



# Laks er mer utsatt for PD når den møter virus i nye farvann

Virussykdommen PD er et stort problem for oppdrettsnæringen. Nye resultater viser at fisken er ekstra utsatt rett etter at den er overført til sjøvann. Størrelsen og/eller tid etter overføringen ser ut til å ha betydning for hvor robust laksen er når den må bekjempe viruset som forårsaker PD.

JIRAPORN JARUNGSRIAPISIT og SONAL PATEL | sonal.patel@imr.no

Pankreassyke (Pancreas disease, PD) er en virussykdom som forekommer hos atlantisk laks og regnbueørret, og er forårsaket av viruset *Salmonid alphavirus* (SAV). Laks går gjennom en smoltifiseringsfase som gjør den klar til å leve i sjøvann, og i perioden etterpå omtales den som postsmolt. SAV-utbrudd forekommer i postsmoltstadiet, vanligvis 5–7 måneder etter at smolten er overført til sjøvann, men fisken kan være smittet lenge før

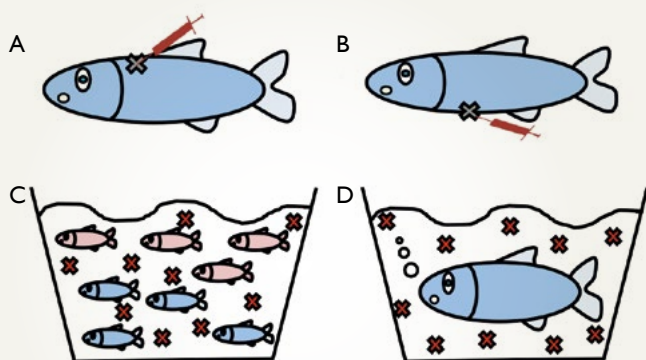
sykdomsutbruddet. Kliniske tegn både på PD og en del andre virussykdommer er at fiskene begynner å svømme unormalt, mister matlysten og de har en tendens til å samles nær overflaten. Etter 2–3 uker kan de dø. Syk fisk får kroniske skader i bukspyttkjertelen (pankreas), dermed blir produksjonen av enkelte fordøyelsesenzymmer redusert og fisken vokser dårligere. I tillegg har syke individer ofte store muskelskader som påvirker

hjerter, muskler og spiserørsmuskulatur slik at også blodsirkulasjon og svømmeadferd blir rammet. Andel fisk som blir kronisk syke eller prosent dødelighet etter et utbrudd varierer. Muskelskadene kan gi dårlig slaktekvalitet på fisk etter utbrudd, noe som får store økonomiske konsekvenser for oppdrettere.

## Smittemodeller

For å kunne forstå årsaker til sykdomsutbrudd, og for å utvikle effektiv forebygging, kontroll og mulig utrydding av PD, er det viktig å kartlegge sykdomsmekanismer under kontrollerte omgivelser (for eksempel på laboratoriet). Det er avgjørende at slike undersøkelser foretas på en måte som etterligner en naturlig sykdom og utbruddsscenario. Gode smittemodeller er et verktøy som gjør det mulig for forskerne å studere forholdet mellom vert, patogen (sykdomsfremkallende organisme) og miljø. De mest populære smittemodellene som brukes under kontrollerte eksperimentelle forhold er injeksjon, ko-habitering og badsmitte (figur 1). Injeksjonsmetoder gir god kontroll over virusdose og tid, men de er ikke i stand til å etterligne opptaksmekanismer og naturlige infeksjonsveier. Vanligvis er det intramuskulære (i en muskel) og/eller intraperitoneale (i bukhulen) injeksjoner (figur 1A og 1B) som brukes i forskning på fiskesykdommer. Ko-habitering er basert på å plassere syke fisk sammen med frisk fisk. Når den syke fisken skiller ut virus i

Illustrasjon: Jiraporn Jarungriapisit



Figur 1. De mest brukte smittemodellene innen fiskeforskning. A: Intramuskulær injeksjon (i.m.), B: Intraperitoneal injeksjon (i.p.) (X viser mulig injeksjonssted), C: Ko-habitering hvor patogenet vises med rødt kryss (syk fisk = rosa, frisk fisk = blå), D: Badsmittemodell.

Four most popular challenge models commonly used in fish disease research. A: Intramuscular injection (i.m.), B: Intraperitoneal injection (i.p.) (X represent possible injection site), C: Cohabitation; Pathogen (red cross) (sick fish = pink, healthy fish = blue), D: Bath challenge.

vannet, kan virus bli overført til den friske fisken (figur 1C). Ved ko-habitering blir friske fisk utsatt for patogenet over flere dager, avhengig av hvor lenge de syke fiskene skiller ut virus i vannet. Denne metoden gir dermed lite kontroll på når fisken ble smittet. Badsmitte utføres ved å plassere frisk fisk i miljø som inneholder patogenet i en bestemt og kortvarig periode. Deretter blir vannet i tanken byttet ut ved gjennomstrømming av nytt vann (figur 1D). Både ved ko-habitering og badsmitte brukes den naturlige smitteveien, selv om smittedosen og tid for eksponering i disse to modellene kan være litt annerledes.

### Ny badsmittemodell for PD-studie

Gjennom forskningsrådsprosjektet Mit-SAV har vi nylig etablert en badsmittemodell i sjøvann med SAV for atlantisk laks på postsmoltstadiet. Fordelen med denne modellen er at den etterligner naturlig infeksjonsrute. Samtidig gir den god kontroll over eksponeringstid og til en viss grad infeksjonsdosen. Badsmitte modellen vår (figur 2) består av to hovedtrinn;

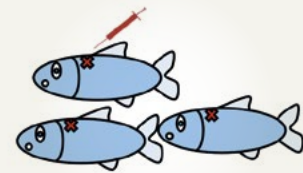
#### (i) Lage sjøvann som inneholder virus utskilt av syk fisk:

En gruppe postsmolt blir brukt som "shedders", disse skal produsere og skille ut viruset i vannet. De ble injisert med SAV i muskel, deretter holdt i eksperimentell tank i ca. en uke fram til forventet maksimal utskillelse av virus. Fordelen med denne metoden er at viruset alt har vært gjennom fisk når hovedforsøket starter, dermed er det mye mer likt virus som smitter mellom fisk, i stedet for det som dyrkes i cellekultur.

#### (ii) Badinfeksjon i sjøvann som inneholder SAV:

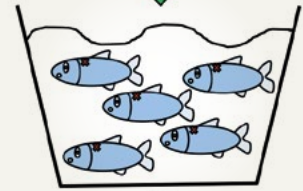
Den dagen virusutskillelse fra den smittede fisken er på det høyeste, blir vanngjennomstrømmingen i tanken stoppet en kort periode. Tanken blir forsynt med ekstra lufting for å unngå at fisk skal kveles. På denne måten blir virus samlet opp istedenfor å bli fortennet med vannstrømmen. Den virusinfiserte fisken ("shedders") blir deretter fjernet fra tankene og erstattet med frisk fisk som man ønsker å infisere. Mens den friske fisken svømmer noen timer i "virus-vannet", overvåkes oksygenivået i tankene nøye. Etter badsmitten blir vannstrømmen gjenopptatt og ekstra lufting trekkes ut. Forsøksfisken blir deretter overvåket i ytterligere en time. Nylig infisert fisk går i smitteforsøk i 4-6 uker hvor de blir føret daglig og nøye overvåket. Med jevne mellomrom blir noen fisk i hver gruppe avlivet for prøvetaking. Prøvene blir analysert for å se om og hvor mye virus fiskene har.

Shedder-fisk injiseres med virus

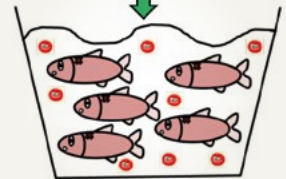


i.m.-injeksjon

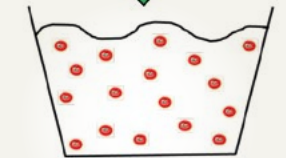
Shedder-fisk plasseres i tank



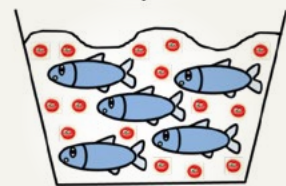
Shedder-fisk blir syk og skiller ut virus i vannet



Shedder-fisk fjernes fra tanken som nå inneholder virus

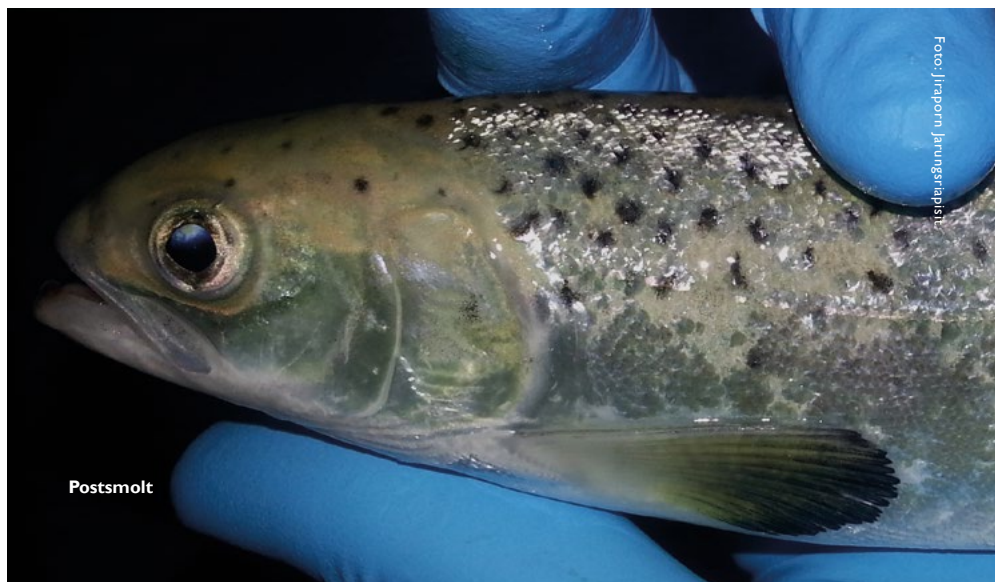


Frisk fisk plasseres i tanken for badsmitte

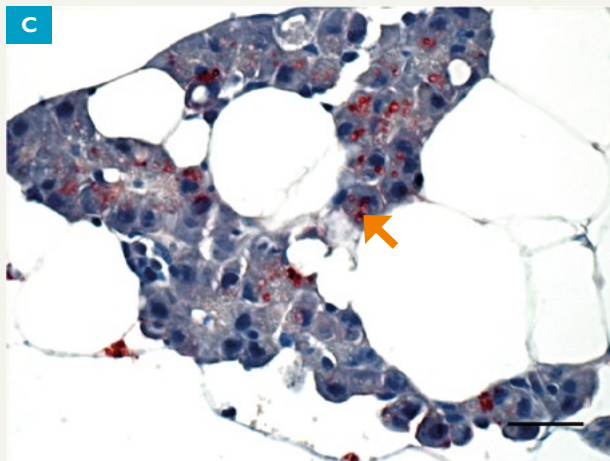
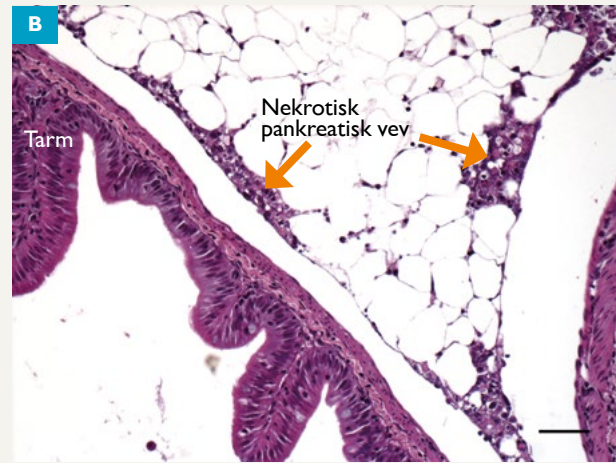
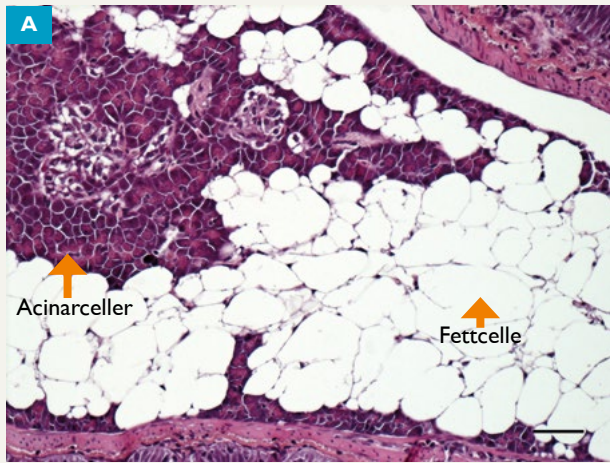


Figur 2. Skjematisert sammendrag av nylig etablert badsmittemodell med SAV3 i sjøvann for postsmolt av atlantisk laks. (Shedder-fisk = virusinjisert fisk som skiller ut virus).

Summary of recently established bath challenge model with SAV3 in seawater for Atlantic salmon post-smolt.



Postsmolt



**Figur 3. Pankreasvev fra atlantisk laks som er infisert med SAV3. Hematoxylin og eosin-farging (HES) av den enzymproduserende delen av pankreas, altså eksokrinvev fra (A) frisk fisk, (B) badsmittet fisk som viser nekrose av den enzymproduserende delen av pankreas, altså eksokrin-celler; og (C) immunohistokjemi på badsmittet fisk som viser relativt normale pankreasceller med påvisning av SAV3 i vevet (rød farge, gul pil). Målestokk: 100  $\mu$ m i A og B, 50  $\mu$ m i C.**

*Pancreatic tissue from experimental infection of Atlantic salmon post-smolt with SAV3. Hematoxylin and eosin-staining (HES) of pancreas from (A) healthy fish (B), bath challenged fish with necrosis of exocrine pancreatic cells; and (C) Immuno-histochemistry on bath challenged fish showing relatively normal pancreatic cells with SAV (red colour, yellow arrow) in the cell. Scalebar: 100  $\mu$ m i A og B, 50  $\mu$ m i C.*

Dette gir en indikasjon på sykdomsstatus i gruppen på et gitt tidspunkt.

### Laks mer utsatt for SAV-smitte rett etter sjøvannsoverføring

SAV-smitte med badsmittemodellen og *intramuskulær injeksjon* ble brukt til å studere forskjeller i mottakelighet for SAV hos to grupper. Den første gruppen ble smittet to uker etter overføring til sjøvann og den andre gruppen etter ni uker. Fisken kom fra samme produksjon for å unngå store genetiske forskjeller. Fiskene som ble smittet to uker etter sjøvannsoverføring ble testet for å bekrefte at de var ferdige med smoltifiseringsfasen slik at ikke det skulle være en medvirkende faktor for mottakelighet av SAV-infeksjon. Denne gruppen hadde høyere virusmengde i hjertet enn de som ble smittet senere. Mest sannsynlig var dette på grunn av at viruset kunne formere seg best i fisken som bare hadde vært to uker i sjøen. Det var også denne fiskegruppen som skilte ut virus over den lengste perioden og som

totalt utskilte mest virus. Det tyder på at det er mer spredning av sykdommen dersom infeksjonen finner sted i gruppen som først ble overført til sjøvann, sammenlignet med den andre gruppen. I tillegg fikk fisken som ble smittet tidligst, mer alvorlige histopatologiske lesjoner sammenlignet med den andre gruppen fisk (figur 3).

Dette viser at postsmolt av atlantisk laks er mer utsatt for SAV3 tidlig i sjøvannsperioden enn de som har fått noen uker ekstra i sjøvann før de blir utsatt for farer i form av sykdomsagens. Resultatene våre tyder på at størrelsen og/eller tid etter overføring til sjøvann spiller en rolle i å hjelpe postsmolt å bli mer robust for å bekjempe SAV3-infeksjon. Siden fisken som overlever PD ikke alltid blir helt frisk fra påslag av sykdomslesjoner, kan det spekuleres i om fisken som ble tidligst smittet og som overlevde PD-utbruddet, kan ha enda dårligere vekst sammenlignet med gruppen som ble smittet ni uker etter overføring til sjøvann.

### Salmon is more susceptible to PD in new waters

The results in this study suggest that post-smolts are more susceptible to SAV3 infection at two weeks rather than at nine weeks after seawater-transfer. This would give a good foundation for further considerations about when transfer of Atlantic salmon to sea cages should be carried out, and determine whether it would minimize the loss or the number of SAV3 outbreaks. Furthermore, our established bath challenge model in seawater with SAV3 offers better control of time and dose of infection, at the same time mimicking natural route of infection. It will be an important tool as an alternative for SAV3 infection model to study basic immunological mechanisms and disease progression.