

MĀKSLĪGI RADĪTĀ LAŠU SPURU NEKROZE

ARTIFICIAL INDUCED SALMON FIN NECROSIS

Ruta Medne, Edgars Liepiņš

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

ABSTRACT

Fin necrosis is a progressive necrotic disease of many fish species. Several bacteria have been implicated in the etiology of the disease. To determine the bacteria associated with the disease in Baltic salmon, fish were sampled on hatcheries around the year. For determination of *Aeromonas* virulence, fish were artificially infected with *A. salmonicidae* and *A. hydrophila*.

KEY WORDS: salmon, fin necrosis, *Aeromonas spp.*

IEVADS

Lielākā daļa zivju slimības izraisīto baktēriju ir ūdens vides parastie iemītnieki, un parastos apstākļos tie nerada nekādas problēmas. Tomēr zivīm, kuras atrodas viena vai vairāku negatīvu faktoru ietekmē (krasas temperatūras izmaiņas, slikta ūdens kvalitāte, transportēšana vai dažādas manipulācijas) var radīt stresu un novājināt imūnsistēmu. Tādas zivis kļūst daudz uzņēmīgākas pret bakteriālajām infekcijām. Turklāt stresa faktori, kas izjauc zivju imūnās sistēmas līdzsvaru, var palielināt zivju saslimšanas uzliesmojuma risku arī nākotnē (Stoskopf, 1993; Pippet et al., 1982). Slimības ātrāk attīstās siltā ūdenī- pavasarī, vasarā, turpretī ziemas laikā tā pāriet latentā formā- tas ir zivju mirstība samazinās, klīniskās pazīmes izzūd, taču ierosinātais joprojām atrodas zivīs un ūdenī un gaida labvēlīgāku laiku (Stoskopf, 1993; Pippet et al., 1982).

Zivīm patogēnas galvenokārt ir gramnegatīvās un dažas grampozitīvās baktērijas. Dažādu zivju bakterioloģisko slimību ierosinātāji (*Aeromonas*, *Pseudomonas* *gintis* u.c.) plaši izplatīti ūdenstilpes sedimentā. Tā bakterioloģiskā analīzē visplašāk sastopamas *Aeromonas hydrophila* 24 - 33% gadījumā. Tā ir biežāk no zivīm izolētā patogēnā *Aeromonas* ģints baktērija, kura izsauc karpu, zandartu, līdaku, lašu u.c. zivju, kā arī cilvēka saslimšanu (Hazen et al., 1978; Paniagua et al., 1990; Mateos et al., 1992; Kawula et al., 1996; Nielsen et al., 2001; Gonzalez et al., 2001; Sechi et al., 2002) Lašveidīgajām zivīm smagu saslimšanu miksobakteriozi izsauc *Flavobacterium spp.* (Pippet et al., 1982; Stoskopf, 1993).

Baktērijas var izraisīt arī zivs spuru saslimšanu. Spuras ir zivs kustību orgāns, tām ir svarīga nozīme dažādu manevru veikšanā. Spuru patoloģiju pētījumi pasaulē notiek divu svarīgu iemeslu dēļ: pirmkārt, lai palielinātu zivju izdzīvošanas iespējas dabiskā vidē pēc zivju izlaišanas no audzētavām, otrkārt estētiskais faktors- makšķerniekiem un pircējiem labāk patīk zivis ar veselām spurām. Vairāk pētītas ir dzīves laikā iegūtās spuru patoloģijas: spuru nekroze/puve, deformācijas, defekti (Khan et al., 1981; Lakshmanaperumalsamy et al., 1984; Clayton et al., 1998; Lang et al., 1999; Van den Heuvel, et.al., 2000).

Spuru nekroze un/vai spuru puve ir aprakstīta vairākām zivju sugām: zandartiem (Wiklund, Bylund, 1995; Van den Heuvel, et al., 2000), karpām (Kirubaharan et al., 1995), varavīksnes forelēm (Holm, 1988; Noble, Summerfelt, 1996; Moutou et al.,

1998), plekstēm (Atallah et al., 1998; Lang et al., 1999; Bangaramma et al. 1999), skumbrijām (Khan et al., 1981; Lakshmanaperumalsamy et al., 1984;) u.c.

Latvijā ir aktuāla problēma spuru nekroze zivju audzētavās Valsts zivju atražošanas programmas ietvaros audzētajiem lašu mazuļiem.

Darba mērķis pierādīt spuru nekrozes etioloģisko faktoru.

MATERIĀLS UN METODIKA

Darbu izstrādāja no 2000. līdz 2003. gadam Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas un vides higiēnas institūtā, Latvijas zivsaimniecības pētniecības institūta Akvakultūras laboratorijā.

Bakterioloģiskajai analīzei zivis ieguva valsts zivju audzētavās. Spuru bojājumus iedalīja trijās grupās: pirmā- sadzijusi brūce un vesela spura (B-1), otrā- akūta progresējoša nekroze (B-2), trešā- spuras vietā izveidojusies čūla (B-3).

Lašu mākslīgo inficēšanu ar baktērijām *A. salmonicidae* un *A. hydrophila* veica, LZPI Akvakultūras laboratorijas akvāriju telpā.

Bioraudzei, lai pierādītu *A. salmonicidae* un *A. hydrophila* ietekmi uz spuru nekrozes veidošanos, izmantoja Baltijas laša mazuļus, kas audzēti specializētās lašu audzētavas inkubatorā.

Eksperimentu veica stikla akvārijos ar zivju izvietojamu platību 0.5 m² katram. Akvāriji bija aprīkoti ar ūdens temperatūras regulētājiem un aeratoriem. Ūdens temperatūru uzturēja 18 ± 1.3 °C, skābekli - 5 g/L un kontrolēja 2 reizes dienā ar oksimetru DO - 300.

Veica trīs pētījumu sērijas, izmantojot dažādus inficēšanas veidus. Izveidoja 9 zivju grupas, katrā 14 laši ar vidējo garumu 6.0 ± 0.3 cm. Zivis līdz eksperimentam inkubētas un audzētas specializētajā lašu audzētavā, izmantojot avota ūdeni. Visas zivis bija klīniski veselas, ar sugai raksturīgu uzvedību. Pirms inficēšanas manipulācijām lašus anestezēja ar 2-metilhinolīnu (hinaldīnu), izmantojot vannošanas metodi. Anestēzijas līdzekļa deva 10 mg/L ūdens.

Pirmā pētījuma zivīm injicēja baktēriju suspensiju vēdera dobumā. Katrai eksperimentā iekļautajai zivij vēdera dobumā, netraumējot iekšējos orgānus, ar šļirci ievadīja baktēriju suspensiju 0.5 mL ar koncentrāciju 1.5 x 10⁴ KVV. I-1 grupas zivīm injicēja *A. hydrophila* baktēriju suspensiju, I-2 grupas zivīm injicēja *A. salmonicidae* baktēriju suspensiju, bet I-K grupai injicējām 0.5 mL sterilu fizioloģisko šķīdumu.

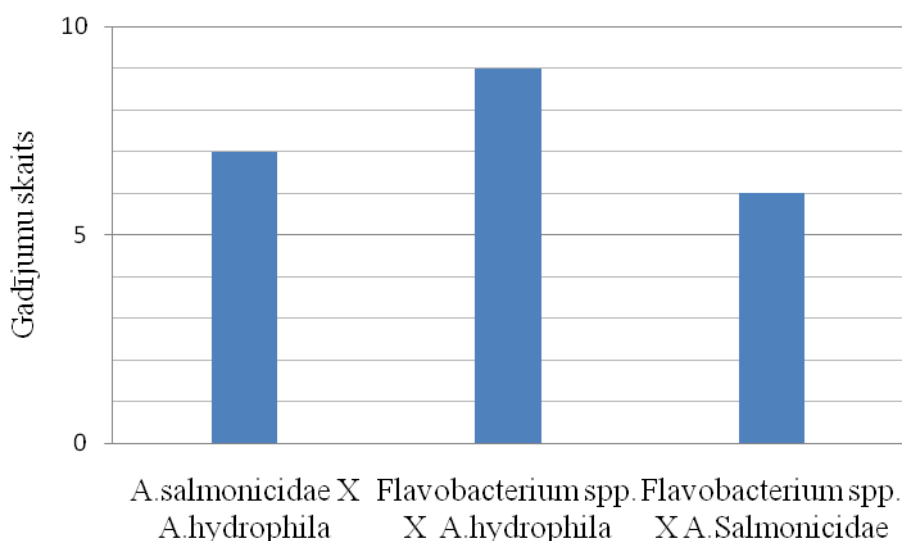
Otrā pētījuma sērijas zivis vannoja baktēriju suspensijā: 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. hydrophila* baktēriju suspensijā 1.5 x 10⁴ KVV /mL⁻¹ (V-1) un 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. salmonicidae* baktēriju suspensijā 1.5 x 10⁴ KVV /mL⁻¹ (V-2). Kontroles grupā iekļautos lašus izturēja tīrā ūdenī, radot eksperimenta grupām līdzīgus apstākļus (V-K).

Trešā pētījuma zivīm pirms vannošanas baktēriju suspensijā, muguras spurā radīja brūci- veica spuras daļas ekstirpāciju. Radušos brūci neapstrādāja ar antiseptiskiem līdzekļiem, tādējādi imitējot dabiski radušos brūci, zivij dzīvojot baseinā. Pēc operācijas zivis vannoja baktēriju suspensijā: 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. hydrophila* baktēriju suspensijā 1.5 x 10⁴ KVV /mL⁻¹ (VB-1) un 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. salmonicidae* baktēriju suspensijā 1.5 x 10⁴ KVV /mL⁻¹ (VB-2). Kontroles grupā iekļautajiem lašiem veica iegriezumu muguras spurā, pēc tam izturēja tīrā ūdenī, radot eksperimenta grupām līdzīgus apstākļus (VB-K).

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

No lašu spuru audiem izolēti ģinšu *Aeromonas*, *Flavobacterium* un *Pseudomonas* mikroorganismi. Vairumā gadījumu izolēta viena baktēriju sugu (1. att.), tomēr bija gadījumi, kad uz slimajām spurām bija divas patogēno baktēriju sugas. Vairāk par divām baktēriju sugām vienai zivij neatrada nevienā no izmeklētajiem gadījumiem. No veselām spurām visos gadījumos izolēta tikai viena patogēno baktēriju sugu.

Maišinfekcija konstatēta 22 gadījumos. Dažādās kombinācijās atrasta ģinšu *Aeromonas* un *Flavobacterium* baktērijas. Savukārt *Pseudomonas* ģints baktērija, visos diagnosticētajos gadījumos bija vienīgā patogēnā ģints pārstāve.



1. attēls. Baktēriju kombinācija maišinfekcijas gadījumā

Figure 1. Combination of bacteria in case of miscellaneous infection

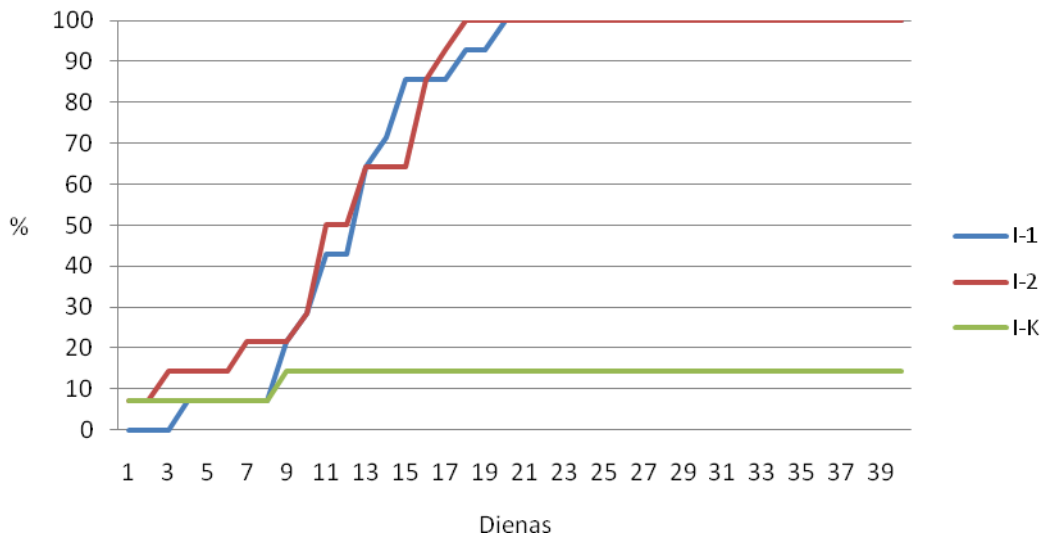
Analizējot literatūru, noskaidrojām, ka dažādās valstīs no spurām ir izolētas *P. fluorescens*, *P. anquilliseptica* u.c. (El Altara et al., 1996; Khan et al., 1981), *A. salmonicidae* (Turnbull, 1993) *Vibrio spp.* (Khan et al., 1981). Mūsu pētījumā visbiežāk atrastas *A.hydrophila* un *Flavobacterium spp.*. *A. hydrophila* ir visbiežāk ūdens sedimentā atrastā baktērija (Mateos et al., 1992), bet *Flavobacterium spp.* Latvijas apstākļos lašiem biežāk sastopamā infekcijas izraisītāja. Tādēļ loģiska ir šo baktēriju kombinācija arī uz spurām. Kombināciju: *A.hydrophila* un *A. salmonicidae* diagnosticējām 7 gadījumos, bet neidentificētas *Flavobacterium* ģints baktērijas un *A. salmonicidae* 6 gadījumos.

Lai pierādītu spuru nekrozes etioloģiju, eksperimentā izmantotos lašu mazulus inficēja ar izolēto baktēriju tūrkultūru. Monoinfekcijai izmantoja *Aeromonas hydrophila* un *A. salmonicidae*. Pēc zivju inficēšanas katru dienu novēroja zivis, mirušajām zivīm veica bakterioloģisko analīzi.

Otrā dienā pēc zivju inficēšanas vēdera dobumā, ap injekcijas vietu parādījās iekaisuma pazīmes. Inficējot vēdera dobumā ar *A. salmonicidae* pirmā zivs nomira jau nākamajā dienā pēc injekcijas, bet *A. hydrophila* gadījumā 4. dienā. Straujāka zivju mirstība bija inficējot *A. salmonicidae*, nedaudz lēnāk slimības attīstības process

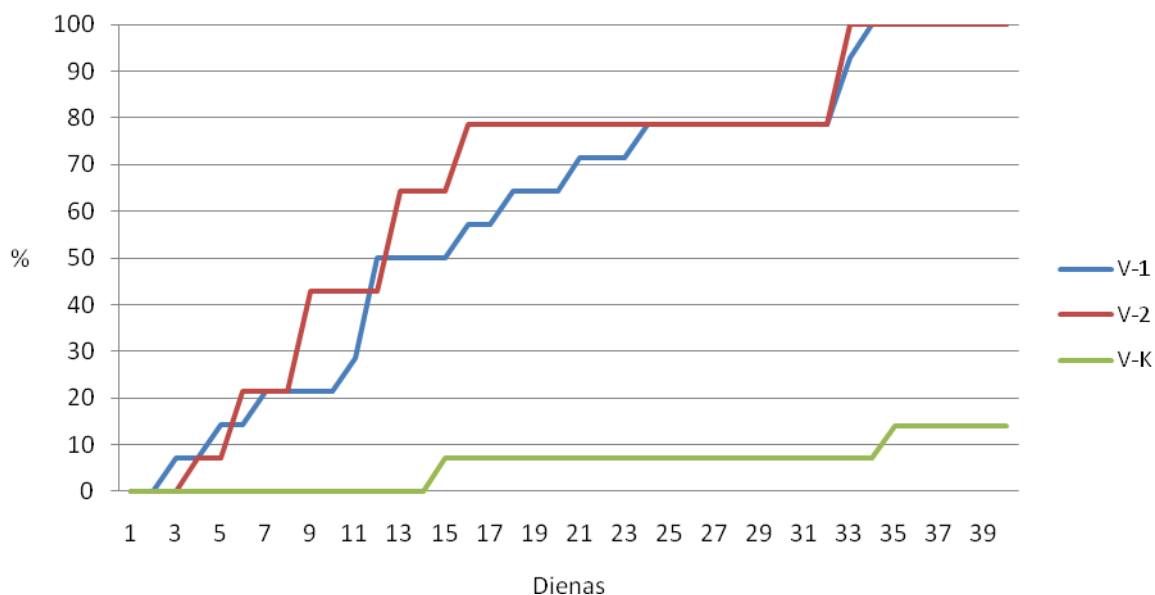
noritēja inficējot ar *A. hydrophila* un kumulatīvā mirstība sasniedza 100% attiecīgi 18. un 20. dienā pēc inficēšanas (2. att.).

Lašiem, kuri tika inficēti vēdera dobumā spuru nekroze neattīstījās. Veicot ihtiopatoloģisko izmeklēšanu, noskaidrojām, ka visām mirušajām zivīm vēdera dobumā bija sarkans šķidrums, serozajās plēvēs skaidri redzams asinsvadu zīmējums. Pēc 10 dienas mirušajiem lašiem palielināta liesa, ar noapaļotām malām, muskulatūra sarkanīga. Kontroles grupā līdz piektajai dienai bija mirusi viena zivs, kurai nekādas redzamas patoloģiskās izmaiņas nesaskatījām. Otra kontroles grupas zivs nomira 9. dienā un arī bez redzamām patoloģiskām izmaiņām.



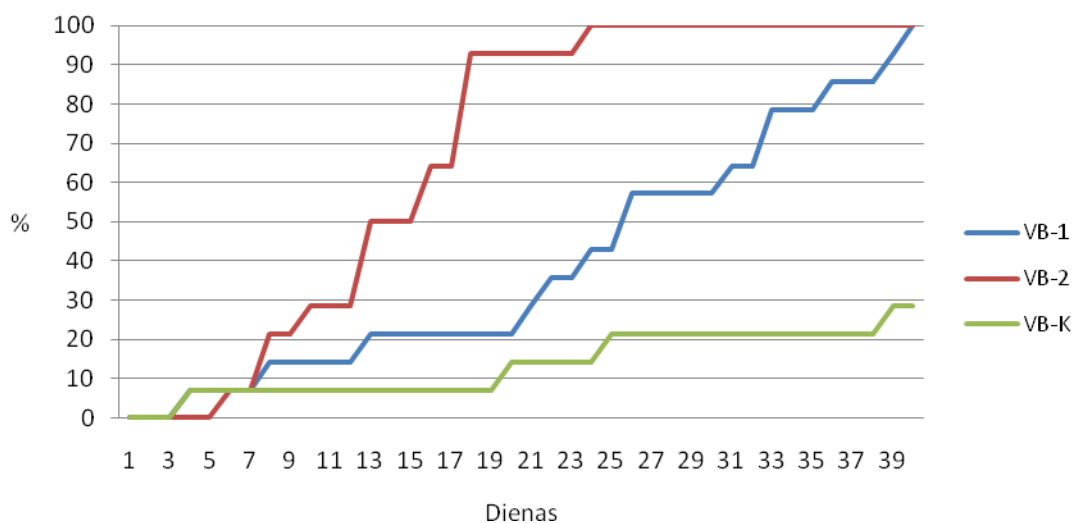
2.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc baktēriju suspensijas injekcijas vēdera dobumā**
 Figure 2. **Cumulative mortality after intraabdominal injection of suspension of bacteria**

Vannojot lašus baktēriju suspensijā (2. pētījumu grupa) infekcijas ceļš ir gremošanas trakts un žaunas. Mirstība zivju grupā, kuras vannotas *A. salmonicidae* suspensijā pieauga no 9. līdz 16. dienai (3.att). Šajā periodā nomira 50 % zivju, kumulatīvā mirstība 100% atzīmi sasniedza 34. eksperimenta dienā. Mirušajām zivīm novēroja asinsiplūdumus muskulatūrā un uz serozajām plēvēm, dažām zivīm bija redzami asinsizplūdumi žaunās. Spuru nekrozes pazīmes šajā eksperimenta grupā nenovērojām.



3.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc zivju vannošanas baktēriju suspensijā**
 Figure 3. **Cumulative mortality after fish bathing in suspension of bacteria**

Trešās eksperimenta grupas lašiem, pirms ievietošanas baktēriju suspensijā, veica iegriezumu, (radīja brūci) muguras spurā. Brūci pēc šīs ķirurģiskās manipulācijas neapstrādāja ar dezinficējošu šķīdumu, lai imitētu brūču rašanos baseinā (4. att).



4.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc mākslīgās brūces radīšanas un zivju vannošanas baktēriju suspensijā**
 Figure 4. **Cumulative mortality after fin incision and fish bathing in suspension of bacteria**

Spuru nekrozes klīniskās pazīmes novēroja tikai tajās eksperimenta grupās, kurām veicām iegriezumu spurā. Klīniskās spuru nekrozes pazīmes sāka veidoties no 6. dienā

pēc vannošanas baktēriju emulsijā. Sākumā traumētajā vietā sāka veidoties iekaisums: apsārtums, bet 2-3 dienas vēlāk (8-9. dienā) jau labi saskatāms aplikums. Spuru nekroze attīstījās tikai VB-1 un VB-2 grupā.

Pēc zivju inficēšanas jau pirmajā diennaktī nomira divas zivis, viena I-2 un viena I-K grupā. Kopumā visātrāk 100% kumulatīvo mirstību sasniedza I-2 grupa- 18. dienā, bet I-1 20. dienā pēc inficēšanas, turpretī, zivis vannojot baktēriju suspensijā, 100 % kumulatīvā mirstība V-2 un V-1 grupā iestājās attiecīgi tikai 33. un 34. dienā.

Salīdzinot zivju kumulatīvo mirstību visās eksperimenta grupās, novērojām, ka zivis, kuras inficētas, injicējot vēdera dobumā baktēriju *A. hydrophila* suspensiju, nomira ātrāk nekā zivis, kuras vannotas suspensijā. Salīdzinot divus vannošanas veidus, noskaidrojām, ka vēlāk kumulatīvo mirstību sasniedza tā zivju grupa, kurai radījām brūci muguras spurā pirms vannošanas baktēriju *A. hydrophila* suspensijā.

Nedaudz atšķirīga situācija veidojās eksperimenta grupās, kurās inficēšanai izmantota *A. salmonicidae*. Tāpat kā iepriekšējā gadījumā, visātrāk kumulatīvo mirstību 100 % sasniedza eksperimentālā grupa, kurai vēdera dobumā injicēta baktēriju suspensija. Bet salīdzinot abas grupas, kurās izmantojām zivju vannošanu baktēriju suspensijā, pirmā kumulatīvo mirstību 100 % sasniedza zivju grupa, kurai radījām brūci muguras spurā pirms vannošanas baktēriju *A. salmonicidae* suspensijā.

Visas mirušās zivis atlasīja un veica bakterioloģisko izmeklēšanu. 1. un 2. pētījumā zivīm no spurām patogēnās baktērijas neizdalīja, taču I-1 un I-2 grupā no žaunām un iekšējiem orgāniem izolējām attiecīgi *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*. Kontroles grupas zivīm patogēnās baktērijas neizolēja.

Toties trešajā pētījumā sērijā, kur zivis inficēja veicot iegriezumu spurās, no spurām izolējām patogēnās baktērijas attiecīgi *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*. Visos gadījumos novēroja monoinfekciju.

Inficējot mencas (*Gadus morhua* L.) ar atipisko *A. salmonicidae* Magnodottir et al (2002) pielietoja intramuskulārās un intraperitoneālās inficēšanas metodi. Mortalitāti un klīniskās pazīmes pētīja 28 dienas. Zivju mirstība LD₅₀. zivīm pēc intramuskulārās injicēšanas visām zivīm parādījās klīniskās pazīmes un no visām mirušajām izolēja *A. salmonicidae*. Toties pēc intraperitoneālās injekcijas ne no visām zivīm izolēja *A. salmonicidae*, pat gadījumos, kad bija redzamas slimības pazīmes. Ar *A. salmonicidae* eksperimentāli inficētas mencas (*Gadus morhua*) pēc intraperitoneālās inficēšanas ar *A. salmonicidae* 20 zivis no 49 mira pirmajās 15 dienās, pie kam viena zivs bija no kontroles grupas.

SECINĀJUMI

1. Pētījumā konstatēts, ka lašu mazuļu spuru nekrozes gadījumā no skartajiem audiem ir izolētas *Flavobacterium*., *Aeromonas* un *Pseudomonas ginšu* baktērijas.
2. Uz lašu mazuļu spurām atrastas divas *Aeromonas spp.* sugas: *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*.
3. Eksperimentāli pierādīts, ka primārais spuru nekrozes cēlonis ir traumatisms un sekundāri pievienojusies mikroflora. Ir izdevies izsaukt spuru nekrozi inficējot zivis ar vannošanas metodi baktēriju suspensijā pēc mākslīgi radītās traumas.

LITERATŪRA

1. Atallah, O.A., Easa, M.E., Aly, A.A., Diab, A.S., Sakr, S.F. Pathological changes associated with the fin-rot-inducing bacterial diseases in fresh-water fish - *Alexandria-Journal-of-Veterinary-Science* (Egypt). 2008; 13(6): 629-644.
2. Bangaramma, Y., Rao, L.M., Lakshmi, B.B. Frequency of occurrence of external diseases in mullets from polluted waters of Visakhapatnam harbor - *Journal-of-Environmental-Biology*. 20.1: 25-27
3. Hazen, T.C., Fliermans C.B., Hirsch, R.P., Esch, G.W., Prevalence and Distribution of *Aeromonas* spp. In the United States. - *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; 36: 731-739.
4. Holm, J.C., Mono- and duo culture of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Arctic char (*Salvenius alpinus*) – *Canadian Journal Fisheries aquatic science* 1988; 46 (4): 697-704.
5. Kawula, T.H., Lelivelt. M.J., Orndorff, P.E., Using a new inbred fish model and cultured fish tissue cells to study *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri* pathogenesis. *Microbiology and Pathology*.1996; 20(2):119-125.
6. Khan, R.A., Campbell. J., Lear. H., Mortality in captive Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with fin rot disease.- *J Wildl Dis.* 1981; 17(4):521-7
7. Kirubaharan, J.J., Ravaneswaran, K., William, B.J., Balachandran, S., Studies on tail and fin - rot (*Bacterioses pinnarum*) disease in common carps (*Cyprinus carpio*). *Cheiron*. 1995; 24: 1: 31-34
8. Lang, T., Mellergaard, S., Wosniok, W., Kadakas, V., Neumann, K., Spatial distribution of grossly visible diseases and parasites in flounder (*Platichthys flesus*) from the Baltic Sea: a synoptic survey. *ICES Journal of Marine Science* 1999; 56: 138-147.
9. Lakshmanaperumalsamy, P., Chandramohan, D., Natarajan, R., Fin rot and other diseases in marine fishes. *Proceedings-of-the-Indian-Academy-of-Sciences,-Animal-Sciences*. 1984; 93: 2: 107-114.
10. Mateos, D., Anguita, J., Rivero, O., Naharro, G., Paniagua, C., Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water and sediments of a river. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1992;193(2):114-122
11. Moutou, K.A., McCarthy, I.D., Houlihan, D.F., The effect of ration level and social rank on the development of fin damage in juvenile rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 1998; 52: 756-770.
12. Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Dis Aquat Organ*. 2001; 22; 46(1): 23-29.
13. Noble, A.C., Summerfelt, S.T., Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual-Review-of-Fish-Diseases*. 1996. 6: 65-92
14. Kirubaharan, J.J., Ravaneswaran, K., William, B.J., Balachandran, S., Studies on tail and fin - rot (*Bacterioses pinnarum*) disease in common carps (*Cyprinus carpio*). *Cheiron*. 1995. 24: 1, 31-34.
15. Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J., Naharro, G., Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinic Microbiology*. 1990; 28(2): 350-355.

16. Piper, R. G., McElwain, I. B., Orme, L. E., McCraren, J. P., Fovler, L. G., Leonard, J. R. Fish Hatchery Management. In: Fish Hatchery Management. (ed.). Department of the Interior U S Fish and Wildfish service, Washington, 1982; 515.
17. Sechi, L.A., Deriu, A., Falchi, M.P., Fadda, G., Zanetti, S., Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *J Appl Microbiol* 2002; 92(2): 221-7.
18. Stoskopf, M.K., Fish medicine. In: *Fish medicine*. Anderson, D. P., Gatzek, J. B (eds.). W B Saunders Company, London, 1993; 880.
19. Turnbull, F., Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R., Bacterial gill disease and fin rot. *Bacterial-diseases-of-fish*. 1993; 40-57.
20. Van den Heuvel, M.R., Power, M., Richards, J., MacKinnon, M., Dixon., D.G., Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2000; 46(3):334-341.
21. Wiklund, T., Bylund, G. Fin abnormalities of pikeperch in coastal areas off the Finnish south coast. *Journal of Fish Biology* 1995; 48: 652-657.