

# DIZBI

Preuzimanjem digitalne kopije pristali ste na uvjete korištenja

[./?ct&key=download-terms](http://?ct&key=download-terms)

Zapis je preuzet s web adrese

<https://dizbi.hazu.hr/?pr=i&id=171613>

## [Dalji prilog etiologiji zarazne vodene bolesti šarana / I. Tomašec, Z. Brudnjak, N. Fijan ml. i Lj. Kunst](#)



Bibliografska razina	<a href="#">a – analitička jedinica (sastavnica)</a>
Autor	<a href="#">Tomašec, Ivo [autor]</a>
Ostali autori	<a href="#">Brudnjak, Zvonimir</a> • <a href="#">Fijan, Nikola</a> • <a href="#">Kunst, Ljubo</a>
Stranice	31 – 41
Tematska predmetnica	<a href="#">Šaran</a> • <a href="#">Etiologija</a> • <a href="#">Infekcije</a>
UDK	<a href="#">597.554.3 – Šaran</a> • <a href="#">616-02 – Etiologija</a> • <a href="#">616-022.1 – Infekcije</a>
Jezik teksta	<a href="#">hrv – hrvatski</a>
Licencije	<a href="#">InC</a>
Vrsta građe	<a href="#">članak</a>
urn:NBN	<a href="#">NBN: urn:nbn:hr:275:079303</a>
Dio od	<a href="#">Rad Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti. Odjel za medicinske nauke</a>
Svezak	<a href="#">Knj. 9(1964)=knj. 336 / urednik D. Perović</a>

Akademik I. TOMAŠEC, Z. BRUDNJAK, N. FIJAN ml. i Lj. KUNST

## DALJI PRILOG ETIOLOGIJI ZARAZNE VODENE BOLESTI ŠARANA

Pitanje etiologije zarazne vodene bolesti šarana (zvbš) zaokuplja naučne radnike i ribarske stručnjake već nekoliko decenija. Unatoč tome još uvijek ne postoji jedinstveno mišljenje o tom pitanju.

Danas je općenito prihvaćeno mišljenje da je to bolest zarazne naravi, čiji je nastanak i tok u izvjesnoj mjeri ovisan i o nekim faktorima izvan zaraznog agensa. No u pitanju primarnog uzročnika ove bolesti mišljenja se razilaze. Jedni smatraju da je primarni uzročnik bolesti bakterija *Aeromonas* (*Pseudomonas*) *punctata*, a drugi smatraju da je primarni **uzročnik virus**. Glavni pobornik mišljenja da je *Aeromonas punctata* primarni uzročnik ove bolesti je W. SCHÄPERCLAUS, koji je prvi pred više od tri decenija počeo proučavati ovu bolest. Pitanje uloge *Aeromonas punctata* kod ove bolesti je iscrpno istraživano na našem fakultetu (I. TOMAŠEC i suradnici). Rezultati naših istraživanja pokazali su da se **ta bakterija ne može smatrati kao primarni uzročnik zvbš**, već da ona tek naknadno ulazi u bolesni organizam. Ne ulazeći ovdje potanje u taj problem, iznijet ćemo samo glavne razloge za takvo naše stajalište.

Općenito je poznato da je bakterija *Aeromonas punctata* raširena u svim vodama, pa je jednako nalazimo u vodama u kojima ova bolest vlada, kao i u onima gdje bolesti nema. Nalazimo je redovito i u crijevu zdravih šarana, a izuzetno je možemo naći i u njegovim organima. Utvrđeno je da nema bitne razlike u patogenitetu prema šaranima između sojeva *Aeromonas punctata* koji su izolirani iz vode u kojoj nema bolesnih šarana i sojeva koji su izolirani iz bolesnih šarana odnosno iz šarana koji su uginuli od zvbš. Šta više, bilo je i slučajeva u kojima je patogenitet sojeva iz vode u kojoj nije bilo bolesnih šarana bio znatno veći od patogeniteta onih sojeva koji su izolirani iz bolesnih šarana. Bolesne promjene se kod šarana mogu proizvesti tek velikim dozama *Aeromonas punctata* **apliciranih intraperitonealno, intramuskularno ili supkutano**. U vodi se redovito nalazi veći broj tipova *Aeromonas punctata*, koji se

međusobno razlikuju uglavnom po nekim biokemijskim svojstvima. Iz bolesnih šarana jednog te istog ribnjaka izolirali smo u isto vrijeme veći broj tipova te bakterije, a i neke druge bakterijske vrste. Ta činjenica govori protiv mišljenja da je *Aeromonas punctata* specifički i primarni uzročnik bolesti. Patološko-anatomske promjene kod prirodne zvbš i kod umjetne infekcije šarana s *Aeromonas punctata* su samo na prvi pogled slične, a u svojoj biti su različite. Na tu činjenicu neki autori nisu svratili dovoljno pažnje. Kod prirodne zvbš nalazimo u prvom redu hidropičke promjene s hiperemijama, krvarenjima i nekrozama naročito u koži, a kod umjetne infekcije s *Aeromonas punctata* prevladavaju uglavnom gnojno-upalni procesi, i to na mjestu aplikacije bakterijske kulture. Bolest koju smo proizveli kod šarana umjetnom infekcijom s *Aeromonas punctata* (pomoću intramuskularne ili intraperitonealne aplikacije) nije uspjelo kohabitacijom u vodi prenijeti na zdrave šarane, dok je takav način prijenosa bolesti moguć kod prirodne zvbš. Izrazita razlika postoji i u inkubaciji, koja je kod umjetne infekcije s *Aeromonas punctata* mnogo kraća. Nadalje je općenito poznato da zvbš u akutnom i teškom obliku najčešće vlada u proljeće kod temperature vode od 15 do 20°C. Kad temperatura vode prijeđe 20°C, tada bolest obično prestaje, odnosno rjeđe se javlja. Međutim se bakterija *Aeromonas punctata* veoma dobro razmnaža u vodi, pa i u šaranskom organizmu kod više temperature (28–30°C), a kod te temperature vode se zvbš rjeđe javlja, a ukoliko se javi, tada je to obično u blažem obliku. Svakako, razmnažanje te bakterije u već bolesnom šaranskom organizmu nije indiferentno, te imade izvjestan utjecaj na tok i razvoj zvbš.

Mišljenje da bi virus mogao biti uzročnik zvbš zapravo je starijeg datuma. Već je god. 1935. M. A. PJEŠKOV na osnovu provedenih bakterioloških pretraga i infekcijskih pokusa, kao i na osnovu nalaza G. V. EPŠTEJNA da se u stanicama kože i mozga bolesnih šarana nalaze specifični uključci, zaključio da je zvbš bolest virusnog karaktera. God. 1949. je G. D. GONČAROV postigao pozitivni rezultat serološkom metodom za utvrđivanje virusa, a god. 1950. i 1951. su S. ROEGNER-AUST, G. BRUNNER, R. STRIEGEL-JAXTHEIMER i F. SCHLEICH našli u tekućini iz trbušne šupljine kao i u organima bolesnih šarana okrugla elementarna tjelešca velika do 100 milimikrona, za koja drže da je virus. S. ROEGNER-AUST i F. SCHLEICH izvršili su infekcijske pokuse s filtratom organa bolesnih šarana. S tim filtratom, u kojemu nije bilo bakterija, uspjelo im je kod pokusnih šarana izazvati karakteristične simptome bolesti bez čirova s eksudatom u trbušnoj šupljini.

Navedeni pozitivni rezultati u vezi s utvrđivanjem virusnog karaktera zvbš, kao i rezultati istraživanja koja su kod nas provedena o ulozi bakterije *Aeromonas punctata* kod ove bolesti, ponukali su nas da na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu pristupimo sustavnom daljem istraživanju problema njezine etiologije. U toku god. 1953. i 1954. proveli smo istraživanja o virusnom karakteru ove bolesti (I. TOMAŠEC, E. TOPOLNIK

i M. WINTERHALTER, 12\*). Pokušalo se dokazati postojanje virusa nasađivanjem materijala iz bolesnih šarana na kokošje embrione kod temperature od 20°C. Rezultati tih pokusa bili su negativni. U istom radu je izvješteno da je filtratom organa šarana bolesnih od zvbš, kao i njihovom punom krvi bez bakterija, uspjelo bolest prenijeti na zdrave šarane i zlatne karase. Navedeni filtrat uštrcan je u tri pokusa intraperitonealno i intramuskularno dvadeset i dvama šaranima i sedmorima zlatnim karasima. S vanjskim znacima bolesti oboljelo je jedanaest šarana i tri karasa, tj. 48,3% od ukupnog broja inficiranih riba. Od njih je uginulo pet šarana i jedan karas, šest šarana je ubijeno u raznim stadijima bolesti, a dva šarančića su ozdravila. Na temelju tih rezultata mi smo zaključili da zvbš uzrokuje neki filtrabilni mikroorganizam, najvjerojatnije virus.

No ni iza ove naše publikacije nije općenito prihvaćeno mišljenje da bi virus bio primarni uzročnik zvbš, već je problem proučavanja njezine etiologije ostao i dalje aktuelan.

G. D. GONČAROV (4, 5, 6) bavi se i dalje tim pitanjem. U zajednici s E. J. TUREVIČEM utvrdio je uključke u stanicama bolesnih riba jednake onima koje je utvrdio EPŠTEJN. Jednake uključke našli su DINULESCU i suradnici u mozgu bolesnih šarana (cit. po GONČAROVU). Na osnovu dermatotropnosti virusa GONČAROV ga je nazvao *Dermatropus haemorrhagica piscis*. U svojim radovima GONČAROV ističe da je »krasnuha« šarana, koja se javlja u SSSR i koju on smatra virusnom bolešću, identična s bolešću koja se s jednakim znacima javlja i u drugim zemljama (u Njemačkoj: *Infektiöse Bauchwassersucht des Karpfens*), a za koju SCHÄPERCLAUS smatra da je uzrokuje *Aeromonas punctata*. Ne prihvaća obrazloženje koje SCHÄPERCLAUS navodi u prilog svog stava. Posebno ističe da je virusnom vakcinom uspio imunizirati šarane protiv ove bolesti.

O. BAUER (2) iznosi na Savjetovanju o slatkovodnom ribarstvu u Leipzigu god. 1956. stajalište sovjetskih istraživača da je uzročnik bolesti virus. No prema podacima u literaturi vidi se da ni u SSSR ne vlada o tom problemu još posve jednodušno mišljenje. I. A. ARTJUH i A. G. OSTAŠEVSKIJ (1) nisu uspjeli filtratom organa bolesnih šarana bolest prenijeti na zdrave šarane. Smatraju da je *Aeromonas punctata* primarni uzročnik bolesti. V. I. TEC (10) izvješćuje da nije uspio čirasti oblik zvbš prenijeti na druge zdrave šarane ni u laboratoriju ni u prirodnim ribnjacima.

Negativne rezultate u vezi s utvrđivanjem virusa (biološki pokus s filtratom) postigli su i bugarski istraživači J. KABAIVANSKI, H. SLAVKOV, D. SAVOV i ST. STANOEVI (7). Prema njihovom izvještaju uspjeli su bolest prouzrokovati bakterijom *Aeromonas punctata*. Poljski istraživači M. DYBOWICZ i BR. KOCYLOWSKI (3) uspjeli su tek djelomice pružiti do-

\* U tom radu navedena je i sva literatura koja je ovdje naprijed citirana, pa se u popisu literature neće ponovo navesti.

kaz o virusnom karakteru zvbš. Serološkom metodom dobili su pozitivan rezultat, ali supkutanom aplikacijom filtrata organa bolesnih šarana uspjeli su prouzrokovati samo lokalnu upalu.

Posebno valja istaći da i izvjestan broj istaknutih stručnjaka u svojim knjigama i mnogobrojnim člancima o bolestima riba i nadalje smatra da je *Aeromonas punctata* primarni uzročnik zvbš (W. SCHÄPERCLAUS, W. WUNDER, A. K. ŠČERBINA, H. MANN i dr.).

Takvo stanje nas je ponukalo da i dalje nastavimo proučavanje tog problema. Pitanje tačnog poznavanja uzročnika je bitno za odluku o primjeni mjera za suzbijanje ove bolesti, koja je kod nas još uvijek jedan od najakutnijih problema našeg slatkovodnog ribarstva. Posebno želimo ovom prilikom istaći da stručnjaci koji osporavaju mišljenje da je virus primarni uzročnik bolesti naročito napominju da do sada još nitko nije uspio uzgojiti taj virus u umjetnoj kulturi.

Stoga smo sebi stavili u zadatak da pokušamo uzgojiti virus te bolesti na kulturi tkiva šarana i da time damo dalji prilog mišljenju ga je virus primarni uzročnik zvbš. Time bi ujedno stvorili mogućnost za dalje istraživanje svojstava toga virusa, što je jedan od preduvjeta za uspješno suzbijanje ove bolesti.

Dosada su V. I. TEC i G. S. JAKOVLJEVA (II) pokušali da dokažu virus kod zvbš nasadivanjem zaraznog materijala na umjetnu kulturu tkiva srea šarana. Oni su uspjeli uzgojiti u umjetnoj kulturi tkivo raznih organa šarana po metodi KEN WOLFA i C. E. DUNBARA. Organi su potjecali od šarana u dobi od 3 do 12 mjeseci. Kultura je inkubirana kod 19°C. Zarazni materijal potjecao je od šarana razne dobi koji su prirodno oboljeli od čirastog oblika zvbš. Trajanje bolesti tih šarana bilo je nepoznato. Šarani su utamanjeni neposredno prije uzimanja materijala. Autori navode da je citopatogeni efekt utvrđen u umjetnoj kulturi tkiva u četiri slučaja. Od ta četiri slučaja tri su potjecala od šarana koji nisu bolovali od zvbš. Prema tome je citopatogeni efekt nastao iz drugih razloga, a ne djelovanjem virusa. Šarani koji su inficirani materijalom iz kulture tkiva nisu reagirali. Pregledom na elektronskom mikroskopu u tim kulturama nisu utvrđena elementarna tjelešca. Na temelju tih rezultata autori zaključuju da kod čirastog oblika zvbš nema virusa.

#### KULTURA TKIVA ŠARANA

Da bi se moglo pristupiti rješavanju navedenog problema, valjalo je u prvome redu riješiti pitanje kulture tkiva šarana i time stvoriti valjana supstrat na kojem će se moći uzgajati virus, ukoliko on postoji u zaraznom materijalu bolesnih šarana. Taj je problem više godina rješavao jedan od nas (Lj. KUNST 8, 9) u nizu pokusa. Mi smo upotrijebili onu metodu kojom je uvijek postignut siguran i dobar rast tkiva.

U našim pokusima je upotrebljavana kultura bubrežnog tkiva šarana, koja je pripravljena po metodi pomoću zgrušane kokošje plazme. Tkivo je uzimano od šarana u dobi oko 9 mjeseci. Za pripremanje kulture uzi-

mani su režnjevi srednjeg bubrega. Nakon usitnjavanja i temeljitog ispiranja u modificiranoj Hanksovoj otopini komadići tkiva su raspoređeni u kokošjoj plazmi, kojom su premazane stijenke epruvete. Dodavanjem pilećeg embrionalnog ekstrakta plazma se zgruša, tako da su komadići tkiva čvrsto fiksirani za stijenku epruvete. U svakoj epruveti dimenzije 11x160 mm nalazilo se 4–6 eksplantata veličine oko 1 mm<sup>2</sup>. Epruvete su punjene s 1,5 ml gojilišta, koje se sastojalo od 89,5% modificirane Hanksove otopine, 10,0% šaranskog seruma i 0,5% laktalbuminskog hidrolizata. Gojilište je sadržavalo i antibiotike, i to penicilina 200 I J/ml i streptomicina 200 mikrograma/ml. pH gojilišta je iznosio 7,2. Hanksova otopina je modificirana dodavanjem 32,3% vode da bi se izbjegla hipertoničnost gojilišta. Kulture su inkubirane na 25°C. Svakako bi bilo bolje da smo upotrijebili i kulturu tkiva kože, ali to na žalost nije bilo moguće, jer su te kulture obično bile kontaminirane gljivicama unatoč upotrebi antibiotika.

Proliferacija stanica započela je 48 sati nakon pripremanja kultura. Oko manjih i tanjih eksplantata počele su rasti jedre vretenaste stanice fibroblasta s finim dugim izdancima, koje su se pružale u svim pravcima oko eksplantata. Citoplazma je bila svijetla s jedva zamjetljivom nježnom granulacijom. Jezgra se samo nazirala. Nakon tri do četiri dana znatno se proširila zona novoizraslih fibroblasta. Oko pojedinih eksplantata su počele rasti i male poligonalne stanice s veoma dobro izraženom jezgrom i lagano granuliranom svijetlom citoplazmom. Te su epitelne stanice rasle u kompaktnom sloju, tvoreći na taj način ploče koje su se mjestimično spajale jedna s drugom. Rast fibroblasta je napredovao do 45. dana uz redovitu izmjenu gojilišta, koja je vršena svaka 4 dana. Epitelne stanice su rasle od 3. do 15. dana, nakon čega su ih fibroblasti postepeno prerasli. U kulturama tkiva starim preko 10 dana bilo je moguće i makroskopski vidjeti zonu novoizraslih stanica.

#### PRIPREMA ZARAZNOG MATERIJALA BOLESNIH ŠARANA

Odabiranjem zaraznog materijala bolesnih šarana s kojim ćemo vršiti naše pokuse posvetili smo posebnu pažnju. Poznato je naime da neki autori nisu uspjeli bolest prenijeti na druge šarane u slučajevima kada se radilo o čirastom, kroničnom obliku bolesti. Može se pretpostaviti da je u toj fazi bolesti virus već nestao iz organizma šarana, a dalju akciju razaranja da su preuzele bakterije.

Mi smo stoga radili samo s materijalom čija je infektivnost bila dokazana. Radi toga smo dopremili s uzgajališta riba bolesne šarane i stavili ih u naše pokusne bazene volumena oko 350 litara s protočnom vodom temperature 13–16°C. Njima smo inficirali zdrave šarane. Infekciju smo vršili tako da smo zdravim šaranima lagano oštetili površni dio kože trljanjem suhom vatom. To smo mjesto iza toga natrljali komadom kože bolesnog šarana, na kojemu se nalazila tipična promjena. To je prokušana metoda, kojom smo već u prijašnjim pokusima uspjeli bolest

redovito prenositi na zdrave šarana u laboratorijskim uvjetima. Prvi znaci bolesti javljali su se na mjestu trljanja i u neposrednoj okolini nakon inkubacije od 6-9 dana, a kasnije i na koži ostalih dijelova tijela. Bolest smo s tih, kod naš oboljelih šarana, na isti način prenosili dalje na nove grupe zdravih šarana. Materijal za inokulaciju kultura tkiva uzimali smo od šarana oboljelih u drugoj i trećoj laboratorijskoj pasaži zaraznog agensa.

Materijal smo uzimali od onih oboljelih šarana kod kojih su se u jačem stupnju razvile početne promjene na koži, i to hiperemija, edemi i krvarenja s manjim fokalnim nekrozama epiderme i supepiderme. Promijenjene i okolne zdrave dijelove epiderme i supepiderme odvajali smo skalpelom od lamelarnog korijuma (Stratum compactum). Pod mjestom gdje su bile razvijene početne promjene izazvane zvbš na lamelarnom dijelu korijuma nismo ulazili mikroskopski vidljive patološke promjene. Odvojenu epidermu sa supepidermom na kojoj su bili patološki procesi usitnili smo škarama, zdrobili u tarioniku i razrijedili s 5 dijelova gojišta za uzgoj kulture tkiva. Dobivenu masu smo centrifugirali 20 minuta na 2000 okretaja. Zatim smo odvajali supernatant i filtrirali ga kroz Seitzov EK filter. S dobivenim filtratom vršili smo inokulaciju kulture tkiva. Tu inokulaciju vršili smo pri prvoj i drugoj izmjeni gojišta. Nakon odlijevanja starog gojišta u svaku epruvetu je dodano 0.2 ml filtrata kože bolesnih šarana. Okretanjem epruveta omogućeno je da filtrat dođe u doticaj sa svim eksplantatima, a zatim je u svaku epruvetu dodano 1,5 ml novoga gojišta. Nakon inokulacije gojište više nije mijenjano.

#### VLASTITI POKUSI

*Pokus I.* Materijal za inokulaciju kultura tkiva uzet je od 2 šarana s opsežnim početnim znacima zvbš, koji su oboljeli u drugoj pasaži prijenosa bolesti. Kod jednog šarana nalazila se na korijenu repne peraje okrugla površinska nekroza kože u promjeru od oko 5 mm, okružena hiperemijom i tačkastim krvarenjima. Kod drugog šarana se takva promjena nalazila u području lijeve prsne peraje. Netom utamanjenim šaranima izrezana su, naprijed opisanom tehnikom, promijenjena mjesta zajedno s okolnim zdravim tkivom.

Za nasadivanje zaraznog materijala upotrijebljene su 8 dana stare kulture hubrežnog tkiva šarana. Kulture su podijeljene u tri skupine po 6 epruveta. Prva skupina inokulirana je s 0.2 ml filtrata tkiva oboljelih šarana, a ostale dvije skupine služile su kao kontrola. Kulture druge skupine inokulirane su s 0,2 ml filtrata kože zdravih šarana, koja je obrađena na jednaki način kao i koža bolesnih šarana. Tu smo skupinu nasadili da utvrdimo ne djeluje li eventualno ekstrakt kože zdravih šarana na neki način štetno na kulturu tkiva. U kulture treće skupine nije stavljeno ništa da bi se moglo tačno razlikovati obično propadanje stanica u starijoj kulturi od eventualnog citopatogenog efekta u kulturama prve skupine.

Na stanicama kultura prve skupine (zarazni materijal) javile su se prve promjene tri dana nakon inokulacije, a očitovale su se u pojavi grube tamne granulacije u citoplazmi epitelnih stanica. Unutar do tada kompaktnih ploča epitelnih stanica pojavile su se pukotine na čijim rubovima su pojedine stanice tamne i smežurane. Na fibroblastima se također mjestimično opaža gruba granulacija. Nakon četiri dana su se epitelne stanice u svim kulturama prve skupine raspale u zrnastu masu. Fibroblasti su se smežurali i izgubili svoju prozirnost. Mjestimično je došlo do skupljanja fibroblasta u grozdaste nakupine, u kojima se više nisu mogle razlikovati pojedine stanice ili njihovi dijelovi. Petog dana je opisanim promjenama bilo zahvaćeno oko dvije trećine fibroblasta, a sve su epitelne stanice bile potpuno propale. Nakon sedmog dana su se sve stanice u kulturama prve skupine raspale u bezobličnu zrnastu masu. U kontrolnim kulturama druge i treće skupine su se prve degenerativne promjene na stanicama pojavile tek nakon deset dana. Te su se promjene očitovale u gubitku jedrine i prozirnosti.

U toku inkubacije pojavila se i izrazita razlika u boji gojišta pojedinih skupina. Boja gojišta prve skupine ostala je crvena, dok je boja gojišta druge i treće skupine postepeno prelazila iz crvene u žutona-randžastu, a sedam dana od početka pokusa bila je već potpuno žuta.

Da bismo dokazali postojanje patogenog virusa u kulturi tkiva, mi smo njome inficirali određeni broj pokusnih riba. Za te biološke pokuse upotrijebili smo šarane težine 80–100 g. Riba su držane u betonskim bazenima volumena oko 350 l bez protoka vode. Prije pokusa sve su ribe bile pod kontrolom oko 4 mjeseca. U tom razdoblju na njima nisu primijećene nikakve bolesne promjene. Riba u pokusu pregledavane su svaki drugi dan.

S materijalom iz epruveta prve skupine inficirano je 9 šarana, i to 5 intraperitonealno s 0,2 ml gojišta inficiranih kultura i 4 trljanjem tkivom iz istih epruveta iz kojih je uzeto gojište. Da bi se provjerilo djelovanje neinficirane kulture na šarane, izvršen je i kontrolni pokus, u kojemu je isti broj šarana tretiran na jednaki način s neinficiranom kulturom tkiva. Temperatura vode je za vrijeme pokusa iznosila oko 13,5°C.

Nakon 6 dana pojavila se kod 2 šarana koji su inficirani trljanjem kože lagana hiperemija na mjestu trljanja i na ljuskama u području ramenog pojasa. Te su se promjene u toku slijedećih nekoliko dana izgubile. Osamnaest dana nakon infekcije je kod jednog šarana koji je inficiran intraperitonealnom aplikacijom gojišta došlo do edema kože i hiperemije ljusaka u području lijeve prsne peraje. U toku slijedeća dva dana te su se promjene izgubile. Na ostalim inficiranim ribama nisu u toku 35 dana, koliko je trajao pokus, utvrđene nikakve promjene. Šarani tretirani radi kontrole s neinficiranom kulturom nisu reagirali u istom vremenskom razdoblju.

Da bismo pružili dalji dokaz da su promjene na kulturi tkiva nastale zaista djelovanjem virusa, mi smo materijalom iz epruveta prve skupine inokulirali novu kulturu tkiva. Za prvu pasaju virusa na kulturi tkiva

upotrijebljeno je gojilište iz kulture tkiva prve skupine, koje je bilo pohranjeno na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gojilište je otopljeno i inokulirano u količini od 0,2 ml novim kulturama tkiva odmah pri njihovu pripremanju. Kao kontrola je poslužila kultura tkiva koja je pripremljena u isto vrijeme. U inficiranim kulturama prvih 5 dana nije došlo do proliferacije stanica, dok su kontrolne kulture normalno rasle. Petoga dana nakon inokulacije je oko jednog manjeg eksplantata u jednoj inficiranoj kulturi došlo do proliferacije takvih fibroblasta, koji su bili jedri i svijetli, te se ni po čemu nisu razlikovali od onih u kontrolnim kulturama. Epitelne stanice u inficiranim kulturama nisu rasle. Nakon 7 dana pojavile su se degenerativne promjene na stanicama i u kulturama kontrolne skupine, jer gojilište nije mijenjano, pa je pokus prekinut. Boja gojilišta je u inficiranim kulturama ostala crvena, dok je ona u kontrolnim kulturama u kojima je došlo do proliferacije tkiva prešla u žutu.

Sedmog dana nakon inokulacije kultura s materijalom inficiranih kultura inficirano je 8 šarana. Svakom šaranu aplicirano je 0,1 ml gojilišta pod veće ljuske i 0,4 ml gojilišta intraperitonealno. Pored toga je svaki šaran natrljan i tkivom iz istog gojilišta. Od sedmog do desetog dana nakon aplikacije pojavile su se na mjestu trljanja jedva vidljive hiperemije, koje su u toku daljih nekoliko dana nestale. Poslije tog vremena na šaranima nismo primijetili nikakve promjene.

*Pokus II.* Da bismo provjerili da se kod promjena u kulturi tkiva u prvoj skupini prvog pokusa nije radilo o slučajnosti, mi smo takav pokus ponovili. Materijal za inokulaciju kultura uzet je od šarana s jako raširenim početnim znacima zvbš iz treće laboratorijske pasaže. U času uzimanja materijala proteklo je 18 dana od infekcije.

Nakon filtriranja zaraznog materijala jedan dio je upotrijebljen za infekciju kultura, a drugi dio za infekciju šarana radi kontrole infekcijske materijala. Šarani su inficirani na jednaki način kao i šarani prethodnog pokusa. Kod šarana koji su bili inficirani filtratom izvornog materijala pojavila se nakon 28 dana slaba hiperemija, koja je trajala oko 10 dana. Četrdeset pet dana nakon infekcije pokus je prekinut jer su svi šarani bili zdravi. Temperatura vode za vrijeme trajanja pokusa iznosila je oko  $13,5^{\circ}\text{C}$ .

Zarazni materijal nasaden je na kulture tkiva stare 8 dana. Kao kontrola upotrijebljena je kultura tkiva iste starosti. U toku 5 dana inokulacije nisu na stanicama utvrđene nikakve promjene. Nakon 8 dana u svim epruvetama utvrđeni su znakovi degeneracije, koja se očitovala u smežuranim stanicama i pojavi grube tamne granulacije u citoplazmi. Gojilište je u svim epruvetama imalo žutu boju. Među kontrolnim i inficiranim epruvetama nije bilo nikakvih razlika.

*Pokus III.* Kako s nasadenim materijalom u II pokusu nismo u kulturi tkiva dobili pozitivni rezultat, odlučili smo takav pokus pod jednakim uvjetima provesti još dva puta, odabirući kod svakog drugi izvorni materijal bolesnih šarana.

Materijal za inokulaciju kultura u ovom pokusu uzet je od šarana oboljelog u trećoj pasaži prijenosa bolesti. Iznad desne trbušne peraje nalazio se mjehur veličine trešnje, ljubičasto crvene boje (slika 1). Oko mjehura bila je koža lagano edematozna i hiperemična. Sadržaj mjehura sastojao se od bistre crvenoljubičaste tekućine, koja se nalazila između epitela i korijuna. Te su promjene nastale 18 dana iza infekcije. Punktatom sadržaja mjehura inficirane su 4 epruvete kulture tkiva koja je bila stara 8 dana.

Kako punktati nije bio obrađen s antibioticima, to su se 3 od inokuliranih kultura zagađile. U četvrtoj epruveti su se nakon 3 dana pojavile opsežne promjene na stanicama. Epitel je bio potpuno razoren, a fibroblasti su bili tamni i smežurani. Četvrtog dana se sve novoizraslo tkivo raspalo u grozdastu masu. U kontrolnim epruvetama nije bilo promjena na stanicama. Epruveta s inficiranom kulturom pohranjena je na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Nakon 30 dana je materijal iz pohranjene epruvete otopljen i inokuliran 8 dana starim kulturama. Inokulirano je 5 epruveta. Već nakon 48 sati su se u 2 epruvete počele smežuravati pojedine nakupine fibroblasta. Stanice su postale tamne i zrnate. Idućeg dana su tim promjenama već bili zahvaćeni fibroblasti u svim inokuliranim kulturama. Rast epitelnih stanica, kako u inokuliranim epruvetama, tako i u kontrolnim, bio je veoma oskudan, pa na njih nije obraćana posebna pažnja. Nakon 5 dana je većina fibroblasta bila pretvorena u bezobličnu zrnatu masu. Tri epruvete s inficiranim kulturama su dalje pohranjene na  $-20^{\circ}\text{C}$ , dok su ostale epruvete upotrijebljene za biološki pokus na ribama. Na fibroblastima u kontrolnim kulturama nisu za vrijeme trajanja pokusa utvrđene nikakve promjene.

S materijalom iz prve pasaže na kulturi tkiva inficirano je 8 šarana. Infekcija je izvršena parenteralnom aplikacijom gojilišta, i to 0,4 ml intraperitonealno i 0,1 ml pod veće ljuske. Svaki šaran je osim toga trljan na jednom mjestu kože tkivom inficiranih kultura. Temperatura vode iznosila je  $13-14^{\circ}\text{C}$ . Nakon 14 dana je kod 4 šarana došlo do lagane hiperemije oko mjesta trljanja, koja se u toku slijedećih 8 dana izgubila. Mjesec dana nakon infekcije svi su šarani bili bez promjene, pa je pokus prekinut.

**Pokus IV.** Kao materijal za inokulaciju kultura upotrijebljeno je tkivo kože šarana oboljelih u trećoj pasaži prijenosa bolesti. Filtrat promjena s kože oboljelih šarana je inokuliran u 5 epruveta s 8 dana starim kulturama tkiva. Kao i u prethodnom pokusu, tako se i ovdje nakon 48 sati u citoplazmi fibroblasta pojavila tamna granulacija, koja je bila naročito izražena na stanicama koje su se nalazile na rubovima zone rasta. Fibroblasti uz sam eksplantat su bili jedri i prozirni. U pločama epitelnih stanica su se pojavile pukotine, na čijim rubovima su stanice bile tamne i smežurane. Nakon 3 dana epitelnih stanica postale su granulirane, izgubile su međusobnu povezanost, a promjene na fibroblastima su se proširile i na stanice uz sam eksplantat. Na stanicama u kontrol-

nim kulturama u isto vrijeme nije bilo nikakvih promjena. Nakon 3 dana pokus je prekinut. Inficirane kulture su dijelom upotrijebljene za biološki pokus, a ostatak je pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

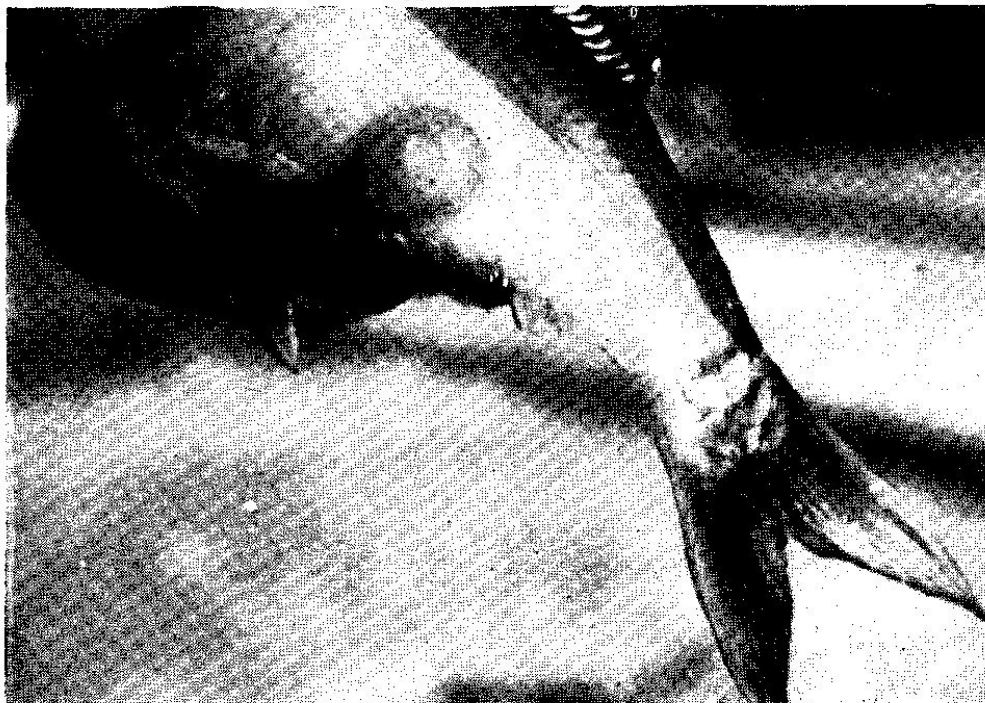
U biološkom pokusu inficirano je 8 šarana, i to intraperitonealno s 0,5 ml gojilišta i trljanjem po koži tkivom inficiranih kultura. Nakon 10 dana se kod jednog šarana ispod jedne ljuske pojavilo krvarenje, a oko mjesta trljanja hiperemija i lagani edem. Te su promjene nakon 3 dana nestale. Kod 2 šarana se na mjestu trljanja 17 dana nakon infekcije pojavila jedva uočljiva hiperemija, koja je brzo nestala.

*Pokus V.* Iz dosadašnjih pokusa vidimo da su šarani inficirani infektivnim materijalom iz kulture tkiva veoma slabo reagirali. Smatrali smo da jedan od razloga za to moguće leži u tome što su temperature kulture tkiva i temperature vode u kojoj su boravili šarani bile različite. Prva je iznosila  $25^{\circ}\text{C}$ , a druga oko  $13-14^{\circ}\text{C}$ . Stoga smo u ovom pokusu, kao i idućim pokusima, temperature tih dviju sredina izjednačili, i ona je iznosila oko  $18^{\circ}\text{C}$ .

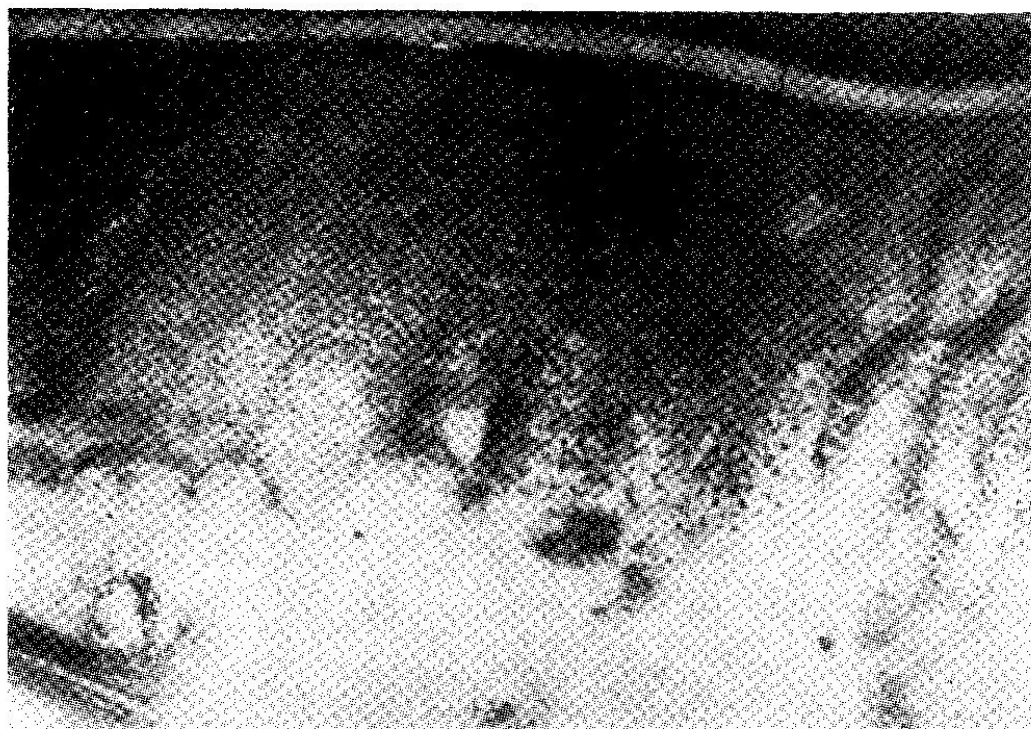
Za inokulaciju kultura u tom pokusu upotrijebljeno je tkivo šarana oboljelih u trećoj pasaži bolesti. Šarani su bili zahvaćeni početnim znacima zvbš. Na koži su se nalazila manja i veća nekrotična područja okružena krvarenjima, hiperemijom i laganim edemom. Nekroze nisu zahvatile muskulaturu (sl. 2).

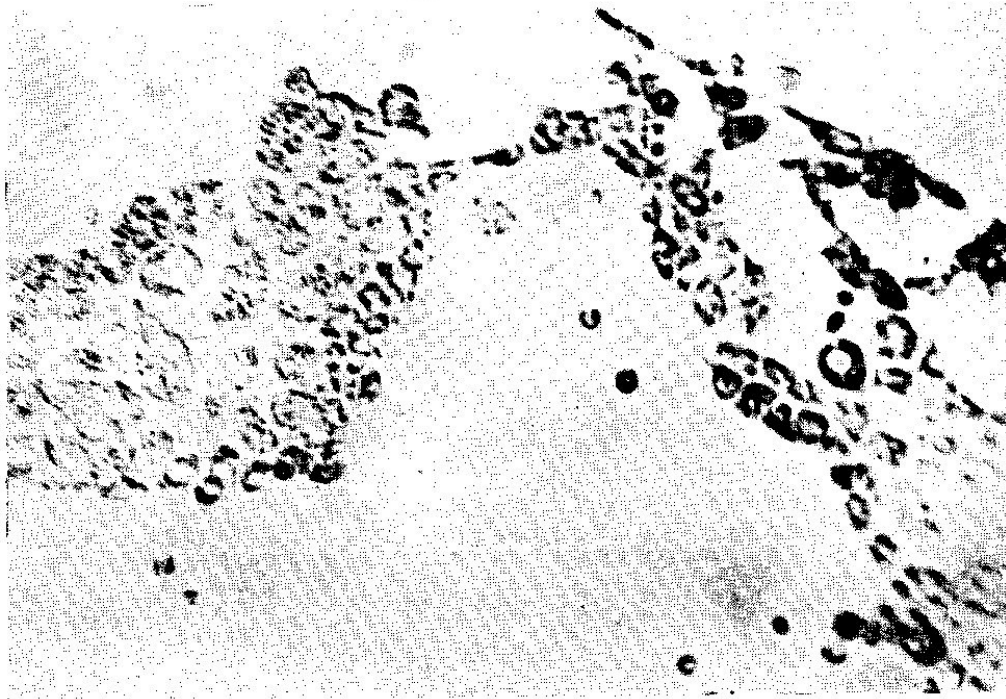
Filtrat tkiva oboljelih šarana inokuliran je u 5 epruveta kulture tkiva stare 8 dana. Trećeg dana iza inokulacije pojavile su se na pločama epitelnih stanica pukotine, na čijim rubovima su stanice bile tamne i smežurane (sl. 3). Ploče epitelnih stanica u kontrolnim kulturama ostale su nepromijenjene (sl. 4). Degenerativne promjene na fibroblastima su opažene istoga dana, a očitovale su se u gubitku povezanosti između pojedinih snopova stanica i u njihovu smežuravanje (sl. 5). Na fibroblastima kontrolne kulture nije bilo takvih promjena (sl. 6). Četvrtog dana, kada je promjenom bilo zahvaćeno oko  $\frac{2}{3}$  stanica, pokus je prekinut. Dio kultura je upotrijebljen za biološki pokus na ribama, a ostatak je pohranjen za dalje pasaže na kulturama tkiva.

U biološkom pokusu inficirano je 5 šarana i 5 zlatnih karasa na jednak način kao i u prethodnim pokusima. Prve promjene pojavile su se na karasima već 6. dana nakon infekcije. Na mjestu trljanja i na mjestu intraperitonealne aplikacije pojavile su se na koži kod svih 5 karasa sitna tačkasta krvarenja i lagani edem. Navedene promjene su 7. dana izražene nešto jače, a zatim su počele jenjavati, tako da su 16. dana sve ribe bile bez promjena. Nakon 22 dana su se kod 2 karasa pojavili edem i hiperemija ispod mjesta trljanja, dok je kod jednog šarana utvrđeno opsežno krvarenje u području prsne peraje. Trideset dana nakon infekcije su kod karasa navedene promjene nestale, a 3 šarana bila su zahvaćena početnim znacima zvbš. Kod šarana koji je prije prethodnog pregleda imao krvarenja na području prsne peraje došlo je na tom mjestu do razvoja čira. Od peraje su ostale samo žbice. Kod drugog šarana utvrđen je početak čira na repnom stablu i jača krvarenja na kori-jenu repne peraje. Treći šaran je imao opsežna krvarenja na donjoj usni

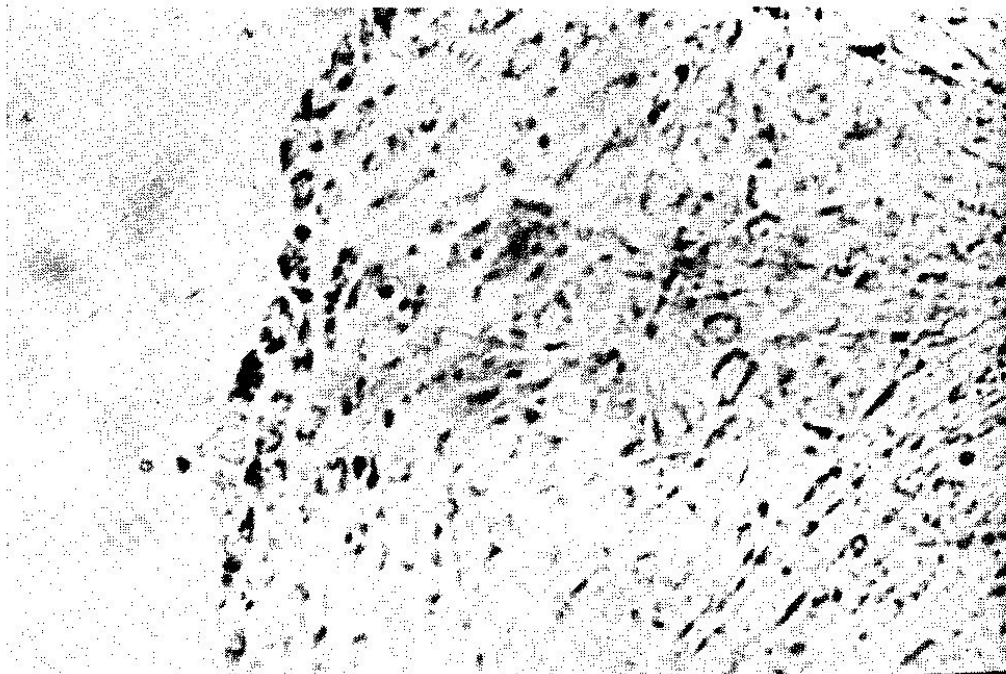


Sl. 1. Mjehur kože bolesnog šarana od zviš ispunjen bistrom crvenoljubačastom tekućinom.  
Pokusni materijal u III pokusu.

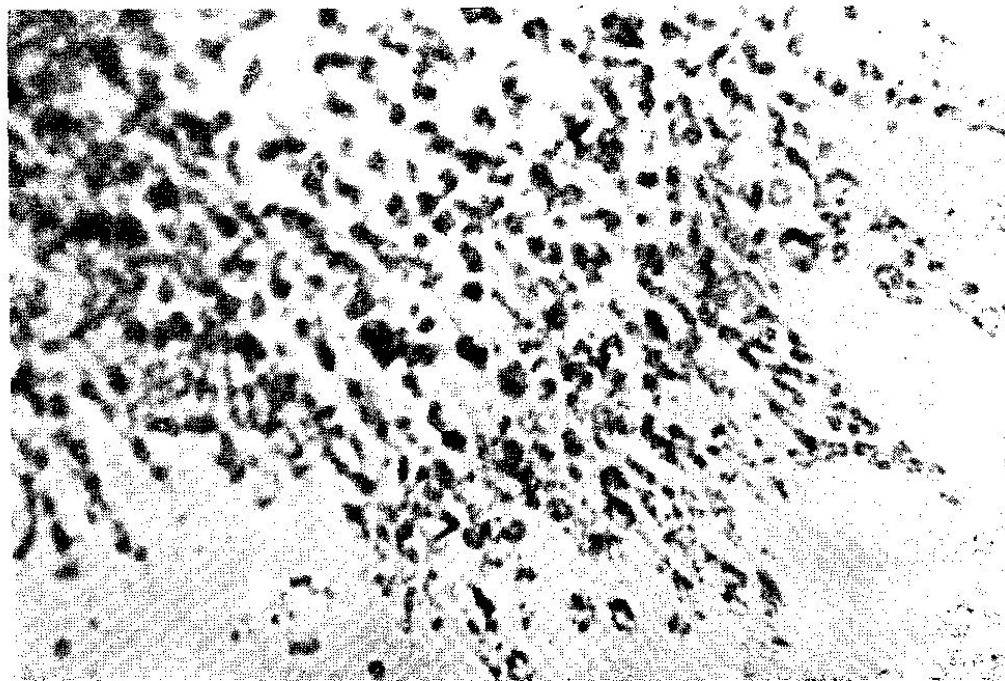




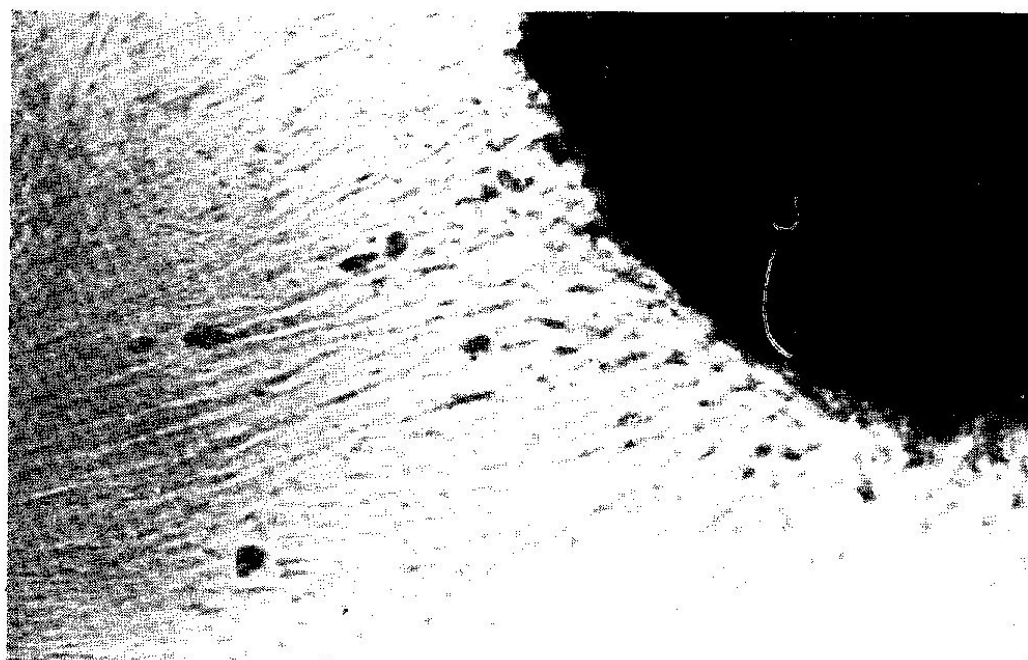
Sl. 3. Citopatogeni efekt na epitelnim stanicama bubrežnog tkiva šarana 3 dana iza inokulacije filtriranog materijala bolesnih šarana.



Sl. 4. Ploča nepromijenjenih epitelnih stanica u 11 dana staroj kulturi bubrežnog tkiva šarana.



Sl. 5. Citopatogeni efekti na fibroblastima bubreznog tkiva šarana 3 dana iza inokulacije filtriranog materijala bolesnog šarana.



©DiZbi.HAZU



dizbi.hazu.hr



i na branhiostegmalnoj membrani. Nakon 40 dana su promjene kod 3 oboljela šarana napredovale, dok se kod četvrtog pojavila difuzna hiperemija kože trbuha, ispućenje zacrvenjelog anusa i opsežna krvarenja oko trbušnih peraja s edemom ljusaka na tom području. Kod 2 karasa utvrđena su manja krvarenja oko mjesta trljanja. Slijedećih dana su se promjene kod karasa potpuno izgubile, a one kod šarana su napredovale. Tako su 2 mjeseca nakon infekcije svi šarani bili u jačem stupnju zahvaćeni zvbš, dok su svi zlatni karasi bili bez promjena.

Dva i po mjeseca nakon infekcije uginuo je prvi šaran s jasno izraženim promjenama na koži. U trbušnoj šupljini se nalazilo oko 5 ml bistre žućkaste serozne tekućine. Utvrđena je serozna prokvašenost jetre i bubrega, uz opću anemiju. Nakon toga je biološki pokus prekinut.

Materijal od jednog bolesnog šarana poslužio je za dalju infekciju riba, a od ostalih je materijal uzet za infekciju kultura tkiva u idućem pokusu. Infekcija tim materijalom je provedena da se utvrdi infektivnost bolesti koja se razvila nakon inokulacije s promijenjenim kulturama tkiva. Inficirano je 5 zdravih šarana i 5 zlatnih karasa na taj način da smo oštećenu kožu riba trljali s promijenjenim mjestima na koži oboljelih šarana. Sedam dana nakon infekcije su se kod inficiranih šarana pojavila opsežna krvarenja s edemom na mjestu trljanja. Nakon 13 dana je jedan od pokusnih šarana uginuo. Na koži trbuha nalazila su se krvarenja s laganim edemom, a anus je bio zacrvenjen i ispružen. Isticao se obostrani egzoftalmus. U trbušnoj šupljini nađena je žućkasto crvenkasta tekućina. Nutarnji organi bili su serozno prokvašeni, a svi organi su bili anemični. Slijedećeg dana uginuo je jedan karas sa znacima jake hiperemije i edema kože na truhu. Na mjestu trljanja nađena su jaka krvarenja. U trbušnoj šupljini bilo je nešto bistre žućkaste tekućine. Pokus je nakon toga prekinut, jer su preostala dva šarana pokazivala karakteristične znakove zvbš.

*Pokus VI.* U ovom pokusu je serija kultura bubrežnog tkiva šarana podijeljena na 4 skupine. U svakoj skupini nalazilo se 5 epruveta s 8 dana starom kulturom tkiva. Prvoj skupini kultura inokuliran je materijal iz inficiranih i promijenjenih kultura prethodnog pokusa, koje su bile pohranjene na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Drugoj skupini inokuliran je materijal od šarana oboljelih u V pokusu nakon infekcije s kulturom tkiva koja je bila promijenjena. Trećoj skupini kultura inokuliran je materijal od šarana na koje smo bolest prenijeli sa šarana koji su u V pokusu oboljeli nakon infekcije s kulturom tkiva. Četvrta skupina kultura nije ničim inokulirana i služila je kao kontrola.

Nakon trećeg dana bila je slika u svim inficiranim skupinama kultura (skupina 1, 2 i 3) približno jednaka. Fibroblasti i epitelne stanice bile su zahvaćene degenerativnim promjenama koje su već opisane kod prijašnjih pokusa. Na stanicama u kontrolnim kulturama četvrte skupine nije bilo promjena.

Pet dana nakon inokulacije uzet je materijal za infekciju riba iz druge i treće skupine kultura. Inficirano je po 5 šarana i 2 zlatna karasa. Svaka skupina riba držana je u posebnom bazenu. Kod šarana koji su

inficirani materijalom iz druge skupine kultura pojavila su se 7 dana nakon infekcije kod 3 šarana veoma sitna tačkasta krvarenja na mjestu trljanja. Kod jednog zlatnog karasa pojavio se na mjestu intraperitonealne aplikacije lagani edem kože i krvarenja ispod ljsaka. Devetog dana na šaranima više nije bilo nikakvih promjena, dok su kod zlatnih karasa ostale iste. Šesnaestog dana pojavio se kod 2 šarana na mjestu trljanja ponovo laki edem i malena tačkasta krvarenja. Dvadeset i prvog dana nakon infekcije na šaranima nije bilo promjene. Takvo stanje je ostalo i dalje, pa je pokus prekinut nakon 30 dana.

U skupini inficiranih šarana s materijalom iz treće skupine kultura također su se sedmog dana javili laki znaci bolesti. Kod 4 šarana je zapažena laka hiperemija na mjestu trljanja, a kod jednog zlatnog karasa je na mjestu intraperitonealne aplikacije bilo vidljivo krvarenje na koži. Devetog dana su promjene na svim ribama nestale. Šestnaesti dan utvrđeno je kod jednog šarana tačkasto krvarenje na mjestu trljanja, a kod jednog karasa hiperemija kože na mjestu intraperitonealne aplikacije. Dvadeset i prvog dana nismo na ribama našli više nikakvih promjena, pa je 30. dan pokus prekinut.

#### RASPRAVA O REZULTATIMA POKUSA

U toku naših pokusa mi smo u 7 navrata stavili u kulture bubrežnog tkiva šarana zarazni materijal šarana raznih slučajeva zvbš. U 6 slučajeva javile su se već nakon 2-3 dana u fibroblastima i epitelnim stanicama degenerativne promjene, koje su se u toku idućih dana pojačale. Samo u jednom slučaju tkivo je u prvim danima ostalo nepromijenjeno, a u toku daljih dana promjene na njemu bile su jednake promjenama u kontrolnim kulturama. Navedene promjene na bubrežnom tkivu možemo smatrati kao tipičan citopatogeni efekt, koji je uzrokovan djelovanjem agensa koji je u gojilište unesen s materijalom bolesnih šarana.

U slučajevima kada smo kulturi bubrežnog tkiva dodali istovrsni materijal zdravih šarana izostao je citopatogeni efekt.

U skladu s reakcijama na tkivnim stanicama mijenjala se i boja tekućeg medija u kulturi tkiva, pa nam je ta promjena boje poslužila kao tzv. »colour test«. U kulturama gdje se pojavio citopatogeni efekt boja gojilišta ostala je nepromijenjena, tj. crvena, dok je crvena boja gojilišta kontrolnih kultura prelazila najprije u žutonarandžastu, a kasnije u žutu. U gojilištu se nalazi fenolno crvenilo kao indikator. Rastom stanica povećava se intenzitet promjene tvari, uglavnom se radi o glikolizi, kod čega se stvaraju kiseli produkti, koji pomjeraju pH gojilišta prema kiselom području, pa crvena boja prelazi u žutu. Održavanje crvene boje u inficiranim kulturama ukazuje na smanjenu aktivnost stanica na kojima su se javile degenerativne promjene.

Na temelju citoloških promjena i pozitivnog »colour testa« u promijenjenim kulturama možemo zaključiti da je filtratom materijala od bolesnih šarana unesen u gojilište agens koji je štetno djelovao na bubrežno tkivo. U konkretnom slučaju moglo bi se raditi o virusu ili o toksinu.

Da bismo isključili postojanje toksina, mi smo u više pokusa izvršili dalju pasazu materijala iz kultura s promjenama u nove kulture. U novim kulturama javio se uvijek u jednakom vremenskom razmaku jasan citopatogeni efekt. Na osnovu toga možemo zaključiti da se u ovom slučaju nije radilo o djelovanju toksina, već da se radilo o živom agensu koji se u gojilištu razmnožio i štetno djelovao na stanice tkiva, tj. o virusu.

Da bismo utvrdili da se ovdje zaista radi o virusu zvbš, mi smo s materijalom iz kultura na kojima se pojavio citopatogeni efekt inficirali šarane i zlatne karase.

Kod jednog dijela inficiranih riba pojavili su se prvi znaci bolesti 1–2 sedmice iza aplikacije materijala. Ta inkubacija bila bi približno jednaka inkubaciji kao u slučajevima kada smo bolest prenosili izravno trljanjem zdravih šarana s promjenama u bolesnim. Osim toga, u 10 od 10 slučajeva

Nasađivanjem filtriranog materijala bolesnih šarana od zarazne vodene bolesti na kulturu bubrežnog tkiva šarana uspjelo je na njemu proizvesti tipičan citopatogeni efekt. Te promjene na tkivu rezultat su djelovanja virusa koji se nalazi u materijalu bolesnih šarana. Materijalom promije-  
njenih kultura izazvali smo kod većine pokusnih riba lake znakove zarazne vodene bolesti, pa iz toga zaključujemo da je ova bolest primarno uzrokovana virusom.

## LITERATURA

1. Artjuh I. A., A. G. Ostaševskij, O roli Pseudomonas punctatum v etiologii zaholevanija karpov krasnuhoj, Sb. tr. Harkovsk. vet. inst. (23), 185-190, 1958.
2. Bauer O., Die Erforschung der Fischkrankheiten in den Sowjetteichwirtschaften und ihre Bekämpfung, Zeitschr. f. Fischerei 7 (1/2), 153-160, 1958.
3. Dybowicz M., Br. Kocylowski, Badania nad obecnością zarazka przesaczalnego w przebiegu posocznicy karpia, Roczn. nauk rolniczych E 67 (4), 517-527, 1956.
4. Gončarov G. D., O vobuditele krasnuhi, Rybnoe hozjajstvo 31 (10), 34-35, 1955.
5. Gončarov G. D., Virusnaja krasnuha ryb v SSSR i za rubežom, Soveščanija po boleznjam ryb, str. 28, 1957.
6. Gončarov G. D., Virusnaja krasnuha ryb v SSSR i za rubežom. Trudy soveščanija po boleznjam ryb, 34-38, 1959.
7. Kabavanski J., H. Slavkov, D. Savov, St. Stanoev, Hemoragična septikemija po šarenite u nas, Izvestija na mikrobiološki institut, Blgarska akademija na naukite, 5, 257-266, 1957.
8. Kunst Lj., Kultura bubrežnog tkiva šarana, Vet. arhiv 31 (9/10), 241-245, 1961.
9. Kunst Lj., Kultura bubrežnih stanica šarana, Vet. arhiv (5/6), 121-126, 1962.
10. Tec V. I., O kontagioznosti jazvennoj formy krasnuhi, Naučno-tehnički bjulleten GosNIORH (13-14), 105-108, 1961.
11. Tec V. I., G. S. Jakovleva, Polučenie kulture tkanej karpia i jejo primenenie pri izučenii etiologii krasnuhi ryb, Nauč.-tehn. bjulleten GosNIORH (15), 73-77, 1962.
12. Tomašec I., E. Topolnik, M. Winterhalter, Istraživanja o virusnoj etiologiji zarazne vodene bolesti šarana, Rad Jug. akad. 316, 75-90, 1958.
13. Tomašec I., N. Fijan, Prilog problemu prirodnog prenošenja zarazne vodene bolesti šarana, Ribarstvo Jug. 16 (5), 113-116, 1961.
14. Tomašec I., Lutte contre les principales maladies infectieuses des poissons. Office International des Epizooties, Rapport à la XXVIII<sup>e</sup> Session R. No 548, 1960.
15. Tomašec I., Le probleme de la lutte contre l'Hydropisie infectieuse de la carpe (Expériences effectuées en Yougoslavie), Bull. Off. int. Epiz., 59 (1-2), 147-152, 1963.

Iz Instituta za zarazne i invazivne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj rad je izvršen sredstvima Saveznog fonda za naučni rad.

Primljeno na sjednici Odjela za medicinske nauke 6. I 1964.