

LESŐHARCSEA (*SILURUS GLANIS*) FOGÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA TÖRPEHARCSEA RANAVÍRUSRA (ECV)

ABONYI FLÓRA*¹, VARGA ÁDÁM*², SELLYEI BOGLÁRKA*³, ESZTERBAUER EDIT*⁴, DOSZPOLY ANDOR*⁵

*Állatorvostudományi Kutatóintézet; Budapest, Hungária krt. 21. 1143;

¹abonyi.flora@vmri.hu;

²nyomjukmeg@gmail.com

³sellyei.boglarka@vmri.hu

⁴eszterbauer.edit@vmri.hu

⁵doszpoly.andor@vmri.hu

Kivonat

Bevezetés

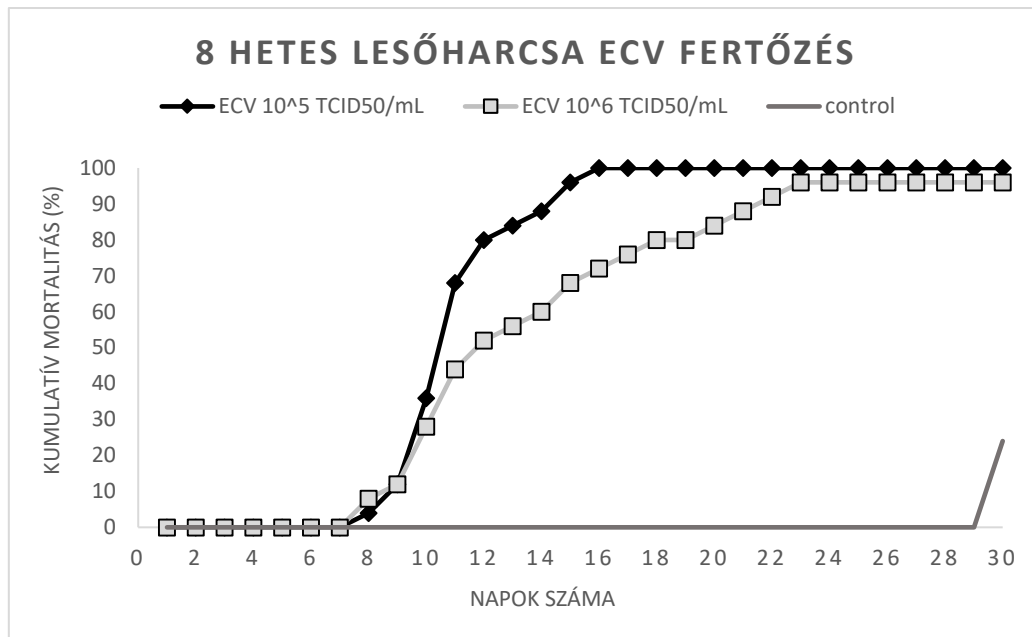
Az akvakultúra az egyik legdinamikusabban fejlődő mezőgazdasági ágazat az egész világon. Az intenzív állattenyésztésben, így a halgazdálkodásban is, a magas mortalitással és így jelentős gazdasági károkkal járó járványokat okozó vírusok jelentik az egyik legnagyobb problémát (Kibenge 2016). A világszerte azonosított több halvírus közül számos vírusfajra a hazai halállományok is fogékonyak, mint például a harcsák ranavírusaira (European catfish virus, ECV és European sheatfish virus, ESV), a pontyok tavaszi virémiájának vírusára (SVCV) és a koi herpeszvírusra (KHV) (Gray and Chinchar 2015; Kibenge 2016). A ranavírusok az *Iridoviridae* családba tartozó duplaszálú DNS vírusok, melyek halak, hullók és kétélűek állományaiban okozhatnak tömeges elhullásokat (Chinchar 2002; Holopainen et al. 2009). Magyarországon 2013-ban izoláltak először ranavírust (ECV) halból, amely Szegeden (2008), majd Esztergom és Mártély környékén okozott tömeges elhullást a törpeharcsa állományokban (Juhász et al. 2013). Az ECV képes megfertőzni gazdaságilag jelentős halfajokat is, mint például az európai lesőharcsát (*Silurus glanis*), amely Európában kedvelt étkezési és horgászhal (Leimbach et al. 2014), így Magyarországon is egyre nagyobb mértékben vonják tenyésztésbe. Munkánk célja az volt, hogy meghatározzuk különböző korú lesőharcsák fogékonyságát egy Magyarországon izolált törpeharcsa ranavírusra.

Anyag és módszer

A lesőharcsa fertőzéses kísérletek során három különböző korú, 8 hetes (átlagos testtömeg: 3 g), 10 hetes (8 g) és 16 hetes (55 g) csoportot fertőztünk kétféle ECV dózissal (10^5 és 10^6 TCID₅₀/ml) $21\pm 0,5$ °C-on. A négy hónapos halak esetében helyhiány miatt csak a 10^5 TCID₅₀/ml dózisban vizsgáltuk a vírus hatását a kontrollcsoport mellett. A lesőharcsák halgazdaságból, ugyanabból a szaporításból származtak. A kísérletben használt halakon parazitológiai és bakteriológiai vizsgálatokat is végeztünk. Minden csoportban 25 db hal volt, és a fertőzést követően 1 hónapig figyeltük meg az állatokat. A halakon megmutatkozó tüneteket dokumentáltuk. A vírusfertőzést máj mintákból DNS kivonást követően vírus-specifikus PCR-rel igazoltuk, valamint belső szervekből újra izoláltuk a vírust EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) sejtvonalon. A kapott kumulatív mortalitás adatok statisztikai értékelését Fisher-egzakt teszttel, R Commander program használatával értékeltük, a diagramokat Microsoft Excel programmal generáltuk. Minden kísérletből a 10^5 TCID₅₀/ml-es dózissal fertőzött csoportok mortalitás adatait hasonlítottuk össze, az ECV okozta mortalitás korfüggésének vizsgálata céljából.

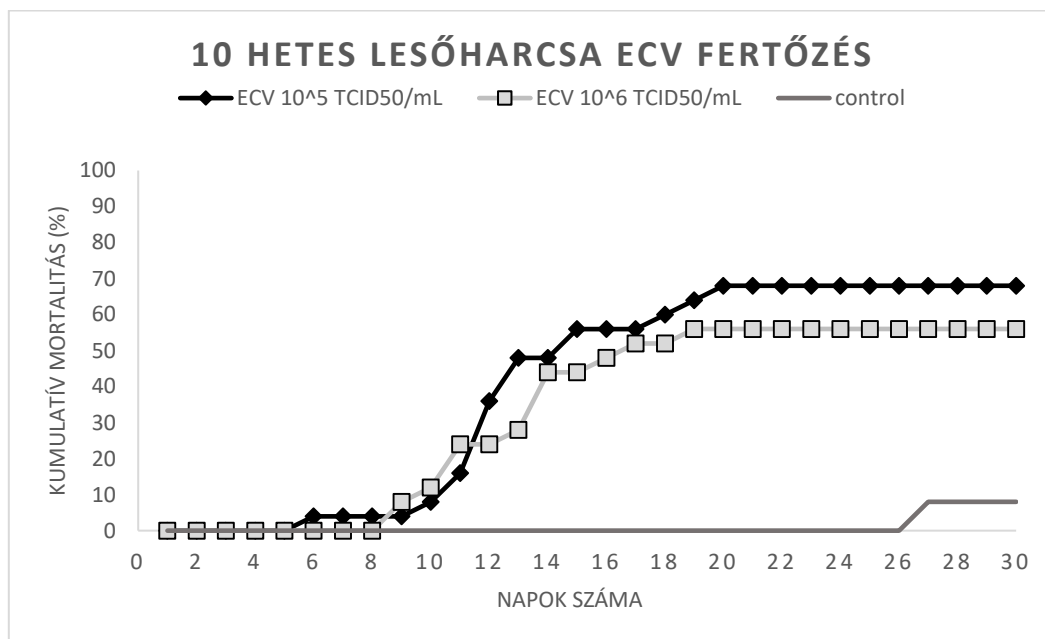
Eredmények és következtetések

A 8 hetes halakon végzett kísérletben a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan megemelkedett kumulatív mortalitást tapasztaltunk: 100%-ot a 10^5 , 96%-ot a 10^6 TCID₅₀/ml-es csoportokban (1. ábra). A kontroll csoportban a kísérlet utolsó néhány napjában a 24%-os elhullást kannibalizmus okozta. A kontroll és a fertőzött csoportok között szignifikáns ($p < 0.0001$) különbséget tudtunk kimutatni a Fisher-egzakt teszt használatával. Elhullás a fertőzést követő 8. naptól a 23. napig volt megfigyelhető. Az elpusztult halak bőrén pontszerű vagy kiterjedt gyulladásokat, vérzéseket, boncolás során pedig hasüregi folyadékgyülemet (ascites), és a belső szervek anémiáját (elsősorban a májban) figyeltük meg. Minden vírusfertőzött csoportban étvágytalanságot tapasztaltunk.



1. ábra: Kumulatív mortalitás 8 hetes lesőharcsa (*Silurus glanis*) ECV fertőzéses kísérletben

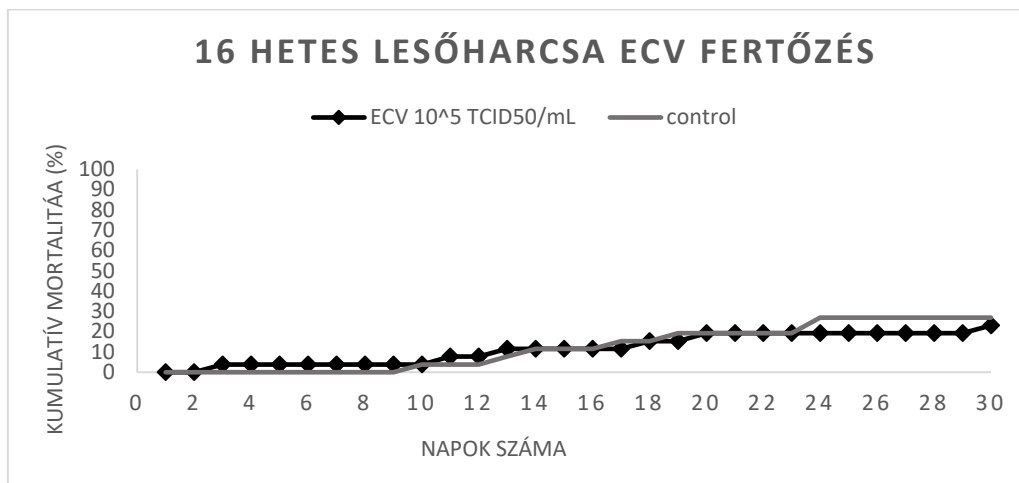
A 10 hetes korcsoportban 68% (10^5 TCID₅₀ per ml, $p < 0.0001$) és 56% (10^6 TCID₅₀ per ml, $p = 0.0003$) kumulatív mortalitást kaptunk. Az elhullások a fertőzést követő 9. napon kezdődtek, és a 20. napig tartottak (2. ábra). A kontroll csoportban tapasztalt minimális (8%) elhullást szintén kannibalizmus okozta a kísérlet utolsó napjaiban.



2. ábra: Kumulatív mortalitás 10 hetes lesőharcsa (*Silurus glanis*) ECV fertőzéses kísérletben

A 16 hetes korcsoportban a kontroll és a fertőzött csoportban hasonló, 23-26% mortalitást tapasztaltunk, a fertőzést követő 3. naptól a 30. napig ($p = 1.0000$) (3. ábra). A fertőzött csoportban étvágytalanság jelentkezett a fertőzést átvészelt halakon, továbbá pontszerű gyulladásokat figyeltünk meg a bőrön. Mivel a kontroll csoportban nem volt jellemző az étvágytalanság, így a halak agresszívabb viselkedése következményeként kialakult sebek miatt következhetek be az elhullások, amely kis mértékben módosíthatja az eredményeket.

A 3 kísérlet alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a mortalitás szignifikánsan függ a lesőharcsa korától ($p < 0.0001$). A két alkalmazott dózis (10^5 és 10^6 TCID₅₀/ml) között $n=25$ egyed szám mellett (mely ez esetben alacsonynak tekinthető) a statisztikai teszttel egyik kísérletben sem volt kimutatható szignifikáns különbség (8 hetes: $p=1.0000$, 10 hetes: $p < 0.0001$).



3. ábra: Kumulatív mortalitás 10 hetes lesőharcsa (*Silurus glanis*) ECV fertőzéses kísérletben

A vírus újra izolálásához a 8 hetes kísérlet első 3 elhullott halából vettünk mintát. A sejtkárosító hatás (CPE) megfigyelhető volt EPC sejteken két nap után, míg a negatív kontrollban ez nem volt tapasztalható.

Vírus-specifikus PCR felhasználásával az összes kísérletben részt vett halból gyűjtött (lép, máj,) szövetmintát megvizsgáltuk (1. táblázat). A 8 és 10 hetes halak esetében az elhullott egyedek száma korrelált a pozitív PCR eredményekkel, és a vírusfertőzést átvészelt halak többsége negatív PCR eredményt adott. Ezzel szemben a 16 hetes korcsoportban a fertőzést átvészelt halak (19 db) közül 11 halban igazoltuk az ECV DNS jelenlétét. A pozitív minták közül random módon kiválasztott néhány mintán szekvencia analízist végeztünk, mellyel 100%-os nukleotid azonosságot mutattunk ki az ECV vírussal.

1. táblázat: Ranavírus PCR eredmények

| Kísérlet | Tömeg | Csoport | Mortalitás | | Pozitív PCR eredmény/összes tesztelt egyed | |
|----------|----------|--|--------------------------------|---------------------------------|--|---------------------|
| | | | elhullott egyedek száma/összes | kumulatív százalékos mortalitás | Elhullott | Fertőzést átvészelt |
| 8 hetes | kb. 3 g | 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml dózis | 25/25 | 100% | 19/25 | 0/0 |
| | | 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml dózis | 24/25 | 96% | 24/25 | 0/1 |
| | | kontroll | 6/25* | 24% | 0/6 | 0/19 |
| 10 hetes | kb. 8 g | 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml dózis | 17/25 | 68% | 17/17 | 0/8 |
| | | 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml dózis | 14/25 | 56% | 14/14 | 0/11 |
| | | kontroll | 2/25 | 8% | 0/2 | 0/23 |
| 16 hetes | kb. 55 g | 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml dózis | 6/26 | 23% | 6/6 | 11/20 |
| | | kontroll | 7/26* | 27% | 0/7 | 0/19 |

*Kannibalizmus vagy agresszív viselkedés miatti elhullás

A kísérletet megelőzően a felhasználásra szánt lesőharcsákon szűrővizsgálatot végeztünk úgy, hogy néhány egyed májából gyűjtött szövetmintákat ranavírus specifikus PCR felhasználásával teszteltük. Ennek eredményeként ranavírus jelenlétét nem tudtuk kimutatni az állományban. A kísérlet előtti karantén időszakban paraziták jelenlétét nem tapasztaltunk a 8 hetes kísérletben használt egyedek vizsgálata során. Később, az elhullások kezdetekor darakór (*Ichthyophthirius multifiliis*) jelent meg a 8 hetes kísérlet összes csoportjában. Ekkor FMC (formalin, malachitöld, metilénkék) kezelést végeztünk, így a kontroll csoportban nem történtek parazita

okozta elhullások. Az első kísérletet tapasztalatai miatt a következő kísérletek előtt megelőző FMC kezelést (0,6-0,75 ml/50 liter) hajtottunk végre. Így a 10 hetes halakon végzett kísérletben nem jelentkezett semmilyen zavaró tényező.

A 16 hetes fertőzéses kísérlet előtt bakteriológiai vizsgálatok céljából az akklimatizációs időszak alatt mintát vettünk májból és lépéből. Ennek eredményeként alfa- és béta- hemolizáló baktériumokat azonosítottunk Columbia véres agaron. Az API20NE biokémiai teszt és a rpo DNS szekvencia eredmények *Aeromonas veronii* jelenlétét igazolták. Az agresszív viselkedés következményei mellett ez is felelős lehetett az elhullások egy részéért a kontroll és a fertőzött csoportban is.

Korábban már vizsgálták a *Silurus glanis* fogékonyságát különböző típusú ranavírusokra (Leimbach et al. 2014). Munkánkban hasonló módon megvizsgáltuk a magyarországi ECV izolátum fertőzőképességét különböző korú lesőharcsákon. Jelentős elhullást tapasztaltunk, mely alapján arra következtethetünk, hogy a magyarországi izolátum az Olaszországban izolált ECV-24 (Bovo et al. 1993) vírushoz hasonló elhullásokat képes okozni, szemben más külföldi izolátumokkal kapott eredményekhez képest, ahol alacsonyabb mortalitást tapasztaltak. Az első, 8 hetes halakon végzett kísérlet eredményei alapján azt feltételezzük, hogy ebben az életkorban a lesőharcsa immunrendszere még nem fejlődött ki teljes mértékben, ezért kaphattuk a legmagasabb mortalitást ebben a korcsoportban. Ezek alapján feltételezhető, hogy a halak immunrendszere körülbelül 3 hónapos kor elérését követően képes megküzdeni a ranavírus fertőzéssel, így a 16 hetes halakon végzett kísérletünkben az ECV mortalitása már szignifikánsan csökkent. Eredményeink azt mutatják, hogy a 4 hónaposnál fiatalabb egyedeket veszélyeztetni elsősorban a vírus, így az ivadéknevelés során lenne szükség a legnagyobb védelemre. További munkánk során a halgazdaságokban megjelenő ranavírus járványok megelőzése céljából ECV elleni prototípus újgenerációs vakcinákat fejlesztünk, melyeket törpeharcsákon, mint modellállaton kívánunk tesztelni.

Összefoglalás

A ranavírusok világszerte elterjedt, gazdasági károkat okozó vírusok az akvakultúrában. Az európai lesőharcsa Európában egyre népszerűbb étkezési és horgászhal, állományjaiban a különböző ranavírus törzsek eltérő mértékű mortalitást okozhatnak. Ezért munkánk célja volt, hogy meghatározzuk a különböző korú lesőharcsák fogékonyságát a Magyarországon izolálásra került törpeharcsa ranavírus (ECV) törzssel szemben. A vírusra való érzékenységet három korcsoportban vizsgáltuk: 8 hetes, 10 hetes és 16 hetes korú lesőharcsákon, melyeket egy magasabb és egy alacsonyabb ECV dózissal (10^5 és 10^6 TCID₅₀/ml) fertőztünk 21 ± 0.5 °C-on. A legfiatalabb korcsoportban magas (96-100%), a középső korcsoportban mérsékelt (56-68%), a legidősebb korosztályban pedig nem tapasztaltunk szignifikáns elhullást, bár az állomány jelentős részében kimutattuk a vírus jelenlétét. Az elhullások mértékéből arra következtethetünk, hogy a hazánkban izolált ECV az olaszországi ECV-24-es izolátumhoz hasonló mortalitást képes okozni. Kísérleti eredményeinkből kitűnik, hogy a magyarországi ECV izolátum magas kockázatot jelent a fiatal lesőharcsa állományok számára, így a 4 hónapnál fiatalabb lesőharcsák esetében megfontolandó a vírus elleni vakcina alapú védekezés.

Kulcsszavak: törpeharcsa ranavírus, lesőharcsa, kísérletes vírus fertőzés

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a 2018-ban elnyert NKFI K140348 OTKA pályázat keretén belül valósulhatott meg. Köszönettel tartozunk a kísérleti állatok biztosításáért az Aranypony Zrt.-nek, és a Debreceni Egyetem, Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszékének.

Irodalom

- Bovo G, Comuzi M, Cescia G, Giorgetti G, Giacometti P, Cappellozza E (1993) Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictalurus melas*) dallevalimento. *Boll Soc It Patol Ittica* 11:3–10.
- Chinchar VG (2002) Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers. *Arch Virol* 147:447–470. <https://doi.org/10.1007/s007050200000>
- Gray MJ, Chinchar G V. (2015) Introduction: history and future of ranaviruses. In: Gray MJ, Chinchar G V. (eds) *Ranaviruses*. Springer International Publishing, pp 1-8.
- Holopainen R, Ohlemeyer S, Schütze H, Bergmann SM, Tapiovaara H (2009) Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis Aquat Organ* 85:81–91. <https://doi.org/10.3354/dao02074>
- Juhász T, Woynárovichné Láng M, Csaba G, L. Farkas S, Dán Á (2013) Isolation of a ranavirus causing mass mortality in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) in Hungary. *Magy Állatorvosok lapja* 135.:763–768
- Kibenge FSB (2016) Introduction to aquaculture and fisheries. In: Kibenge FSB, Godoy MG (eds) *Aquaculture Virology*. Elsevier, pp 3-8.
- Leimbach S, Schütze H, Bergmann SM (2014) Susceptibility of European sheatfish *Silurus glanis* to a panel of ranaviruses. *J Appl Ichthyol* 30:93–101. <https://doi.org/10.1111/jai.12219>