

IHN – występowanie, patogeneza i diagnostyka

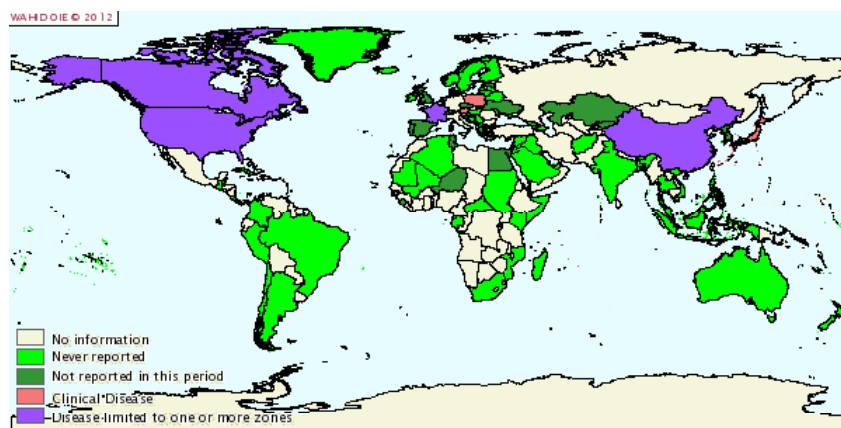
Marek Matras, Magdalena Stachnik, Ewa Borzym, Joanna Maj

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Chorób Ryb

Na podstawie analizy objawów chorobowych i zmian anatomopatologicznych, obserwowanych u ryb, przypuszcza się, iż pierwsze przypadki IHN wystąpiły w latach czterdziestych XX wieku w Ameryce Północnej. Ogromne śnięcia notowano w śródlądowych obiektach rybackich, gdzie hodowano łosie nerka (*Oncorhynchus nerka*). W latach osiemdziesiątych pojawiły się doniesienia o obecności wirusa IHN w Europie. Zakaźna martwica układu krwiotwórczego jest najpoważniejszą chorobą ograniczającą dochodowość hodowli łososi Oceanu Spokojnego w Stanach Zjednoczonych oraz powoduje duże straty w hodowli pstrąga tęczowego w Europie. Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem IHN są młode osobniki, u których choroba przebiega najczęściej w postaci ostrej powodując do 90% śnięć. U starszych pstrągów i smoltów łososi występuje sporadycznie. Czynnikiem warunkującym występowanie choroby jest wiek ryb i temperatura wody. Strefa występowania IHN jest ograniczona do terenów, gdzie temperatura wody spada okresowo przynajmniej do 10°C.

Zakaźna martwica układu krwiotwórczego (IHN) oprócz Ameryki Północnej i Europy, występuje również w Azji (ryc. 1).



Ryc.1. Występowanie IHN w poszczególnych państwach w roku 2011 na podstawie danych WAHID O.I.E. (kolor biały – brak informacji, kolor jasnozielony – nigdy nie odnotowano IHN, kolor ciemnozielony – nie odnotowano przypadku IHN w roku 2011, kolor różowy – kliniczna postać

IHN – występowanie, patogeniza i diagnostyka

choroby, kolor niebieski – choroba ograniczona do niewielkiego obszaru, kolor czerwony – aktualnie stwierdzone przypadki).

W roku 2011, na podstawie danych zebranych przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne w zakresie chorób ryb (EURL), obecność wyżej wymienionego wirusa odnotowano w następujących państwach europejskich: Austria, Belgia, Czechy, Holandia, Niemcy, Polska i Słowenia. Łączna liczba gospodarstw rybackich w Europie, które zaklasyfikowano jako podejrzane o obecność wirusa IHN w roku 2011 wyniosła 61.

W Polsce po raz pierwszy wirus IHN został wyizolowany w 2001 roku (Antychowicz i wsp. 2001). Kolejne przypadki zaczęły pojawiać się od roku 2008. Liczba gospodarstw, w których stwierdzano wirus IHN stale rosła i w roku 2011 zgodnie z danymi opublikowanymi przez Główny Inspektorat Weterynarii w biuletynie „Stan zakaźnych chorób zwierzęcych” odnotowano IHN w sześciu gospodarstwach w województwie zachodniopomorskim oraz w dwóch w województwie pomorskim. Wzrastająca ilość notowanych przypadków utrzymała się również w roku 2012, w którym stwierdzono obecność wirusa IHN w 9 gospodarstwach rybackich w województwie zachodniopomorskim oraz w pomorskim. (ryc. 2).



Ryc. 2. Rozprzestrzenienie IHN w Polsce w 2011 r., 2012 r.

1 Liczba przypadków w województwie w 2011 r.

1 Liczba przypadków w województwie w 2012 r.

W roku 2011 po raz pierwszy liczba gospodarstw zakażonych wirusem IHN przewyższyła liczbę gospodarstw zakażonych wirusem VHS.

Pierwsze przypadki zakażnej martwicy układu krwiotwórczego miały najprawdopodobniej związek z importem ikry z krajów Zachodniej Europy, gdzie IHNV występuje od wielu lat. Natomiast rozprzestrzenienie zakażenia w kolejnych latach, jest wynikiem przenoszenia wirusa w obrębie polskich gospodarstw rybackich za pośrednictwem transportu zakażonej ikry, jak i zakażonego materiału obsadowego. Niepokojącym objawem jest fakt, iż pomimo wdrażania procedur natychmiastowego zwalczania choroby w gospodarstwie, w którym wykryto wirus IHN, liczba takich gospodarstw stopniowo wzrasta.

Wyjaśnieniem zaistniałej sytuacji może być fakt, iż w gospodarstwie rybackim tylko niewielki procent ziaren ikry oraz niewielki odsetek wylęgu może być zarażony wirusem IHN. Jednak nawet bardzo mała ilość zakażonych ziaren, czy też zakażonego wylęgu wystarczy, by choroba stale występowała w obiekcie. Ponadto, w dużych gospodarstwach rybackich, przy masowej produkcji ikry, nie obserwuje się strat spowodowanych przez wirus IHN i dlatego niezwykle trudno jest stwierdzić obecność wirusa. Natomiast kiedy ryby pochodzące z takiego obiektu zostaną poddane stresowi (transport oraz obsadzenie w nowym obiekcie), stają się często źródłem zakażenia dla kolejnych obiektów rybackich.

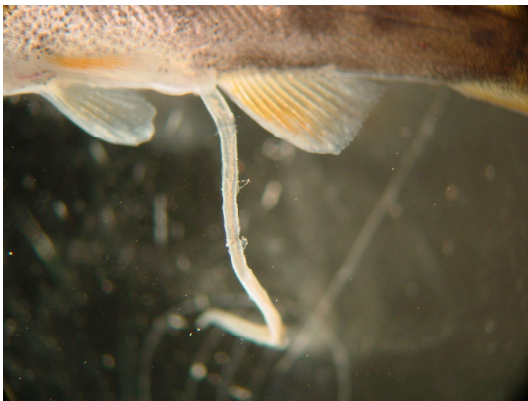
Źródłem infekcji wirusa IHN są chore ryby, ryby nosiciele, ikra, skontaminowana woda, sprzęt rybacki i sprzęt używany do transportu ryb. Ryby rozsiewają wirusy z odchodami, moczem, produktami płciowymi i śluzem powłok zewnętrznych.

Znaczne ilości wirusa są wydalane przez zakażone młode ryby. Starsze ryby stają się coraz bardziej odporne na infekcję, ale podczas tarła u tych ryb stwierdza się wirus w produktach płciowych.

Okres inkubacji, czyli czas od zakażenia się ryby do pojawienia się pierwszych objawów chorobowych wynosi od 5 dni do 2 tygodni. Najbardziej wrażliwe na infekcję IHN są ryby bezpośrednio po wykluciu się z ikry. Duża wrażliwość ryb na infekcję wirusa IHN utrzymuje się do wieku kilku miesięcy. Wraz z

wiekami wrażliwość ryb na infekcje wirusa IHN maleje. U ryb powyżej 1 roku życia infekcja IHN przebiega zwykle w postaci bezobjawowej.

Objawy chorobowe, które są charakterystyczne dla IHN to nagły wzrost śmiertelności, pociemnienie skóry, anemia skrzel, wysadzenie gałek ocznych, obrzęk jamy ciała spowodowany gromadzącym się wysiękiem oraz ciągnące się pasemka śluzu z odbytu określane jako pseudoodchody (Fot. 1). Ponadto, u ryb można zaobserwować punkcikowate wybroczyny, które występują często u nasady płetw (Fot. 2).



Fot. 1. Pseudoodchody u pstrąga tęczowego w przebiegu IHN.



Fot. 2. Obrzęk jamy ciała oraz punkcikowate wybroczyny w okolicy płetw piersiowych u pstrąga tęczowego w przebiegu IHN

W celu potwierdzenia, bądź wykluczenia obecności wirusa IHN należy pobrać i przebadac próbkę ryb. Regulacje dotyczące pobierania próbek ryb w kierunku badań wirusologicznych IHN oraz postępowanie diagnostyczne można znaleźć na wielu poziomach legislacyjnych. W przypadku badań urzędowych następujące dokumenty regulujące tematykę pobierania materiału do badań wirusologicznych to: Dyrektywa Rady 2006/88/WE, Decyzja Komisji z 22 lutego 2011/183/WE, Projekt „Diagnostic Manual for certain aquatic animal diseases”, Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr GIW.400/R-10/06 z dnia 17 marca 2006r. w sprawie postępowania

powiatowych lekarzy weterynarii przy wysyłaniu próbek ryb do badań w Krajowym Laboratorium Referencyjnym dla Chorób Ryb oraz „Podręcznik pobierania próbek do laboratoryjnych badań diagnostycznych chorób zakaźnych zwierząt” opracowany przez Główny Inspektorat Weterynarii w 2008r. Wszystkie wyżej wymienione dokumenty określają sposób wyboru ryb do próbki (ich ilości oraz gatunki wrażliwe na poszczególne wirusy), ponadto reżimy termiczne oraz sposób transportu próbki do laboratorium.

Inspekcje gospodarstwa rybackiego i pobieranie próbek w kierunku IHN należy prowadzić w czasie gdy temperatura wody jest poniżej 15°C.

W przypadku gdy próbki muszą być pobrane dwukrotnie w ciągu roku w tym samym gospodarstwie, odstęp czasowy między jednym a drugim pobraniem próbek powinien być możliwie największy. Wszystkie baseny, stawy w gospodarstwie podczas inspekcji powinny być sprawdzone pod względem obecności śniętych, słabych i dziwnie zachowujących się ryb. Bardzo ważne jest, aby zwrócić szczególną uwagę na miejsca odprowadzające wodę ze stawu lub basenu, gdzie bardzo często gromadzą się słabe, chore ryby. W przypadku obecności w gospodarstwie takich ryb, wykazujących objawy chorobowe, takie osobniki powinny znaleźć się w przygotowywanej próbce. Jeżeli takich ryb nie ma w gospodarstwie, próbki należy pobrać tak, aby wszystkie grupy wiekowe ryb przebywające w gospodarstwie znalazły odzwierciedlenie w próbce. Ważny jest również wybór właściwego gatunku ryb. W przypadku pobierania próbek w kierunku badań IHN należy wybrać do próbki w pierwszej kolejności pstrąga tęczowego, jeżeli jest utrzymywany w gospodarstwie. Jeżeli nie ma pstrąga tęczowego w gospodarstwie, ryby do próbki należy wybrać wśród pozostałych gatunków, które wykazują wrażliwość na wirusy VHS, IHN. Wrażliwe gatunki ryb zostały wymienione w Dyrektywie 2006/88 (Tabela 1).

Tabela. 1 Wrażliwe gatunki ryb wymieniane w dyrektywie 2006/88

Choroba	Gatunki wrażliwe
VHS	Sledź (<i>Clupea spp.</i>), gładź (<i>Coregonus sp.</i>), szczupak (<i>Esox lucius</i>), plamiak (łupacz) (<i>Gadus aeglefinus</i>), dorsz pacyficzny (<i>Gadus macrocephalus</i>), dorsz atlantycki (<i>Gadus morhua</i>), łosoś pacyficzny (<i>Oncorhynchus spp.</i>), pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), onos (mustelka) (<i>Onos mustelus</i>), troć wędrowną (<i>Salmo trutta</i>), turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>), szprot (<i>Sprattus sprattus</i>) oraz lipień europejski (<i>Thymallus thymallus</i>)
IHN	Łosoś keta (<i>Oncorhynchus keta</i>), kizucz (<i>O. kisutch</i>), łosoś japoński (masu) (<i>O. masou</i>), pstrąg tęczowy (<i>O. mykiss</i>), łosoś nerka (czerwony) (<i>O. nerka</i>), <i>O. rhodurus</i> i łosoś chinook (<i>O. tshawytscha</i>) oraz łosoś atlantycki (<i>Salmo salar</i>)

Do badania należy pobierać 30 sztuk ryb, jeżeli u ryb występują objawy kliniczne, próbka może składać się z 10 takich ryb.

Jeżeli gospodarstwo jest zasilane w wodę z kilku ujęć (woda studzienna i woda z rzeki) ważne jest aby próbka zawierała ryby reprezentujące poszczególne ujęcia wody.

Z dostarczonej próbki ryb do badań w kierunku IHN, zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii Nr GIW.400/R-10/06 z dnia 17 marca 2006r w laboratorium sporządza się laboratoryjne próbki ze skrawków narządów wewnętrznych (nerka przednia, śledziona, wątroba, serce, mózg) lub płynu jajnikowego pochodzących maksymalnie od 10 ryb. Odpowiednią ilość materiału umieszcza się w odpowiedniej ilości płynu transportowego.

Przygotowany materiał w płynie transportowym jest homogenizowany w homogenizatorze szklanym, następnie próbki są wirowane, przesączone przez filtr strzykawkowy 0,45 µm, po czym zakażane są wcześniej przygotowane linie komórkowe.

Zakażone linie komórkowe są obserwowane przez 7 do 10 dni w przypadku braku zmian cytopatycznych przeprowadzany jest drugi pasaż. Hodowle drugiego pasażu są również obserwowane przez 7 do 10 dni i w przypadku braku efektu cytopatycznego w drugim pasażu wynik badania jest ujemny. Zmiany cytopatyczne na linii komórkowej pierwszego bądź drugiego pasażu, świadczące o replikacji wirusa, są przekazywane do identyfikacji przy zastosowaniu metod rekomendowanych przez O.I.E oraz Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne. Polecanymi metodami są test ELISA, immunofluorescencja, seroneutralizacja i PCR. W przypadku badań wirusa IHN „złotym standardem” diagnostycznym jest wykorzystanie linii komórkowych, a następnie identyfikacja jedną z wyżej wymienionych metod. W myśl Dyrektywy 2006/88/WE laboratoria zajmujące się diagnostyką wirusowych chorób ryb wpisane są w system referencyjności. Każde z państw członkowskich musi wyznaczyć laboratoria regionalne (np. ZHW) oraz krajowe laboratorium referencyjne, które będzie sprawowało opiekę merytoryczną nad laboratoriami wyznaczonymi. Wszystkie krajowe laboratoria referencyjne są pod opieką Wspólnotowego Laboratorium Referencyjnego. Wszystkie wymienione trzy rodzaje laboratoriów muszą spełniać określone wymagania. Wszystkie laboratoria

muszą mieć wdrożony System Zarządzania jakością oraz posiadać akredytacje na stosowane metody. Ważnym elementem potwierdzającym biegłość laboratoriów jest uczestnictwo w badaniach biegłości organizowanych przez jednostki referencyjne. Zakład Chorób Ryb pełniący obowiązki Krajowego Laboratorium Referencyjnego w zakresie chorób ryb organizuje dla wyznaczonych placówek ZHW badania biegłości oraz uczestniczy w badaniach organizowanych przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne w Aarhus w Danii. Wypełnianie przez laboratoria zajmujące się diagnostyką wirusowych chorób obowiązków narzuconych przez Dyrektywę 2006/88/WE przez laboratoria zajmujące się diagnostyką wirusowych chorób daje pewność, że wszystkie elementy systemu uzyskują jednolite i wiarygodne wyniki badań.

Wydaje się, iż jedyną skuteczną metodą walki z IHN jest uzyskiwanie przez gospodarstwa statusu wolnego od wymienionych jednostek chorobowych. W Polsce status gospodarstwa wolnego od VHS i IHN posiada 20 obiektów rozmieszczonych w różnych rejonach kraju.

Gospodarstwa wolne od VHS i IHN na terenie Polski uzyskały swój status jako enklawy, czyli gospodarstwa uniezależnione od sytuacji epizootologicznej wód otaczających, posiadające ujemne wyniki badań w kierunku VHS i IHN oraz posiadające własny materiał zarybieniowy lub materiał zarybieniowy pochodzący z gospodarstw wolnych od VHS, IHN.

Zgodnie z dyrektywą Rady 2006/88 oprócz gospodarstw o statusie wolnym wymienione są również cztery inne kategorie (Tab. 1)

Tabela.1. Kategorie gospodarstw rybackich.

Kategoria	I	II	III	IV	V
Opis kat.	Uznane za wolne od choroby	Nie uznane za wolne od choroby, lecz objęte programem nadzoru i eliminowania	Bez informacji o zakażeniu, lecz nieobjęte programem nadzoru prowadzącym do osiągnięcia statusu obszaru wolnego od choroby	Istnieją informacje o zakażeniu; objęte programem zwalczania i eliminowania	Istnieją informacje o zakażeniu. Podlega minimalnym środkom zwalczania chorób

Na podstawie danych zebranych przez EURL, dotyczących kategoryzacji gospodarstw rybackich zgodnie z wytycznymi dyrektywy Rady 2006/88/WE, w Europie około 40 procent gospodarstw rybackich jest wolnych od VHS i 50 procent wolnych od IHN.

Tabela.2. Status gospodarstw rybackich dla VHS, IHN w Europie (według Olesen i wsp. 2012).

	Kat. I	Kat. II	Kat. III	Kat. IV	Kat. V	Liczba gospodarstw
VHS	3306	446	4348	37	47	8184
IHN	3674	370	3041	0	63	7148

Z danych zawartych w Tabeli nr 2 wynika, iż status nieznany (kat III) posiada jeszcze wiele gospodarstw rybackich utrzymujących ryby wrażliwe na VHS oraz IHN.

Piśmiennictwo:

1. Antychowicz J., Reichert M., Pękała A., Matusiewicz J.: Przypadek zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego i wirusowej posocznicy krwotocznej u wylęgu pstrąga tęczowego – wprowadzenie metody RT-PCR do diagnostyki tych wirusów w Polsce. *Medycyna Wet.* 2001, 12, 894-898.
2. Decyzja Komisji z dnia 22 lutego 2001 r. ustanawiająca plany pobierania próbek i metody diagnostyczne do celów wykrywania i potwierdzania występowania niektórych chorób ryb oraz uchylająca decyzję 92/532/EWG.
3. 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.
4. Draft Commission Decision of Diagnostic Manual for certain aquatic animal diseases (Text with EEA relevance) Brussels C (2009).
5. Instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii nr GIW.400/R-10/06 z dnia 17 marca 2006r. w sprawie postępowania powiatowych lekarzy weterynarii przy wysyłaniu próbek ryb do badań w Krajowym Laboratorium Referencyjnym dla Chorób Ryb.
6. Olesen N. J., Nicolajsen N.: Overview of the diseases situation and surveillance in Europe in 2011. 16. Annual Meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Aarhus, 2012.
7. Podręcznik pobierania próbek do laboratoryjnych badań diagnostycznych chorób zakaźnych zwierząt opracowany przez Główny Inspektorat Weterynarii w 2008r.