianych z łowisk naturalnych. Ten wzrost produkcji osiągany jest głównie poprzez intensyfikację hodowli, a jedynie w stosunkowo małym stopniu poprzez powiększanie arealu stawów lub innych zbiorników wodnych. Intensyfikacja hodowli ryb ma jednak niewątpliwy wpływ na jakość i bezpieczeństwo produktu żywnościowego jakim są ryby, co przede wszystkim w praktyce wyraża się lub wiąże się z:

- stanem zdrowotnym ryb
- jakością paszy dla ryb
- jakością wody w stawach lub innych zbiornikach wodnych
- kontaktem z człowiekiem podczas przetwarzania ryb
- możliwością nosicielstwa pasożytów człowieka przez ryby.

Zagadnienia te były od wielu lat przedmiotem zainteresowania i specjalistycznego nadzoru, obecnie używa się określenia „urzędowej kontroli”, odpowiednich służb weterynaryjnych. W ostatnich latach nabrały one jednak szczególnie dużego znaczenia, ze względu na dokonywaną aktualizację przepisów z zakresu warunków zdrowotnych żywności oraz konieczność dostosowania działań w tej dziedzinie i regulacji prawnych do wymagań weterynaryjnych Unii Europejskiej, które są zawarte głównie w dyrektywach 91/493 EEC, 91/67 EEC, 93/54 EEC, 95/22 EEC, 97/79 EEC oraz 98/45 EEC.

Polska, jak każdy przystępujący do Unii Europejskiej kraj, jest zobowiązana do przyjęcia całego dorobku prawnego Unii. Dotyczy to oczywiście regulacji prawnych z dziedziny ochrony zdrowia ryb oraz warunków ich hodowli mających niewątpliwie istotny wpływ na jakość i bezpieczeństwo zdrowotne ryb przeznaczonych do konsumpcji, ich przetwórstwa i obrotu handlowego (Bykowski, 2004).

Wprowadzenie na rynek UE ryb i przetworów rybnych wymaga spełnienia następujących warunków (dyrektywa Rady 91/67 EEC, 1991; ustawa z 11.03.2004 r.; rozporządzenie MRiRW z 22.06.2004 r.):

1. Ryby nie mogą wykazywać żadnych objawów klinicznych choroby w dniu załadunku.
2. Transport ryb do miejsca przeznaczenia powinien odbywać się w możliwie najkrótszym czasie, przy użyciu środków transportu, które zostały uprzednio odpowiednio oczyszczone i wydezynfekowane przy zastosowaniu środka odkażającego zarejestrowanego w danym kraju (w Polsce jest to dokonywane przez Urząd Rejestracji Leków i Środków Farmaceutycznych).
3. Pojazdy powinny być tak zaprojektowane, aby w czasie transportu woda nie mogła wydostawać się na jezdnię.
4. Wymiana wody w czasie transportu może odbywać się jedynie w obiektach zatwierdzonych przez państwa członkowskie Unii i musi spełniać następujące warunki:
 - a/ posiadać właściwości, które nie zmienią stanu zdrowotnego transportowanych ryb przez kontakt z czynnikami chorobotwórczymi wymienionymi w punkcie 2 niniejszego opracowania,
 - b/ odprowadzenie wody ze środka transportu nie spowoduje zakażenia środowiska oraz nie przedostanie się bezpośrednio do cieku wodnego, morza lub oceanu.
5. Wykaz miejsc, w których jest możliwa wymiana wody spełniająca warunki podane powyżej, powinien być zgłoszony przez każde spośród państw członkowskich do Komisji Weterynaryjnej Wspólnoty, która przekaże uzyskane informacje pozostałym krajom.

Bardzo ważną sprawą w obrocie handlowym ryb jest uzyskanie przez hodowcę statusu tzw. lądowej strefy zatwierdzonej (dyrektywa Rady 91/67 EEC, 1991; ustawa z 11.03.2004 r.; rozporządzenie MRiRW, 2004), która składa się z terytorium

obejmującego całkowity obszar zlewni od źródeł aż po ujście jednego ciek w wodnego lub części zlewni rozpoczynającej się od źródeł ciek w wodnego, a kończącej się w miejscu zlokalizowania naturalnych lub sztucznych barier zapobiegających wędrówce ryb. Wielkość i położenie geograficzne tej strefy muszą sprzyjać ograniczeniu do minimum możliwości ponownego zakażenia ciek w wodnego, np. poprzez wędrówkę ryb. Nadzór weterynaryjny nad strefą zatwierdzoną powinien obejmować hodowlę, przetrzymywanie i poławianie ryb.

W celu uzyskania statusu strefy zatwierdzonej odpowiednie urzędy państw członkowskich powinny przedłożyć Komisji Weterynaryjnej Wspólnoty następujące dane świadczące o tym, że:

1. W ciągu ostatnich czterech lat ryby w danej strefie (a nie tylko w gospodarstwie) nie wykazują objawów chorób podlegających obowiązkowi zwalczania.
2. Wszystkie gospodarstwa w strefie lądowej znajdują się pod nadzorem Inspekcji Weterynaryjnej, która na przestrzeni przynajmniej czterech lat przeprowadziła dwie kontrole stanu zdrowia rocznie. Kontrole te powinny być przeprowadzone w porze roku i temperaturze wody sprzyjających rozwojowi tych chorób.
3. Wyniki badań laboratoryjnych, pobieranych podczas kontroli stanu zdrowotnego, stwierdzają brak patogenów tych chorób.
4. Do badania należy pobierać ryby wykazujące jakiegokolwiek anomalie lub losowo, o ile nie stwierdzono ryb z objawami chorobowymi. Pobrane próby ryb powinny zostać jak najszybciej przekazane do specjalistycznego badania laboratoryjnego Inspekcji Weterynaryjnej, celem stwierdzenia lub wykluczenia obecności patogenów tych chorób.

Akty prawne określające warunki zdrowotne, decydujące o umieszczeniu na rynku ryb i przetworów rybnych pochodzących z tzw. kultur wodnych, określają ponadto jeszcze inne działania i konieczne dokumenty, a mianowicie rodzaj i okoliczności inspekcji dokonywanych przez ekspertów weterynaryjnych Wspólnoty, wzory dokumentów przewozowych dla żywych ryb, ich jaj i gamet pochodzących ze strefy zatwierdzonej lub z gospodarstwa zatwierdzonego strefy nie zatwierdzonej, czas rozpatrywania, konsultacji i odwołań dotyczący złożonych do Komisji Weterynaryjnej Wspólnoty wniosków o przyznanie strefy lub gospodarstwa zatwierdzonego oraz sposób realizacji przez państwa członkowskie programu dochodzenia do pełnej kontroli stanu

zdrowotnego ryb przez Inspekcję Weterynaryjną (dyrektywa Rady 91/67 EEC, 1991; ustawa z 11.03.2004 r.; rozporządzenie MRiRW z 22.06.2004 r.).

Stan zdrowotny ryb

Według dyrektywy Rady 91/67 EEC z 28 stycznia 1991 r. oraz ustawy z 11 marca 2004 r. ryby w dniu załadunku nie mogą wykazywać żadnych objawów klinicznych choroby. Jest to warunek nie budzący żadnych wątpliwości, bowiem choroby ryb słodkowodnych zarówno tła zakaźnego, jak i powodowane przez pasożyty (Antychowicz, 1996; Antychowicz, 2004; Kocyłowski, 1960; Prost, 1994; Żelazny, 2002 a), podobnie jak to ma miejsce u innych zwierząt, zmieniają na niekorzyść walory smakowe lub jakość mięsa, przyczyniając się przy tym do wystąpienia tzw. odrażającego wyglądu. Zaznaczam przy tym, że chodzi tu o choroby, które nie są zoonozami i nie przenoszą się na człowieka. Mają one jednak niewątpliwie ujemny wpływ na jakość i wartość spożywczą mięsa, skóry i wątrób. Biorąc pod uwagę obecną sytuację epizotologiczną zakaźnych chorób ryb w Polsce dotyczy to przede wszystkim:

- zakaźnej anemii łososia – ISA (obrzęk i przekrwienie wątroby i śledziony, zmiany zwyrodnieniowe w wątrobie, wybroczyny w otrzewnej – w Polsce dotychczas nie notowana),
- zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych - IHN (zmiany zwyrodnieniowe w wątrobie, nerkach i śledzionie - w Polsce dotychczas stwierdzono jedynie jedno ognisko choroby, w 1999 roku),
- infekcji KHV (przekrwienie skóry i skrzel, martwica skóry i skrzel, twardniejące naloty śluzu na skórze),
- wirusowej krwotocznej posocznicy ryb łososiowatych – VHS i wiosennej wiremii karpia - SVC (naciek mięśni i skóry płynem wysiękowym, obrzęk brzucha, wysadzenie galek ocznych, nastroszenie łusek, wybroczyny oraz przekrwienia w mięśniach i na skórze, wtórnie zakażenia głównie bakteriami z rodzaju *Aeromonas* i *Pseudomonas* narządów wewnętrznych, mięśni i powłok zewnętrznych - w Polsce przez wiele lat bardzo rzadko występowały, ostatnio zanotowano gwałtowny wzrost liczby przypadków wirusowej posocznicy krwotocznej),
- zakaźnej martwicy trzustki - IPN (pociemnienie skóry, rozdzęcie powłok zewnętrznych, wysadzenie galek ocznych i odbytu – martwica trzustki - w Polsce ostatnio coraz częściej notowana),

- ospy karpia (białawe guzki na skórze ryb, które potem powiększają się tworząc różnej wielkości naloty mocno przytwierdzone do powłok zewnętrznych - w Polsce rzadko występuje),
- wrzodzienicy lososiovatych (wybroczyny na skórze, guzowate obrzęki na powłokach zewnętrznych ryb, przechodzące w ropnie i owrzodzenia obejmujące swym zasięgiem skórę i mięśnie - w Polsce jest rzadko notowana),
- erythrodermatitis karpia i ryb z rodziny karpiovatych (owrzodzenia obejmujące skórę i mięśnie, które następnie perforują do jamy ciała lub rozlewają się na znaczną część powłok zewnętrznych, odsłaniając często kośćce ryby - stosunkowo często występuje w Polsce),
- flawobakteriozy – dawniej fleksibakteriozy (ogniska martwicy skóry i skrzelii, ogniskowe silne naloty śluzu, martwica końców pletw, zmiany zwyrodnieniowe w mięśniach – ostatnio często notowana u karpia i pstrągów tęczowych w Polsce),
- posocznicy MAS (wysadzenie galek ocznych, nastroszenie łusek, płyn surowiczy lub surowiczo-ropny w torebce łuski i jamie ciała - występuje u karpia w Polsce, głównie na wiosnę),
- wibriozy (wybroczyny na skórze u podstawy pletw, rozległe, silne przekrwienia skóry, pociemnienie skóry, owrzodzenia skóry i mięśni - występuje rzadko u ryb lososiovatych w Polsce),
- bakteryjnej choroby nerek ryb lososiovatych - BKD (ogniska przekrwienia w mięśniach szkieletowych, w których następnie rozwija się martwica i powstają ogniskowe ubytki mięśni, zwane kawernami - występuje bardzo rzadko u ryb lososiovatych w Polsce),
- jersiniozy (wybroczyny na skórze w okolicy jamy gębowej i u nasady pletw, przekrwienie i martwicze ubytki mięśni - ostatnio notuje się u ryb lososiovatych w Polsce),
- edwardsiellozy (wybroczyny na skórze w okolicy głowy, wysadzenie galek ocznych, owrzodzenia na głowie - w Polsce pierwsze przypadki zanotowano u karpia i pstrąga tęczowego),
- mykobakteriozy suma afrykańskiego (guzki gruźlicze w wątrobie – od 3 lat występuje sporadycznie w Polsce u suma afrykańskiego).

Spośród wielu chorób powodowanych przez pasożyty, zasługują na uwagę przy ocenie przydatności do spożycia:

- ichtioftirioza (zwiększona znacznie ilość śluzu, uszkodzenie naskórka, stany zapalne powierzchniowych warstw skóry - u wszystkich gatunków ryb w Polsce),
- chilodonoza i gyrodaktyloza (zwiększona znacznie ilość śluzu w postaci niebieskawoszarych nalotów, przekrwienia i płytkie ubytki skóry - u wszystkich gatunków ryb w Polsce),
- botriocefaloza, kawioza i kariofiloza (widoczne podczas obróbki ryb tasiemce długości 2-28 cm w przewodzie pokarmowym - często u ryb karpiowatych w Polsce),
- filometroidoza (ogniska przekrwienia na skórze ryb, widoczne podczas obróbki ryb samice nicienia długości do 8 cm - obecnie sporadycznie u karpia w Polsce),
- pijawczyca, arguloza i lerneozza (widoczne na skórze ryb pasożyty długości lub średnicy 0,5-4 cm, ogniska depigmentacji lub przekrwienia skóry - często u ryb w Polsce, szczególnie pijawczyca).

Spośród chorób grzybiczych istotne znaczenie dla przydatności ryb do spożycia ma jedynie pleśniawka, która jest powodowana przez chorobotwórcze grzyby z rodzaju *Saprolegnia* i *Achlya*, które atakują uszkodzoną mechanicznie, chemicznie lub w wyniku infekcji bakteryjnych skórę. W dalszym przebiegu strzępki grzybów wrastają w mięśnie, uszkadzając je oraz czyniąc rybę nieatrakcyjną do spożycia. Choroba dosyć często notowana w naszym kraju, chociaż ostatnio obserwuje się spadek liczby przypadków.

Mniejsze znaczenie ma branchiomykoza, w przebiegu której powstają wylewy krwawe i martwica skrzelii.

Przedstawiony stan rzeczy wykazuje zatem w sposób nie podlegający dyskusji, potrzebę stałego udziału specjalistycznej służby weterynaryjnej w procesie hodowli ryb słodkowodnych, aby do minimum ograniczyć występowanie chorób u tych zwierząt i bez obaw wchodzić z nimi na rynek krajowy oraz na teren innych państw, w tym szczególnie Unii Europejskiej. Tylko lekarz weterynarii - ichtiopatolog może skutecznie zapobiegać lub zwalczać choroby ryb poprzez właściwie prowadzoną terapię oraz unikanie lub ograniczanie skutków działania czynników usposabiających do wystąpienia tych chorób, mających z reguły ścisły związek z tzw. warunkami hodowli.

Jakość paszy

Karp jest rybą hodowaną najczęściej w stawach gwarantujących warunki zbliżone do środowiska naturalnego. Umożliwiają one wytworzenie pokarmu naturalnego ryb, stanowiącego istotny element żywienia uzupełniany przez hodowcę najczęściej paszami zbożowymi lub granulataми wprowadzanymi z zewnątrz. Pokarm naturalny karpi stanowią dafnie, oczliki, wrotki, małe ślimaki, małże, nasiona roślin itp. Karpie tak się odżywiające pobierają nie tylko składniki pokarmowe, ale niezbędne do ich życia witaminy i sole mineralne. Chcąc zwiększyć bazę pokarmową karpi, a w konsekwencji osiągnięcie odpowiedniej masy jednostkowej, karpie dokarmia się ziarnem zbóż (jęczmień, pszenica, pszenżyto, kukurydza, rzadziej inne) oraz paszami granulowanymi, które uzupełniają niedobory białka w ich organizmie (Szczerbowski, 2006).

Inne, stosunkowo często hodowane w stawach ryby z rodziny karpiowatych, takie jak amur biały, tołpyga biała i tołpyga pstra, jako pokarmu naturalnego używają roślinność wodną. Stąd zwane są one rybami roślinożernymi. Ryby te zużywają około 50 kg roślinności wodnej na zwiększenie swojej masy ciała o 1 kg (Antalfi, Tolg, 1975; Szczerbowski, 2006).

Żywienie pstrągów i innych ryb z rodziny lososiowatych odbywa się przy użyciu pasz świeżych (mokrych) składających się z ryb małowartościowych lub odpadów rzeźnych zwierząt stałocieplnych, albo też mieszanek suchych, granulowanych, sporządzonych najczęściej i głównie z ryb morskich. Aktualnie pstrągi i inne ryby z rodziny lososiowatych karmi się najczęściej suchymi mieszankami granulowanymi (Szczerbowski, 2006).

Jeżeli chodzi o zagrożenia dla zdrowia konsumenta ze strony złych jakościowo pasz, używanych do karmienia ryb, to jest ono nieistotne, bowiem w Polsce używa się do tego celu głównie dobrej jakości zboża dla karpi, a dla pstrągów dobre jakościowo pasze granulowane produkcji duńskiej, norweskiej, a ostatnio również polskiej, które posiadają atesty niezbędne w krajach Unii Europejskiej, a świadczące o kontroli jakości tej paszy. Poza tym w naszym kraju prowadzone są regularne badania kontrolne jakości pasz, w miejscu ich dystrybucji i stosowania, z uwagi na fakt, że mogą one być czasami przechowywane w złych warunkach i mogą wówczas zawierać aflatoksyny lub inne zanieczyszczenia, natomiast pasze granulowane mogą mieć dodawane stymulatory wzrostu lub inne substancje niepożądane, a będąca w ich składzie mączka rybna może zawierać nadmierne ilości niektórych metali ciężkich np. arsenu lub rtęci. Zagadnienia

te są szczegółowo określone w wielu polskich aktach prawnych (ustawa z 22.07.2006 r.; rozporządzenie MRiRW z 11.12.2006 r.; rozporządzenie MRiRW z 23.01.2007 r.; rozporządzenie MRiRW z 14.12.2006 i inne), które są wprowadzone w życie, a odpowiednie służby pełnią stały nadzór nad ich właściwym stosowaniem. Absurdem wydaje się być jednak dodawanie do paszy ryb substancji, które zmieniają barwę mięśni ryb na bardziej atrakcyjną dla klienta, jak ma to miejsce w przypadku lososia norweskiego; w przypadku dodania do paszy astaksantyny barwa mięsa tej ryby staje się koloru intensywnie lososiwatego (Goryczko, 1998). W żywieniu karpia, pstrąga i innych ryb hodowanych w Polsce nie ma to miejsca.

Zanieczyszczenie środowiska wodnego

Istotne znaczenie dla jakości produktu spożywczego jakimi są ryby ma stan środowiska wodnego. W Polsce jest pod tym względem dość dobra sytuacja, bowiem nadmiernemu zanieczyszczeniu ulegają głównie duże rzeki, natomiast obiekty hodowli stawowej karpia lub pstrąga są z reguły zlokalizowane na małych ciekach wodnych, które są najczęściej zbyt małe by wykorzystywać ich wody na potrzeby dużego zakładu przemysłowego. Stwierdzane zanieczyszczenia takich wód pochodzą najczęściej z przemysłu rolnego (mleczarnie, krochmalnie, rzeźnie, masarnie, cukrownie itp.), który nie emituje trucizn do środowiska, a jedynie substancje organiczne, które stosunkowo łatwo ulegają rozkładowi gnilnemu lub służą eutrofizacji wody, czyli zwiększeniu ilości pokarmu naturalnego (Żelazny, 2002; Żelazny, 2003). Potwierdzają to prowadzone od kilku lat badania monitoringowe pozostałości pestycydów, polichlorowanych bifenyli i metali ciężkich, które nie wykazują bardzo wysokich stężeń w tkankach ryb słodkowodnych. Spośród hodowanych w Polsce ryb najniższe stężenia wyżej wymienionych pozostałości są u karpia i innych ryb z rodziny karpiowatych (amur biały, tołpyga biała, tołpyga pstra, lin, karaś pospolity, karaś srebrzysty). Na przykład zawartość polichlorowanych bifenyli (PCB) u karpia wynosi ok. 0,092 mg/kg tłuszczu mięśni, podczas gdy u ryb drapieżnych: pstrąg - 1,74 mg/kg, okoń - 1,58 mg/kg, sandacz - 1,39 mg/kg (Niewiadomska, 1988). Należy przy tym zaznaczyć, że zawartość PCB w mięśniach ryb słodkowodnych spada i na przykład u pstrągów, w badaniach prowadzonych w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach w latach 2001-2003, wynosiła 0,149-0,427 mg/kg tłuszczu mięśni (Niewiadomska, 2007), podczas gdy w 1983 roku stwierdzano 1,58 mg/kg (Niewiadomska, 1988). Również niskie wartości stwierdzano w przypadku innych

wskaźników skażenia mięśni ryb słodkowodnych. Poziom skażenia heksachlorobenzenem (HCB) w latach 1995-2003 kształtował się na poziomie 0-0,004 mg/kg tłuszczu mięśni karpia i 0-0,014 mg/kg tłuszczu mięśni pstrągów. Poziom skażenia heksachlorocykloheksanem (HCH) kształtował się w tych latach na poziomie 0-0,022 mg/kg tłuszczu mięśni karpia i 0-0,018 mg/kg tłuszczu mięśni pstrągów (Niewiadowska, 2007). Zwraca ponadto uwagę nieco podwyższona ilość kadmu u ryb w rejonie północno-wschodnim Polski, gdzie ok. 10% prób ryb stwierdzano nieznaczne podwyższenie poziomu tego pierwiastka w mięśniach, który średnio wynosił 0,007 mg/kg, a jedynie w dwu próbkach na sto zbadanych stwierdzono ponad 0,05 mg/kg, to jest powyżej wielkości dopuszczalnej w Polsce i innych krajach Unii Europejskiej. Wartości rtęci, arsenu, cynku, żelaza i miedzi były znacznie poniżej dopuszczalnych limitów (Żmudzki i in., 2001). Względnie niskie stężenia pierwiastków toksycznych w tkankach ryb świadczą o tym, że krajowe ryby hodowlane nie są istotnym źródłem zagrożenia konsumenta metalami ciężkimi.

Promieniotwórczość ryb w Polsce była bardzo niska i wynosiła średnio według CLOR-u w latach 1986-1995 od 2,7 do 6,3 Bq/kg⁻¹ (przy dopuszczalnej dawce dla żywności zwierzęcego pochodzenia 600 Bq/kg⁻¹). Jedynie w rejonie śląskim stwierdzano w tym okresie 78,85 - 98,35 Bq/kg⁻¹. Pomimo tego, odnosząc te wyniki do dopuszczalnych w świecie, można stwierdzić, że ryby słodkowodne hodowane w Polsce nie stanowią zagrożenia dla konsumenta (Kossakowski, 1995).

Przedstawione powyżej dane wskazują na bardzo niski poziom zanieczyszczenia ściekami pochodzenia przemysłowego i rolniczego wód, w których hoduje się w Polsce ryby słodkowodne. Problemem jednak są nieoczyszczone lub niedostatecznie oczyszczone ścieki komunalne oraz ścieki z mleczarni, cukrowni, gorzelnii, obór i chlewni, które przyczyniają się do nadmiernej eutrofizacji wód oraz rozwoju flory bakteryjnej typowej i nietypowej dla wód powierzchniowych (Antychowicz, Lipiec, 2006; Guziur i in., 2001; Kozińska, 2002; Prost, 1977; Report of Joint FAO/NACA/WHO, 1999; Żelazny, 2002 b; Żelazny, 2003). W konsekwencji stwierdza się wówczas u ryb w przewodzie pokarmowym lub na powłokach zewnętrznych takie drobnoustroje jak:

- *Salmonella paratyphi* A
- *S. paratyphi* B
- *S. suipestifer*
- *S. enteritidis* Gärtneri

- *Escherichia coli*
- *Clostridium botulinum* typ E
- *Clostridium tytani*
- *Staphylococcus* sp. (głównie zakażenia ryb spowodowane przez ludzi nosicieli zarazka)
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- *Edwardsiella tarda*
- *Serratia liquefaciens*
- *Shigella sonnei*
- *Shigella dysenteriae*
- *Citrobacter freundii*
- *Mycobacterium* sp. (różne, nierozstrzygnięte ostatecznie są opinie na ten temat).

Przedstawiony wykaz gatunków bakterii zdecydowanie zaprzecza dość powszechnej opinii iż „mięso świeżo złowionej ryby jest jałowe”. Należy też w tym miejscu podkreślić, że u ryb w czasie ich przechowywania w stanie niezamrożonym następuje bardzo szybki rozwój bakterii, głównie na powłokach zewnętrznych i w przewodzie pokarmowym. Wzrost ten jest szczególnie wysoki u chorych ryb, co potwierdza dodatkowo zasadę, że takie ryby nie mogą być przeznaczane do przetwórstwa, czy bezpośredniej konsumpcji.

Zakażenie bakteriami ryb żywych może niekiedy dotyczyć całej tuszki w wyniku przedostania się bakterii do krwi, narządów wewnętrznych i mięśni, co ma miejsce przy działaniu silnego czynnika immunosupresyjnego w ich organizmie, np. deficyt tlenu w wodzie stawowej lub w basenie podczas transportu, gwałtowna zmiana temperatury wody (powyżej 4°C podczas obrotu handlowego żywych ryb, niepełnowartościowy pokarm lub głodowanie ryb. Bakterie te pochodzą wówczas z reguły z powłok zewnętrznych ryby lub z jej przewodu pokarmowego.

Należy przy tym nadmienić, że naturalny sposób żerowania karpia i innych ryb z rodziny karpowatych polega na poszukiwaniu pokarmu w dnie zbiornika wodnego, czyli w osadach dennych zawierających między innymi odchody ryb oraz różnego pochodzenia ulegające rozkładowi gnilnemu substancje organiczne, które mogą stanowić doskonałą pożywkę do gromadzenia się, a nawet rozwoju bakterii chorobotwórczych dla człowieka. Bakterie te mogą zainfekować, podczas żerowania ryb, przewód pokarmowy, powłoki zewnętrzne lub skrzela tych organizmów wodnych.

Kontakt z człowiekiem

Tak, jak ma to miejsce z każdym produktem żywnościowym podlegającym przetwarzaniu, kontakt ryby jako podmiotu spożywczego z człowiekiem będącym

nosicielem patogennych drobnoustrojów, może doprowadzić do skażenia tej żywności. Postępowanie mające na celu uniknięcie tych zagrożeń jest precyzyjnie uregulowane poprzez stosowne badania zdrowia pracowników mających kontakt w różnych etapach procesu przetwarzania, co wynika z obowiązujących unormowań prawnych w naszym kraju.

Możliwość nosicielstwa pasożytów człowieka

Spośród bardzo dużej liczby pasożytów ryb hodowlanych tylko nieliczne są niebezpieczne dla człowieka. Są to następujące przywry, tasiemce lub nicienie (Prost, 1977; Prost, 1994; Radkowski i in., 1997):

- *Opistorchis felineus* (ryba jest żywicielem pośrednim, człowiek i świnia ostatecznym), występuje w Polsce, ale bardzo rzadko,
- *Opistorchis sinensis* (ryba jest żywicielem pośrednim, człowiek ostatecznym),
- *Echinochasmus perfoliatus* (ryba jest żywicielem pośrednim, a pies, kot, świnia i rzadko człowiek - ostatecznym),
- *Euparyphium melis* (ryba jest żywicielem pośrednim, a ssaki, gryzonie lub rzadko człowiek - ostatecznym),
- *Metagonimus yokogawai* (ryby karpowate i lososiowate są żywicielem pośrednim, a człowiek, świnia i zwierzęta mięsożerne ostatecznym),
- *Pseudamphistomum truncatum* (ryby karpowate są żywicielem pośrednim, a człowiek i ssaki mięsożerne ostatecznym),
- *Rossicotrema donicum* (różne gatunki ryb są żywicielem pośrednim, a ptaki i rzadko człowiek - ostatecznym),
- *Nanophyetus salmincola* (ryby lososiowate są żywicielem pośrednim, a ssaki mięsożerne lub człowiek ostatecznym),
- *Diphyllbothrium latum* (ryby drapieżne są żywicielem pośrednim, a człowiek, pies, kot, lis lub świnia ostatecznym), występuje w Polsce, głównie w jeziorach Mazur i Kujaw, ale bardzo rzadko,
- *Diphyllbothrium minus* (ryby drapieżne są żywicielem pośrednim, ptaki ostatecznym),

- a człowiek przypadkowym),
- *Diphyllbothrium norvegicum* (ryby lososowate są żywicielem pośrednim, ptaki i gryzonie ostatecznym, a człowiek przypadkowym),
 - *Diphyllbothrium cordatum* (ryby są żywicielem pośrednim, a psy i rzadko człowiek ostatecznym),
 - *Diplogonoporus* sp. (człowiek może być przypadkowym żywicielem pośrednim),
 - *Gnathostoma hispidum* (żywicielem paratenicznym są między innymi ryby, a człowiek może być żywicielem przypadkowym),
 - *Dictophyma renale* (żywicielami paratenicznymi są ryby, głównie sumowate, a ssaki mięsożerne i rzadko człowiek ostatecznym).

Zdecydowana większość tych pasożytów występuje w świecie, natomiast w Polsce sporadycznie notowane są jedynie dwa, a mianowicie *Opisthorchis felineus* i *Diphyllbothrium latum*. Obydwa pasożyty poddane zdecydowanej obróbce termicznej (smażenie) giną i nie stanowią zagrożenia dla człowieka.

Podsumowanie

Podsumowując przedstawione powyżej dane dotyczące zarówno pasożytów, jak i bakterii (za wyjątkiem zakażeń *Staphylococcus* sp.), należy stwierdzić, że zagrożenia dla zdrowia ludzi podczas spożywania potraw z ryb mają miejsce jedynie wówczas kiedy mięso, wątroba lub ikra ryb nie zostały poddane odpowiedniej obróbce termicznej. Zagrożenia te są natomiast bardzo realne przy spożywaniu ryb hodowlanych na surowo, co w niektórych krajach jest dość powszechne.

Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że ryby słodkowodne hodowane w Polsce nie stanowią istotnego zagrożenia dla zdrowia konsumenta. Pomimo tego konieczne jest jednak prowadzenie i dokumentowanie badań dotyczących stanu zdrowia ryb, stanu środowiska wodnego, jakości paszy i innych warunków hodowli, bowiem takie wymagania zawierają zapisy dyrektyw Unii Europejskiej oraz szereg polskich aktów prawnych z tego zakresu.

Należy mieć przy tym nadzieję, że przy kontynuowaniu ścisłej, dobrej, sprawdzonej od lat współpracy pomiędzy rybactwem a służbą weterynaryjną, przedstawiony powyżej zakres badań zostanie powszechnie wprowadzony w życie dla dobra konsumenta, dla poprawy jakości zdrowotnej mięsa ryb, dla właściwie pojętej ochrony zdrowia ryb, dla spełnienia wymogów weterynaryjnych Unii Europejskiej i wchodzenia na rynki tych państw bez obaw i zahamowań.

Piśmiennictwo

1. Antalfi A., Tolg J. (1975). Ryby roślinożerne. PWRiL, Warszawa. 231-252.
2. Antychowicz J. (1996). Choroby i zatrucia ryb. Wyd. SGGW, Warszawa. 85-305.
3. Antychowicz J. (2004). Choroby karpia. Wyd. PIWet-PIB, Puławy. 50-213.
4. Antychowicz J., Lipiec M. (2006). Mykobakterie chorobotwórcze dla ryb i ludzi. Med. Wet. 62, 731-735.
5. Bykowski P., Lorek O. (2004). Bezpieczeństwo produktu – główny atrybut unijnej polityki żywnościowej: Pstragarstwo. Problemy prawne, zdrowotne i jakościowe. Wyd. IRS Olsztyn. 103-114.
6. Dyrektywa Rady 91/67/EWG z dnia 28 stycznia 1991 dotycząca warunków zdrowotnych zwierząt, obowiązujących przy wprowadzaniu na rynek zwierząt i produktów akwakultury. O.J. 1991, L.46, 46.
7. Goryczko K. (1998). Pojęcie dobrostanu w hodowli ryb łososiowatych. Mat. XXIII Kraj. Konf. Hod. Ryb Łos. Wyd. IRS, Olsztyn. 43-47.
8. Guziur J., Zmysłowska S., Wodniak M. (2001). Ocena bakteriologiczna skóry, mięśni i treści pokarmowej karpia zimowanego w sadzach na wodach pochłodniczych. Mag. Przem. Ryb. 24, 28-30.
9. Kocyłowski Br., Miączyński T. (1960). Choroby ryb i raków. PWRiL, Warszawa. 117-351.
10. Kossakowski S. (1995). Promieniotwórcze skażenie środowiska. Wyd. PIWet, Puławy. 18-196.
11. Kosińska A. (2002). Infekcje bakterii *Pseudomonas* u ryb jako konsekwencja zmieniających się warunków środowiska: w Środowisko a stan zdrowotny karpia. Wyd. PIWet, Puławy. 55-62.
12. Niewiadowska A. (1988). Polichlorowane bifenyle w tłuszczu i mleku u ludzi i zwierząt w Polsce. Praca doktorska. Wyd. PIWet, Puławy. 44-45.
13. Niewiadowska A. (2007). Ocena narażenia na pestycydy chloroorganiczne i polichlorowane bifenyle (PCB) pobierane z żywnością pochodzenia zwierzęcego. Wyd. PIWet-PIB, Puławy. 35-55.
14. Pejsak Z., Żmudziński J.F. (2007). I Międzynarodowa Konferencja Laboratoriów Referencyjnych OIE i Centrów Współpracujących z OIE. Med. Wet. 63, 491-494.
15. Prost M. (1977). Ryby jako źródło infekcji i inwazji człowieka. Med. Wet. 33, 641-646.
16. Prost M. (1994). Choroby ryb. PTNW, Lublin. 40-418.
17. Radkowski M., Sztegn J., Uradziński J. (1997). Badanie sanitarno-weterynaryjne ryb. Med. Wet. 53, 141-143.
18. Report of a Joint FAO/NACA/WHO Study Group. (1999). Food safety issues with products from aquaculture. World Health Organization, Genewa. 9-46.
19. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych dla umieszczania na rynku zwierząt i produktów akwakultury. Dz. U. 2004, 158, poz. 1656.
20. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 11 grudnia 2006 r. w sprawie kategorii materiałów paszowych. Dz. U. 2007, 2, poz. 13.
21. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2006 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu pobierania próbek do badań oraz postępowania z próbkami pobranymi w ramach urzędowej kontroli pasz. Dz. U. 2007, 2, poz. 14.
22. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2007 r. w sprawie dopuszczalnych substancji niepożądanych w paszach. Dz. U. 2007, 20, poz. 119.
23. Szczerbowski J. (2006). Żywnienie ryb: w Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. Wyd. Nauk PTNW, Warszawa. 423-433.
24. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Dz. U. 2004, 69, poz. 625.
25. Ustawa z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach. Dz. U. 2006, 144, poz. 1045.
26. Żelazny J. (2002 a). Zdrowotność karpia w warunkach stawów hodowlanych. Przegląd Rybacki 27, 16-22.
27. Żelazny J. (2002 b). Zanieczyszczenia środowiska wodnego a zdrowotność karpia: w Środowisko a stan zdrowotny karpia. Wyd. PIWet., Puławy. 15-24.
28. Żelazny J. (2003). Postępowanie w przypadku zaburzeń w hodowli ryb spowodowanych zanieczyszczeniem środowiska wodnego. Mat. VIII Konf. Hod. Karpia. Wyd. PTRyb, Poznań. 27-33.
29. Żmudziński J., Niewiadowska A., Szkoda J., Semeniuk S., Różańska A., Wojtoń B. (2001). Badania surowców zwierzęcych: w Raport z monitoringu jakości gleb, roślin, produktów rolniczych i spożywczych. Wyd. MRiRW, Warszawa. 126-154.

WPŁYW ZANIECZYSZCZENIA WÓD POWIERZCHNIOWYCH PESTYCYDAMI NA PATOLOGIE TKANEK I NARZĄDÓW RYB SŁODKOWODNYCH

HANNA LUTNICKA

Zakład Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej,
Akademia Rolnicza,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Czystość wód powierzchniowych jest jednym z warunków, jakie powinny być zachowane dla zdrowia ryb. Stan środowiska wodnego często predysponuje ryby do zachorowania na choroby zakaźne, pasożytnicze czy środowiskowe. Wszelkie substancje chemiczne czy biologiczne, które dostają się do wód, i które nie są naturalnym składnikiem żywego organizmu, a na które organizm jest narażony nazywamy ksenobiotykiem. Definicja ksenobiotyku obejmuje więc substancje obce dla organizmu docelowego. Należy tu większość leków i trucizn. Ważną grupą ksenobiotyków są związki chemiczne otrzymywane przez człowieka, o strukturze chemicznej, zwykle (choć nie zawsze) nie występującej w przyrodzie, a do których to związków organizmy nie przystosowały się w drodze ewolucji. Do tych właśnie związków należą m.in. pestycydy. Są to substancje pochodzenia głównie syntetycznego, które są wprowadzane do biocenozy w wyniku zamierzonej decyzji człowieka. Są one wykorzystywane w ochronie roślin przed szkodnikami, chorobami lub chwastami, a również i do zwalczania pasożytów zwierząt hodowlanych, gryzoni itp.. Są to więc związki o wysokiej aktywności biologicznej przejawiającej się w stosunku do zwierząt, roślin i mikroorganizmów. Z założenia związki należące do pestycydów stosuje się zwykle do zabijania np. owadów, glonów, roślin, grzybów. Efektem ich bójczonego działania są organizmy docelowe np. szkodniki roślin, ale również i przypadkowe organizmy, dla których nie są one przeznaczone, a u których wywołują efekty niepożądane, ze śmiercią włącznie (Róžański, 1992).

Pestycydy dostają się dość często do wód powierzchniowych w wyniku stosowania ich na polach uprawnych czy w sadach. Masowe ich zastosowanie, szczególnie na wiosnę, a zwłaszcza w sytuacji, gdy po tych zabiegach wystąpią ulewne deszcze, jest najczęściej

powodem zanieczyszczenia wód powierzchniowych tymi związkami. Pestycydy pojawiają się wówczas w stężeniach znacznie przekraczających dopuszczalne normy i nie pozostających bez wpływu na zdrowie wszystkich organizmów biocenozy wodnej, w tym i ryb, zarówno wolnożyjących jak i tych hodowlanych. Skutkuje to zwiększoną śmiertelnością ryb, co od razu zwraca uwagę hodowcy. Jednak bardzo często w wodach obecne są takie stężenia pestycydów i innych substancji toksycznych, które nie powodują śmierci ryb, ale wywierają wielokierunkowy, negatywny wpływ na organizm. Takim częstym, charakterystycznym symptomem zanieczyszczenia wód niskimi, podprogowymi stężeniami substancji toksycznych w stawach hodowlanych i niekorzystnego oddziaływania ich na ryby są pojedyncze, ale częste przypadki śmiertelne, co określa się jako tzw. „kapanie” ryb. Takie zjawisko ma właśnie miejsce zwłaszcza na wiosnę. Trudno wówczas znaleźć przyczynę śmierci ryb, gdyż, nawet podejrzewając zatrucie, nie można wykryć substancji toksycznej z powodu zbyt niskiego jej stężenia. Również objawy towarzyszące zejściom śmiertelnym nie są charakterystyczne. Stąd też zjawisko to pozostaje na ogół nie wyjaśnione i samoistnie zanika.

Substancje toksyczne, w tym i pestycydy, dostają się z wody do organizmu ryby trzema drogami: przez skórę, przewód pokarmowy i skrzel. Znaczenie tych dróg w patogenezie zatruc u ryb jest zróżnicowane (Jara,1999).

Przepuszczalność skóry, która u ryb jest pokryta łuskami i śluzem, dla wody i obecnych w niej związków toksycznych, nawet pestycydów, jest niewielka. Ta droga więc ma ograniczone znaczenie w patologii zatruc u ryb. Jedynym symptomem oddziaływania trucizn tą drogą na organizm ryb jest zwiększona ilość śluzu, mająca swoje podłoże w pobudzeniu procesu mukosekrecji przez komórki śluzowe naskórka, jak to się dzieje w przypadku ekspozycji ryb na pyretroidy czy fenol (fot.1) (Lutnicka,1997). Jednakże objaw ten, jeśli nie występuje masowo, pozostaje nie zauważony. Nie jest on również patognomoniczny dla obecności w wodzie tylko zanieczyszczeń, towarzyszy wielu infekcyjnym i pasożytniczym jednostkom chorobowym. Nie wskazuje też na rodzaj zanieczyszczenia, gdyż można go obserwować np. u ryb ekspozowanych na wiele pestycydów, czy metale ciężkie (Jezińska, 2001, Lutnicka, 1982, 1994,1995).

Druga droga wnikania substancji toksycznych z wody do organizmu ryby – przez przewód pokarmowy ma również niewielkie znaczenie. Wiąże się to z wnikaniem na ogół bardzo małej dawki trucizny, kiedy wraz z pokarmem stałym dostaje się do jelita niewielka ilość wody, a wraz z nią i śladowe ilości substancji toksycznej. Ryby słodkowodne nie piją wody, stąd przewodem pokarmowym dostaje się jej bardzo niewiele do wnętrza organizmu.

Droga pokarmowa ma znaczenie wówczas, gdy związki toksyczne zawarte są w paszy podawanej rybam do wody lub zanieczyszczenia mają bardzo toksyczny wpływ na ryby, jak np. związki azotu (Lutnicka, 1995)

Najważniejsze znaczenie dla przenikania substancji toksycznych, w tym i pestycydów, ma droga przez skrzela. Skrzela ryb słodkowodnych są nieustannie i wciąż omywane przez wodę, co zapewnia rybie oddychanie. Ponieważ organizm ryby słodkowodnej jest hipertoniczny w stosunku do środowiska zewnętrznego, woda wpływa ciągle przez skrzela do wewnątrz, co łączy się jednocześnie z pozbywaniem się pewnych ilości soli mineralnych z organizmu. Bardzo cienki, jednowarstwowy nabłonek skrzeli, duża powierzchnia kontaktu z wodą i bardzo dobrze rozwinięty układ krążenia w tym narządzie, to wszystko ułatwia przedostawanie się substancji toksycznych do wnętrza przez skrzela. Przenikając przez komórki nabłonka oddechowego pestycydy czy inne substancje toksyczne (trucizny są zwykle rozpuszczalne w tłuszczach, stąd szybko przenikają przez błony komórkowe) dostają się do krwi w naczyniach włosowatych skrzeli, a stąd do aorty. Zanim wraz z krwią zostaną rozprowadzone po organizmie, znaczna ich część, naczyniami głowowymi, oddzielającymi się od aorty przenika przez barierę: krew – mózg i dostaje się do centralnego układu nerwowego, dając objawy neurotoksyczne. Właśnie dla ryb charakterystycznym zjawiskiem przy zatruciach są występujące znacznie szybciej niż u zwierząt stałocieplnych objawy nerwowe, co wiąże się z budową układu krwionośnego i szybszym na ogół pokonywaniem bariery: krew - mózg. Stąd też w wielu wypadkach np. przy zatruciu insektycydami pyretroidowymi, obserwuje się u tych zwierząt znacznie silniejsze, neurotoksyczne oddziaływanie pestycydu w porównaniu np. do ssaków (Edwards, 1987).

Dalej, substancje toksyczne wraz z krwią transportowane są do wątroby i innych narządów. W wątrobie trucizny mogą ulegać biokumulacji (nie wszystkie), ale przede wszystkim - biotransformacji, co oznacza przemianę ich do takiej postaci substancji toksycznej, która jest rozpuszczalna w wodzie, mniej szkodliwa dla organizmu, i która może następnie ulec wydaleniu. Procesy biotransformacji zachodzą w komórkach wątrobowych – hepatocytach, a dokładnie w organelum tych komórek – retikulum endoplazmatycznym. Substancje toksyczne, zanim zostaną tu zmetabolizowane, stają się przyczyną pojawienia się w wątrobie zmian patologicznych

Metabolity substancji toksycznych, zwykle, ale nie zawsze - mniej szkodliwe aniżeli wyjściowe związki, trafiają następnie do narządu wydalniczego – nerek, skąd są usuwane na zewnątrz organizmu. Do tego narządu również może dostać się wraz z krwią utlenowaną substancja toksyczna, a nie tylko jej metabolity, przekazane tu z wątroby. Nerki ryb są

szczególным narządem, gdyż składają się z części wydalniczej i krwiotwórczej. Zmiany patologiczne w nerkach jakie towarzyszą zatruciom ryb obserwuje się zwykle w obu tych częściach narządu.

Z przedstawionych trzech możliwych dróg wnikania substancji toksycznych, w tym i pestycydów, do organizmu ryb słodkowodnych oraz różnych jej losów wynikają też określone skutki obserwowane jako zmiany patologiczne, diagnozowane przyżyciowo i pośmiertnie w tkankach czy narządach tych zwierząt. Przyżyciowo możemy obserwować zmiany zachowania się ryb, które są symptomem neurotoksycznego oddziaływania zanieczyszczeń oraz trudności z oddychaniem. Manifestuje się to na ogół w formie zaburzeń w pływaniu, utraty równowagi, niepokoju, początkowo pobudzenia, a następnie apatii. Wymienione objawy nie są charakterystyczne tylko i wyłącznie dla ekspozycji ryb na substancje toksyczne. Podobne symptomy towarzyszą wielu infekcyjnym czy pasożytniczym jednostkom chorobowym.

Przyżyciowo możemy również obserwować pojawienie się zmian we krwi obwodowej ryb. Obecności substancji toksycznych w wodzie mogą towarzyszyć zmiany parametrów hematologicznych, a przede wszystkim liczby elementów morfotycznych krwi. Pojawiają się też zmiany patologiczne w elementach morfotycznych, które można obserwować w rozmazach krwi. Najczęściej obserwuje się zmiany ich kształtu (różne deformacje), zmiany kształtu jądra komórkowego, wakuolizację ich cytoplazmy, co sprawia wrażenie piankowatości jej struktury. Opisane zmiany towarzyszą często obecności w wodzie pestycydów np. insektycydów pyretroidowych (Lutnicka, 2001), czy metali ciężkich (Jezińska, 2001).

Obserwowane nietypowe zachowanie ryb wskazuje na toczące się procesy chorobowe w skrzelach. Obserwuje się wówczas podpływanie i skupianie się ryb przy dopływie wody do stawu, pobudzenie i/lub ospałość ryb, leżenie na boku, czy też ich „zawieszenie” w wodzie, początkowo przyspieszone, a następnie zwolnione ruchy pokryw skrzelowych. Takie zachowania ryb wskazują na trudności z oddychaniem. Makroskopowo w skrzelach można często stwierdzić nieprawidłowe zmiany w ich wyglądzie: zwiększoną ilość śluzu, przekrwienie lub/i bladeść listków skrzelowych, co często, w konsekwencji, daje obraz marmurkowatości skrzeli (miejscami przekrwione, a miejscami blade). Również i te zmiany nie świadczą o zatruciu ryb substancjami toksycznymi. Wymienione objawy towarzyszą wielu jednostkom chorobowym infekcyjnym i nieinfekcyjnym. Wskazują one jedynie na nieprawidłowe procesy toczące się w tym narządzie, a nie na ich przyczynę.

Wszystkie wymienione objawy patologiczne zwykle, jeśli stężenie substancji toksycznych w wodzie jest niskie, nie powodują na ogół masowej śmierci ryb i na ogół również pozostają niezauważone przez hodowcę. Jedynym niepokojącym sygnałem dla hodowcy mogą być pojedyncze zejścia śmiertelne (tzw. kapanie ryb), które zdarzają dość często w przeciągu pewnego okresu czasu (na ogół dłuższego) lub też pojawiają się w tych samych okresach czasu rokrocznie. Jeśli wykluczone zostaną infekcje ryb możemy wówczas przypuszczać, że przyczyną mogą być obecne w wodzie zanieczyszczenia np. pestycydy, zwłaszcza jeśli z wywiadu wynika, że odbywały się wcześniej w pobliżu zabiegi agrotechniczne z użyciem np. środków ochrony roślin.

Wówczas możemy wykonać badanie sekcyjne kilku ryb, a zwłaszcza tych słabszych, które wykazują jakieś nieprawidłowości np. w zachowaniu, nie pobieraniu karmy, podpływaniu stale do dopływu wody. Po wstępnych oględzinach narządów wewnętrznych, jeśli makroskopowo nie wykazują one widocznych zmian patologicznych, zwracamy uwagę na wątrobę i nerkę, a przede wszystkim na ich wielkość, kolor, konsystencję. Bardzo często, jeśli w wodzie obecne są wyższe stężenia substancji toksycznych, nawet przez krótki czas, możemy zaobserwować zmiany w tych narządach. Zwykle mają one zmieniony kolor, są przekrwione lub blade, o ciastowatej lub wręcz miękkiej konsystencji, podczas gdy w pozostałych narządach zwykle nie obserwuje się widocznych makroskopowo zmian patologicznych.

Jeśli zestawimy ze sobą zmiany patologiczne w narządach mięsistych i obserwowane przyżyciowo w skrzelach, wówczas możemy przypuszczać, że przyczyną śmierci ryb może być okresowe zanieczyszczenie wód. Po wykonaniu preparatów histologicznych ze skrzeli i narządów mięsistych ryb można obserwować występowanie w nich, w różnym stopniu zaawansowania, zmian histopatologicznych.

W skrzelach, które stanowią bramę wnikania substancji toksycznych z wody do organizmu obserwuje się najczęściej (fot. 2):

- wzrost liczby komórek śluzowych na szczytach blaszek drugorzędowych listków skrzelowych. Jest to reakcja obronna tkanki przed szkodliwym wpływem substancji toksycznych. Reakcja ta towarzyszy często obecności w wodzie nawet niskich stężeń tych substancji, których nie możemy wykryć dostępnymi metodami badawczymi,
- proliferacja i rozrost nabłonka oddechowego wskutek drażniącego oddziaływania substancji toksycznych na tę tkankę. Dochodzi często do obrzęku komórek, wskutek czego nabłonek odstaje od rusztowania podporowego. Z powodu rozrostu nabłonka i

zwiększonego wydzielania śluzu dochodzić może do sklejanania się pojedynczych blaszek drugorzędowych i zniesienia jego funkcji oddechowych,

- obecność nacieków komórkowych pomiędzy blaszkami drugorzędowymi, które podminowują nabłonek. W skrajnych przypadkach może dochodzić do zrównania nabłonka z końcami tych blaszek, co powoduje zaprzestanie funkcji oddechowych tych blaszek,

- naczynia włosowate blaszek skrzelowych mogą być na początku rozszerzone, lub poszerzone mogą być ich końce. W wyniku dłuższej trwającego procesu całe naczynia, wzdłuż ich przebiegu w skrzelach rozszerzają się i fałdują. Na końcach blaszek drugorzędowych można przy niektórych substancjach toksycznych np. amoniaku czy azotynach obserwować rozszerzenie naczyń włosowatych w formie dużych kul, co doprowadza w konsekwencji do ich pęknięcia i wynaczynień (Lutnicka, 1982, 1994, 1995; Walsh, 1975).

W wątrobie, gdzie ma miejsce biotransformacja substancji toksycznych obserwuje się najczęściej zmiany histopatologiczne w formie (fot. 3):

- rozszerzenie naczyń krwionośnych włosowatych,
- miejscowego, ogniskowego zatarcia struktury zrazikowej i komórkowej.

Występowanie tych zmian obserwuje się zwłaszcza wokół dużych naczyń krwionośnych. Jest to efekt docierania tą drogą do narządu większych stężeń substancji toksycznych. U karpia zmiany te towarzyszą również skupieniom komórek trzustkowych rozsianym w wątrobie, ze względu na duże ukrwienie tych miejsc,

- procesu stłuszczenia wątroby, o różnym stopniu nasilenia, co bardzo często pojawia się jako zmiana histopatologiczna towarzysząca zatruciom ryb, zwłaszcza podczas dłuższej ekspozycji (Antychowicz, 1998; Braunbeck, 1993; Couch, 1975; Jezierska 2001; Lutnicka 1995)
- obserwuje się też częste występowanie centrów melanomakrofagowych, zwłaszcza w okolicy naczyń krwionośnych. Proces ich tworzenia świadczy o pobudzeniu układu makrofagowego, wzmożonej fagocytozie zarówno w sensie uprzążania zniszczonych fragmentów komórek, jak i pinocytozie substancji toksycznych. Przyżyciowo można wtedy stwierdzić pozytywną reakcję na fosfatazę kwaśną (enzym lizosomalny).

Występowanie wyżej opisanych zmian histopatologicznych, jak i pozytywnej reakcji na fosfatazę kwaśną nie jest charakterystyczne tylko i wyłącznie dla zanieczyszczenia wód substancjami toksycznymi. Towarzyszą one takim zjawiskom jak np. niektóre infekcje czy inwazje pasożytów, długa głodówka, nieodpowiednia dieta, osłabienie.

Ostatnim narządem, który z racji funkcji narażony jest na toksyczny wpływ większych, w porównaniu do innych narządów, stężeń substancji toksycznych jest nerka wydalnicza. W narządzie tym również obserwuje się występowanie zmian histopatologicznych. Mają one najczęściej charakter (fot. 4):

- obrzmienia nabłonka kanalików nerkowych, co przy dłużej trwającym procesie doprowadzić może do zwężenia ich światła,
- zatarcia struktury kanalików nerkowych oraz miejscową i ogniskową nekrozę o charakterze martwicy skrzepowej czy rozplywnej,
- poszerzenia przestrzeni moczowej wokół kłębuszków nerkowych (Lutnicka, 1982, 1994; Walsh, 1975).

U ryb słodkowodnych nerka wydalnicza służy do usuwania dużych ilości bardzo rozcieńczonego moczu ze względu na stały napływ wody do ich organizmu. Stały napływ wody jest w tym wypadku dobrodziejstwem dla ryb. Służy szybszemu wydaleniu trucizny czy metabolitów. Stąd zrobienie w takiej sytuacji większego przepływu wody w stawie (na zasadzie płuczki) wykazuje bardzo dobry, oczyszczający wpływ na ryby.

Oprócz części wydalniczej w nerce znajduje się też część krwiotwórcza. Ma ona charakter porzrzucanych pomiędzy kanalikami nerkowymi wysp krwiotwórczych. W narządzie tym, podobnie jak i w pozostałych narządach krwiotwórczych można często obserwować rozplem tej tkanki, ogniskowe zatarcie jej struktury i występowanie centrów melano-makrofagowych (fot. 4). Komórki układu makrofagowego (żernego) wyłapują komórki obciążone trucizną i same stają się martwe. Tworzą wówczas te charakterystyczne skupiska komórek w narządach nazywane właśnie centrami melano-makrofagowymi. Są one następnie usuwane z narządów do jamy otrzewnowej i w ten sposób znaczna część trucizny jest neutralizowana, z pominięciem nerki, co wydatnie oszczędza ten narząd.

Wszystkie, opisane wyżej zmiany histopatologiczne w narządach ryb, nie są typowe tylko dla ekspozycji ryb na różne czynniki toksyczne np. metale ciężkie czy pestycydy (Couch, 1975; Jezierska, 2001; Walsh, 1975). Opisywane są również przy wielu jednostkach chorobowych o różnym tle, a zwłaszcza zakaźnym (Couch, 1975; Yasutake, 1975) Wskazują jedynie na toczące się w organizmie procesy chorobowe i ich mechanizm, nie dając jednak pewności co do ich przyczyny. Jednakże mogą one sugerować ich podłoże, zwłaszcza po wykluczeniu udziału czynników infekcyjnych oraz jeśli zmiany te powtarzają się sezonowo.

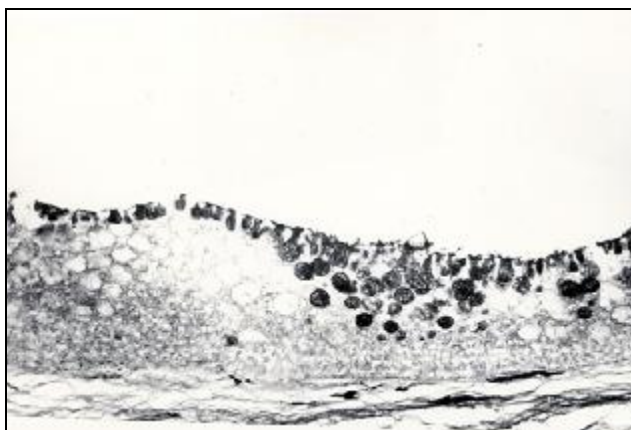
Z przedstawionych wyżej dróg wnikania substancji toksycznych czy szkodliwych dla zdrowia ryb wynika ich niekorzystne oddziaływanie szczególnie na takie narządy jak: skrzela, wątroba, nerka. Nie oznacza to jednak, że substancje te nie wpływają i na funkcjonowanie pozostałych narządów. Jednakże wymienione narządy są szczególnie predysponowane do

pojawiania się w nich i rozwoju procesów patologicznych z racji ich funkcji. Efekty końcowe oddziaływania substancji toksycznych są trudne do przewidzenia. Zależą one od rodzaju, dawki i czasu działania trucizny. Z drugiej strony znaczenie ma wiek ryby, jej kondycja, temperatura wody i wiele jeszcze innych parametrów środowiska. Niewątpliwie, niezależnie od wszystkich tych czynników, niekorzystne oddziaływanie zanieczyszczonego środowiska nigdy nie pozostaje bez wpływu na organizm ryb. Poza masowymi śnięciami ryb w przypadku obecności w wodzie wysokich stężeń substancji toksycznych, zwykle w środowisku stwierdza się ich śladowe bądź podprogowe ilości, które nie powodując śmierci ryb - osłabiają jednak ich kondycję zdrowotną. Możemy to obserwować w formie zmniejszonego pobierania pożywienia i jego przyswajania (zmiany w wątrobie). Świadczy o tym obserwowany podczas sekcji ryb fakt, iż przewód pokarmowy jest słabo wypełniony pokarmem lub w ogóle pusty. Ponieważ toczące się w narządach procesy patologiczne i jednocześnie naprawcze są długotrwałe, ryby wówczas żerują słabo i nie wykazują prawidłowych przyrostów. Są w różnym stopniu osłabione, a więc bardziej stają się podatne na choroby. Zwiększona wrażliwość na czynniki zakaźne i inwazyjne wynika też z osłabienia układu immunologicznego, gdyż w narządach krwiotwórczych mają miejsce z reguły również procesy patologiczne (Lutnicka, 2001; Stadnicka, 1997). Wszystko to przyczynia się do osłabienia kondycji ryb, co czyni je bardziej podatnymi na występowanie chorób powodowanych przez mikroorganizmy chorobotwórcze, jak i warunkowo chorobotwórcze, przyczyniając się do ich uzjadliwienia.

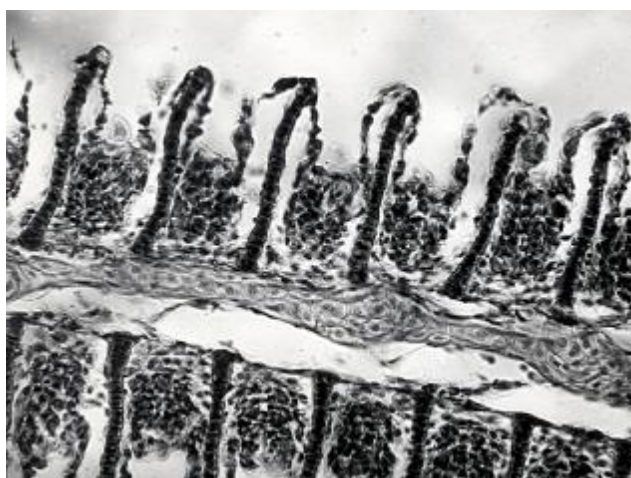
Piśmiennictwo

1. Antychowicz J., Lutnicka H., Grawiński E. (1998). Zwyródnienie tłuszczowe wątroby. *Życie Weterynaryjne* 3, 91-92.
2. Bendele R. A., Klontz G.W. (1975). Histopathology of Teleost Kidney Disease: In: *The Pathology of Fishes*. W. E. Ribelin, G. Migaki, ed. the University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 365-382.
3. Braunbeck T., Völkl A. (1993). Toxicant – induced cytological alterations in fish liver as biomarkers of environmental pollution?. A case study on hepatocellular effects of dinitro-o-cresol in golden ide (*Leuciscus idus melanotus*): in: *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*. T. Braunbeck, W. Hanke, H. Segner, ed. VCH Weinheim. pp. 55-80.
4. Couch J. A. (1975). Histopathological Effects of Pesticides and related chemicals on the livers of fishes: In: *The Pathology of Fishes*. W. E. Ribelin, G. Migaki, ed. the University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 559-584.
5. Edwards R., Millburn P., Hutson D. H. (1987). Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84, 512-522.
6. Eller L. (1975). Gill lesions in fresh water *Teleosts*: In: *The Pathology of Fishes*. W. E. Ribelin, G. Migaki, ed. the University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 305-331.
7. Jara Z., Chodyniecki A. (1999). *Ichtiopatologia*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
8. Jezierska B., Witeska M. (2001). *Metal Toxicity to Fish*. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce.
9. Lutnicka H. (1982). Zmiany histopatologiczne w narządach karpia poddanego działaniu Gamakarbatoxu. *Medycyna Wet.* 38, 585-588.

10. Lutnicka H , Grawiński E., Nozdryn-Płotnicki Z. (1994). Zmiany histopatologiczne w narządach karpia (*Cyprinus carpio L.*) poddanego działaniu trójbutyllocyny (TBT). *Acta Poloniae Toxicologica* 2, 82-90.
11. Lutnicka H., Sopińska A., Nozdryn-Płotnicki Z. (1995). Histopathology changes in the inner organs of carp exposed to nitrogen compounds of industrial sewage. *Acta Poloniae Toxicologica* 3, 155-166.
12. Lutnicka H. (1997). Wpływ amoniaku, fenolu i Ambuszu 25 EC na komórki śluzowe skóry ryb. *Annales UMCS Lublin, Sec. DD, LII, 27, 275-289.*
13. Lutnicka H. (2001). Wpływ zanieczyszczenia wód pyretroidami na organizm ryb. *Rozprawy Naukowe AR w Lublinie, zeszyt 252.*
14. Różański L. (1992). *Przemiany Pestycydów w Organizmach Żywych i Środowisku.* Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
15. Studnicka M., Dunier M., Siwicki K., Morand M. (1997). Zastosowanie prostymulatorów w korygowaniu reaktywności immunologicznej upośledzonej pestycydami fosforoorganicznymi: w: *Wpływ Ksenobiotyków Na Układ Odpornościowy*, pod red. A. K. Siwickiego. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie.
16. Yasutake W. T. (1975). Fish viral diseases: clinical, histopathological and comparative aspects: in: *The Pathology of Fishes.* W. E. Ribelin, G. Migaki, ed. the University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 247-271.
17. Walsh A. H., Ribelin W. E., 1975. The pathology of pesticide poisoning: in: *The Pathology of Fishes.* W. E. Ribelin, G. Migaki, ed. the University of Wisconsin Press, Wisconsin. pp. 515-541.



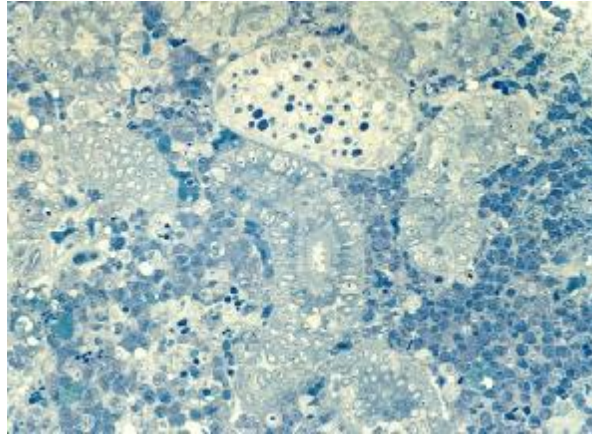
Fot. 1. Liczne komórki śluzowe skóry karpia poddanego 3-dniowej ekspozycji na wysokie stężenie fenolu. Widoczny proces wydzielania śluzu i skupiania się komórek w miejscach uszkodzenia naskórka.



Fot. 2. Zmiany histopatologiczne w skrzelach karpia poddanego 6-tygodniowej ekspozycji na niskie stężenie trójbutylocyny (TBT). Widoczny rozrost i odstawianie nabłonka oddechowego od rusztowania podporowego. Pośród blaszek drugorzędowych obecne duże nacieki komórkowe niszczące nabłonek oddechowy.



Fot. 3. Zmiany histopatologiczne w wątrobie karpia poddanego działaniu niskiego stężenia pyretroidu - fenwaleratu przez okres 2 tygodni. Widoczne zatarcie struktury narządu wokół naczynia krwionośnego. Cytoplazma zmienionych patologicznie hepatocytów wykazuje niedobarwliwość.



Fot. 4. Zmiany histopatologiczne w nerce wydalniczej karpia eksponowanego przez 2 tygodnie na niskie stężenie pyretroidu – cypermetryny. Widoczne zatarcie struktury kanalików, zniszczenie ich nabłonka oraz rozwój procesów nekrotycznych. W części krwiotwórczej nerki widoczny rozplątanie tkanki, która wciska się pomiędzy kanaliki nerkowe, rujnując ich strukturę. W sąsiedztwie uszkodzonych kanalików tkanka krwiotwórcza wykazuje obecność licznych skupisk melano-makrofagowych.

WYSTĘPOWANIE POZOSTAŁOŚCI ZIELENI MALACHITOWEJ U RYB SŁODKOWODNYCH

KAMILA MITROWSKA

Zakład Farmakologii i Toksykologii,
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Zieleń malachitowa (MG) jest syntetycznym barwnikiem posiadającym szerokie spektrum działania przeciw grzybom, pierwotniakom pasożytniczym oraz bakteriom chorobotwórczym i dzięki terapeutycznym właściwościom od 1933 roku jest stosowana w hodowli ryb, skorupiaków i mięczaków na całym świecie. W organizmach żywych MG jest redukowana do bezbarwnej zieleni leukomalachitowej (LMG). Forma ta ze względu na wysoką lipofilność bardzo długo pozostaje w organizmie ryby, a szybkość jej eliminacji zależy od zawartości tkanki tłuszczowej (Allen, 1994).

Zarówno zieleń malachitowa, jak i jej główny metabolit, zieleń leukomalachitowa mogą powodować odległe efekty działania genotoksycznego, w tym: mutagennego, rakotwórczego, teratogennego. Mogą również oddziaływać cytotoksycznie na wiele narządów ryb i ssaków (Culp, 2004). Toksyczność MG u ryb zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury i pH wody oraz wydłużeniem czasu ekspozycji (Bills, 1977).

Negatywne oddziaływania zieleni malachitowej są powodem zakazu jej stosowania jako leku weterynaryjnego w wielu krajach. Obowiązująca w państwach Unii Europejskiej Regulacja Komisji 2377/90/EC (Anon., 1990) przedstawia wykaz leków weterynaryjnych dopuszczonych do stosowania u zwierząt hodowlanych w celach konsumpcyjnych, natomiast Dyrektywa Rady 96/23/EC (Anon., 1996) mówi o konieczności prowadzenia badań kontrolnych pozostałości. W wykazie substancji objętych badaniami kontrolnymi barwniki znajdują się, obok pestycydów, metali toksycznych i miktotoksyn, w grupie B3e odnoszącej się do zanieczyszczeń środowiskowych. W oparciu o te regulacje zieleń malachitowa, jako substancja farmakologicznie aktywna nie jest zarejestrowanym lekiem weterynaryjnym i w związku z tym jej stosowanie jest zabronione w hodowlach ryb, mięczaków i skorupiaków przeznaczonych do konsumpcji. Zieleń malachitowa jest substancją, która nie powinna występować w mięśniach ryb przeznaczonych do konsumpcji w najmniejszym nawet

stężeniu. Ponieważ laboratoria oznaczające MG i LMG stosują metody o różnej sprawności analitycznej, decyzją Komisji 2004/25/EC (Anon., 2004a) wprowadzono wymagany minimalny poziom oznaczania (MRPL – *ang. minimum required performance limit*) dla sumy MG i LMG, który wynosi 2 µg/kg. Znalezione stężenia sumy związków powyżej tej wartości kwalifikują próbkę jako niezgodną, a w konsekwencji żywność, jako nie nadającą się do obrotu i konsumpcji.

Po zastosowaniu zieleni malachitowa szybko wchłania się do organizmu ryby głównie przez skórę i skrzel. Na efektywność tego procesu wpływa gatunek, wiek i stan fizjologiczny ryb oraz czynniki abiotyczne, przede wszystkim stężenie i czas ekspozycji barwnika oraz właściwości fizyko-chemiczne wody. Temperatura, twardość, zawartość tlenu i pH wody warunkują stopień jonizacji cząsteczek barwnika i wpływają na parametry farmakokinetyczne. Ponieważ ryby są organizmami zmiennocieplnymi, szybkość procesu absorpcji, dystrybucji i eliminacji zieleni malachitowej wzrasta wraz ze wzrostem temperatury wody. Ze wzrostem pH wody maleje stopień jonizacji cząsteczki barwnika i wzrasta stopień wchłaniania przez organizm ryby (Plakas, 1996).

Pozostałości MG i LMG mogą występować we wszystkich tkankach i narządach ryb oraz w ikrze i narybku. W badaniach własnych nad rozmieszczeniem i kinetyką zanikania zieleni malachitowej w tkankach i narządach karpia określono około 2-miesięczny czas zanikania MG oraz około 11-miesięczny czas pozostawania LMG w tkance mięśniowej karpia po trzygodzinnej kąpieli ryb w roztworze zieleni malachitowej o stężeniu 2 mg/l. Podczas doświadczenia temperatura wody wahała się w granicach od 14°C do 17°C a wartości pH pozostawały w zakresie od 7,5 do 8,1.

Ponadto zbadano wpływ obróbki termicznej na zawartość MG i LMG w mięśniach ryb. Wykazano, że procesy kulinarne przeprowadzane w wysokiej temperaturze nie zapewniają całkowitej redukcji pozostałości MG i LMG, a zawartości MG w mięśniach ryb zmniejsza się o 54% w czasie 15 min. gotowania w wodzie oraz pieczenia. Natomiast jedyną metodą, w której stężenie LMG ulega redukcji jest działanie mikrofal (40% w ciągu 1 min.).

Badania kontrolne ryb w kierunku zieleni malachitowej w Polsce rozpoczęto w 2003 roku. Wówczas na 10 przebadanych próbek w jednej stwierdzono przekroczenie dopuszczalnego limitu. W tym też roku odnotowano 81 próbek niezgodnych w dziesięciu państwach członkowskich Unii Europejskiej, z czego najwięcej w Wielkiej Brytanii (29), Francji (15) i Finlandii (14) (Anon., 2004b). W Polsce w badaniach kontrolnych w 2004 roku na 55 próbek mięśni stwierdzono 17 przekroczeń dopuszczalnego limitu, co stanowiło około 27%. Na tle innych państw Unii Europejskiej, w której odnotowano 253 próbki niezgodne,

Polska znalazła się na trzecim miejscu razem z Finlandią. Największe ilości zieleni malachitowej stwierdzono w Wielkiej Brytanii (88 próbek niezgodnych) oraz w Danii (82 przekroczenia dopuszczalnego limitu) (Anon., 2005). W wyniku badań kontrolnych przeprowadzonych w 2005 roku w Polsce na 99 przebadanych próbek stwierdzono 10 próbek niezgodnych, co stanowiło około 10% (Anon., 2006). W Europie stwierdzono wówczas 99 próbek niezgodnych; najwięcej w Niemczech (40) i Czechach (18). W roku 2006 liczba próbek pobranych w kontroli urzędowej wzrosła do 155 i otrzymano 19 wyników niezgodnych (12%). Przekroczenia te dotyczyły głównie zieleni leukomalachitowej, którą znajdowano w mięśniach karpia, pstrąga i amura, a zakres oznaczonych stężeń w próbkach mięśni wahał się w granicach od kilku do kilkudziesięciu $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Na podstawie wyników uzyskanych w latach 2003-2006 można stwierdzić, że problem stosowania zieleni malachitowej istniał od momentu rozpoczęcia badań i nadal pozostaje aktualny. Ponieważ do roku 2003 barwnik ten nie był objęty urzędowymi badaniami kontrolnymi, jego stosowanie w hodowli ryb przeznaczonych do spożycia nie było związane z jakimikolwiek ograniczeniami. Pilotażowe badania z 2003 roku jedynie zasygnalizowały istnienie problemu, a dopiero w kolejnych latach - poprzez zwiększenie ilości analizowanych próbek - uzyskano pełniejszy obraz zagrożenia ze strony niebezpiecznych dla zdrowia konsumenta pozostałości zieleni malachitowej i jej głównego metabolitu.

Polska nie jest jedynym krajem, w którym istnieje problem występowania pozostałości tego barwnika w produktach akwakultury. Podobnie wygląda sytuacja w innych krajach Unii Europejskiej, a także poza jej granicami. Świadczą o tym raporty Systemu Wczesnego Ostrzegania o Substancjach Niebezpiecznych w Żywności i Paszach (RASFF, ang. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (Anon., 2007), które na bieżąco informują o próbach wprowadzenia na rynek unijny partii towarów zawierających niedozwolone poziomy pozostałości nie tylko zieleni malachitowej, ale również innego niebezpiecznego dla zdrowia konsumentów barwnika - fioletu krystalicznego. Przekroczenia dopuszczalnego limitu najczęściej odnotowuje się w pandze sprowadzanej z Wietnamu oraz w węgorzu przywożonym z Chin i Indonezji.

Piśmiennictwo

1. Allen J.L., Gofus J.E., Meinertz J.R. (1994). **Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *J AOAC Int.* 77, 553-557.
2. Anon. (1990). **Commission Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.**, OJ L 224, 1-8.

3. Anon. (1996). Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC, 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. OJ L 125, 10-31.
4. Anon. (2004a). Commission Decision 2004/25/EC of 22 December 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. OJ L, 6, 38.
5. Anon. (2004b). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2003 (Council Directive 96/23/EC). http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2003_en.pdf
6. Anon. (2005). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2004 (Council Directive 96/23/EC). http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2004_en.pdf
7. Anon. (2006). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2004 (Council Directive 96/23/EC). http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2005_en.pdf
8. Anon. (2007). Rapid Alert System for Food and Feed - Weekly Overview Reports. http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
9. Bills T.D., Marking L.L., Chandler Jr. J.H. (1977). Malachite green: its toxicity to aquatic organisms, persistence and removal with activated carbon. Invest. Fish Contr. 75, 6.
10. Culp S.J. (2004). NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. Toxic. Rep. Ser. 71, 1-10.
11. Plakas S.M., El Said K.R., Stehly G.R., Gingerich W.H., Allen J.L. (1996). Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1417-1433.

PTASIA GRYPA - ŚWIATOWE ZAGROŻENIE ZDROWIA PUBLICZNEGO Z UWZGLĘDNIENIEM GOSPODARKI RYBACKIEJ

ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu,
Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy; al. Partyzantów;
24-100 Puławy

Wielkie epidemie od wieków towarzyszyły ludzkości siejąc ogromne spustoszenia, dziesiątkując całe populacje oraz wpływając na losy świata. Wirus ospy przyczynił się do upadku imperium rzymskiego, ułatwiał kolonizację Brazylii, konkwistę Meksyku, osadnictwo Francuzów i Anglików w Ameryce Północnej i walkę z Indianami. Średniowieczne kontakty z Chinami zaowocowały wielką pandemią grypy. Obecnie pojawiły się nowe wirusy stanowiące zagrożenie dla zdrowia publicznego. Liczne z nich to infekcje przeniesione bezpośrednio od zwierząt. Ocenia się, że około 60% ludzkich patogenów pochodzi od zwierząt, a 75% nowych chorób to choroby odzwierzęce. Przykładem jest grypa, nazywana „zakaźnym wyzwaniem” trzeciego tysiąclecia. Pierwszą wzmiankę o epidemii grypy, która wydarzyła się w 412 roku p.n.e zawdzięczamy Hipokratesowi, natomiast pierwszy szczegółowy opis pandemii grypy pochodzi z 1580 r. Od tego czasu na świecie zanotowano ponad trzydzieści pandemii, trzy pandemie miały miejsce w XX wieku. W latach 1918/19 pojawił się nowy szczep wirusa grypy H1N1. Został on w stanie niezmiennym przeniesiony na człowieka od zakażonych ptaków. Wywołał pandemię tzw. „hiszpankę”, w wyniku której zmarło 30 – 50 milionów osób na świecie. Kolejne epidemie wydarzyły się w 1957 i 1968 r. Odpowiedzialne za nie wirusy, a mianowicie wirus grypy azjatyckiej z 1957 r. i wirus grypy Hong Kong z 1968 r. powstały w wyniku przyłączenia materiału genetycznego wirusa grypy ludzkiej do wirusa ptasiego. Wirus grypy azjatyckiej spowodował zgon około 1 mln osób, natomiast wirus grypy Hong Kong był przyczyną zejść śmiertelnych około 700 000 osób. Pandemie te, podobnie jak i większe epidemie wzięły swój początek z Azji południowo-wschodniej, uznawanej za światowe epicentrum grypy, a ich źródłem były dzikie lub domowe ptaki. Każde pojawienie się nowego typu wirusa u ptaków stanowi potencjalne

niebezpieczeństwo wystąpienia nowej pandemii grypy. Nic więc dziwnego, że pojawienie się wirusa H5N1 u ptaków i śmiertelne zachorowania u ludzi po zakażeniu tym wirusem uzmysłowiły zagrożenie dla zdrowia ludzi. Nie można przewidzieć, czy i kiedy wystąpi pandemia, można jednak zakładać, że im bardziej jest wirus rozpowszechniony wśród zwierząt, tym większe jest ryzyko jej pojawienia się.

CHARAKTERYSTYKA WIRUSA GRYPY

Grypa, zakaźna choroba ludzi i zwierząt, wywoływana jest przez wirus należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus*. Ma symetrię helikalną, oprócz cząstek sferycznych o średnicy 80-120 nm, spotykane są formy nitkowate o długości nawet 1000 nm. Jego materiałem genetycznym jest jednoniciowy RNA o ujemnej polarności (ssRNA⁽⁻⁾), podzielony na osiem segmentów o różnej długości. Segmenty te oznaczono kolejnymi cyframi od 1 do 8. Osiem segmentów RNA koduje dziesięć białek. Nukleokapsyd stanowiący rdzeń wirusa składa się z RNA połączonego z kodowaną przez 5 segment genomu nukleoproteiną oraz z trzema białkami kompleksu polimerazy PB1, PB2 i PA, kodowanymi przez trzy pierwsze segmenty genomu. Białka kompleksu polimeraz odpowiadają za procesy replikacji/transkrypcji. Zewnętrzną warstwę wirionu stanowi otoczka lipidowa, z której wystają liczne wypustki glikoproteinowe: hemaglutynina (HA) i neuraminidaza (NA). Między otoczką a nukleokapsydem znajduje się warstwa białka M1, które jest głównym białkiem strukturalnym wirusa, kodowanym przez 7 segment genomu. Różnice antygenowe pomiędzy nukleoproteinami oraz budowa antygenowa białka M stanowią podstawę do wyróżnienia trzech typów wirusów grypy: A, B i C. Wirusy grypy typu A są najczęściej spotykane, wywołują one sezonowe zachorowania, a także mogą być przyczyną epidemii i pandemii. Atakują również zwierzęta, wywołują infekcje u ptaków, świń, koni i ssaków wodnych. Łącznie występowanie ich potwierdzono u około 50 gatunków ptaków i 10 gatunków ssaków (22).

Wirus grypy typu A, na podstawie budowy antygenów powierzchniowych, został podzielony na podtypy. Hemaglutynina będącą główną glikoproteiną powierzchniową jest kodowana przez segment 4. Jest syntetyzowana w postaci nieaktywnego polipeptydu HAO, który podczas i po translacji ulega znacznym modyfikacjom obejmującym cięcie proteolityczne, glikolizację i dołączenie grup palmitylowych. Hemaglutynina odpowiedzialna jest za związanie wirusa ze specyficznymi receptorami komórkowymi, uczestnicząc w fuzji błony komórkowej z otoczką lipidową wirusa, odgrywa więc kluczową rolę w procesie przyłączania i wnikania wirusa do komórki gospodarza. Posiada miejsca hiper-zmienne, w

których często występują mutacje punktowe. Stwierdzono występowanie 16 rodzajów HA oznaczanych cyframi arabskimi od 1 do 16. Neuraminidaza, drugi ważny antygen powierzchniowy, kodowany przez 6 segment genomu, występuje w 9 odmianach, oznaczonych od 1 do 9. Główną rolę spełnia przy uwalnianiu wirusów potomnych z zakażonych komórek ułatwiając im odczepianie od błon komórkowych przez rozkładanie i usuwanie reszt kwasu sialowego znajdujących się w receptorach komórkowych. Podobnie jak HA jest bardzo zmienna. Trzecim białkiem powierzchniowym wirusa grypy typu A jest białko M2 kodowane przez 7 segment genomu. Występuje ono obficie w zakażonych komórkach, a tylko w niewielkiej liczbie kopii w cząsteczkach wirionu. Jest białkiem membranowym i tworzy kanały jonowe w błonie komórkowej. Segment 8 koduje białka NS1 i NS2. Białko NS1 wydaje się być jedynym białkiem niestrukturalnym wirusa, nie wykryto jego obecności w wirionach. Jest natomiast obficie syntetyzowane w zakażonych komórkach. Białko NS2 jest najmniej poznane (12).

Wirusy grypy są najbardziej zmiennie ze wszystkich znanych wirusów. Konsekwencją tej zmienności jest powstawanie odległych antygenowo szczepów co pozwala zarówno na ich adaptację do różnych gospodarzy oraz na uniknięcie mechanizmów obronnych gospodarza. Znane są dwa rodzaje zmienności: przesunięcie antygenowe (ang. antigenic drift) oraz reasortacja genowa, nazywana skokiem antygenowym (ang. antigenic shift) (12, 22).

Przesunięcie antygenowe (antigenic drift) dotyczy drobnych zmian w segmentach kodujących antygeny powierzchniowe. Polimeraza RNA zależna od RNA jest enzymem dokonującym licznych pomyłek, polegających na wstawianiu błędnych zasad podczas syntezy potomnych łańcuchów RNA. Polimerazy RNA nie mają tzw. własności autokorektorskich i nie potrafią ich usunąć. W wyniku tego powstają mutacje punktowe prowadzące do pojawiania się w następstwie selekcji nowych wariantów antygenowych uprzednio występujących podtypów. Zmiany antygenowe są niewielkie i zwykle istniejące przeciwciała skierowane przeciwko uprzednio występującym podtypom są w stanie częściowo chronić gospodarza. Warianty szczepów grypy ludzi zwykle nie powodują epidemii, lecz tylko ograniczone zachorowania. Natomiast antygenowy dryft występujący w genomie szczepów ptasich, może spowodować powstanie szczepów atakujących inne gatunki zwierząt oraz ludzi i potencjalnie mogących wywołać pandemię (12, 22).

Reasortacja, czyli skok antygenowy może wystąpić, gdy komórka gospodarza zostanie jednocześnie zakażona przez dwa różniące się od siebie szczepy wirusa grypy. Dochodzi wówczas między nimi do wymiany poszczególnych segmentów RNA, co jest przyczyną poważnych zmian antygenowych na powierzchni wiriona. Skok antygenowy może dotyczyć

każdego z ośmiu segmentów genomu wirusa. Potencjalnie może wystąpić 256 różnych genetycznie szczepów potomnych. Wymiana segmentów genomu jest również możliwa pomiędzy szczepami wirusa pochodzącymi od różnych gatunków zwierząt. Równoczesne zakażenie komórki szczepem ludzkim i ptasim może doprowadzić do powstania nowych podtypów różnych od już istniejących. Powstający wirus posiada część segmentów pochodzących z genomu od jednego szczepu, a część od drugiego szczepu. Ta zmienność pozwala na uniknięcie mechanizmów obronnych gospodarza wytworzonych przeciwko innym, poprzednio występującym podtypom wirusa grypy. Powstający nowy podtyp nie napotyka barier ochronnych gospodarza i w efekcie może stać się podtypem dającym początek epidemii, a nawet pandemii (12, 14, 22).

Przesunięcie antygenowe jest procesem stałym i ciągłym, natomiast skok antygenowy pojawia się nagle, co kilkanaście/ kilkadziesiąt lat (12, 14, 22).

WIRUSY PTASIEJ GRYPY

Wirusy grypy A o różnych antygenach powierzchniowych od H1 do H16 oraz od N1 do N9 występują u ptaków domowych, u ptaków dzikich, izolowano je również od ptaków ozdobnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w populacjach ptaków wodnych odnotowano występowanie wszystkich możliwych kombinacji rodzajów H i N. Podtypy patogenne dla jednego gatunku ptaków mogą być nie patogenne dla innych gatunków (1). Jednakże słabo patogenne szczepy (LPAI – Low Pathogenic Avian Influenza) na skutek mutacji szybko mogą stać się szczepami wysoce zjadliwymi i wywołać wysoce zjadliwą grypę ptaków (HPAI – Highly Pathogenic Avian Influenza) (18). Dzikie ptaki wodne, wędrowne, morskie zakażone bezobjawowo stanowią największy naturalny rezerwuuar i mogą przenosić wirusy grypy na znaczne odległości. Największą wrażliwość na zakażenie wirusami grypy ptasiej wykazują indyki, kury oraz inne gatunki drobiu grzebiącego. Sugeruje się, że prawdopodobnie od drobiu zakażają się ptaki wodne migrujące (1,18). Jednakże rola dzikich ptaków jak dotąd jeszcze nie jest w pełni poznana.

Definicja grypy ptaków podana przez UE jest następująca:

1. „grypa ptaków” oznacza zakażenie drobiu lub innych ptaków wywołane przez jakikolwiek wirus grypy typu A podtypów H5 lub H7 lub z indeksem dożylną zjadliwości wirusa (IVPI) u 6-cio tygodniowych kurcząt wynoszącym powyżej 1,2;
2. „wysoce zjadliwa grypa ptaków (HPAI)” oznacza zakażenie drobiu lub innych ptaków wywołane wirusami H5 i H7, z sekwencjami kodującymi liczne aminokwasy

zasadowe w miejscu cięcia cząsteczki hemaglutyniny podobnymi do sekwencji obserwowanych w innych wirusach HPAI, wskazujących na możliwość rozszczepienia cząsteczki hemaglutyniny przez większość proteaz gospodarza lub z wirusami grypy ptaków z indeksem dożylniej zjadliwości wirusa (IVPI) u 6-cio tygodniowych kurcząt wynoszącym powyżej 1,2;

3. „grypa ptaków o niskiej zjadliwości (LPAI)” oznacza zakażenie drobiu lub innych ptaków wywołane wirusami grypy ptaków, których nie obejmuje definicja w ust.2.

ZAKAŻENIA LUDZI WIRUSEM H5N1

Grypa stanowi bardzo szczególny rodzaj zoonozy, czyli choroby odzwierzęcej (4, 18).

Wprowadzenie metod biologii molekularnej pozwoliło na jednoznaczne wykazanie "ptasiego" pochodzenia szczepu wirusa grypy H1N1, który wywołał „hiszpankę”.

Odpowiedzialny za „grypę azjatycką” szczep Asian 57 będący podtypem H2N2 posiadał trzy segmenty: HA, NA i PB1 z wirusa ptasiego, natomiast wirus Hong Kong/68 podtyp H3N2, będący przyczyną „grypy Hong Kong” posiadał segment HA i segment PB1 z wirusa występującego u kaczek (8).

U ludzi grypę wywołują wirusy posiadające hemaglutyniny H1, H2 i H3 specyficzne dla receptorów znajdujących się na powierzchni komórek ludzkich (36). Aminokwasy w cząsteczce hemaglutyniny umieszczone w pozycji 226 i 228 określają specyficzność receptorową. Hemaglutyniny z leucyną (Leu) w pozycji 226 i seryną (Ser) w pozycji 228 charakterystyczne dla szczepów ludzkich rozpoznają połączenia pomiędzy kwasem sialowym (SA) a galaktozą (Gal), czyli strukturę SA- α -2,6-Gal receptorów ludzkich. Natomiast hemaglutyniny subtypów ptasich H5 i H7 nie mają zdolności łączenia się z tymi receptorami. Posiadają one w pozycji 226 kwas glutaminowy (Gln), a w pozycji 228 glicynę (Gly) i rozpoznają struktury receptorowe SA- α -2,3-Gal. Jednak u świń wykazano obydwa typy receptorów swoistych zarówno SA- α -2,6-Gal, jak i SA- α -2,3-Gal. Dlatego też świnię spełniają rolę ogniwa pośredniego i stanowią "mikser", w którym powstaje nowy zarazek przeważnie wysoce patogenny dla ludzi (9, 17). W Azji z powodu ścisłych kontaktów ludzi z wieloma gatunkami zwierząt, jak również ogromnego zagęszczenia istnieją korzystne

warunki do międzygatunkowej transmisji wirusów i powstawania nowych podtypów. Z tego powodu południowa Azja jest uznawana za światowe epicentrum grypy (14).

Wirusami ptasiej grypy na ogół zakażają się tylko ptaki, rzadziej świnie. Niestety w 1997 r. w Hong Kongu wyizolowano nowy podtyp wirusa, określony jako H5N1, który był reasortantem dwóch różnych szczepów kaczych i spowodował na fermach drobiu wystąpienie HPAI. Odnotowano 18 zachorowań u ludzi, potwierdzonych zarówno izolacją wirusa H5N1, jak i badaniem serologicznym. Sześć osób zmarło. Źródłem infekcji we wszystkich przypadkach był bezpośredni kontakt ludzi z chorymi ptakami domowymi (7).

Wirus grypy ptasiej H5N1 ponownie pojawił się pod koniec 2003 r. Jego obecność odnotowano początkowo w Południowej Korei, a następnie w ciągu roku na fermach drobiu 8 państw azjatyckich. W ciągu 3 lat krążąc między ptactwem dzikim a drobiem pojawił się na trzech kontynentach. Obecnie zaatakowanych jest 8 państw w Afryce, 26 państw w Europie i rejonach Kaukazu oraz 15 krajów azjatyckich. Ponad 30 krajów potwierdziło wystąpienie ognisk grypy u drobiu, a w 13 krajach europejskich zanotowano H5N1 tylko u ptaków dzikich, przeważnie u łabędzi.

Już na samym początku, w grudniu 2003 r w Wietnamie opisano pierwszy przypadek bezpośredniej transmisji wirusa H5N1 od drobiu na człowieka, następnie pojawiły się dalsze. W okresie 2003-2004 zostały zaatakowane Wietnam i Tajlandia, gdzie odnotowano 46 przypadków zachorowań i 32 przypadki zakończone śmiercią pacjentów. W 2005 r pojawiły się zachorowania u ludzi w pięciu krajach. Do Wietnamu i Tajlandii dołączyła Kambodża, Chiny i Indonezja (7). Wirus H5N1 od drobiu zakażyło się 95 osób, a 41 zmarło. W roku 2006 chorobę u ludzi zanotowano w 10 krajach: Azerbejdżanie, Kambodży, Chinach, Djibouti, Egipcie, Indonezji, Iraku, Tajlandii, Turcji i Wietnamie. Ogółem od grudnia 2003 r. do 12 marca 2007 r. na świecie zachorowało 283 osoby, a zmarło 170 (23). Z uwagi, że WHO odnotowuje jedynie przypadki potwierdzone laboratoryjnie, rzeczywista liczba zakażeń może być znacznie wyższa.

WHO opracowała sześciofazową skalę zagrożenia pandemią grypy (24). Obecnie znajdujemy się w trzeciej fazie, która oznacza pojawienie się infekcji ludzi nowym, dotychczas nie występującym podtypem wirusa, lecz nie dochodzi lub dochodzi jedynie sporadycznie do bezpośredniego przeniesienia wirusa z człowieka na człowieka. Dotychczas zanotowano dwa przypadki transmisji wirusa od człowieka do człowieka. W Tajlandii śmiertelnie chora córka zakażyła opiekującą się nią matkę, która po paru dniach pełno objawowej choroby również zmarła. Badania laboratoryjne potwierdziły obecność wirusa

H5N1. Drugi przypadek, który zdarzył się w Wietnamie był podobny i też miał miejsce w obrębie rodziny (7, 24).

Badania laboratoryjne wykazały, że występują liczne odmiany genotypowe wirusa H5N1 różniące się od genotypu wirusa izolowanego w 1996 r. Analiza sekwencyjna izolatów wirusowych wykazała dwie gałęzie filogenetyczne wirusów H5N1 (13, 29). Wyróżnia się grupy wirusów o genotypie Z, Z+, V, W, G. Niektóre z nich powstały poprzez mutacje punktowe dotyczące sekwencji aminokwasowej w hemaglutyninie oraz w segmentach PB2, NP i NS; inne jak na przykład genotyp G powstał poprzez reasortację pomiędzy genotypem Z i W. Jedną gałąź drzewa filogenetycznego stanowią wirusy cyrkulujące w okresie 2004–2005 w Kambodży, Tajlandii i Wietnamie. Są to wirusy o genotypie Z+. Drugą gałąź stanowią wirusy odpowiedzialne za obecny atak na Indonezję. Wirusy te rozprzestrzeniły się na Bliski Wschód, Europę i Afrykę. W tej grupie można wyróżnić już 6 podgrup. Obecnie za szczep dominujący u ptaków uważa się szczep Fujian, który pojawił się w październiku 2006 r. w Chinach (17).

Dotychczas wirus H5N1 ma ograniczoną możliwość atakowania ludzi oraz nie posiada zdolności transmisji pomiędzy ludźmi. Hemaglutynina w aktualnie krążących szczepach tego wirusa posiada w pozycji 226 glutaminę, a w pozycji 228 glicynę i jak wszystkie szczepy ptasie rozpoznaje struktury SA- α -2,3-Gal receptorów komórkowych. Jednakże badania histologiczne skrawków pobranych z dolnych partii dróg oddechowych ludzi zakażonych wirusem H5N1 wykazały, że ma on predylekcję do pneumocytów typu II, makrofagów pęcherzyków płucnych oraz nie urzęsionych komórek nabłonkowych oskrzelików końcowych. U pacjentów obserwowano ciężką infekcję dolnych dróg oddechowych z szybką progresją do zapalenia płuc. Wirus nie atakował górnych dróg oddechowych i nie przenosił się drogą kropelkową (11, 21). Jednakże stwierdzono, że wirus H5N1 wciąż mutuje i aminokwasy zlokalizowane blisko miejsca wiązania receptorów ulegają zmianom (13, 15). Wykazano szereg podobieństw do obecnie zrekonstruowanego szczepu wirusa H1N1, który wywołał ‘hiszpankę’ (19, 20). Zauważono też zmiany w wirusowej polimerazie PB2 (13). W ptasich szczepach grypy w PB2 w pozycji 627 znajduje się zazwyczaj kwas glutaminowy, podczas gdy w ludzkich szczepach jest lizyna. Jednakże w niektórych szczepach H5N1 izolowanych od zmarłych pacjentów wykryto w PB2 lizynę. Również lizyna w tej pozycji była w szczepach pochodzących od dzikich ptaków wodnych z jeziora Qinghai w Chinach (17).

Analiza zakażeń człowieka wirusem H5N1 wykazała, że większość zachorowań nastąpiła w wyniku bezpośredniego kontaktu z chorym drobiem. Zakażone ptaki wydalają

wirus z wydzieliną z układu oddechowego, worka spojówkowego, a także z kałem do 30 dni po zakażeniu. Zakaźność wirusów w kale ptaków wynosi 30-35 dni w 4⁰C i około 7 dni w 20⁰C. W 1 g zakażonego kału koncentracja infekcyjnych cząstek wirusowych może wynosić nawet 10⁷. Wydzieliny te oraz zainfekowany wirusem kał mogą zanieczyszczać narzędzia, sprzęt, wyposażenie fermy, pojazdy, ubrania i obuwie ludzi. W ten sposób wirus może być przeniesiony w obrębie jednej lub kilku ferm. Może się także przenosić droga powietrzną. Również woda z jezior i stawów zanieczyszczona odchodami ptaków stanowi bezpośrednie zagrożenie. Wirus może w niej pozostać zakaźny do 105 dni (18).

Ludzie zakażają się drogą aerogenną lub *per os*, przez bezpośredni kontakt z chorym drobiem, lub poprzez kontakt z zakażonym środowiskiem. Do zakażenia dochodzi podczas uboju, obróbki drobiu i spożywania surowych produktów drobiowych. Dopiero mięso poddane obróbce termicznej w temperaturze co najmniej 70⁰C (temperatura w środku i we wszystkich miejscach produktu) jest bezpieczne. Jaja mogą zawierać wirus zarówno na zewnątrz (na skorupkach), jak i w środku (białko i żółtko), lecz wirus ginie po pasteryzacji lub gotowaniu jaj (temperatura 60⁰C –3,5 min.) (18).

Okres inkubacji choroby u ludzi wynosi zazwyczaj 2-8 dni. Choroba rozpoczyna się jak normalna, sezonowa grypa: bólem głowy, gorączką, mięśniobólami i biegunką. Następnie rozwija się zespół ciężkiej niewydolności oddechowej, po 4–10 dniach pacjenci wymagają intubacji, obserwowane są zaburzenia kardiologiczne, rozsiane wykrzepianie śródnaczyniowe, wytwarzanie nadmiernej ilości cytokin, zaburzenia żołądkowo–jelitowe, rozwija się niewydolność nerek, wątroby. Zejście śmiertelne następuje prawie w połowie przypadków pomiędzy 8 a 14 dniem od wystąpienia pierwszych objawów. Podobny przebieg choroby występował podczas pandemii „hiszpanki” w 1918 r. (20). W Wietnamie opisano też (2, 5) atypowy przebieg choroby u kilku pacjentów, u których występowała silna biegunka i zapalenie opon mózgowych, przy braku zmian w układzie oddechowym.

Średnia wieku zakażonych osób wynosi 24 lata, mediana 20 lat, rozpiętość wieku wynosi od 3 miesięcy do 75 lat. Współczynnik śmiertelności w zależności od grupy wiekowej wynosi od 73% (grupa wiekowa między 10-19 lat) do 18% u osób powyżej 50 lat. Biorąc pod uwagę wszystkie przypadki razem procent śmiertelność wynosi obecnie 57, a w 2006 roku był wyższy i kształtował się na poziomie 64 (24).

ZAKAŻENIA INNYCH ZWIERZAT WIRUSEM H5N1

W grudniu 2003 r. na samym początku wybuchu epidemii H5N1 u drobiu w Tajlandii, po spożyciu kurcząt pochodzących z zakażonego stada, padły dwa tygrysy i dwa lamparty w ZOO. Z ich narządów wewnętrznych wyizolowano wirus H5N1. Nieco później również w Tajlandii padły koty domowe po zjedzeniu chorych gołębi. Dotychczas kotowate były uznawane za zwierzęta niewrażliwe na zakażenie wirusem grypy. Był to pierwszy przypadek choroby i śmierci u kotów, spowodowany tym wirusem. Eksperymentalne zakażenie kotów domowych wykazało, że następuje transmisja wirusa między kotami (10, 16). Zakażenie tygrysów w ZOO tajlandzkim obserwowano ponownie w 2004 r. Padło wówczas 147 tygrysów ze stada liczącego 441 sztuk. Zakażenie nastąpiło po nakarmieniu zwierząt chorymi kurczętami z likwidowanej fermy (3). Infekcje kotów obserwowano również w 2006 r. w Europie, w Niemczech i Austrii. Ponadto w Niemczech wirus H5N1 izolowano także od padłej kuny. Jest to pierwszy udokumentowany przypadek zakażenia tego gatunku zwierzęcia wirusem grypy.

Ponadto wirus H5N1 izolowano od padłych cywet w Wietnamie, od świń w Chinach. U psów badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał (10). Nie stwierdzono zakażeń wirusem grypy ani ryb, ani małży lub ślimaków.

SYTUACJA NA ŚWIECIE I PRZYGOTOWANIA DO ZABEZPIECZENIA SIĘ PRZED PANDEMIĄ

Po raz pierwszy w historii wydarzyła się epidemia u zwierząt o tak szerokim zasięgu. Do lat dziewięćdziesiątych XX wieku ogniska choroby były ograniczone do jednej fermy drobiu, w następnych latach odnotowano przypadki występowania choroby w kilku fermach znajdujących się na terenie jednego państwa. Na przełomie 2003/2004 r. zaatakowanych zostało wiele ferm w 9 krajach azjatyckich, obecnie wirus H5N1 notowany jest na trzech kontynentach, w 50 krajach. Według raportu FAO na skutek HPAI na świecie padło lub zlikwidowano ponad 220 milionów ptaków. Jest to więcej niż w poprzednich latach łącznie. Straty finansowe są ogromne i sięgają kilkuset, a nawet kilku tysięcy milionów dolarów. Eksperti z trzech międzynarodowych organizacji zajmujących się sprawami zdrowia, a mianowicie: Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), Organizacji

Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) oświadczyli, że „ptasia grypa, występująca w wielu krajach świata, może stanowić w skali świata poważne zagrożenie dla ludzkości”.

Przez cały czas prowadzone są badania nad wirusem, jego rozprzestrzenianiem się i zmiennością, sposobami kontroli powstałego stanu zagrożenia, nad przygotowaniem szczepionki oraz nowymi, skutecznymi lekami. Badania te są priorytetem w zakresie ochrony zdrowia publicznego. „Jest możliwość konkretnego zredukowania ryzyka pandemii u ludzi wywołanej przez wirus H5N1 poprzez zniszczenie wirusa u jego źródła – u zwierząt” - powiedział J. Domenech, szef służb weterynaryjnych w FAO. Opracowuje się wspólną światową strategię do walki z wysoko patogenną ptasią gripą, stworzono system szybkiego ostrzegania pozwalający na natychmiastowe działania. Wykorzystuje się satelity, sieci komputerowe, a nawet turystów do monitorowania sytuacji u dzikich ptaków. Ważność problemu oddają słowa dyrektora generalnego OIE – dr. B. Vallata: „Wczesne wykrycie zarazki i szybka reakcja są czynnikami rozstrzygającymi w ochronie przed światowym kryzysem związanym z pojawieniem się w przyszłości choroby zwierząt potencjalnie mogącej przenieść się na ludzi.”. Z kolei J. Adams – wice-prezydent Banku Światowego wzywa w trybie natychmiastowym do poszukiwania źródeł finansowania działań zmniejszających światowe zagrożenie.

SYTUACJA W POLSCE

W Polsce nie notowano wystąpienia grypy w stadach drobiu. Podobnie jak w większości krajów UE była notowana jedynie u dzikich ptaków. Zgodnie z Dyrektywą Rady Europy (6) wysoce zjadliwa grypa ptaków znajduje się na liście chorób zakaźnych zwierząt podlegających obowiązkowi zwalczania. Zwalczanie polega na przerwaniu możliwości kontaktów wirusa z ptakami, czyli uniemożliwieniu wnikięcia wirusa do fermy, a jeśli to się nie uda, uniemożliwieniu wydostania się wirusa z fermy. Są to standardowe działania takie jak: zlokalizowanie źródła infekcji i wyeliminowanie źródła zakażenia, likwidacja wszystkich gatunków zakażonych ptaków, utylizacja padłych i zlikwidowanych ptaków, mięsa, jaj oraz produktów drobiowych, odkażanie obiektów oraz pomieszczeń, wprowadzenie kwarantanny. Likwidacji podlegają również ptaki znajdujące się w promieniu 1 km od ogniska oraz w fermach mających kontakt z okęgiem zapowietrzonym o promieniu 3 km i zagrożonym o promieniu 10 km. Wprowadza się też rozszerzony monitoring obejmujący cały kraj i

uwzględniający ptaki wolnożyjące. Główny lekarz weterynarii może zarządzić pod urzędowym nadzorem szczepienia interwencyjne, jako uzupełnienie innych środków zwalczania grypy.

Piśmiennictwo

1. Alexander D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3 – 13.
2. Apisarnthanarak A. et al. (2004) Atypical avian influenza (H5N1). *Emerg.Infect.Dis.* 10, 1321-1324.
3. Amonsin A., Payyungporn S., Theamboonlers A., Thanawongnuwech R I wsp(2006) Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology*, , 344, 480–491
4. Cohen J. (1997). The flu pandemic that might have been. *Science*, 277, 1600 – 1601
5. De Jong M.(2005): Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N.Engl.J.Med.* 352, 686-691
6. Dyrektywa Rady 2005/94/WE z dn.20 grudnia 2005r w sprawie wspólnotowych środków zwalczania grypy ptaków. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L.* 10/16.PI 14.I.2
7. Hayden F., Croisier A.(2005). Transmission of avian influenza viruses to and between humans. *JID*, 192, 1-4
8. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G (1989). Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 1989, 63, 4603 – 4608
9. Kuiken T.,Holmes E., McCouley J .i wsp.(2006). Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 312, 394-397
10. Kuiken T., Immellzwaan G., Riel D.,Amerongen G., Baars R. i wsp.(2004).Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 310, 306-310
11. van Riel D., Munster V.J., Witt E., Rimmelzwaan G.F. i wsp.(2006). H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science* 312, 399-401
12. Scholtisek C.(1995) Molecular evolution of influenza viruses. *Virus Genes* 11, 209 – 215
13. Shinya K(2006). Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440, 435-436
14. Shortridge K.F (1997).:The influenza conundrum. *J. Med. Microbiol.* 46, 813 – 815,
15. Sims L.D., Ellis T.M.,Liu K.K.(2003) Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis.* 47,832-838
16. Songserm T., Amosin A., Jam-on R.,Sae-Heng N. i wsp.(2006) Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg. Infect.Dis.* 12, 681-683
17. Stevens J., Blixt O., Tumpey T., Taubenberger JK. i wsp..(2006) Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312, 404-410
18. Swayne D.E., Halvorson D.A.(2003) Avian Influenza. [W]. *Diseases of Poultry* ,XI ed. Iowa State Press a Blackwell Publishing Company. 135 –160
19. Taubenberger J.K.(2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437, 889-893
20. Tumpey T.M.(2005).Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005, 310, 77-80
21. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F.(2005) Probable person-to-person transmission of avian influenza (H5N1). *N.Eng.J.Med.*2005, 352, 333-340
22. Webster R.G.(1999) Influenza viruses (Orthomyxoviridae). W. *Encyclopedia of Virology*. T.2, red.: Granoff F., Webster R.G., Academic Press, San Diego, 824 – 829.
23. WHO. (2007) Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1). Epidemic and pandemic Alert and Response. www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases March 12,
24. WHO (2007). Weekly Epidemiological Record, 81, 249-260 www.who.int/wer

