

Forårsaket av virus?

Av Kuninori Watanabe, Stelmar Økland, Tove Hovland, Bjørn Midttun*, Bjørn Krossøy og Are Nylund
Institutt for fiskeri og marin biologi, Universitetet i Bergen

*ALPHARMA Aquatic Animal Health Division

Hjertesprekk eller cardiac myopathy syndrome (CMS) har en offisiell historie som går tilbake til begynnelsen av 1980-årene. Sykdommen var lenge kun påvist på laks i marint oppdrett i Norge, men er nå også påvist på laks i Skottland. Mangel på en sikker diagnostikk for sykdommen er et problem og det foreligger eksempler på at ILA og CMS er blitt forvekslet. Utbredelsen og omfanget av CMS er dårlig kjent, blant annet fordi den ikke er rapporteringspliktig. Det er likevel klart at for en rekke oppdrettere utgjør CMS et betydelig problem.

Karakteristisk for sykdommen har vært at den i hovedsak rammer stor og hurtigvoksende fisk i god kondisjon, fortrinnsvis laks som har gått 12 - 18 måneder i sjøen. I den senere tid har imidlertid sykdommen også forårsaket betydelig dødelighet hos parr/smolt i ferskvann. Døden inntreffer brått og ofte foreligger ingen utvendige sykdomstegn. Det mest vanlige funn ved obduksjon er et blodkoagel i hjertesekken. Et annet forholdsvis vanlig funn er sprukket atrium (forkammer i hjertet). Blødninger i fremre del av bukhalen kan forekomme og ikke sjelden er leveren misfarget og dekket av et fibrin belegget på overflaten. Det er svært vanlig å finne mat i mage og tarm hos fisk som dør på grunn av akutt CMS. De mest alvorlige vevsforandringer finner en i hjertets myokardium (muskulatur). Nekroser forekommer imidlertid også i andre vev og organer (eks. lever og nyre). Degenerasjon av skjelett-muskulatur kan ofte påvises.

Årsaken til CMS har frem til idag ikke vært kjent, men det har vært spekulert i om sykdommen kunne være et resultat av

feilernæring (mangel på vitamin E og selen) eller avl (dvs at noen laksestammer skulle være predisponert for sykdommen). Oppdretternes egen erfaring med sykdommen, men synes imidlertid å gi klare indikasjoner på at disse forklaringer ikke kan være riktige. Flere oppdrettere har skiftet både laksestammer og fôrtyper uten at dette har hindret nye utbrudd i anleggene. Erfaringer med CMS, sykdomsforløp, spredning og nye utbrudd, tyder på at sykdommen er forårsaket av et smittsomt agens. Det har imidlertid ikke vært mulig å knytte verken parasitter, bakterier eller sopp til sykdommen, og selv om IPN virus har vært isolert fra fisk med CMS, har det ikke vært mulig å fremkalle sykdom ved smitte med dette viruset.

Viruslignende partikler i syk laks

I vårt arbeid med sykdommen har vi samlet inn materiale fra ialt sju forskjellige anlegg fra Troms i nord til Hordaland i sør. Noe av materialet går helt tilbake til 1987, men det meste er innsamlet i 1993, 1994 og 1995. Det er tatt prøver fra de fleste vev og organer, og disse prøvene er blant annet preparert for studium i transmisjons elektronmikroskop (TEM). Ved hjelp av TEM kan en forstørre opp innholdet i celler slik at det er mulig å se både bakterier og virus. Det var ved hjelp av denne teknikken at ILA viruset først ble påvist og teknikken er fortsatt den eneste sikre diagnostiske metode for ILA. Flere viruslignende partikler er funnet i vev/celler fra organer hentet fra laks med hjertesprekk. Disse partiklene forekommer imidlertid i svært lav frekvens og har ikke vært tilstede i alle de undersøkte CMS-laks fra forskjellige anlegg. Selv om en ikke kan utelukke en eventuell betyd-

ning av disse i forbindelse med hjertesprekk foreligger ingen indikasjoner på at de er årsaken til sykdommen (NB: Det kan heller ikke utelukkes at hjertesprekk er et klinisk bilde på flere sykdommer forårsaket av forskjellige agens). En del av laksen av forskjellige agens). En del av laksen (innsamlet i 1995) hadde også en lettere grad av epitheliocystis.

CMS viruset?

Endringer i hjertets myokardlag i ventrikel (hjerterekammer) og atrium (forkammer) regnes som et av de "sikreste" tegn på hjertesprekk. Figurene A, B og C viser vegghjertesprekk. Figurene A, B og C viser vegghjertesprekk hos frisk laks (kontroll) og hos laks med akutt og kronisk CMS. Hos laks med akutt eller kronisk hjertesprekk er det betydelig ødeleggelse i forkammerets myokardlag (muskellag) og cellene har mistet sin normale struktur. Selv om endo- og epikardiet synes å være forholdsvis intakt hos den akutte syke laksen, foreligger en betydelig invasjon av celler i myokardiet. Disse cellene er i hovedsak hvite blodceller, dvs en del av fiskens immunforsvar. Tilstedeværelsen av disse i myokardiet kan være et tegn på at en fremmed organisme (sykdoms agens) er tilstede i hjerterveggen. Disse cellene har blant annet til oppgave å uskadeliggjøre sykdomsorganismer. Selv om det foreligger klare endringer også i andre organ hos laks med CMS var det likevel, på denne bakgrunn, naturlig å begynne med å undersøke myokardiet ved hjelp av TEM. Hos laks med CMS ble store mengder med viruslignende partikler (naken-virus) påvist i forkammerets myokardlag (Figurene D, E og F). Disse partiklene er 39,8 nm ± 1,5 (N = 32) (nm = 10⁻⁹ m) og har den typiske krystallstruktur (icosahedron) som kjennetegner naken-virus. Til sammenligning er ILA viruset ca 100 nm (kappevirus) og IPN viruset ca 60 nm (nakenvirus). De viruslignende partiklene var også tilstede i hjerterekammerets myokard, men her var mengden mindre. I sterkt "infiserte" celler danner partiklene store "sjøer" som fyller det meste av cellen. Infiserte celler kjennetegnes ellers ved at

kromatinet i cellekjernene er kondensert og kjernemembranen oppsvulmet. Disse cellene er ofte omgitt av fiskens forsvarsceller og noen av disse forsvarscellene har spist viruspartikler (partiklene ligger i vakuoler (hulrom) i forsvarscellene). Hos noen målceller er cellemembranen sprukket og virus frigis til omgivelsene (intercellulære rom). I mindre infiserte celler ligger virusene gjerne i nærheten av membranvesikler og iblant inne i disse. Infiserte celler er forholdsvis rike på mitokondrier (dvs energiproducentene i celler). Det er usikkert hvilke celler som er målceller for viruset og det kan ikke utelukkes at flere cellyper kan infiseres. Viruset forekommer imidlertid i celler med atrium spesifikke granuler noe som indikerer at målcellene er myokardiets muskelceller. Arbeidet med identifikasjon av infiserte celler pågår. På nåværende tidspunkt er det vanskelig å fastslå hvilken familie viruset tilhører. Virus som er mindre enn 40 nm og uten kappe, blir ofte referert til i litteraturen som "picorna-lignende" virus (tilhørende familiene picornaviridae (20-30 nm) eller familien Calciviridae (35-40 nm)). Andre nakenvirus som er påvist hos virveldyr tilhører familiene Reoviridae (60 - 80 nm), Parvoviridae (18-26 nm), Papovaviridae (45 - 55 nm) og Adenoviridae (70 - 90 nm). På bakgrunn av størrelse og lokalisering av virus-partiklene er det mest naturlig å plassere viruset i familien Calciviridae. Denne plassering må imidlertid ikke oppfattes som endelig.

Et spørsmål som raskt melder seg er hvorfor dette viruset ikke er blitt oppdaget tidligere. Den mest sannsynlige forklaring på dette er at viruset kan ha blitt forvekslet med glykogen-partikler (som er vanlig i for eksempel muskelceller og leverceller, figur G), selv om formen på viruset er forskjellig fra formen på glykogen-partiklene. Det forekommer to hovedtyper glykogen-partikler: a- og β-partikler. a-partiklene er fra 50 - 200 nm i diameter og β-partiklene er mellom 25 og 35 nm (β-partiklene består igjen av partikler som er mellom 30 og 20 nm.). Dette plasserer CMS viruset (ca. 40 nm) i størrelse midt mellom de minste a-partiklene og de største β-partiklene. Det er likevel mulig at en i tidligere undersøkelser har forvekslet viruset med glykogen-partikler.

Videre arbeid

I all diagnostikk er det viktig å kunne påvise raskt og sikkert hvilken sykdom som er årsaken til for eksempel dødelighet. I denne sammenheng er produksjon av antistoff mot den aktuelle sykdomsorganisme viktig for utvikling av et diagnostisk verktøy. En forutsetning for produksjon av "rene" antistoff mot et virus er at en kan oppnå en renet mulig løsning av viruset. Dette oppnår en som regel ved å dyrke viruset i cellekulturer. Arbeidet med å dyrke "CMS-viruset" i cellekultur er oppstartet. Videre er ett smitteforsøk gjennomført og et nytt

er igangsatt. Bearbeiding av vevsmateriale fra første smitteforsøk er påbegynt og vi forventer at resultatene vil foreligge iløpet av våren 1996.

Forespørsler angående arbeidet med hjertesprekk kan rettes til Are Nylund (tlf: 55 54 44 44, Fax: 55 54 44 50). Vi er interessert i informasjon og materiale fra alle anlegg hvor det er mistanke om hjertesprekk (CMS).

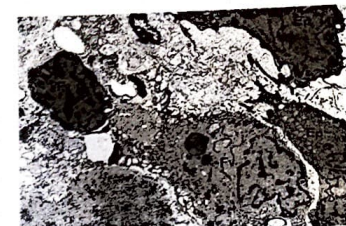


Fig. D Veggen i forkammeret hos laks med akutt CMS. Endotelceller (Ep), forsvarsceller (Fv), "sjø" med virus-lignende partikler (stjerne). x 2700

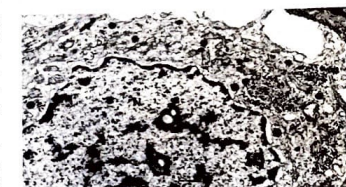


Fig. E Målcelle for viruset. Cellekjernen (N), virus-lignende partikler (stjerne). x 7500

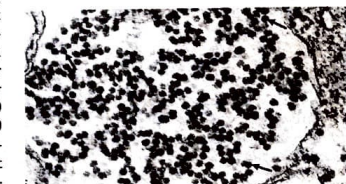


Fig. F Virus-lignende partikler (pil). Kan være årsaken til CMS. x 37000

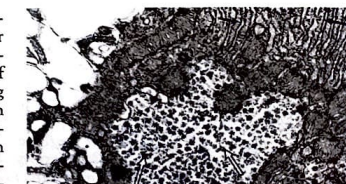


Fig. G Glykogen partikler (åpen pil) og ribosomer (liten pil) i en levercelle hos laks med akutt CMS. x 13750

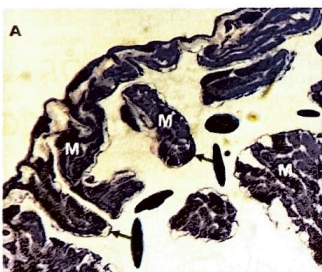


Fig. A Forkammerveggen i hjertet hos frisk laks. M = muskellaget (myokardiet), endotelceller (pil). x 550.

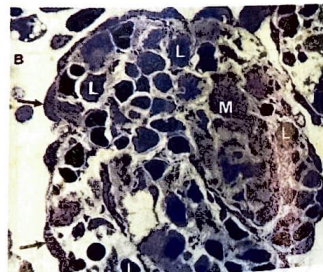


Fig. B Forkammerveggen i hjertet hos laks med akutt CMS. Legg merke til den store mengden med forsvarsceller (L) i muskellaget (M). Endotelceller (pil). x 550.

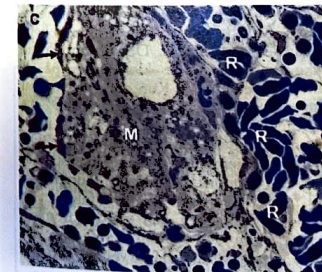


Fig. C Forkammerveggen i hjertet hos laks med kronisk CMS. Muskellaget (M) er nesten helt ødelagt. Hulrommet i forkammeret (H) er fylt av et blodkoagel. Røde blodceller (R), endotelceller (pil). x 550.