

Charakterystyka wirusa zakaźnej martwicy trzustki ryb łososiowatych i jego identyfikacja

JOANNA MAJ-PALUCH, MICHAŁ REICHERT

Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 17.03.2015

Zaakceptowano 18.05.2015

Maj-Paluch J., Reichert M.

Characterization and diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in salmonid fish

Summary

The IPN virus belongs to the Birnaviridae family, Aquabirnavirus genus. It is an enveloped, two-segment, double-stranded RNA virus. Segment A comprises two open reading frames. ORF 1 encodes VP5 protein, whereas ORF 2 encodes VP2, NS and VP3 proteins. Segment B comprises one open reading frame, which encodes VP1 protein. The VP2 gene is responsible for the virulence of the virus. The Aquabirnavirus genus is divided into two serogroups: A and B. There are 9 serotypes in serogroup A, including serotypes occurring in Europe. Serogroup B consists of one serotype. The virus grows in several cell lines and often occurs in dual infections, inhibiting the replication of other viruses. Diagnosis is based on the isolation of the virus in cell lines, serological methods and, above all, techniques of molecular biology.

Keywords: Birnaviridae, Aquabirnavirus, serogroup, serotype

Zakaźna martwica trzustki (IPN) jest chorobą występującą głównie u młodych ryb łososiowatych. Może powodować duże straty ekonomiczne w gospodarstwach hodujących ryby wrażliwe na tę chorobę. Najbardziej wrażliwy na zakażenie wirusem IPN jest pstrąg źródlany (*Salvelinus fontinalis*), a zwłaszcza narybek, podatne są również inne ryby łososiowate np.: troć (*Salmo trutta*), łosoś (*Salmo salar*) czy pstrąg tęczowy (*Salmo gairdneri*) (22).

Wirus wywołujący zakaźną martwicę trzustki po raz pierwszy został wyizolowany w 1957 r. w Stanach Zjednoczonych, następnie jego obecność zanotowano w Kanadzie, skąd rozprzestrzenił się na kraje Europy. Tu po raz pierwszy wirus IPN został wyizolowany w 1964 r. we Francji od narybku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Jego obecność stwierdzano również w Azji (12, 26). Chore ryby, które nie mają zmian chorobowych, mogą być nosicielami wirusa i zakażają zdrowe ryby, bytujące w tym samym zbiorniku wodnym. Zakażenie odbywa się przez kontakt z odchodami chorych ryb, z ikrą czy mleczem (22). Czynniki chorobotwórcze wnika do tkanki skrzelowej albo do układu pokarmowego i docelowo atakuje trzustkę, powodując martwicę jej komórek i zaburzenia funkcji wydzielniczych zarówno enzymatycznych, jak i hormonalnych. Ryby, które przeżyły infekcję wirusem IPN, stają się jego nosicielami, a następnie mogą być zakażone przez inne wirusy (13, 19).

Wirus IPN powoduje nie tylko infekcje i namnażanie się w szerokim zakresie gatunków ryb, ale też jest w stanie wywołać efekt cytopatyczny w kilku liniach komórkowych, takich jak: RTG-2 (komórki gonad pstrąga tęczowego), CHSE-214 (komórki fibroblastyczne łososia czawycza), BF-2 (komórki fibroblastyczne narybku basa wielkogębowego), EPC (komórki epitelialne karpia), FHM (komórki epitelialne ciernika promienistego). Niekiedy w zakażonych hodowlach komórkowych nie obserwuje się zmian cytopatycznych, a komórki zakażone są identyczne jak zdrowe, wówczas wirus przenosi się przez wiele pasażerów, utrzymując stałe, niewielkie miano (2, 10).

Rola wirusa IPN podczas superinfekcji

Wirus IPN często bierze udział w tzw. superinfekcji. Pierwotna infekcja wirusem IPN chroni ryby przed innymi wirusami m.in. wirusem wirusowej posocznicy krwotocznej ryb łososiowatych – VHS czy wirusem zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb łososiowatych – IHN (6, 16, 15, 21), ale też wirusem zakaźnej anemii łososi – ISA (14).

Garcia i wsp. (9) przeprowadzali doświadczenia dotyczące zainfekowanych komórek wirusem IPN i ponownego zakażenia tych komórek innym patogenem. Hodowlę komórkową EPC zakażono szczepem Ab wirusa IPN, a następnie innymi szczepami wirusów. Infekcja zdrowych komórek EPC wirusami VHS,

IHN czy SVC (wirus wiosennej wiremii karpi) dawała wyraźny efekt cytopatyczny, natomiast na komórkach uprzednio zakażonych IPN nie obserwowano żadnych zmian w przypadku wirusa VHS czy IHN. Z kolei wirus SVC dawał efekt cytopatyczny, ale w mniejszym stopniu niż na komórkach zdrowych. Podwójna infekcja wirusami IPN oraz IHN w tym samym czasie powoduje zahamowanie syntezy RNA wirusa IHN (23). Rodriguez i wsp. przeprowadzali doświadczenia dotyczące podwójnej infekcji nie tylko na liniach komórkowych, ale też na populacji pstrąga tęczowego. W obu przypadkach potwierdziło się, że wirus IPN hamuje namnażanie się wirusa IHN. W związku z tym ryby, które pierwotnie przeszły infekcję wirusem IPN, a następnie zostały zakażone wirusem IHN, nie wykazywały w takim stopniu śmiertelności jak ryby, które były zakażone tylko wirusem IHN. Dowiedziono, że ważną rolę w utrzymaniu obecności wirusa odgrywa interferon (25), jednak istnieje też inna teza, która mówi o tym, iż zahamowanie namnażania się wirusa IHN jest spowodowane tym, że IPN replikuje szybciej i namnaża się, osiągając wyższe miano aniżeli IHN (23).

Budowa wirusa IPN

Czynnikiem etiologicznym jest wirus należący do rodziny *Birnaviridae*, rodzaju *Aquabirnavirus*. Jego wirion ma średnicę około 60 nm, jest to wirus bezotoczkowy, o budowie ikosaedralnej. Genom wirusa składa się z dwuniciowego, dwusegmentalnego kwasu nukleinowego RNA: segmentu A oraz segmentu B.

Segment A, o wielkości ok. 3,1 kb, zawiera dwie otwarte ramki odczytu ORF1 oraz ORF2. ORF1 koduje 17 kDa białko VP5 bogate w argininę, które zachodzi na N-terminalny koniec białka VP2. ORF2 koduje poliproteinę o masie cząsteczkowej 106 kDa (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH), (1). PreVP2 jest prekursorem VP2 genu głównych białek kapsydu, NS jest wirusową proteazą, odpowiedzialną za odczepienie pVP2 z poliproteiny, VP3 jest wewnętrznym białkiem strukturalnym. Gen VP2 jest głównym strukturalnym i immunogennym polipeptydem wirusa IPN, a także najbardziej zmiennym genem (11, 28). Uważa się, że gen ten odgrywa istotną rolę w wirulencji (5, 28, 29).

Segment B, o wielkości około 2,7 kb, zawiera jedną ramkę odczytu ORF, która koduje białko VP1 o masie 94 kDa, czyli polimerazę RNA (7).

Sano i wsp. (27) jako pierwsi zasugerowali, iż wirulencja IPN związana jest z segmentem A. Inni naukowcy, np. Santi i wsp. (28), analizując sekwencje nukleotydowe genu VP2, który znajduje się w segmencie A, potwierdzili tę tezę, stwierdzając, że pozycje 217 i 221 tego genu są głównymi wyznacznikami zjadliwości wirusa o serotypie Sp, a pozycję 247 uznano za wysoce zmienną. Za wysoką zjadliwość odpowiadają treonina w pozycji 217 oraz alanina w pozycji 221. Średnia oraz niska zjadliwość spowodowana jest

występowaniem proliny w pozycji 217 oraz alaniny w pozycji 221. Szczepy posiadające w pozycji 221 treoninę uznawane są za niezjadliwe, niezależnie od obecności reszty aminokwasowej w pozycji 217.

Występowanie wirusa IPN

Rodzaj *Aquabirnavirus* jest podzielony na dwie wyróżniające się serogrupy A i B. Serogrupa A zawiera 9 serotypów: A1 (szczep referencyjny WB – West Buton, VR299) pochodzący ze Stanów Zjednoczonych; A2 (Sp) i A3 (Ab) oba serotypy wywodzą się z Danii; A4 (He – Hecht) pochodzi z Niemiec; A5 (Te – Tellina) po raz pierwszy wyizolowany w Wielkiej Brytanii; trzy kolejne serotypy pochodzą, jak sama ich nazwa wskazuje, z Kanady: A6 (C1 – Canada 1), A7 (C2 – Canada 2), A8 (C3 – Canada 3) oraz A9 (Ja – Jasper) wywodzący się również z Kanady (12). Między tymi dziewięcioma serotypami istnieją: wysoka antygenowa zmienność oraz różnice w zjadliwości i chorobotwórczości (29).

Serogrupa B zawiera tylko jeden serotyp TV-1 pochodzący z Wielkiej Brytanii. Taki podział został zaproponowany przez Hilla i Waya na podstawie przeprowadzonych testów seroneutralizacji. Pomimo ogromnej liczby gospodarzy oraz geograficznego rozmieszczenia większość izolatów wydaje się antygenowo podobna do oryginalnego referencyjnego serotypu wirusa IPN Sp (A2), Ab (A3) oraz VR299 (A1) (12). Inny podział, zaproponowany przez Blake'a i wsp. (3), mówi o istnieniu sześciu genogrup w obrębie 9 szczepów serogrupy A. Genogrupa 1 składa się z izolatów pochodzących ze Stanów Zjednoczonych (serogrupa A1) oraz dwóch szczepów Jasper z Kanady. Genogrupa 2 zawiera izolaty z Azji i Europy (A3). Genogrupa 3 złożona jest z dwóch izolatów kanadyjskich (C1 i ASV) (A6) i europejskiego izolatu Te (A5). Genogrupa 4 składa się z dwóch izolatów kanadyjskich C2 oraz C3, reprezentujących serotyp A7 oraz A8. Genogrupa 5 zawiera pięć izolatów europejskich oraz jeden azjatycki (A2). Genogrupa 6 złożona jest ze szczepu HE (A4). Główne serotypy kanadyjskie są bardziej spokrewnione z europejskimi aniżeli z pochodzącymi ze Stanów Zjednoczonych.

Diagnostyka

Identyfikacja wirusa IPN opiera się na badaniach serologicznych, histopatologicznych lub molekularnych, jednak standardową metodą do diagnostyki wirusa IPN jest hodowla na liniach komórkowych i potwierdzenie obecności wirusa metodą serologiczną. Nie zawsze izolacja wirusa jest możliwa od ryb bez objawów choroby, dlatego też wymagane jest użycie bardziej precyzyjnych metod, o czym pisali także Rodriguez i wsp. (24), Gahlawat i wsp. (8), Munro i Ellis (19).

Jako narzędzie biologii molekularnej wykorzystywano takie techniki, jak: RT-PCR, nested-PCR czy Real Time RT-PCR, projektując startery amplifikujące

głównie fragment genu VP2, który jest uważany za rejon najbardziej zmienny i odgrywający istotną rolę w określaniu stopnia zjadliwości wirusa.

Lopez-Jimena i wsp. (17) wykorzystali nested RT-PCR i hybrydyzację dot-blot, aby poprawić specyficzność i szybkość detekcji wirusa IPN u ryb nosicieli, wykorzystując fragment genu pVP2. Swoje badania przeprowadzali na rybach okoniokształtnych. Wszystkie analizowane próbki były ujemne metodą RT-PCR, zaś 26 z 49 próbek pochodzących od *pagrus auriga* i 14 z 18 próbek pochodzących od *pagrus różowy* było dodatnich metodą nested RT-PCR. Najlepsze wyniki otrzymano łącząc metodę nested RT-PCR i hybrydyzację dot-blot, otrzymując 100% wykrywalność wirusa w przypadku *pagrus auriga* i 94,4% u *pagrusa różowego*. Techniki biologii molekularnej do identyfikacji wirusa IPN w swoich badaniach wykorzystali m.in. także Williams i wsp. (30), Milne i wsp. (18) czy Bowers i wsp. (4).

Williams i wsp. (30) opisali metodę multiplex PCR do identyfikacji trzech patogenów jednocześnie: wirusa zakaźnej martwicy trzustki (IPNV), wirusa zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHNV) oraz wirusa wirusowej posocznicy krwotocznej (VHSV). Zastosowana metoda pozwoliła na oszczędność czasu i kosztów w porównaniu z testem neutralizacji przeciwciał czy pojedynczego testu PCR, a dawała zadowalające wyniki. Rodriguez i wsp. (24) w swoich badaniach wykorzystali krew i leukocyty pochodzące od dwuletnich pstrągów tęczowych i wykonywali immunofluorescencję pośrednią, zastosowali też cytometrię przepływową, a także RT-PCR oraz nested-PCR. Z oczyszczonych leukocytów identyfikowali wirusa metodą RT-PCR, otrzymując pozytywny wynik w pięciu z siedmiu przypadków. Nested PCR poprawił jednak czułość metody, dając pozytywny wynik we wszystkich badanych przypadkach. Metodą cytometrii przepływowej otrzymali wszystkie dodatnie próbki w ciągu 8-24 godzin. Według Rodrigueza i wsp. badanie leukocytów jest praktyczną drogą do identyfikacji wirusa IPN i jest dużo mniej czasochłonne w porównaniu ze standardową metodą homogenizacji i izolacji na hodowlach komórkowych.

Milne i wsp. (18) do identyfikacji wirusa IPN wykorzystali metodę kolorymetryczną zwaną RT-PCR-ELISA. Połączyli w niej czułość PCR ze specyficznym przeciwciałem w teście Elisa. Aby produkt PCR mógł być wykryty metodą Elisa, do kwasu nukleinowego podczas amplifikacji dołączana była digoxigenina-dUTP. Ich wyniki sugerują, że metoda ta jest porównywalna do techniki PCR, a próbka z wynikiem pozytywnym identyfikowana była w ciągu kilku godzin.

Najbardziej popularna w ostatnich latach jest metoda Real-Time PCR, którą do identyfikacji wirusa IPN opisali Bowers i współpracownicy (4). Skupili się oni na przyżyciowej i pośmiertnej metodzie pobierania próbek. Pierwsza z wymienionych metod zakładała

pobieranie próbki do badań z części płetwy piersiowej, zaś druga metoda polegała na pobieraniu fragmentów narządów wewnętrznych: śledziony i części głowowej nerki. Narządy pozyskiwali od pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* zakażonego wirusem IPN w warunkach laboratoryjnych. Na uwagę zasługuje metoda przyżyciowa pobierania próbki, która nie wymaga uśmiercania ryby i byłaby bardzo pomocna przy diagnozowaniu choroby u dzikich populacji ryb łososio-watych. Wyniki otrzymane z narządów wewnętrznych, jak i z płetwy piersiowej były porównywalne i dawały pozytywny sygnał już 24 godziny po zakażeniu.

Wszystkie wspomniane powyżej metody są skutecznymi narzędziami do diagnostyki wirusa IPN, jednak ani Real-Time RT-PCR, ani inne metody bazujące na PCR nie pozwalają na rozróżnienie patogennych od niepatogennych form wirusa. Do tego potrzebna jest hodowla na liniach komórkowych. Przydatnym narzędziem są również sekwencjonowanie i tworzenie drzew filogenetycznych, za pomocą których można znaleźć pokrewieństwo między serogrupami.

W Polsce dotychczas brak jest danych dotyczących patogenności wirusa wywołującego zakaźną martwicę trzustki. Według doniesień ustnych można przypuszczać, że występują zarówno szczepy niepatogenne, jak i patogenne, co by sugerowało obecność serotypów Ab i Sp, brak jest też informacji na temat innych serotypów. Metody identyfikacji wirusa IPN wykorzystywane w jego diagnostyce są skuteczne i szybkie, stale zostają poszerzane o nowe techniki. Choroba wywołwana przez ten wirus nie jest zwalczana z urzędu, mimo to może spowodować duże straty w hodowli, dlatego istotne jest bliższe poznanie czynnika etiologicznego, jego budowy, zachowania w kontakcie z innymi wirusami, rozwijania technik do jego identyfikacji, ponadto z punktu widzenia naukowego ważna i interesująca jest wiedza na temat serotypów wirusa IPN występujących na terenie Polski.

Piśmiennictwo

1. Abdullah A., Olsen CH. M., Hodneland K., Rimstad E.: A polyprotein-expressing salmonid alphavirus replicon induces modest protection in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) against infectious pancreatic necrosis. *Viruses* 2015, 7, 252-267.
2. Antychowicz J.: Choroby i zatrucia ryb. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 1996, s. 115-121.
3. Blake S., Ma J. Y., Caporale D. A., Jairath S., Nicholson B. L.: Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Organ.* 2001, 45, 89-102.
4. Bowers R. M., Lapatra S. E., Dhar A. K.: Detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J. Virol. Meth.* 2008, 147, 226-234.
5. Bruslind L. D., Reno P.: Virulence comparison of three Buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *J. Aquat. Anim. Health* 2000, 12, 301-315.
6. Byrne N., Castric J., Cabon J., Quentel C.: Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immun.* 2008, 24, 489-497.
7. Chung H., Lee S., Kim S., Lee H.: Nucleotide sequence analysis of the RNA-dependent RNA polymerase gene of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain. *J. Microbiol. Biotechn.* 1994, 4, 264-269.

8. Gahlawat S. K., Munro E. S., Ellis A. E.: A nondestructive test for detection of IPNV-carriers in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.* 2004, 27, 233-239.
9. Garcia I., Galiana A., Falco A., Estepa A., Perez L.: Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses. *Vet. Microbiol.* 2011, 149, 48-55.
10. Hedric R. P., Leong J. C., Fryer J. L.: Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPN). *J. Fish Dis.* 1978, 1, 297-308.
11. Heppell J., Tarrab E., Lecomte J., Berthiaume L., Arella M.: Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 1995, 214, 40-49.
12. Hill B. J., Way K.: Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1995, 5, 55-77.
13. Jensen I., Seppola M., Steiro K., Sandaker E., Mennen S., Sommer A.-I.: Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua* juveniles to different routes of experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis. Aquat. Organ.* 2009, 85, 105-113.
14. Johansen L. H., Sommer A. I.: Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or *Vibrio salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 2001, 47, 109-117.
15. Kim H. J., Oseko N., Nishizawa T., Yoshimizu M.: Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or poly(I:C). *Dis. Aquat. Organ.* 2009, 83, 105-113.
16. Kinkelin P. de, Dorson M., Renault T.: Interferon and viral interference in viruses in salmonid fish. Kimura, T. Sapporo, Japan, Hokkaido University Press 1992, s. 241-249.
17. Lopez-Jimena B., Garcia-Rosado E., Infante C., Cano I., Manchado M., Castro D., Bornego J. J., Alonso M. C.: Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from asymptomatic redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes and common seabream, *Pagrus pagrus* (L.), using a non-destructive procedure. *J. Fish. Dis.* 2010, 33, 311-319.
18. Milne S. A., Gallacher S., Cash P., Porter A. J.: A reliable RT-PCR-Elisa method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *J. Virol. Meth.* 2006, 132, 92-96.
19. Munro E. S., Ellis A. E.: A comparison between nondestructive and destructive testing of Atlantic salmon *Salmo salar* L., broodfish for IPNV-destructive testing is still the best at time of maturation. *J. Fish Dis.* 2008, 31, 187-195.
20. Munro E. S., Gahlawat S., Acosta F., Ellis A. E.: In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages *ex vivo* contain a low level of non-replicating virus. *J. Fish Dis.* 2006, 29, 43-48.
21. Pakingking R., Okinaka Y., Mori K., Arimoto M., Muroga K., Nakai T. In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral haemorrhagic septicaemia virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) preceedingly infected with aquabirnavirus. *Fish Shellfish Immun.* 2004, 17, 1-11.
22. Prost M.: Choroby ryb. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1989, s. 42-51.
23. Rodriguez S., Alonso M., Perez-Prieto S.: Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis. Aquat. Organ.* 2005, 67, 183-190.
24. Rodriguez S., Alonso M., Perez-Prieto S. I.: Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from leukocytes of carrier rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Path.* 2001, 36, 139-146.
25. Rodriguez S., Heras A., Perez-Prieto S.: The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response. *Vet. Immunol. Immunop.* 2010, 136, 81-91.
26. Sano T.: Studies on viral diseases of Japanese fishes – I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish* 1971, 37, 495-498.
27. Sano T., Tanaka K., Fukuzaki S.: Immune response in adult trout against formalin-killed concentrated IPNV. *Devel. Biol. Standard.* 1981, 49, 63-70.
28. Santi N., Vakharia V. N., Evensen Ø.: Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 2004, 322, 31-40.
29. Shivappa R. B., Song H., Yao K., Aas-Eng A., Evensen Ø., Vakharia V. N.: Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis. Aquat. Organ.* 2004, 61, 23-32.
30. Williams K., Blake S., Sweeney A., Singer J. T., Nicholson B. L.: Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 4139-4141.

Adres autora: mgr inż. Joanna Maj-Paluch, Al. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy; e-mail: joanna.maj@piwet.pulawy.pl