

Identification of infectious salmon anemia virus (ISAV) in rainbow trout

Maj J., Marek Matras M., Stachnik M., Borzym E., Sandomierska A., Department of Fish Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy

The aim of this article was to present an important health problem in rainbow trout in Poland. Infectious salmon anemia (ISA), is a disease caused by virus classified in the genus *Isavirus* from *Orthomyxoviridae* family. ISAV can infect several fish species, as brown trout (*Salmo trutta*), sea trout, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), arctic char (*Salvelinus alpinus*), herring (*Clupea harengus*) and atlantic cod (*Gadus morhua*). In Poland, the most popular is rainbow trout farming. This sensitive fish species has been infected by ISA virus and checked for the possibility of transmission of ISAV to health individuals. The virus can replicate in fish organs and in specific cell line ASK, but it is non-cytopathic. For identification of ISAV molecular methods are most suitable and recommended and were used in this study.

Keywords: ISAV, rainbow trout, RT-PCR, ASK cell line.

Nazwa „pstrąg tęczowy” (*Oncorhynchus mykiss*) obejmuje kilka podgatunków pstrągów żyjących w Ameryce Północnej i odznaczających się m.in. czerwono-purpurową pręgą biegnącą przez środek ciała, po której można odróżnić dorosłego pstrąga tęczowego od pstrąga potokowego czy źródlanego. Do Europy został przywieziony z USA i stopniowo rozprzestrzenił się po całym jej obszarze (1). Do Polski pstrągi zostały sprowadzone najprawdopodobniej

Identyfikacja wirusa zakaźnej anemii łososi (ISAV) u pstrągów tęczowych

Joanna Maj, Marek Matras, Magdalena Stachnik, Ewa Borzym, Agnieszka Sandomierska

Z Zakładu Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

między 1882 a 1899 r. na tereny znajdujące się pod zaborem pruskim. W 1904 r. sprowadzono ikrę pstrągów tęczowych ze Szwecji. Następny transport ikry przybył do Polski z USA w 1924 r., a po 1945 r. sprowadzono ikrę także z Czechosłowacji, NRD, USA i Francji (2).

Pstrągi tęczowe są wysoko cenione z powodów kulinarnych, a także jako wędkarska zdobycz ze względu na swą bojowość oraz piękny wygląd. Z kolei dla biologów są niezwykle interesujące z powodu ich zdumiewających zwyczajów wędrkowych (3).

Pstrągi tęczowe należą do ryb słodkowodnych, występują nie tylko w rzekach, ale też w stawach hodowlanych i jeziorach. Występują jako formy wędrowne oraz osiadłe. Formy wędrowne wczesny okres życia spędzają w rzece, natomiast żerują w morzu. Na okres tarła powracają do wód słodkich. Formy osiadłe pstrągów cały okres życia spędzają w wodzie słodkiej (2).

Pstrąg tęczowy według dyrektywy Rady 2006/88/WE z 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym

chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób (4), jest gatunkiem podatnym m.in. na zakaźną martwicę układu krwiotwórczego (EHN), wirusową posocznicę krwotoczną ryb łososiowatych (VHS), zakaźną martwicę układu krwiotwórczego ryb łososiowatych (IHN) i zakaźną anemię łososi (ISA).

Ostatnia z wymienionych chorób, nieegzotyczna jednostka chorobowa, jak dotąd nie występuje w Polsce, jednakże dostosowując prawo polskie do unijnego, zakaźna anemia łososi podlega obowiązkowi zwalczania obok innych, często występujących chorób ryb.

Choroba ta wywoływana jest przez wirus należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Isavirus*. Jest to otoczkowy wirus, którego materiałem genetycznym jest pojedyncza nić RNA o ujemnej polarności. Wirusowy genom koduje około dziesięciu białek (5, 6). Patogen ten spowodował ogromne ekonomiczne straty w Norwegii, Szkocji, Kanadzie i USA w populacji łososia atlantyckiego (6, 7), który jest najbardziej wrażliwy na wirus, jednakże zagrożonymi gatunkami są także pstrąg tęczowy i troć wędrowna (4).

Celem pracy była izolacja wirusa zakaźnej anemii łososi (ISA) we wrażliwej linii komórkowej ASK (Atlantic salmon kidney) pochodzącej z komórek nerki łososia atlantyckiego oraz w narządach wewnętrznych potencjalnych nosicieli wirusa – pstrągów tęczowych, a także identyfikacja patogenu przy użyciu molekularnej metody RT–PCR.

Materiał i metody

Materiałem do badań molekularnych były narządy wewnętrzne (nerka, wątroba, serce, śledziona, skrzela) pstrągów tęczowych, eksperymentalnie zakażonych supernatantem pochodzącym z linii komórkowej ASK zakażonej referencyjnym izolatem wirusa ISA – ISA Glesvaer otrzymanym z laboratorium EURL, Aarhus, Dania, a także narządy wewnętrzne ryb kontrolnych, niezakażonych wirusem. Z pobranych narządów przeprowadzono izolację materiału genetycznego wirusa przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji RNA (A&A Biotechnology). Do identyfikacji wirusa wykorzystano parę specyficznych starterów opisanych przez Mjaalanda i wsp. (8): 5'– GGC– TAT– CTA– CCA– TGA– ACG– AAT– C– 3' oraz 5'– GCC– AAG– TGT– AAG– TAG– CAC– TCC– 3'. Reakcję przeprowadzono w 45 µl mieszaniny reakcyjnej w następujących warunkach temperaturowo–czasowych: odwrotna transkrypcja 30 min w 50°C, denaturacja wstępna 4 min w 95°C, 35 cykli złożonych z denaturacji właściwej przez 30 s w 94°C, przyłączania starterów przez 30 s w 55°C oraz wydłużania łańcucha przez 1 min w 68°C. Etap wydłużania łańcucha cDNA przeprowadzono przez 7 min w temperaturze 68°C. Produkty amplifikacji wizualizowano przy użyciu 2% żelu agarozowego.

Wyniki i omówienie wyników

Podczas pierwszego eksperymentalnego zakażenia wirusem ISA pstrągów tęczowych nie zaobserwowano żadnych objawów klinicznych, ani śnięć. Wszystkie badane metodą RT–PCR pulowane próbki były dodatnie i we wszystkich badanych oddzielnie narządach (nerka, wątroba, śledziona, serce) w 23 dniu po zakażeniu stwierdzono obecność kwasu nukleinowego wirusa ISA. Na zakażonej hodowli komórkowej ASK nie zaobserwowano efektu cytopatycznego wywołanego przez wirus, natomiast po przeprowadzeniu izolacji materiału genetycznego ISAV metodą RT–PCR stwierdzono jego obecność. Podobne badania zostały przeprowadzone w 1999 r. przez Nylunda i wsp. (9). Eksperymentalne zakażenie m.in. pstrągów tęczowych nie wywołało objawów klinicznych. Jedynie w pojedynczych przypadkach pojawiły się wybroczyny na nerce, a także obniżony był hematokryt. Evensenowi

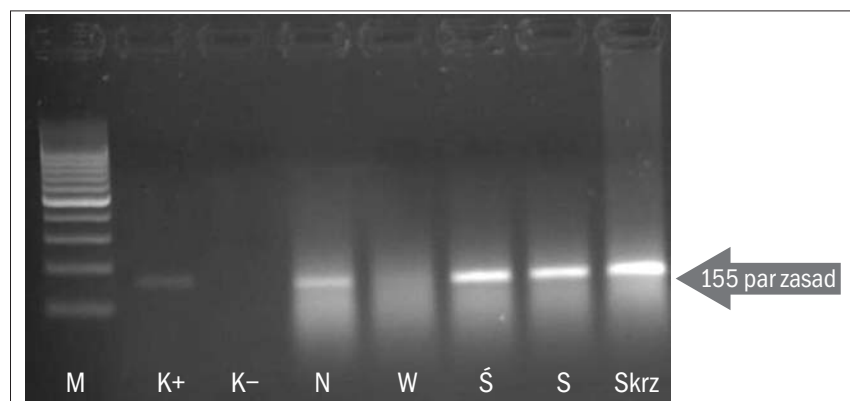
Tabela 1. Występowanie materiału genetycznego wirusa zakaźnej anemii łososi w poszczególnych narządach wewnętrznych w różnym czasie po zakażeniu

Dzień po zakażeniu	Skrzela	Nerka	Śledziona	Wątroba	Serce
7	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
21	+	+	+	-	+
28	+	+	+	+	+
34	-	-	-	-	-

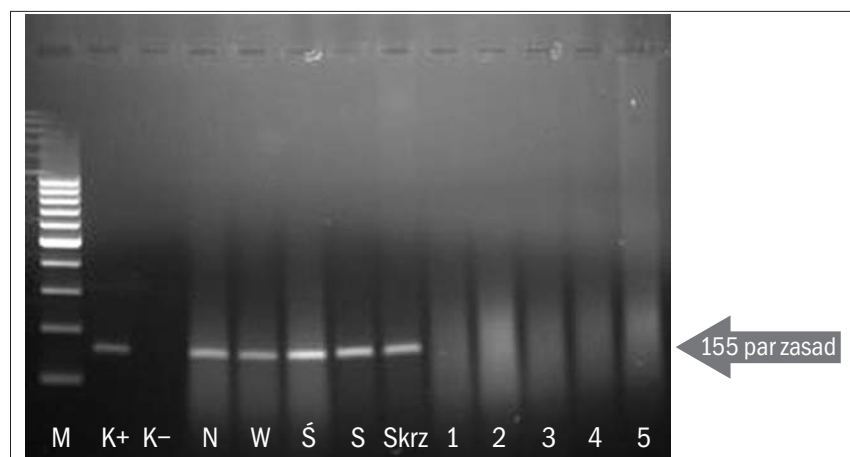
i wsp. (10) udało się uzyskać w swych badaniach typowe zmiany patologiczne obecne na nerce. Brak śmiertelności wśród zakażonych pstrągów oraz występowanie wirusa ISA wskazuje na to, iż ryby te są nosicielami wirusa. Patogenność wirusa może jednak ulec zmianie na skutek różnych mutacji.

W przeprowadzonym po raz drugi doświadczeniu badano pstrągi tęczowe co 7 dni od zakażenia (tab. 1). W 7 oraz 14 dniu po zakażeniu nie stwierdzono obecności kwasu nukleinowego wirusa ISA metodą RT–PCR. Dopiero w 21 dniu po zakażeniu

zaobserwowano jedynie powiększenie pęcherza pławnego, a w niektórych przypadkach również obecność krwi w pęcherzu pławnym. Zaobserwowano także, że zakażone ryby zaczęły pobierać więcej pokarmu. W badanych narządach: nerce, śledzionie, sercu oraz skrzelach stwierdzono metodą RT–PCR obecność kwasu nukleinowego wirusa ISA, natomiast próbki pochodzące ze skrawków wątroby dały wynik ujemny (ryc. 1). Z kolei w 28 dniu po zakażeniu we wszystkich badanych narządach obecny był wirus (ryc. 2). Identyfikacja wirusa



Ryc. 1. Obecność prążków w 2% żelu agarozowym świadcząca o występowaniu kwasu nukleinowego wirusa ISA w badanych narządach: nerce, wątrobie, śledzionie, sercu i skrzelach w 21 dniu po zakażeniu. Ścieżki: M – marker wielkości, K+ kontrola dodatnia, K– kontrola ujemna, N – nerka, W – wątroba, Ś – śledziona, S – serce, Skrz – skrzela



Ryc. 2. Obecność prążków w 2% żelu agarozowym, świadcząca o występowaniu kwasu nukleinowego wirusa ISA w badanych narządach: nerce, wątrobie, śledzionie, sercu i skrzelach w 28 dniu po zakażeniu. Ścieżki: M – marker wielkości, K+ kontrola dodatnia, K– kontrola ujemna, N – nerka, W – wątroba, Ś – śledziona, S – serce, Skrz – skrzela. Ścieżki 1–5 – narządy ryb zdrowych, butujących w jednym zbiorniku wodnym z rybami zakażonymi wirusem ISA

w 34 dniu po zakażeniu nie dała pozytywnego wyniku, badane próbki były ujemne.

W trzecim dniu od zakażenia do zbiornika z zakażonymi pstrągami tęczowymi wpuszczono ryby zdrowe w celu sprawdzenia transmisji wirusa. Narządy od tych ryb były pobierane w tych samych dniach, co od ryb zakażonych, jednakże nie stwierdzono u nich obecności kwasu nukleinowego wirusa ISA.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż metoda molekularna RT-PCR jest czułą metodą identyfikacji wirusa ISA, która pozwala wykryć obecność patogenu, nawet gdy nie wykazuje on żadnego efektu cytotopatycznego na hodowli komórkowej, a także wtedy, gdy nie powoduje żadnych objawów klinicznych u ryb. Inglis i wsp. (11) oraz Rimstad i wsp. (12) mają podobne doświadczenia. Według nich metoda ta jest czuła i bardzo przydatna w diagnostyce wirusa ISA ze względu na szybkość jej wykonania. W przeciwieństwie do badań własnych Rimstad i wsp. (12) zaobserwowali, że po 13 dniu od zakażenia ryb wirusem ISA niemal we wszystkich analizowanych narządach wynik był dodatni. Im później po zakażeniu pobierano próbki do RT-PCR, tym bardziej spadała wartość hematokrytu świadcząca o rozwoju zakażenia.

Badania te dowiodły, że pstrąg tęczy jest nosicielem wirusa zakaźnej anemii łososi i źródłem jego namnażania, przy czym choroba ta u pstrągów może przebiegać bezobjawowo. Nie można też wykluczyć pojawienia się ostrej postaci choroby,

która może doprowadzić do śnięć, nawet od kilku do 100%, dlatego ważne jest opracowanie metod diagnostycznych i kontrolowanie stanu zdrowia ryb w celu zapobiegania skutkom i rozwinięciu się choroby. W badaniach własnych nie udało się udowodnić, aby ryby chore zakażały inne, przebywające wspólnie w zbiorniku wodnym, mimo iż wielu naukowców, np. Melville K.J. i Griffiths S.G., Nylund A. i wsp. (13, 14, 15, 16), dokumentowało transmisję wirusa w wodzie wraz ze śluzem, kałocmzem lub płynem jajnikowym. Być może w przeprowadzonym doświadczeniu uwzględniono zbyt krótki czas, aby wirus się namnożył. W badaniach własnych dowiedziano również występowanie wirusa ISA w skrzelach zakażonych pstrągów tęczowych, co sugeruje, że jest to narząd, przez który wirus dostaje się do organizmu ryby, a następnie replikuje w narządach wewnętrznych (ryc. 1, 2).

Metody stosowane dotychczas w identyfikacji wirusa zakaźnej anemii łososi są skutecznym narzędziem diagnostycznym, jednakże mogą być nadal rozwijane, dostosowując je do nowych trendów w nauce.

Piśmiennictwo

- Michalik J., Reiser F.: *Nasze ryby*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1990, s. 29-31.
- Brylińska M. (red.): *Ryby słodkowodne Polski*. PWN Warszawa 1986, s.133-138.
- Paxton J.R., Eschmeyer W.N.: *Encyklopedia zwierząt*. Ryby. Agencja Elipsa, Warszawa 1994, s.113-118.
- Dyrektywa Rady 2006/88/WE z dn. 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób.
- Ruszczyk A.: Zakaźna anemia łososi. *Życie Wet.* 2004, **79**, 540-545.
- O.I.E. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Infectious Salmon Anaemia, 2009, 2.3.5., 222-235.
- Mjaaland S., Rimstad E., Falk K., Dannevig B. H.: Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo- like virus in a teleost. *J. Virol.* 1997, **71**, 7681-7686.
- Mjaaland S., Rimstad E., Cunningham C.O.: Molecular diagnosis of infectious salmon anaemia. W: Cunningham C.O. (edit): *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2002, s. 1-22.
- Nylund A., Kvenseth A.M., Krossoy B., Hodneland K.: Replication of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish. Dis.* 1997, **20**, 275-279.
- Evensen O., Thorud K.E., Olsen Y.A.: A morphological study of the gross and light microscopic lesions of infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Res. Vet. Sci.* 1991, **51**, 215-222.
- Inglis J.A., Bruce J., Cunningham C.O.: Nucleotide sequence variation in isolates of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland and Norway. *Dis. Aquat. Org.* 2000, **43**, 71-76.
- Rimstad E., Falk K., Mikalsen A.B., Teig A.: Time course tissue distribution of infectious salmon anaemia virus in experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1999, **36**, 107-112.
- Melville K.J., Griffiths S.G.: Absence of vertical transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from individually infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1999, **38**, 231-234.
- Nylund A., Hovland T., Watanabe K & Endresen C.: Presence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., collected during three separate outbreaks of the disease. *J. Fish Dis.* 1995, **18**, 135-145.
- Nylund A., Hovland T., Hodneland K., Nilsen F., Lovik P.: Mechanism for transmission of infectious salmon anaemia (ISA). *Dis. Aquat. Org.* 1994, **19**, 95-100.
- Raynard R.S., Snow M., Bruno D.W.: Experimental infection models and susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* to a Scottish isolate of infectious salmon anaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 2001, **47**, 169-174.