

Zebrafish as a laboratory animal – principles of nursing and veterinary care

Korzeniowski J.P.^{1,2}, Wiweger M.², Zebrafish Core Facility, International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw¹, Veterinary Clinics WET-AQUA, Warsaw²

The purpose of this article was to present the basic issues related to nursing and veterinary care for zebrafish (*Danio rerio*) under laboratory conditions. The development of an animal-based research creates an interesting space for veterinarians. In addition to rodents, which were traditionally used for biological experiments, fish also became an important laboratory animal. Zebrafish is one of the most popular fish species that is widely used in many countries for developmental, behavioral, toxicological, biomedical and biochemical studies. Also in Poland, a number of institutions and companies that are using zebrafish as experimental animal constantly increase. New legislation on laboratory animal welfare puts on new tasks, duties and requirements in which veterinarians play important role. Thus, fish facilities are among areas that offer interesting employment opportunities, stimulating skill development and giving job satisfaction.

Keywords: zebrafish, biological model, laboratory animal, health care.

Dynamiczny rozwój badań z zakresu szeroko pojętej biologii i medycyny spowodował intensywne poszukiwania nowych modeli biologicznych, ułatwiających pracę i jednocześnie z dużym prawdopodobieństwem odwzorowujących złożoność procesów zachodzących w organizmie człowieka. Wśród zwierząt laboratoryjnych znalazły się również różne gatunki ryb. Najpopularniejszym, utrzymanym w wielu placówkach naukowych,

Danio pręgowany jako zwierzę laboratoryjne. Podstawowe zagadnienia z zakresu pielęgnacji i opieki lekarsko-weterynaryjnej nad rybami w warunkach hodowli laboratoryjnej

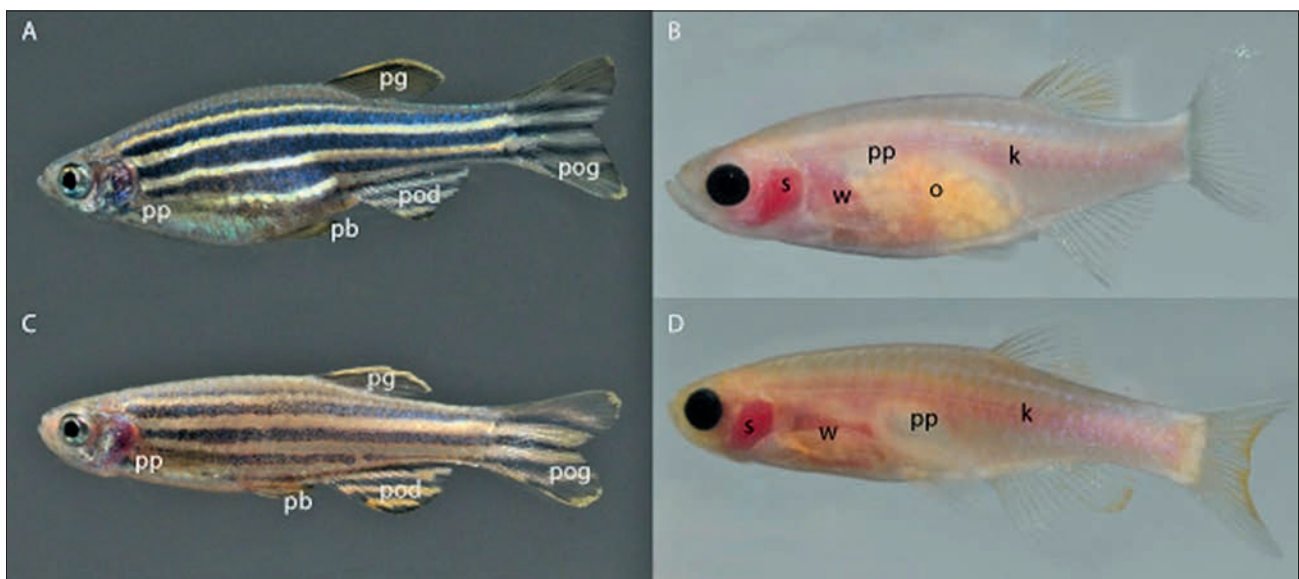
Piotr Jan Korzeniowski^{1,2}, Małgorzata Wiweger¹

z Pracowni Hodowli Ryb *D. rerio* Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie¹ oraz Przychodni Weterynaryjnej WET-AQUA w Warszawie²

jest danio pręgowany – *Danio rerio* (*Brachydanio rerio*, Hamilton 1822, ang. zebrafish). Pomimo że jest to jedna z popularniejszych, mało wymagających ryb, polecanych dla początkujących akwarystów, utrzymanie tego gatunku i ochrona jego zdrowia w warunkach laboratoryjnych jest interesującym wyzwaniem dla lekarzy weterynarii. Niniejsze opracowanie ma na celu prezentację podstawowych zagadnień związanych z pracą osób sprawujących nadzór i opiekę nad akwakulturami laboratoryjnymi utrzymującymi danio dla potrzeb doświadczeń naukowych.

Danio pręgowany należy do rodziny karpiowatych (Cyprinidae); w naturze występuje w wolno płynących i stojących wodach Indii, Pakistanu, Bangladeszu, Nepalu i Birmy. Ta smukła ryba, której ciało osiąga 4,5–5,0 cm długości, ma silnie zaznaczony dymorfizm płciowy (ryc. 1). Samce zazwyczaj są smuklejsze, a ich ubarwienie z wyraźną domieszką koloru pomarańczowego jest szczególnie wyraźnie zaznaczone na płetwach. Samice posiadają bardziej wydłużoną partię brzuszną oraz ubarwienie

z przewagą koloru żółtego i srebrnego. Na to, że ta popularna ryba akwariowa stała się modelem biologicznym wykorzystywanym w setkach ośrodków badawczych na całym świecie (również w Polsce) wpłynęło wiele cech, z których do najważniejszych należą: łatwość utrzymania, krótki cykl rozwojowy (ok. 2–4 miesiące od zapłodnionego jaja do osiągnięcia dojrzałości płciowej), dostępność dużej ilości materiału do badań, łatwość manipulacji genetycznych oraz zasobność kolekcji mutantów i linii transgenicznych (ryc. 2). Bardzo ważną cechą jest także przezroczystość ciała danio we wczesnych stadiach rozwojowych, która w połączeniu z małym rozmiarem larw umożliwia prowadzenie bardzo zaawansowanych badań mikroskopowych *in vivo*. Genom danio został zsekwencjonowany. *D. rerio* posiada 25 chromosomów, na których znajdują się odpowiedniki ponad 70% genów ludzkich (1). Czynnikiem decydującym o przydatności modelu danio do badań laboratoryjnych niewątpliwie jest też podobieństwo zjawisk zachodzących u danio do tych, które zachodzą w organizmie



Ryc. 1. Dorosłe ryby z gatunku *Danio rerio*. Samice (A–B), samce (C–D); linia dzika (A, C); casper – najbardziej przezroczysta linia danio (B, D); pp – płetwa piersiowa; pb – płetwa brzuszna; pg – płetwa grzbietowa; pod – płetwa odbytowa; pog – płetwa ogonowa; s – skrzela; pp – pęcherz pławny; o – oocyty; k – kręgosłup

człowieka (2). Trudno wymienić wszystkie kierunki badań z zakresu biologii i medycyny prowadzonych z zastosowaniem tego modelu. Dla przykładu wspomnijmy tylko kilka ważniejszych – prace z zakresu: genetyki i rozwoju, neurologii i neuropatologii, kardiologii, onkologii, farmakodynamiki i toksykologii.

Jednym z podstawowych wymogów poprawnego przebiegu badań jest utrzymanie zdrowych zwierząt (w tym przypadku ryb) w kontrolowanych warunkach. Dlatego bardzo ważne jest zachowanie wysokich standardów odnoszących się do jakości środowiska, w jakich utrzymywane są zwierzęta, prawidłowego żywienia, a także statusu zdrowotnego, zarówno materiału wyjściowego użytego do hodowli, jak i wszystkich ryb utrzymywanych w akwakułturze laboratoryjnej.

Ryby do celów naukowych najczęściej pozyskiwane są z licencjonowanych hodowli, jakimi są np. certyfikowane hodowle laboratoryjne lub banki genów *D. rerio*. Zwierzęta z takiego źródła posiadają świadectwa zdrowia potwierdzające fakt bycia wolnym od chorób stanowiących największe zagrożenie dla hodowli laboratoryjnej. Dalej dopuszczane jest, choć objęte restrykcjami i rzadko stosowane, pozyskiwanie danio ze stanowisk naturalnych. W takich przypadkach bardzo ważne jest przeprowadzenie badań bakteriologicznych, mikologicznych i parazytologicznych, na podstawie których podejmowane są dalsze decyzje co do przydatności ryb do hodowli. Niezależnie od pochodzenia, nowo wprowadzane ryby powinny trafić do części kwarantannowej hodowli. Ryby, które po przynajmniej 30-dniowej obserwacji, w trakcie której nie wykazały objawów chorobowych, mogą otrzymać zgodę

na dopuszczenie do tarła, ale dopiero odkażona ikra takich ryb powinna być wprowadzana do hodowli w systemie głównym akwakultury. Do odkażania ikry zazwyczaj używane są wodne roztwory podchlorynu sodu (NaOCl), a następnie ikra jest inkubowana w temperaturze 28,5°C w wodnych roztworach soli (np. E3) z dodatkiem błękitu metylowego jako fungostatyku (3). Rzadziej stosowane, niezalecane w rutynowym postępowaniu, są roztwory antybiotyków, takich jak penicylina krystaliczna i streptomycyna.

Jakość warunków środowiska wodnego jest elementarnym czynnikiem decydującym o statusie zdrowia ryb i powodzeniu hodowli. W nowoczesnych laboratoriach utrzymujących *D. rerio* funkcjonują kontrolowane elektronicznie systemy wyposażone w wydajne układy filtracji mechanicznej, chemicznej i biologicznej oraz lampy UV (ryc. 3). Systemy te utrzymują odpowiednią temperaturę, zapewniają automatyczną wymianę wody oraz nieustannie monitorują kluczowe parametry wody, takie jak: pH, przewodnictwo i temperaturę. Do tej pory właściwie nie spotyka się systemów, które automatycznie śledziłyby poziom innych kluczowych parametrów. Dlatego bardzo ważne jest manualne monitorowanie zawartości w wodzie związków azotowych ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, NO_2^- i NO_3^-). Dla zapewnienia optymalnych warunków środowiska zalecane jest hodowanie *D. rerio* w wodzie o następujących parametrach: temperatura 26–28,5°C, pH 6,9–7,5, przewodnictwo 500–800 μS , $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 0,0 mg/l, NO_2^- – 0,0–0,1 mg/l, NO_3^- 1–5 mg/l, twardość ogólna 3–6° i twardość węglanowa 1–3°, zawartość rozpuszczonego tlenu >6 mg/l, średni dobowy cykl wymiany wody 10–15%. Przytoczone wartości są



Ryc. 2. Różnorodność pigmentacji i ubarwienia u wybranych linii dzikich (A, B), mutantów (C–E) i transgenicznych (F) *Danio rerio*



Ryc. 3. Hodowla laboratoryjna danio przegowanego. Widoczna część systemu będącego na wyposażeniu Pracowni Hodowli Ryb Danio w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (A–C). W odróżnieniu od hodowli akwarystycznych, akwaria w hodowli laboratoryjnej danio są wolne od dodatków, takich jak podłoża i żywe rośliny, które są potencjalnym źródłem zakażeń (B). Przykładowy pojemnik tarliskowy z rusztem zabezpieczającym ikrę przed zjedzeniem (C)

uśrednionymi na podstawie danych z różnych ośrodków w Europie, USA i własnych pomiarów parametrów wody pochodzącej z tych ośrodków oraz wody w Pracowni MIBMiK. Przekroczenie górnej wartości stężeń azotynów i amoniaku grozi zatruciem objawiającym się zaburzeniami oddychania (duszność), nadprodukcją śluzu ze zmętnieniami gałek ocznych i skóry oraz martwicą płetw. Ostre zatrucie prowadzi w krótkim czasie do śmierci ryb. Woda systemowa nie może zawierać substancji, takich jak: chlor, metale ciężkie (miedź, rtęć, ołów, chrom i kadm), środków ochrony roślin czy detergentów, które są wysoko toksyczne dla ryb. Zjawiska związane z nieprawidłową zawartością tlenu, choć rzadko mają miejsce w hodowli laboratoryjnej, są zagrożeniem, o którym należy pamiętać – nadmierny wzrost stężenia tlenu w wodzie (niebezpieczne jest przekraczanie wartości 15 mg/l) wywołuje objawy choroby gazowej, natomiast spadek poniżej 2–3 mg/l powoduje przydychę. Oprócz odpowiedniej jakości wody ważne jest także zapewnienie odpowiedniego oświetlenia. Najczęściej polecanymi są lampy jarzeniowe o białej barwie, zapewniające 350 luksów i pracujące w cyklu 14/10 godzin (dzień/noc).

Żywnienie to kolejny czynnik decydujący o prawidłowym rozwoju ryb i ich wysokim statusie immunologicznym. Najczęściej stosowane są gotowe pokarmy produkowane przez wyspecjalizowane firmy, które zapewniają zbilansowaną dietę właściwą dla potrzeb żywieniowych danego gatunku, skład i średnicę granulek dostosowane do danej grupy wiekowej hodowanych ryb, a także czystość mikrobiologiczną eliminującą ryzyko transmisji zakażeń przez karmę. W celu wzbogacenia diety ryby karmione są także wylęganiem w warunkach laboratoryjnych solowcem (*Artemia salina*) oraz suszonymi glonami (*Spirulina platensis*). W wielu ośrodkach dla potrzeb żywienia narybku prowadzone są hodowle pantofelka (*Paramecium caudatum*) lub wrotków (*Rotifera*). Najczęściej ryby są karmione 2–4 razy dziennie takimi porcjami pokarmu, które są szybko zjadane i nie zalegają w zbiornikach (rozkładający się pokarm może doprowadzić do nadmiernego obciążenia systemu przejawiającego się wzrostem stężenia toksycznych związków azotowych oraz wzrostem zapotrzebowania na tlen). W trakcie karmienia ważna jest obserwacja ryb i dopasowanie porcji w zależności od potrzeb, które mogą się zmieniać się pod wpływem wielu czynników, np. pory dnia, spontanicznego tarła, aktywności ruchowej personelu. Karmienie stanowi też dobry moment do oceny stanu zdrowia hodowanych ryb. Wszelkie nieprawidłowości w zachowaniu lub wyglądzie są sygnałem do rozpoczęcia

postępowania mającego na celu wykrycie i eliminację potencjalnych zagrożeń.

Prewencja jest podstawą w walce z chorobami ryb laboratoryjnych. Zachowanie procedur sanitarnych, takich jak: „zasada czystych rąk”, izolacja, odkażanie i sterylizacja sprzętu, utrzymanie odpowiednich parametrów wody, prawidłowe przetrzymywanie i podawanie karmy pochodzącej z tzw. bezpiecznych źródeł, niedopuszczanie do nadmiernego zagęszczenia kolonii, bezwzględna eliminacja ryb o zaburzonemu rozwojowi, chorych lub starych i odizolowanie kwarantanny od systemu głównego hodowli (oddzielny obieg wody) jest absolutnym minimum, jakie musi być przestrzegane.

Mimo spełnienia wszystkich warunków sanitarnych, środowiskowych i żywieniowych, zamknięte hodowle laboratoryjne *D. rerio* są obciążone dużym ryzykiem wystąpienia chorób. Dlatego konieczna jest codzienna wnikliwa obserwacja i w przypadkach podejrzenia choroby natychmiastowa reakcja polegająca na odizolowaniu osobników potencjalnie chorych. Konieczne jest także jak najszybsze rozpoczęcie diagnostyki mającej na celu ustalenie przyczyny zaistniałego zjawiska i umożliwiającej opracowanie strategii dotyczących działań prewencyjnych i ewentualnego leczenia. Monitorowaniu powinien także podlegać osad biologiczny gromadzący się w systemie. Nawis biologiczny zazwyczaj składa się z niewywołujących zakażeń u ryb: śluzowców, wrotków, pierwotniaków, licznych bakterii oraz z zalegających resztek pokarmu i odchodów ryb. Środowisko to jednakże łatwo może stać się sprzyjającym siedliskiem dla rozwoju wielu gatunków bakterii i grzybów patogennych dla ryb. W związku z tym przyrost zanieczyszczeń biologicznych powinien być ograniczany poprzez regularne, mechaniczne oczyszczanie wszystkich dostępnych elementów systemu (zbiorniki hodowlane, filtry, system rozprowadzenia wody). Innym ważnym elementem ochrony jest kontrola ryb przedostających się do przestrzeni filtracyjnej. Pomimo zabezpieczeń, pewien procent zapłodnionych jaj pochodzących ze spontanicznych tarł, do jakich dochodzi w grupach mieszanych hodowli, wydostają się z pojemników i przenika do filtrów i systemu rozprowadzenia wody. Tam dochodzi do wylęgu i rozwoju dzikiej populacji, która żywiąc się nawisem biologicznym, staje się szczególnie narażona na zachorowanie. Taka populacja łatwo może stać się źródłem zakażeń całej akwakultury. Dlatego kontrola tego zjawiska i odławianie wylęgu są koniecznością. Odławione ryby warto poddać badaniom (ocena makroskopowa i mikroskopowa), a w przypadku podejrzenia choroby należy przeprowadzić postępowanie diagnostyczne

dla całości hodowli. Warto pamiętać, że oprócz zmienności osobniczej poszczególne linie danio, które są utrzymywane w laboratoriach, mogą posiadać różny poziom odporności na ten sam czynnik chorobotwórczy. Dlatego materiał do badań powinno się pobierać z jak najbardziej zróżnicowanej i dostatecznie dużej grupy ryb.

Danio rerio jest gatunkiem podatnym na większość chorób ryb, z jakimi spotykamy się w praktyce akwarystycznej. Wymagania dla hodowli laboratoryjnej są dużo wyższe od tych, które funkcjonują w zwykłych domowych akwariach czy w hodowlach komercyjnych. Dlatego stały nadzór weterynaryjny mający na celu utrzymanie ryb w dobrej kondycji i zdrowiu jest bezwzględnie wymagany. Badania w wielu ośrodkach na świecie pozwoliły na wskazanie najważniejszych patogenów, na które należy zwrócić szczególną uwagę przy kontrolach hodowli danio do celów naukowych.

Choroby wirusowe

Choroby wirusowe na razie nie stanowią większego problemu w hodowlach danio. Najczęściej opisywanymi są zakażenia wirusem martwiczego zapalenia śledziony i nerki (infectious spleen and kidney necrosis virus – ISKNV) należącym do rodziny *Iridoviridae* (*Megalocytivirus*). Typowymi objawami tego zakażenia są wybroczyny na pokrywach skrzelowych, żuchwie, oczach, płetwach brzusznych i płetwie odbytowej oraz na brzuchu. Często zachorowania związane są ze wzrostem śmiertelności narybku, szczególnie widocznym w pierwszych tygodniach życia. Nieliczne placówki diagnostyczne posiadają w swojej ofercie badania w kierunku wykrycia tego wirusa, ale większość laboratoriów utrzymujących hodowlę danio takich rutynowych badań na razie nie przeprowadza.

Choroby bakteryjne

Znane od wielu lat, jak również te nowo opisane, zachorowania u różnych ryb karpiowatych sugerują, że zakażenia bakteryjne stanowią jedno z najpoważniejszych zagrożeń. Dla hodowli danio niewątpliwie istotnymi są zakażenia *Mycobacterium* spp. Wywołana przez te bakterie mykobakterioza to choroba o charakterze przewlekłym, często przebiegająca ze słabo wyrażonymi objawami klinicznymi. W klasycznym przebiegu na ciele ryb dochodzi do powstawania guzowatych owrzodzeń oraz nielicznych wybroczyn na skórze. Towarzyszące tym zmianom objawy w obrębie narządów jamy brzusznej polegają na pojawieniu się guzków gruczolnych i ognisk martwicy, które mogą być umiejscowione w wątrobie, śledzionie, nerce lub przewodzie

pokarmowym. Podobne zmiany stwierdza się także w mięśniach. Ryby z mykobakteriozą są bardzo osłabione i wychudzone; tracą naturalne ubarwienie i mogą wykazywać zaburzone oddychanie. Przy zakażeniach mykobakteriami często dochodzi też do charakterystycznych skrzywień kręgosłupa. Do badań w kierunku wykrycia obecności *Mycobacterium* spp. materiałem mogą być tkanki ryb, a także osady, np. nawis biologiczny formujący się w sampach na pograniczu wody i powietrza. Metody diagnostyczne to badanie mikrobiologiczne, histopatologiczne i PCR. Najczęściej odnotowanymi przyczynami mykobakterioz są zakażenia wywołane przez *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. pillulare* i *M. marinum* (3). Oprócz mykobakterii, również niebezpiecznymi patogenami są wszechobecne w środowisku wodnym bakterie *Pseudomonas* spp. i *Aeromonas* spp., wywołujące zachorowania o różnym charakterze i nasileniu. Większość zachorowań ma miejsce w sytuacjach obniżenia odporności ryb w wyniku działania stresorów środowiskowych, takich jak gwałtowne zmiany temperatury wody, wzrost stężeń NH_3 i NO_2^- lub po źle przeprowadzonym transporcie. Przebieg zakażenia może mieć charakter ostrej i silnie wyrażony objawami charakteryzującymi się głównie zmianami na skórze (owrzodzenia, przekrwienia i wybroczyny). Na płetwach pojawiają się strefy martwicy, a na zakażonych skrzelach nadprodukcja śluzu. Często dochodzi do zapalenia pęcherza pławnego, co manifestuje się zaburzeniami pływania (opadanie na dno zbiornika lub wynoszenie pod lustro wody). W wyniku uogólnionego zakażenia dochodzi do gromadzenia się płynu w jamie brzusznej, zwiększenia jej objętości i nastoszenia łusek. Zakażenia powodowane przez te bakterie często mają charakter mieszany – w próbkach stwierdza się obecność bakterii z obu tych rodzajów. Najczęściej są to: *Pseudomonas fluorescens* i *Aeromonas hydrophila* oraz *Aeromonas sobria*. Podobne objawy jak przy zakażeniu bakteriami ze szczepów należących do *Pseudomonas* i *Aeromonas* spowodować może też *Edwardsiella* spp. (4). Tylko badanie bakteriologiczne może rozstrzygnąć o przyczynie zachorowania. Zachorowania wywołane przez *Edwardsiella* były odnotowywane w hodowlach laboratoryjnych *D. rerio* i sklasyfikowane jako istotne. Kolejnymi patogenami, na które trzeba zwrócić szczególną uwagę w hodowlach danio, są *Flavobacterium columnare* i *Flavobacterium branchiophilum*. Objawy kliniczne wywołane przez te bakterie są dość charakterystyczne i manifestują się białymi nalotami okolicy pyska, na bokach ciała i płetwach. W przypadku zakażenia *F. branchiophilum* typowymi są też zmiany w skrzelach

w postaci ognisk martwiczych oraz nadprodukcji śluzu. Przy zachowaniu właściwych parametrów wody i prawidłowym żywieniu zachorowania spowodowane tymi bakteriami są rzadkie. Bakteryjne zakażenia wywołane przez różne szczepy bakterii należących do *Proteus* spp. odnotowywano u wielu gatunków ryb ozdobnych hodowanych w akwariach, jak również karpie ozdobnych w hodowlach stawowych. Stanowią one potencjalne źródło zagrożenia dla hodowli laboratoryjnych danio. Objawami są owrzodzenia okolicy głowy i partii brzusznej ryb. Czasami, na skutek zakażenia, może także dochodzić do martwicy płetw. Zamykającymi listę najważniejszych patogenów bakteryjnych mogących zagrażać danio laboratoryjnemu są *Vibrio* spp., bakterie mogące być przyczyną wysokiej śmiertelności narybku ryb ozdobnych. Chociaż do tej pory bakterie te znane były jako przyczyna strat wśród narybku gupików (*Poecilia reticulata*) i mieczyków (*Xiphophorus helleri*), w dużych hodowlach akwarystycznych (obserwacje własne) należy je zaliczyć do potencjalnie niebezpiecznych w hodowli laboratoryjnej, zwłaszcza że obecność *Vibrio* spp. była także potwierdzona w akwakulturach ryb karpiowatych, w tym także danio pęgowanego.

Przy chorobach bakteryjnych należy zaznaczyć, że podobne objawy mogą być wywołane przez różne bakterie, a w zakażeniach często jednocześnie uczestniczy więcej niż jeden gatunek bakterii, rozpoznanie zawsze musi być potwierdzone badaniem bakteriologicznym.

Choroby wywołane przez grzyby i organizmy grzybobodobne

W prawidłowo prowadzonych hodowlach te choroby nie stanowią dużego zagrożenia. Jednakże w przypadku zachorowań bakteryjnych może dochodzić do powikłań wywołanych przez *Saprolegnia* spp., *Achlya* spp. i *Aphanomyces* spp. (*Saprolegniaceae*), objawiających się pojawieniem kłaczkowatych, białych lub szarych nalotów na skórze, oczach i płetwach. Innym grzybem atakującym wiele gatunków z rodziny Cyprinidae (w tym także danio) jest *Branchiomyces* spp., wywołujący wzrost śmiertelności u narybku i duszność u ryb dorosłych. W badaniu mikroskopowym płatki skrzeli są bardzo blade z fragmentami silnego przekrwienia zapalnego i ogniskami martwicy. Widoczna jest także nadprodukcja śluzu. Bardzo niebezpiecznym patogenem stwierdzonym u wielu gatunków ryb akwariowych jest *Ichthyophonus hoferi*. Patogen ten atakuje wątrobę, śledzionę i nerkę. Stwierdza się również jego obecność w gonadach. Obecnie brak doniesień literaturowych na temat istotnego znaczenia

tego typu zachorowań dla hodowli laboratoryjnej *D. rerio*. Tak jak w przypadku infekcji bakteryjnych, w celu postawienia prawidłowej diagnozy konieczne jest przeprowadzenie badania mikologicznego materiału pobranego od chorych ryb (preparaty bezpośrednie i histopatologiczne).

Choroby pasożytnicze

Danio rerio jest wrażliwy na wszystkie choroby z tej grupy występujące u ryb w hodowli akwarystycznej. Jednym z największych problemów są mikrosporidiozy wywołane przez *Pseudoloma neurophilia* i *Pleistophora hyphessobriensis*. W 2010 r. materiał z 74% laboratoriów, jaki został dostarczony do centrum referencyjnego Zebrafish International Resource Center (University of Oregon, Eugene, USA), wykazywał wynik dodatni w badaniu w kierunku wykrycia *Pseudoloma neurophilia* (4). Przy zakażeniach najczęściej obserwowane jest skrzywienie linii kręgosłupa wynikające ze zmian napięcia mięśni, wychudzenie, zaburzenia w koordynacji pływania lub gwałtowne upadki po krótko trwających zaburzeniach motoryki. Obecność pasożyta potwierdza się badaniami (histopatologicznymi lub PCR) mięśni, układu rozrodczego i mózgu. Innym pasożytem reprezentującym *Microsporidia* jest *Pleistophora hyphessobriensis* wywołująca znaną w akwarystyce tzw. chorobę neonów, w trakcie której dochodzi do martwicy mięśni z charakterystycznymi guzowatymi wyniosłościami i odbarwieniami skóry. Proces jest szybko wiksłany wtórnymi zakażeniami bakteryjnymi, co nasila straty w hodowli. Odkazanie ikry nie chroni przed szerzeniem się inwazji (zakażenia transowarialne). Podobna sytuacja dotyczy także zakażeń myksosporidiami z rodzaju *Myxidium* spp. i *Zschokkella* spp. Pasożyty te spotykane są u wielu gatunków ryb akwariowych i wolnożyjących (także u danio), gdzie atakują narządy wewnętrzne ryb, w krótkim czasie upośledzając ich funkcje. Zakażeniu towarzyszą różnorodne objawy kliniczne. W przypadku inwazji układu nerwowego obserwuje się silnie wyrażone objawy neurologiczne, takie jak zaburzenia równowagi (pływanie spiralne, poruszanie się „skokami”). Zmiany mogą również przyjąć postać wyniosłości i ognisk martwiczych widocznych na skórze i skrzelach. Rozpoznanie ustala się na podstawie oceny preparatów histopatologicznych z narządów wewnętrznych (wątroba, nerka, mózg), gdzie stosunkowo łatwo można stwierdzić obecność spor. Istotnym patogenem należącym do Dinoflagellata, groźnym dla hodowli danio, jest *Piscinodinium pillulare* wywołujące oodinozę. Pasożyt ten atakuje skórę, płetwy oraz skrzela. Ryby jeszcze przed pojawieniem

się typowych objawów wykazują niepokój, ocierają się o elementy zbiornika, składają i rozkładają płetwy, wykonując nimi gwałtowne ruchy. W drugiej fazie zakażenia na skórze i płetwach pojawiają się naloty przypominające mikroskopijne ziarenka piasku, często o złotawym odcieniu. Zarażone ryby zaczynają przetrzymywać płetwy w pozycji złożonej i zaprzestają pobierania pokarmu; pojawia się nadprodukcja śluzu, apatia oraz nasila się duszność wywołana obecnością pasożyta w skrzelach. Inwazji często towarzyszą wtórne zakażenia bakteryjne. Do potwierdzenia rozpoznania badania mikroskopowemu poddane powinny być świeże zeskrobiny ze skóry oraz materiał ze skrzeli. Sprawcą jednej z najczęściej występujących u ryb akwariowych chorób – „ospy” rybiej jest *Ichthyophthirius multifiliis* – jednokomórkowy orzęsek (kolorzések). Danio, jak wiele innych ryb, wykazuje dużą wrażliwość na zakażenie tym pierwotniakiem. Atakowana jest skóra, płetwy oraz skrzel żywicielela. Objawy w zachowaniu ryb są podobne jak w przypadku inwazji *Piscinoodinium* spp., z tą zasadniczą różnicą, że tworzące się na skórze i płetwach wykwyty są znacznie większe i mają kolor białawoszary. W miejscu kolonizacji szybko rozwijają się wtórne zakażenia bakteryjne. Kolorzések wykazuje dużą zmienność morfologiczną. Może osiągać rozmiary dochodzące do 0,5–0,8 mm; kształt okrągły lub bardziej wydłużony. Niezależnie od kształtu i wielkości cechą charakterystyczną kolorzések jest zlokalizowane centralnie makrojądro o kształcie podkowy lub nerki. W celu wykrycia kolorzések materiał powinien być pobierany ze skóry, płetw i skrzeli. Innymi orzęskami stanowiącym potencjalne zagrożenie dla akwakultury *D. rerio* są *Chilonodella* spp. Pasożyty te także atakują skórę i skrzel ryb. Inwazja powoduje nadprodukcję śluzu i obumieranie komórek nabłonkowych, skutkując tworzeniem się owrzodzeń. *Chilonodella* ma ok. 50 mikrometrów długości i charakterystyczne owalne ciało, z jedną stroną wypukłą, a drugą wklęsłą. Wklęsłą stronę pasożyta pokrywają szeregi rzęsek. Do badań mikroskopowych materiał powinien być pobrany ze skóry i skrzeli. Nie należy zapominać o jednym z najbardziej rozpowszechnionych orzęsków, należącym do *Trichodina* spp., uważanym za symbiont, który w sprzyjających okolicznościach może jednak powodować stany zapalne skóry i skrzeli ryb osłabionych innymi czynnikami. Duża aktywność tego orzęska może powodować wzrost śmiertelności narybku. Kostioza również może stanowić problem w hodowlach danio. Choroba ta wywołana jest przez *Ichthyobodo necatrix* (*Costia necatrix*) – pasożyta skóry i skrzeli z rodziny wiciowców. Pasożyt ten

atakuje komórki nabłonka, powodując powstawanie białych nalotów (nadprodukcja śluzu), przekrwień i wybroczyn. W wyniku wtórnych zakażeń bakteryjnych bardzo szybko pojawiają się głębsze owrzodzenia. Wiciowiec ten stanowi szczególne zagrożenie dla narybku, przyczyniając się do jego wysokiej śmiertelności. Wiciowce kostiozy mają 10–20 mikrometrów długości, około 6–10 mikrometrów szerokości i są zaopatrzone w dwie wici. W celu wykrycia *Ichthyobodo* należy pobrać preparaty ze skóry i płetw. *Ichthyobodo*, tak jak wiele innych wyżej wymienionych pasożytów, może tworzyć cysty, które są w stanie przetrwać niesprzyjające warunki poza organizmem ryby. Takie formy przetrwalnikowe są odporne na większość dostępnych środków używanych do odkażania, co zdecydowanie utrudnia walkę z zakażeniami. Częste przypadki inwazji *Hexamita* spp. / *Spironucleus* spp. / *Bodomonas* spp. u różnych gatunków ryb akwariowych sugerują, że wiciowce te mogą też atakować przewód pokarmowy danio. Dlatego, pomimo braku precyzyjnych danych literaturowych na temat inwazji tych pasożytów, sugerowane jest dokładne badanie preparatów z przewodu pokarmowego, uwzględniające ewentualną obecność tych patogenów. Oprócz pasożytów jednokomórkowych dużym zagrożeniem dla hodowli danio mogą być także nicienie. *Capillaria* spp., a zwłaszcza *Pseudocapillaria tomentosa*, to nicienie jelitowe, które są szeroko rozpowszechnionymi pasożytami ryb. Przewlekłe inwazje u *D. rerio* wywołują zapalenie błony śluzowej jelit, spowolnienie przyrostów i zmniejszenie zdolności rozrodczej. Osłabione ryby stają się podatniejsze na inne zakażenia, co stanowi zagrożenie dla sprawnego funkcjonowania całej akwakultury. Istnieją doniesienia, że przewlekłe stany zapalne błony śluzowej jelit powodowane obecnością nicieni mogą u *D. rerio* sprzyjać rozwijaniu się zmian nowotworowych (4). Badaniu mikroskopowemu poddawane są świeże odchody ryb i jelita w trakcie badania pośmiertnego. Obecność nicieni i ich jaj jest łatwa do stwierdzenia w preparacie bezpośrednim (mokrym). Jaja mają charakterystyczny beczułkowaty kształt. Osobniki dorosłe posiadają zróżnicowane rozmiary w zależności od płci (samice 7–12 mm, samce 4–7 mm). Pasożyty skrzeli należące do przywr z rodziny Dactylogyridae (Monogenea) także są potencjalnym zagrożeniem dla hodowli danio. Najczęściej odnotowywane są przypadki zakażeń *Dactylogyrus* spp., które są organizmem obupłciowym (hermafrodytycznym) i nieposiadającym żywiciela pośredniego. Złożone jaja dostają się do wody, gdzie następuje wyłęg orzęsionych larw, które powtórnie zarażają żywiciela. Przytwierdzone w skrzelach

przywry powodują postępujące stany zapalne. Głównym objawem jest duszność bez innych silnie wyrażonych objawów. Może też dochodzić do szybko narastającej śmiertelności narybku. Obecność przywr można potwierdzić w badaniach mikroskopowych płatków skrzeli. Pasożyty te mają charakterystyczną szerszą część przednią, zaopatrzoną w widoczne haki. Osiągają długość ciała w granicach 0,5–1,1 mm przy szerokości 0,1–0,4 mm. Danio jest także wrażliwy na *Gyrodactylus* spp. – pasożyty skóry należące do przywr z rodziny Gyrodactylidae (Monogenea). Jest on płazińcem „żyworodnym” tworzącym „piętrowe embriony”. Powoduje przewlekłe stany zapalne skóry żywiciela, co bezpośrednio sprzyja wtórnym zakażeniom, szczególnie bakteryjnym. Ryby ocierają się o dostępne powierzchnie i mogą tracić naturalne ubarwienie (punktowe pociemnienia skóry). Badaniem rozstrzygającym jest ocena mikroskopowa świeżego preparatu mokrego (zeskrobina ze skóry). Dorosłe osobniki przywr mają długość ok. 0,5 mm i posiadają w części przedniej charakterystyczny aparat czepny z hakami. Innymi gatunkami przywr mogącymi być potencjalnym zagrożeniem dla ryb w hodowli laboratoryjnej są: *Tetraonchus* spp. i *Diplozoon* spp. Podstawowymi czynnikami sprzyjającymi szerzeniu się inwazji przywr jest przegęszczenie hodowli i osłabienie ryb spowodowane przez pogorszenie warunków środowiska.

Choroby nowotworowe

Pionierem prac nad chorobami nowotworowymi u *D. rerio* był dr Merle Stanton z National Cancer Institute (USA), gdzie w latach sześćdziesiątych przeprowadzono eksperymenty z zakresu karcynogenezy wątroby. Następnie badania prowadzone przez dr. Jana Spitsbergena i dr. Jerrego Hendricksa (Oregon State University) na rybach danio w typie dzikim, pochodzących z hodowli akwarystycznych, dowiodły wrażliwości tego gatunku na działanie wielu karcynogenów. Do naturalnych nowotworów typowych dla gatunku *D. rerio* należą: *seminoma*, rak jelit (jest możliwe, że promotorem procesu jest *Pseudocapillaria tomentosa*), nowotwory tarczycy, wątroby i układu nerwowego (4). Częstotliwość występowania i rodzaj nowotworów zmienia się w zależności od wielu czynników. Niewątpliwie uwarunkowania genetyczne, ale także wiek i różnego typu zakażenia mają wpływ na częstotliwość powstania i przebieg choroby. Również dieta może mieć wpływ na predyspozycje do nowotworowych. Występowanie chorób nowotworowych nie stanowi bezpośrednio zagrożenia dla prawidłowego funkcjonowania laboratoryjnej hodowli *D. rerio*,

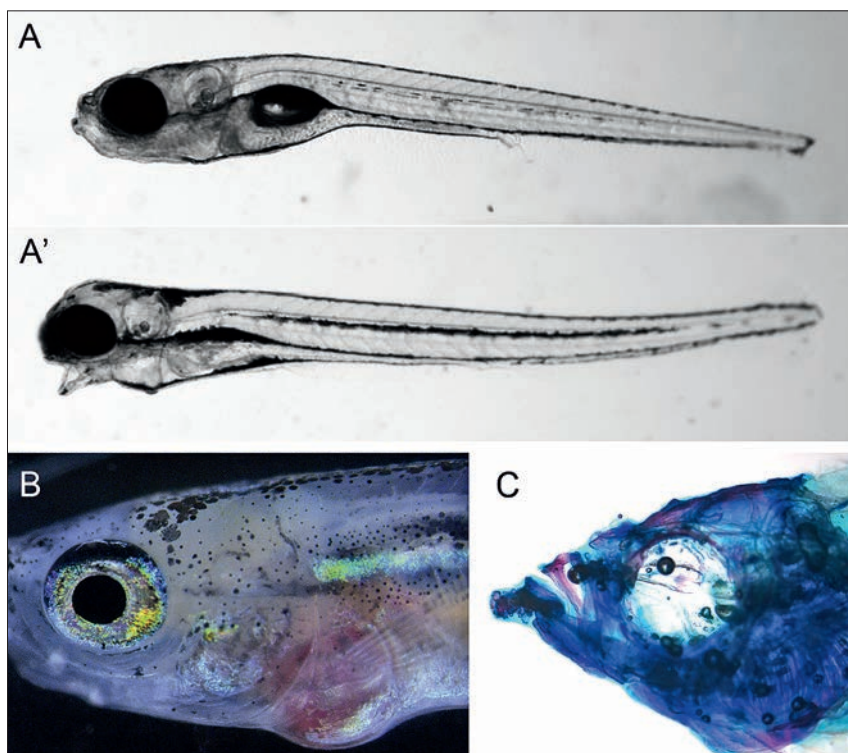
może natomiast stwarzać problemy w hodowli niektórych linii lub utrzymaniu pojedynczych cennych osobników.

Zaburzenia rozwojowe i choroby niezakaźne

W hodowli prowadzonej na dużą skalę, przy zastosowaniu różnych metod hodowlanych, w kjojarzeniu ryb stosunkowo blisko ze sobą spokrewnionych dochodzi do częstego występowania zaburzeń rozwojowych embrionów na tle genetycznym. Również czynniki środowiskowe (niezwiązane z chowem wsobnym) mogą spowodować zaburzenia rozwoju danio. Najczęściej obserwowanymi są: deformacje szczęk (nieдорozwój lub przerost długości), skrzywienia kręgosłupa i odkształcenia manifestujące się skróceniem sylwetki ryby, płytkimi oczodołami i źle wykształconymi, zdeformowanymi płetwami (ryc. 4). Badania ryb z hodowli laboratoryjnych potwierdziły występowanie następujących schorzeń: nefrocalcinosis, kardiomiopatii rozstrzeniowej, megalocytosis wątroby, oraz jednostki określanej jako EAI (egg associated inflammation) – zapalenia jamy otrzewnowej w wyniku zastojów i zwyrodnienia ikry (4). W tym przypadku bardzo ważna jest właściwa gospodarka hodowlana, polegająca na regularnym dopuszczaniu do tarła w odstępach 7–10-dniowych ryb będących u szczytu swoich możliwości rozrodczych. Znaczne przekroczenie tych terminów u izolowanych samic (np. gdy ryby przebywają w zbiornikach podzielonych na grupy samic i samców) może doprowadzić do zastojów ikry i rozwinięcia się procesu zapalnego. Wszystkie ryby z niekontrolowanymi zaburzeniami rozwojowymi i chorobami niezakaźnymi powinny być natychmiast eliminowane z hodowli. Natomiast osobniki, w których zmiany są wynikiem zamierzonych działań (badania naukowe aprobowane przez komisję etyczną) powinny pozostawać pod szczególnym nadzorem. Tu rolę lekarza weterynarii jest dodatkowo opieka, mająca na celu zminimalizowanie dyskomfortu, jaki mogłyby odczuwać zwierzęta. Kiedy jest to konieczne, lekarz powinien podjąć decyzję o poddaniu cierpiących zwierząt eutanazji.

Anestezja i eutanazja

Wszystkie działania laboratoryjne, których obiektem są organizmy żywe muszą być wykonywane z uwzględnieniem minimalizacji stresu i bólu. Obecnie najczęściej stosowanym preparatem w anestezji ryb jest MS-222 (związek o wzorze $C_{10}H_{15}NO_5S$, znany także pod angielską nazwą ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, TMS lub Tricaine) – mający postać białego proszku, z którego



Ryc. 4. Przykładowe wady występujące u danio. Genetycznie uwarunkowana deformacja zuchwy u 6-dniowych larw z homozygotyczną mutacją w genie *ext2* (A'; kontrola A), kardiomiopatia u formy juwenalnej (B) oraz osteochondroma u dorosłego osobnika *ext2*^{+/-} (C)

przygotowuje się roztwory wodne (3). Mechanizm działania MS-222 jest oparty na miorelaksacji poprzez zaburzenie gospodarki sodowo-potasowej w błonach komórek nerwowych organizmów, szczególnie efektywnie działający na organizmy zmiennocieplne. Pierwszymi objawami działania jest spowolnienie ruchów, zwolnienie oddychania, spowolnienie akcji serca. Wrażliwość na działanie preparatu może być zmienna w zależności od wieku i wielkości osobników, dlatego ważna jest stała obserwacja ruchów oddechowych ryb i dopasowanie dawki i czasu anestezji do reakcji danej ryby. W przypadku wykonywania eutanazji stosowane dawki należy zwiększyć i wydłużyć czas przebywania ryb w roztworze. Procedura ta może być połączona ze schładzaniem. Ostatnio jako anestetyki dla danio zalecane są także benzokaina (50 µg/ml) lub etomidat (2 mg/l; 6).

W krótkim opracowaniu można jedynie przedstawić zarys podstawowych zagadnień z zakresu pielęgnacji i opieki lekarsko-weterynaryjnej w hodowli danio przegowanego do celów naukowych. Funkcjonowania systemów akwakultur laboratoryjnych nie da się wytłumaczyć przy użyciu prostych instrukcji, a przebieg większości chorób może się różnić od ścisłych danych literaturowych. Diagnostyka mikroskopowa potwierdza, że obserwowane patogeny mogą znacznie odbiegać pod względem rozmiarów i morfologii od danych literaturowych. Dlatego też, podobnie jak w innych

dziejzinach, wiedza teoretyczna musi być poparta wieloletnimi własnymi doświadczeniami w rozpoznawaniu i leczeniu chorób ryb. Postępujący rozwój badań naukowych z wykorzystaniem różnych gatunków zwierząt jako modeli biologicznych stwarza interesującą przestrzeń zawodową dla lekarzy weterynarii. Nowe ustawodawstwo będzie kładło coraz większy nacisk na rolę lekarza weterynarii w tego typu placówkach. Pielęgnacja i ochrona zdrowia ryb w warunkach nowoczesnego laboratorium badawczego staje się jedną z takich sfer, które otwierają nowe możliwości zatrudnienia, zarazem umożliwiając dalszy rozwój i dając satysfakcję zawodową.

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) posiada licencjonowaną hodowlę danio przegowanego. Zwierzętarnia, będąca częścią Pracowni Hodowli Ryb *Danio rerio*, tzw. Zebrafish Core Facility, została stworzona jako baza dla projektu FishMed (<http://fishmed.iimcb.gov.pl/pl/category/polski/>), kierowanego przez dyrektora Instytutu – prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego. Projekt ten powstał dzięki programowi REGPOT i jest pierwszą tego typu inicjatywą w Polsce. W projekcie udział bierze osiem grup badawczych z MIBMiK zajmujących się m.in. poszukiwaniem innowacyjnych aspektów w zakresie mechanizmów molekularnych związanych z: chorobami nowotworowymi, metylacją DNA, neuropatologią, chorobą Parkinsona, epigenetyką w chorobach serca

oraz rolą mitochondriów w przebiegu choroby i regeneracji tkanek. Prowadzone są także teoretyczne i doświadczalne analizy związków między sekwencją, strukturą i funkcją biomakrocząsteczek, głównie białek i RNA. Pracownia jest także otwarta dla innych użytkowników akademickich, którzy chcieliby przeprowadzić badania w oparciu o model danio.

W publikacji zostały wykorzystane zdjęcia autorstwa mgr. Michała Bazaty z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (ryc. 1, 2, 3).

Piśmiennictwo

1. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J.C., Koch R., Rauch G.J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L.T., Guerra-Assunção J.A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J.H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S.F., Laird G.K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Willey D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliot D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Mortimore B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthravadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley C.M., Ersan-Ürün Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberländer M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Carter N.P., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle S.M., Enright A., Geisler R., Plasterk R.H., Lee C., Westerfield M., de Jong P.J., Zon L.I., Postlethwait J.H., Nüßlein-Volhard C., Hubbard T.J., Roest Crolius H., Rogers J., Stemple D.L., Begum S., Lloyd C., Lanz C., Raddatz G., Schuster S.C.: The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013, **496**, 498–503.
2. Dooley K., Zon L.: Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2000, **10**, 252–256.
3. Westerfield, M.: *The Zebrafish Book. 5th ed., A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, Eugene, University of Oregon Press 2007.
4. Kent, J.M. Spitsbergen, J.M. Matthews, J.W. Fournie, K.N. Murray, Westerfield M.: *ZIRC Health Services Zebrafish Disease Manual: Diseases of Zebrafish in Research Facilities*. Zebrafish International Resource Center, 2012, publikacja online.
5. Murray K.N., Dreska M., Nasiadka A., Rinnie M., Matthews J.M., Carmichael C., Bauer J., Varga Z.H., Westerfield M.: Transmission, diagnostics and recommendation for control of *Pseudoloma neurophilia* in laboratory zebrafish (*Danio rerio*) facilities. *Comparative Medicine* 2011, **61**, 322–329.
6. Readman D., Owen S.F., Murrell J.C., Knowles T.G.: Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive? *PLoS One.* 2013, **8**, e73773.