

# ***Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia)**

## **– poważne zagrożenie dla hodowli laboratoryjnej danio pręgowanego (*Danio rerio*, Hamilton 1822)**

---

**Piotr Jan Korzeniowski<sup>1,2</sup>, Małgorzata Wiweger<sup>1</sup>**

z Pracowni Hodowli Ryb *D. rerio* Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie<sup>1</sup> oraz Przychodni Weterynaryjnej „WET-AQUA” w Warszawie<sup>2</sup>

**W** grupie zwierząt laboratoryjnych i doświadczalnych, ryby stanowią bardzo ciekawy model dla prac naukowych, ale również są interesujące dla lekarzy weterynarii zajmujących się zagadnieniem ochrony zdrowia i dobrostanu w profesjonalnych zwierzętarniach. Tendencja zwiększania wydajności hodowli polegającej na zagęszczaniu ryb (np. dla danio pręgowanego 10 lub więcej dorosłych osobników w litrze wody) oraz intensywna wymiana materiału pomiędzy zwierzętarniami wpływają na wzrost możliwości występowania

i rozprzestrzeniania się wielu chorób. Zakażenia takie mogą nieść ze sobą dotkliwe skutki, ograniczając dostępność materiału do badań, a co ważniejsze, wpływają na jakość, powtarzalność i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

Mikrosporydia stanowią liczną grupę jednokomórkowych patogenów występujących u owadów, ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków, w tym także u ludzi. U ryb słodkowodnych i morskich, jako patogeny, rozpoznano ponad 100 gatunków mikrosporydiów (1, 2). Charakteryzują się

one różną predylekcją narządową oraz odmiennością cyklu rozwojowego i morfologii. Znamienne jest to, że część zakażeń przebiega bezobjawowo. Przez to choroba długo może rozwijać się w sposób skryty, sprzyjając niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się tego patogenu, jednocześnie stwarzając ogromne trudności w wykrywaniu i eliminowaniu ognisk chorobotwórczych. Specyfika cyklu rozwojowego, zdolność do przetrwania w środowisku zewnętrznym i ograniczone możliwości prowadzenia efektywnego postępowania terapeutycznego podnoszą rangę zagrożenia tego typu zakażeniami.

Przynależność systematyczna mikrosporydiów była wielokrotnie zmieniana. Fakt, że mikrosporydia zamiast mitochondriów mają mitosomy, a ich aparat Golgiego jest bardziej funkcjonalnym niż morfologicznym odpowiednikiem tego organellum, powoduje, że pozycja filogenetyczna tych organizmów jest niejasna. Także rybosomy mikrosporydiów nie są typowymi dla organizmów eukariotycznych i bardziej przypominają formy występujące u prokaryota. Dodatkowo, komórki mikrosporydiów cechują się

brakiem peroksysonu; są za to wyposażone w specjalny aparat pozwalający zaaplikować zawartość swojej komórki do zaatakowanej komórki żywiciela (3). Natomiast obecność chityny w wewnętrznej otoczce spory wydaje się potwierdzać fakt bliskiego pokrewieństwa z grzybami. Także badania na poziomie molekularnym sugerują, że mikrosporydia są najbliższymi spokrewnione z grzybami – filogenetyczna analiza genów kodujących: beta tubulinę, podjednostkę polimerazy RNA II, białko wiążące TATA oraz czynniki translacyjne EF-1 i EF-2 (3, 5, 6, 7).

Pierwsze wzmianki o mikrosporydiowych zakażeniach u danio przegowanego pojawiły się w 1980 r. (8). Obserwowano je u ryb użytych do badań toksykologicznych, a pochodzących ze sklepu zoologicznego. Później wielokrotnie potwierdzano obecność tego patogenu także u ryb z różnych hodowli laboratoryjnych (dane Zebrafish International Resource Center – ZIRC) – [https://zebrafish.org/submissions\\_summary\\_2006-2015.pdf](https://zebrafish.org/submissions_summary_2006-2015.pdf); 9, 10). Dopiero w 2001 r., po przeprowadzeniu analiz morfologicznych i molekularnych, nadano temu patogenowi nazwę – *Pseudoloma neurophilia* (11). Człon gatunkowy nazwy był odzwierciedleniem lokalizacji spor w tkance nerwowej rdzenia i tylnej części mózgowia oraz w nerwach obwodowych. Dalsze badania wykazały, że spory mogą również lokalizować się w tkance mięśniowej, w układzie rozrodczym i rzadziej w nerce (12). Nie wiadomo, czy danio zapada na tę chorobę również w środowisku naturalnym. Ze względu na brak tego typu doniesień wielce prawdopodobne wydaje się, że do międzygatunkowych zakażeń mogło dojść dopiero po imporcie, w warunkach sklepu akwarystycznego lub hodowli ryb ozdobnych. To właśnie w takich miejscach wywodzą się najpopularniejsze stada (linie) danio wykorzystywanego w laboratoriach. Sklepy i hurtownie były też, na początku wykorzystania tego modelu, głównym źródłem pozyskiwania ryb „typu dzikiego”. Intensywna wymiana materiału pomiędzy zwierzętarniami, wprowadzanie ryb z nieznanymi źródłami oraz początkowo niewielka uwaga poświęcona zdrowiu ryb wpłynęły na rozprzestrzenienie się wielu chorób, w tym *P. neurophilia*. Według danych ZIRC, gdzie wykonywane są badania diagnostyczne ryb zgłaszanych przez różne pracownie, w 2006 r. obecność *P. neurophilia* stwierdzana była w 19% materiału, a w 2010 r. już u ponad 73% wykrywano tego pasożyta ([https://zebrafish.org/submissions\\_summary\\_2006-2015.pdf](https://zebrafish.org/submissions_summary_2006-2015.pdf)). Dzięki podjętym działaniom profilaktycznym i diagnostycznym, w 2015 r., populacja zakażonych ryb spadła do niespełna 50% (13). Badania te jasno ukazują skalę i szybkość rozprzestrzeniania się tego

patogenu. Dlatego tak ważne jest oszacowanie wagi problemu (wpływ na produkcję ryb oraz przydatność zakażonych ryb do badań) i opracowanie skutecznej walki z *P. neurophilia*.

Spory *P. neurophilia* mają wymiary 4,8–5,9 mikrometra (średnia długość 5,4) × 2,3–3,1 mikrometra (średnia szerokość 2,7; 14), i tak jak stadia przetrwalnikowe innych mikrosporydiów, otoczone są chitynową ścianą (4, 15). Najistotniejszą drogą zakażenia *P. neurophilia* u *Danio rerio* jest droga pokarmowa. Spory mogą być wyjadane z osadu dennego lub, w wyniku kanibalizmu, mogą trafić do przewodu pokarmowego z resztkami martwych ryb (jeśli te natychmiast nie zostają usunięte) bądź z małymi rybami, które padły ofiarą większego osobnika. Możliwa jest również droga zakażenia pionowego z rodziców na potomstwo. W niektórych przypadkach w oocytach i jajnikach znajdowano spory tego pasożyta w ilości 12 000–88 000 sztuk (15). Dokładny mechanizm inwazji tego pasożyta nie jest znany. Możemy tylko spekulować, jak przebiega wędrówka do tkanek predylekcyjnych (tkanka ośrodkowego układu nerwowego – tyłomózgowie i rdzeń oraz tkanka mięśniowa) oraz to gdzie i jak dochodzi do iniekcji sporoplazmy pasożyta do komórki żywiciela. Wiadomo natomiast, że dopiero po wstrzyknięciu zawartości spory możliwa jest proliferacja we wnętrzu zaatakowanej komórki (faza mergony; 11, 14). Kolejnym i ostatnim etapem jest faza sporogony kończąca się wytworzeniem spor otoczonych ścianą sporoforu. Cykl przebiega identycznie w tkance nerwowej i mięśniowej (14). Przy zakażeniach doświadczalnych dokonanych w laboratorium prof. M. Kenta, na Stanowym Uniwersytecie Oregon (OSU) w Corvallis, USA, już po 3 godzinach od ekspozycji, stwierdzono obecność spor w przewodzie pokarmowym larw; po 4–5 dniach pasożyt wykrywany był w tkance mięśniowej, a dopiero po 8 dniach w rdzeniu kręgowym (16). W przypadku dorosłych ryb po 45 dniach od ekspozycji obserwowano w pełni rozwiniętą infekcję układu nerwowego.

Konsekwencją pojawienia się pasożyta mogą (ale nie muszą) być zmiany zwyrodnieniowe w układzie nerwowym i mięśniowym. Zaburzeniu może ulec również funkcjonowanie układu rozrodczego samic. Nasilenie zmian zależy oczywiście od ilości utworzonych sporoforów i ilości obecnych „wolnych” spor. W literaturze najczęściej pojawia się obraz ryb wychudzonych, mogących nosić cechy skrzywienia kręgosłupa spowodowanych zwyrodnieniem mięśni i zmianami w ich napięciu. Przytaczane są także zaburzenia w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego, manifestujące się

### ***Pseudoloma neurophilia* (Microsporidiosis) – a serious threat to the husbandry of laboratory zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822)**

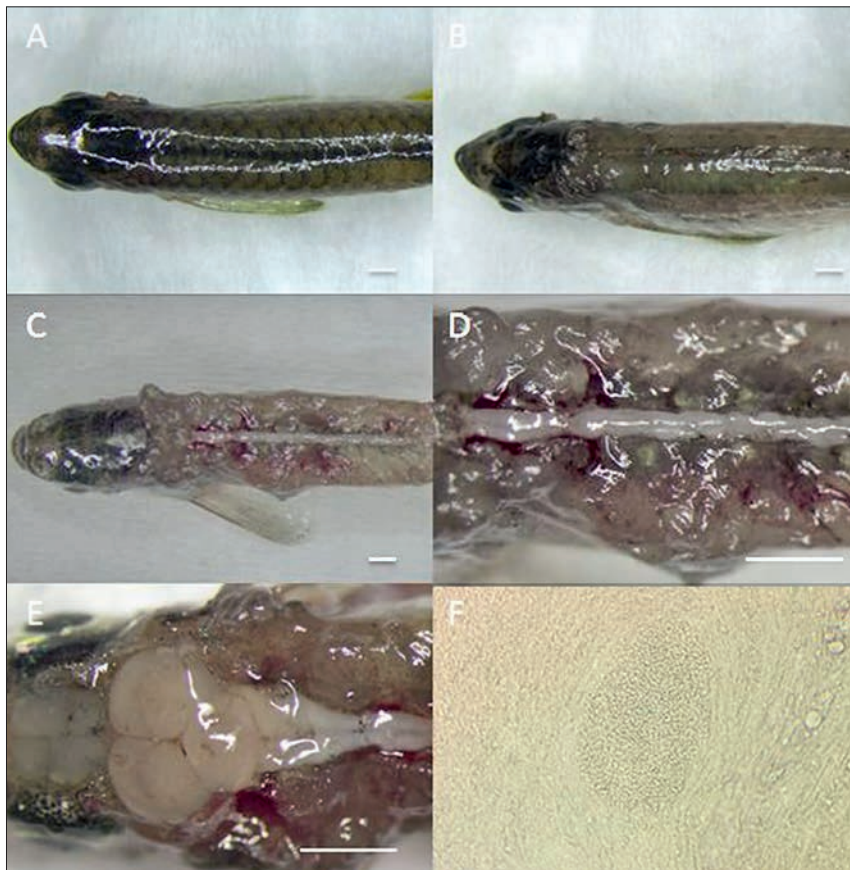
Korzeniowski P.J.<sup>1,2</sup>, Wiweger M.<sup>1</sup>, Zebrafish Core Facility, International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw<sup>1</sup>; „WET-AQUA” Veterinary Clinic, Warsaw<sup>2</sup>

The aim of this article was to present health aspects that may compromise the results of behavioral studies performed in zebrafish (*Danio rerio*). Like the rat, the zebrafish is used in labs worldwide for research. Since both zebrafish and people are highly social, researchers consider the zebrafish a better lab model for some human behaviors than rodents. Zebrafish demonstrate their preference for each other by clustering into shoals – a social behavior that is measurable and reflects how different factors or drugs affect zebrafish stress. Protection of the laboratory animals health ensures their welfare, optimized breeding and in consequence set a base for correct and reproducible results that can be obtained from the experiment. For zebrafish, the sole representative of fish listed as a laboratory animal, there is a number of diseases likely to affect the health and husbandry of aquaculture and consequently, to affect the course of research conducted using this model. One of the most important and most common diseases of zebrafish is microsporidiosis caused by *Pseudoloma neurophilia*. *P. neurophilia* settles in the brain, spinal cord and nerves of zebrafish. As many as half of all laboratory facilities may be using some infected zebrafish, according to Zebrafish International Resource Center (ZIRC) – data from 2015. Double quarantine system, prompt diagnosis and elimination of sick colonies are essential to combat this infection.

**Keywords:** zebrafish, *Pseudoloma neurophilia*, microsporidia, health care.

spiralnym lub „krzywym pływaniem”. Ponieważ może to utrudniać chorym rybom pobieranie pokarmu, postępująca choroba doprowadza do dalszego wyniszczenia organizmu. W niektórych przypadkach (niekoniecznie związanych z mniej nasiloną inwazją) przebieg choroby długo może pozostać bez objawów klinicznych. W związku z tym, że objawy kliniczne są niejednoznaczne i mają różny stopień nasilenia, odnotowanie obniżenia potencjału rozrodczego kolonii, spowolnienie przyrostów i wzrost śmiertelności narybku powinny pociągnąć za sobą szczegółową diagnostykę w kierunku zakażenia *P. neurophilia*.

Metody diagnostyczne, jakimi można się posłużyć przy wykrywaniu *P. neurophilia* u danio przegowanego, są różnorodne. Podstawowym działaniem jest wykonywanie preparatów mokrych bezpośrednich



**Ryc. 1.** Technika pobrania materiału z układu nerwowego (mózg i rdzeń) do wykonania preparatów diagnostycznych mokrych bezpośrednich. A-E, technika odsłonięcia rdzenia i mózgu, skala 1 mm; F – skupisko spor *Pseudoloma neurophilia* widoczne w preparacie bezpośrednim mokrym, obiektyw 40×. F, zdjęcie preparatu wykonanego przez autorów w laboratorium prof. M. Kenta ze Stanowego Uniwersytetu Oregon, USA

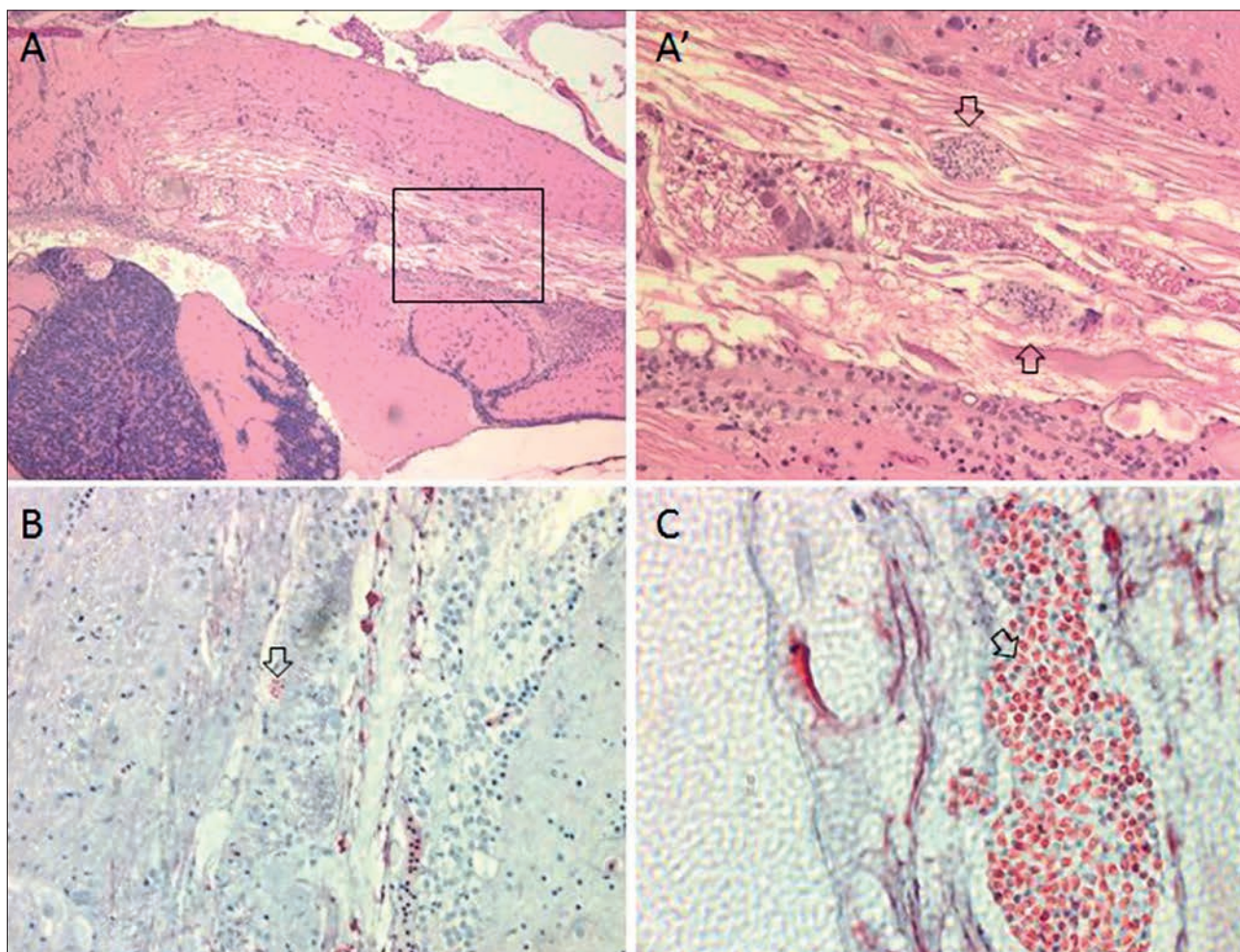
z mózgu i rdzenia kręgowego (ryc. 1). W celu wykonania takiego preparatu, po dokonaniu eutanazji, z ryby usuwa się skórę oraz mięśnie grzbietowe. Dopiero z tak odsłoniętego kręgosłupa łatwo jest wypręparować rdzeń kręgowy. Preparacja mózgu jest technicznie mniej wymagająca i z łatwością może być dokonana zarówno od strony mózgowcaszki, jak i od strony trzewiowcaszki. Pobrany materiał nakłada się na szkiełko podstawowe, na którym wcześniej nałożona została niewielka kropla sterylnej wody. Materiał dobrze jest poddać lekkiej kompresji poprzez naciśnięcie szkiełka nakrywkowego. W zgniecionym preparacie, pod obiektywem 40× szuka się ciemniejszych pól w tkance nerwowej. Po wykryciu takiego ogniska używa się powiększenia 60× i 100× w celu potwierdzenia obecności ogniska spor (ryc. 2a). W przypadku poszukiwania pojedynczych *P. neurophilia* używa się obiektywów immersyjnych (100×). Ocena tego typu preparatów wymaga jednak dużego doświadczenia.

Inną podstawową metodą jest wykonanie rozmazu z mózgu i rdzenia, wysuszenie go i wybarwienie metodą Diff-Quick. Nie jest to w pełni kierunkowa metoda w przypadku tego typu materiału, jest jednak przydatna w diagnostyce

na poziomie podstawowym. Sprawdzoną metodą w szybkiej diagnostyce jest także barwienie Fungi Fluor, które może być zastosowane zarówno do materiału świeżo pobranego, jak i zamrożonego. W barwieniu tym chitynowa ściana spor może być obserwowana pod mikroskopem fluorescencyjnym. Metodą doskonale obrazującą obecność *P. neurophilia* jest badanie histopatologiczne. Tego typu badanie daje dodatkowo trwałe materiały do przechowywania w celach porównawczych i szkoleniowych. Przy wykrywaniu *P. neurophilia* tą metodą dominują dwie techniki barwienia – HE i Luna (ryc. 2b, c). W pierwszej z nich spory przybierają kolor jasnoniebieski, a sporoplazma staje się ciemnoniebieska; natomiast w barwieniu Luna spory zabarwiają się na kolor czerwony (13). Częściowe barwienie spor można osiągnąć przy użyciu metody Giemsy, zwykłego barwienia metodą Grama (spory są Gram-dodatnie) oraz różnych metod kwasoopornych (np. Ziehl–Neelsena czy PAS; 17). Cenną metodą diagnostyczną, podobnie jak w identyfikacji innych patogenów, jest także technika PCR. Jako czuła metoda, szybko potwierdza lub neguje podejrzenie obecności *P. neurophilia*. Wprawdzie ilość materiału dostępna do badań jest na ogół bardzo niewielka, ale przyjmuje się,

że przy użyciu PCR można wykryć nawet 2–10 spor w próbce (18). Przykładowe startery służące do wykrywania *P. neurophilia* przedstawiono w tabeli 1.

Podobnie jak w przypadku gryzoni oraz innych zwierząt laboratoryjnych wiele dyskusji budzą propozycje leczenia danio przęgowanego wykorzystywanego do celów naukowych. Podstawową obawą jest wpływ zastosowanych leków na dalsze użytkowanie zwierząt (rozmród, odchów narybku), a także możliwość wpływu leków (nawet w kolejnych pokoleniach) na wyniki badań prowadzonych na tym modelu. Niezależnie od stanowiska, w przypadku mikrosporidioz leczenia nie jest możliwe, ponieważ na razie nie ma na nie skutecznego leku kierunkowego. Obecnie główną metodę ograniczenia szerzenia się zakażeń *P. neurophilia* stanowi profilaktyka. Dlatego tak ważny jest wysoki poziom wyszkolenia personelu, bezwzględna izolacja pomieszczenia kwarantanny od głównego systemu hodowlanego i bezwzględne przestrzeganie zasad przebiegu kwarantanny. Niezależnie od tego, na jakie patogeny są narażone ryby, w hodowli danio przęgowanego w warunkach laboratoryjnych, kwarantanna powinna mieć charakter ostateczny. Oznacza to, że ryby pochodzące spoza zwierzętarni nigdy nie powinny trafiać do hodowli w głównym systemie. Jedynie potomstwo ryb uznanych za zdrowe (w kwarantannie) i wyłącznie po przejściu odkażenia przed 27. godziną po zapłodnieniu może być wprowadzane do systemu głównego. W związku z tym, że można się spodziewać obecności dużej ilości spor w wodzie tarliskowej (uwolnionych w trakcie składania ikry), bardzo ważne jest wielokrotne i obfite płukanie uzyskanej ikry (zwiększenie szansy na mechaniczne usunięcie spor z powierzchni jaja) tuż po zbiorze i przed dalszym postępowaniem hodowlanym – odkażaniem zewnętrznym. Typowo, do oczyszczania ikry danio stosuje się dwie 5-minutowe kąpiele w podchlorynie sodu, po których następuje 5-minutowa kąpiel w wodzie (lub roztworze soli, np. E3; 19). Jednak w przypadku zakażenia *P. neurophilia* sytuacja jest dużo trudniejsza. Po wodom jest odporność spor tego mikrosporzydium na związek chloru stosowane do odkażenia ikry danio. Dopiero stężenie 100 ppm (przy pH zbuforowanym do wartości 7,0) zabija ok. 99% spor (20). Niestety, warunki te są równie toksyczne dla ikry. Dlatego też zalecane jest stosowanie podchlorynu sodu o stężeniu 100 ppm w niezbuforowanym środowisku. Zmiana taka wprawdzie powoduje spadek skuteczności zabiegu do ok. 80%, ale zapewnia dobrą przeżywalność ikry. Podobne rezultaty uzyskuje się, stosując metody oparte na preparatach zawierających jod (21). Dodatkowo całą sytuację komplikuje możliwość



**Ryc. 2.** Obraz histopatologiczny zakażenia *Pseudoloma neurophilia* w tkance nerwowej dorosłego osobnika *Danio rerio*. (A, A') – barwienie H&E; (B, C) – barwienie Luna. Zdjęcie spod obiektywu: 10× (A), 40× (A', B), 100× (C); strzałkami zaznaczono: skupiska spor (A', B) i charakterystyczną wakuolę w sporze (C). (A-C) – zdjęcia z materiału udostępnionego przez prof. M. Kenta ze Stanowego Uniwersytetu Oregon, USA

zakażenia sporami wewnątrz jaja (*intra-ovum*) w trakcie jego rozwoju w ciele samicy (18). Chorion otaczający zarodek jest też barierą obronną dla pasożyta, skutecznie chroniąc go przed działaniem środków używanych do odkażania ikry danio. Mimo że zakażenia *intra-ovum* są stosunkowo rzadkie, trzeba się z nimi liczyć, planując skuteczną ochronę akwakultury. Ciężar zachowania wysokiego statusu zdrowotnego akwakultury spoczywa głównie na personelu i zależy od jego codziennej

pracy. Szybkie wykrywanie ryb z objawami mogącymi wskazywać na zakażenie mikrosporydiami, natychmiastowe usuwanie osobników chorych oraz padłych, a także nieskarmianie tarlaków nadmiarem ikry, która nie została wykorzystana do prac badawczych, zdecydowanie obniża ryzyko transmisji. Nie powinno się również wlewać wody z pojemników tarliskowych do systemu hodowlanego. Spory często gromadzą się w osadach. Z tego powodu ważnym elementem profilaktyki

szerzenia się zakażenia mikrosporydiami jest także minimalizacja wszelkich zanieczyszczeń w obrębie układu cyrkulacji wody i w zbiornikach, w których przebywają ryby. Czynnności te polegają na regularnym mechanicznym czyszczeniu zarówno pojemników, jak i wszelkich elementów systemu (np. rynny odprowadzającej wodę). Ryby nieustannie penetrują dostępne im części systemu i chętnie żerują, wykorzystując do tego wszelkie możliwe źródła (także osady). W akwakulturach danio

**Tabela 1.** Zestawienie starterów PCR używanych do wykrywania *Pseudoloma neurophilia*

Nazwa startera	Sekwencja starterów	Wykrywany gatunek	Amplifikowany fragment (pz)	Piśmiennictwo
PNA_03 PNA_04	5'-TGA AAT GTG GTG ACC CGT TTA GG-3' 5'-TCC TTG ACC CAT CCT TCC TGT G-3'	<i>P. neurophilia</i>	441	Matthews i wsp., 2001 (11)
Pn18S5F Pn18S5R	5'-GAA AAT TAC CGG AGC CTG AAG TC-3' 5'-TTC CCT CTC TCT CCA AAT TTC GG-3'	<i>P. neurophilia</i>	788	Whipps i Kent, 2006 (25)
530f 580r	5'-GTG CCA GC(C/A) GCC GCG G-3' 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'	<i>P. neurophilia</i> <i>Loma salmonae</i> <i>Glugea stephani</i> <i>Nucleospora salmonis</i> <i>Heterosporis</i> spp.	1553	Vossbrincka i wsp. 2010 (26)
Pn10F Pn10R	5'-GTA ATC GCG GGC TCA CTA AG-3' 5'- GCT CGC TCA GCC AAA TAA AC- 3'	<i>P. neurophilia</i>	113	Ferguson i wsp., 2007 (20)

laboratoryjnego, oprócz zwierząt hodowlanych czasem można spotkać „dziłkie populacje” ryb zamieszkujące sumpy/osadniki. Zwierzęta te rozwijają się z ikry wymywanej z pojemników (tarła spontaniczne w mieszanych płciowo grupach danio). Grupy te mogą być też zasilane przez dorosłe osobniki, którym udało się uciec ze zbiorników. Głównym pokarmem takich ryb są wszelkie resztki, przez co są one potencjalnie narażone na zakażenia różnymi patogenami, w tym *P. neurophilia*. Dlatego ważne jest regularne usuwanie takich ryb z systemu oraz ich badanie.

Idealnym, aczkolwiek kosztownym programem jest tworzenie hodowli danio o charakterze SPF (wolnych od swoistych patogenów). Obecnie tylko jedna hodowla gwarantuje materiał wolny od *P. neurophilia* i jest to hodowla danio pręgowanego w Sinnhuber Aquatic Research Laboratory (SARL), w Oregonie w USA. Osiągnięcie celu, jakim było uzyskanie kolonii w standardzie SPF (wolnych od *P. neurophilia*, a także od *Mycobacterium marinum*), było możliwe dzięki zastosowaniu wielopoziomowej kwarantanny, wdrożeniu programu badań specjalistycznych zarówno dla ryb dorosłych, jak i potomstwa w celu wykluczenia nosicielstwa patogenu oraz opracowania zasad pracy. W SARL rygorystycznie przestrzegane są zasady izolacji kwarantanny (pomieszczenia w innej części budynku niż lokalizacja głównej hodowli, autonomiczny obieg wody oraz oddelegowany personel obsługujący kwarantannę i niemający styczności z pozostałą częścią akwakultury). Konieczna i nieoceniona jest też profesjonalna diagnostyka. W przypadku SARL zapewnia ją laboratorium prof. M. Kenta ze Stanowego Uniwersytetu Oregon (OSU) w Corvallis, USA. Z pewnością tego typu przedsięwzięcia są dobrą, acz żmudną drogą do stopniowego uwalniania hodowli laboratoryjnych ryb od najgroźniejszych patogenów. Zainteresowanych hodowców w standardzie SPF odsyłamy do publikacji na ten temat (22, 23).

Profesjonalne pracownie hodowli ryb laboratoryjnych powinny tworzyć własne programy ochrony zdrowia. W Pracowni Hodowli Danio Pręgowanego Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie funkcjonuje program profilaktyczny, obejmujący działania diagnostyczne, ze szczególnym naciskiem na zapobieganie transmisji *P. neurophilia*, *Pseudocapillaria tomentosa* i *Mycobacterium* spp. Do zwierzętarni przyjmowane są ryby (niezależnie od stadium rozwojowego) pochodzące jedynie z licencjonowanych i znanych hodowli danio. Niezależnie od informacji o statusie zdrowia kolonii oraz o zabiegach, jakim poddano ikrę, cały dostarczany materiał hodowlany (zapłodniona ikra lub/i osobniki

dorośle) jest umieszczany w kwarantannie o charakterze ostatecznym. W przypadkach, kiedy z miejsca pochodzenia materiału przychodzi informacja o ryzyku zakażenia np. *P. neurophilia*, ikra i ryby trafiają do pomieszczenia weterynaryjnego w oddzielnej części budynku (prekwarantanna). Daje to szanse przeprowadzenia obserwacji i dodatkowych badań przed ostateczną decyzją o ulokowaniu w kwarantannie lub podjęciu działań mających na celu eliminację patogenu. Wszystkie grupy ryb (pokój weterynaryjny, kwarantanna i system główny) są codziennie szczegółowo przeglądane w celu wykrycia osobników wykazujących kliniczne objawy ewentualnego zakażenia. Na bieżąco wykonywane są badania diagnostyczne ryb wykazujących jakiegokolwiek niepokojące objawy oraz ryb zdrowych klinicznie, a przeznaczonych do eutanazji z powodów nadwyżek hodowlanych czy wycofania z hodowli. Wyniki tych badań są dokumentowane w comiesięcznym raporcie. Dwa razy w roku wykonywane są badania w zewnętrznym autoryzowanym laboratorium diagnostycznym, w profilu obejmującym najważniejsze jednostki chorobowe dla *Danio rerio*. Zarówno w badaniach miesięcznych, jak półrocznych monitorowane są także osady z systemu głównego i kwarantanny. Do badań półrocznych są wykorzystywane grupy ryb „strażników” (sentinel), które przez sześć miesięcy przebywały w wodzie spływającej ze wszystkich zbiorników z rybami, odpowiednio dla systemu głównego i kwarantanny. W ten sposób ryby poddawane były celowej ekspozycji na potencjalny materiał zakaźny mogący znajdować się w osadach i wodzie systemowej. Obecnie wskazane wydaje się stosowanie dwóch grup sentineli. Druga grupa w stosunku do wyżej opisanej, przebywa w wodzie, która przeszła przez układ filtracji, ale co ważniejsze: została poddana promieniowaniu lamp UV, co ma na celu ograniczenie obecności patogenów, w tym oczywiście spor *P. neurophilia*. Porównanie wyników badań dla obu grup daje możliwość oceny skuteczności odkażania wody hodowlanej przy użyciu lamp UV. Warto pamiętać, że wrażliwość patogenów na promieniowanie UV jest zróżnicowana. O ile w przypadku bakterii *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. i *Pseudomonas* spp. moc lampy w granicach 4000–5000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$  jest wystarczająca, o tyle zwalczanie *P. neurophilia* wymaga dawek UV w granicach 50 000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$  (24). Oprócz dobrania lamp o odpowiedniej mocy należy pamiętać o ich regularnej kontroli i wymianie. Inaczej z czasem przestaną spełniać swoje zadanie. Systemy wyposażone są w lampy o mocy 120 000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$ . Cała woda krążąca w systemie poddawana jest temu promieniowaniu. Dodatkowo, przy odpływie wody z pojemnika na

sentinela założona jest dodatkowa lampa UV, która ma ograniczać ryzyko ewentualnego rozprzestrzeniania się chorób. Przy profilaktyce ważne jest zachowanie podwyższonych zasad higieny – autoklawowanie materiałów z kwarantanny, używanie automatów myjąco-sterylizujących do systematycznego czyszczenia pojemników na ryby, siatek itp.

Dynamiczny rozwój modelu danio, dbałość o dobrostan zwierząt laboratoryjnych oraz o jakość materiału używanego do badań sprawiły, że zainteresowano się utrzymaniem właściwego statusu zdrowia w hodowlach także i tego gatunku ryb. Początkowo traktowano tę rybę (podobnie jak w zwykłej praktyce akwarystycznej) jako łatwą w utrzymaniu i odporną na wiele chorób występujących u ryb ozdobnych. Wieloletnie doświadczenia oraz intensyfikacja hodowli laboratoryjnej spowodowały zmianę tych poglądów. Stało się oczywiste, że hodowle danio również są narażone na zakażenia mikrosporydiami i że coraz bardziej potrzebna jest skuteczna metoda walki z *P. neurophilia* i *Pleistophora hyphessobricolis*. Optymalne byłoby znalezienie skutecznej metody odkażania ikry przeznaczonej do dalszej hodowli oraz odkażania systemów hodowlanych, w środowisku wodnym, w obecności ryb. Przewiedzone próby (podobnie jak w przypadku mikrosporydii u ludzi) obejmują różne grupy leków. Z najważniejszych należy wymienić: fumagilinę, toltrazuril, albendazol, mebendazol, fenbendazol, metronidazol i azytromycynę. Być może konieczne jest zastosowanie więcej niż jednego leku (terapia skojarzona). Z pewnością każda metoda przerywająca cykl rozwojowy stwarza możliwości skutecznego zwalczania tej mikrosporydii i uwalniania od niej akwakultur laboratoryjnych danio pręgowanego. Do tego typu badań konieczne są jednak duże grupy ryb, z potwierdzonym zakażeniem, utrzymywane w izolowanych pomieszczeniach. Badania, choć wymagające dość znacznych nakładów, są bardzo potrzebne, zwłaszcza że dodatkowo mikrosporydii danio pręgowanego (*P. neurophilia* i *Pleistophora hyphessobricolis*) mogą stanowić ciekawy model do znalezienia skutecznych metod leczenia tego typu zakażeń u ludzi.

## Podziękowania

Autorzy dziękują prof. Michaelowi Kentowi ze Stanowego Uniwersytetu Oregon (OSU) w Corvallis, USA, za możliwość odbycia stażu oraz za udostępnienie unikatowych materiałów, a także prof. Jackowi Kuźnickiemu, dyrektorowi Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej, za wsparcie i konstruktywne uwagi przy przygotowywaniu tego artykułu.

## Piśmiennictwo

- Cali A., Takvorian P. M.: Microsporidia. W: Margulis L. (edit.): *Handbook of Protozoa*, 2<sup>nd</sup> ed., Jones & Bartlett, Boston, MA 2011.
- Canning E.U., Lom J.: *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, London 1986.
- Weiss L.M., Becnel J.J., Kent M.L., Shaw R.W., Sanders J.L.: *Microsporidia: Pathogens of opportunity*. Wiley-Blackwell, 2014.
- Bednarska M.: Mikrosporydia: oportunistyczne patogeny ludzi. *Post. Mikrobiol.* 2013, **52**, 53–63.
- Keeling P.J., Luker M.A., Palmer J.D.: Evidence from beta tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 2000, **17**, 23–31.
- Keeling P.J., Fast N.M.: Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002, **56**, 93–116.
- Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. 3<sup>rd</sup>, Torres-Martinez S., Dietrich E.S., Keeling P.J., Heitman J.: Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* 2008, **18**, 1675–1679.
- De Kinkelin P.: Occurrence of a microsporidian infection in zebra danio *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Fish. Dis.* 1980, **3**, 71–73.
- Legendre L., Guillet B., Leguay E., Meunier E., Labrut N.K., Keck N., Bardotti M., Michelet L., Sohm F.: RESAMA: A Network for Monitoring Health and Husbandry Practices in Aquatic Research Facilities. *Zebrafish* 2016, **13**, 56–65.
- Borges A.C., Pereira N., Franco M., Vale L., Pereira M., Cunha M.V., Amaro A., Albuaerque T., Rebelo M.: Implementation of a Zebrafish Health Program in a Research Facility: A 4-Year Retrospective Study. *Zebrafish*. 2016, **13**, 115–126.
- Matthews J.L., Brown A.M.V., Larison K., Bishop-Stewart J.K., Rogers P., Kent M.L.: *Pseudoloma neurophilia* n.g., n. sp., a New Microsporidium from the Central Nervous System of the Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 2001, **48**, 227–233.
- Kent M.L., Bishop-Stewart J.K.: Transmission and tissue distribution of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *J. Fish. Dis.* 2003, **26**, 423–426.
- Murray K.N., Dreska M., Nasiadka A., Rinne M., Matthews J., Carmichael C., Bauer J., Varga Z.M., Westerfield M.: Transmission, Diagnosis and Recommendations for Control of *Pseudoloma neurophilia* infections in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*) Facilities. *Comp. Medicine* 2011, **61**, 322–329.
- Cali A., Kent M., Sanders J., Pau C., Takvorian P.M.: Development, Ultrastructural Pathology, and Taxonomic Revision of the Microsporidian Genus, *Pseudoloma* and Its Type Species *Pseudoloma neurophilia*, in Skeletal Muscle and Nervous Tissue of Experimentally Infected Zebrafish *Danio rerio*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2012, **59**, 40–48.
- Sanders J.L., Watral V., Kent M.L.: Microsporidiosis in Zebrafish Research Facilities. *ILAR Journal*. 2012, **53**, 106–113.
- Sanders J.L., Watral V., Clarkon K., Kent M.L.: Verification of Intraovum Transmission of a Microsporidium of Vertebrates: *Pseudoloma neurophilia* Infecting the Zebrafish *Danio rerio*. *PLoS One*. 2013, **8**, e76064.
- Peterson T.S., Spitsbergen J.M., Feist S.W., Kent M.L.: Luna stain, an improved selective stain for detection of microsporidian spores in histologic sections. *Dis. Aquat. Org.* 2011, **95**, 175–180.
- Sanders J.L., Kent M.L.: Development of a sensitive assay for the detection of *Pseudoloma neurophilia* in laboratory populations of the zebrafish *Danio rerio*. *Dis. Aquat. Organ.* 2011, **9**, 145–156.
- Westerfield M.: *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5<sup>th</sup> edit., University of Oregon Press, 2007.
- Ferguson J.A., Watral V., Schwindt A.R., Kent M.L.: Spores of two fish microsporidia (*Pseudoloma neurophilia* and *Flugea anomala*) are highly resistant to chlorine. *Dis. Aquat. Org.* 2007, **76**, 205–214.
- Chang C.T., Amack J.D., Whipps C.M.: Zebrafish Embryo Disinfection with Povidone-Iodine: Evaluating an Alternative to Chlorine Bleach. *Zebrafish*. 2016, **13**, 96–101.
- Barton C.L., Johnson E.W., Tanguay R.L. Facility Design and Health Management Program at the Sinnhuber Aquatic Research laboratory. *Zebrafish*, 2016, **13**, 39–43.
- Kent M.L., Buchner C., Watral V.G., Sanders J.L., Ladu J., Peterson T.S., Tanguay R.L.: Development and Maintenance of a Specific Pathogen-free (SPF) Zebrafish Research Facility for *Pseudoloma neurophilia*. *Dis. Aquat. Org.* 2011, **95**, 73–79.
- Kent M.L., Feist S.W., Harper C., Hoogstraten-Miller S., Law J.M., Sanchez-Morgado J.M., Tanguay R.L., Sanders G.E., Spitsbergen J.M., Whipps Ch.: Recommendation for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxic Pharmacol.* 2009, **149**, 240–248.
- Whipps Ch., Kent M.L.: Polymerase Chain Reaction Detection of *Pseudoloma neurophilia*, a Common Microsporidian of Zebrafish (*Danio rerio*) Reared in Research Laboratories. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2006, **45**, 36–39.
- Vossbrincka Ch.R., Baker M.D., Andreadis T.G.: Phylogenetic position of *Octosporea muscaedomesticae* (Microsporidia) and its relationship to *Octosporea bayeri* based on small subunit rDNA analysis. *J. Invertebrate Pathology* 2010, **105**, 366–370.