

Deel 1

Visvirussen

door Olga Haenen

Dit is een nieuwe serie binnen 'Uit de ziekenboek', die, na de serie over visparasieten gewijd wordt aan visvirussen. Het begint met een algemene inleiding, alvorens de virussen elk apart te gaan belichten.

Wat is een virus?

Bij virussen gaat het om zeer kleine infectieuze deeltjes, die 20-300 nanometer groot zijn, met een vaste maat per virus. Een virusdeeltje bestaat uit een stukje erfelijk materiaal (DNA of RNA), de zgn. nucleocapsid, met daar omheen een eiwitmantel, die de capsid genoemd wordt. Deze eiwitmantels zijn specifiek per virus type en bestaat uit zgn. capsomeren (structurele eenheden). Soms is het virusdeeltje ook nog omgeven door een zgn. envelop, die vetten van de gastheercel bevat. Als er geen envelop aanwezig is, spreken we van een naakt virus.

Hoe 'leeft' een virus?

Ook al kunnen virussen vreselijke schade toebrengen aan levende wezens, toch kun je niet zeggen, dat virussen 'leven'. Ze kunnen zich vermenigvuldigen (repliceren), als ze bestanddelen van een levende gastheercel daarvoor gebruiken. Daarbij maakt het virus vaak de cel kapot. Vergelijk het maar met als wij verkouden zijn: Het virus deelt zich in de cellen van het neusslijmvlies en maakt deze daarbij kapot, waardoor we gaan snotteren. Sommige virussen kunnen heel goed tegen langdurig verblijven buiten de gastheercel. Het vispathogene IPN-virus (infectieuze pancreatische necrose virus) van forelachtigen is daar een voorbeeld van, waartoe ook het type

Ab, te weten EVE (Eel Virus European) van paling behoort: het virus kan 60 dagen tegen uitdroging. Sommige virussen kunnen slecht tegen het buiten een gastheercel zijn en worden dan geïnactiveerd, waardoor ze onschadelijk zijn gemaakt. Hiervan wordt bij desinfectie van bijvoorbeeld met virus besmette aarden vijvers gebruik gemaakt: eerst worden alle vissen verwijderd en gedestruueerd en dan volgt drooglegging voor enkele maanden met vaak een extra behandeling van de vijverbodem met ongebluste kalk, alvorens de vijvers weer aangestuwd worden en bevolkt met vis.

Indeling van de visvirussen

De indeling gebeurt op basis van uiterlijk van het virusdeeltje (Figuur 1), te zien met behulp van een elektronenmicroscop. Er zijn DNA- en RNA-virussen. We onderscheiden de volgende groepen (Figuur 2), en de volgende belangrijkste visvirussen, o.a.:

- *Herpesvirussen (complexe vorm, DNA-virussen):*
- HVA: Herpesvirus anguillae, van de paling
- CCV: Channel Catfish Virus van de Amerikaanse meerval
- *Rhabdovirussen (kogelvormige virussen en RNA-virussen):*
- VHSV: Virale Haemorrhagische Septicaemie Virus van forelachtigen

- IHNV: Infectieuze Haematopoietische Necrose Virus van forelachtigen
- SVCV: Spring Viraemia of Carp Virus van de karperachtigen
- PFRV: Pike Fry Rhabdo virus, zgn. snoekbroedvirus van snoek
- EVEX: Eel Virus European X van paling
- *Icosahedrische virussen (BiRNA virussen)*:
- IPNV: type Sp: Infectieuze Pancreatische Necrose Virus van forelachtigen
- EVE: Eel Virus European, wordt getypeerd als IPNV type Ab en VR299.
- *Myxovirus (RNA-virussen)*:
- ISAV: Infectious Salmon Anaemia Virus van de zalm, een orthomyxo-like virus

Bovenstaande virussen zullen in de volgende afleveringen van Aquacultuur de revue passer.

Hoe verloopt de diagnostiek van visvirussen?

Vissencellijnen

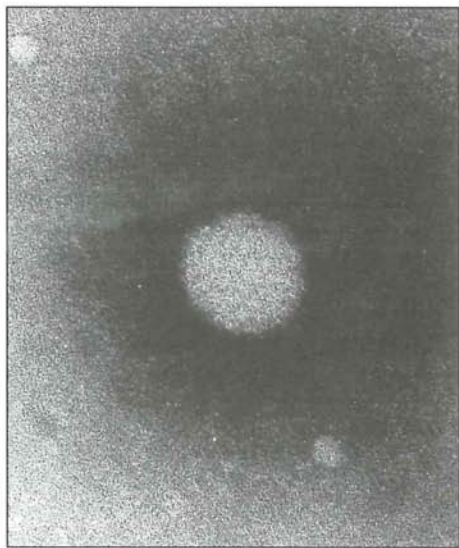
Virussen hebben zoals gezegd levende cellen nodig voor hun vermeerdering (replicatie). Daarom wordt voor virusisotatie gebruik gemaakt van internationaal ontwikkelde vissencellijnen, die in vitro aan te houden zijn op een visziektkundig lab. Een vissencellijn is een continu doorgroeiende kweek van vissencellen, die je op de bodem van een steriele kweekfles kunt laten groeien en na enige tijd, als de bodem van het flesje geheel bedekt is met cellen, weer daarvan kan losmaken met een middeltje (Trypsine bijvoorbeeld), zodat je de cellen in suspensie weer verder kunt "uitzaaien" in nieuwe kweekflessen. Voor IPN-virus isotatie gebruiken we bijvoorbeeld een continue cellijn van forelachtigen, de zgn. RTG-2 = rainbow trout gonad-2, oorspronkelijk een mengkweek van mannelijke en vrouwelijke geslachtscellen van de regenboogforel, voor SVC-virus de karperachtige cellijn van de Fat Head Minnow (FHM-cellijn) en voor meerval de Brown Bulhead meervalcellijn (BB-cellijn).

We hebben tegenwoordig ook de beschikking

over palingcellijnen, o.a. Eel Kidney-1 (EK-1) waardoor de vindkans van palingvirussen is vergroot.

Virusisotatie uit vis

Voor het bepalen, of en zo ja, welk virus er in een vis aanwezig is wordt de vis gedood en worden standaard van grote vissen de lever, nier en milt gepoold en met steriel kweekmedium en zand verwreven, om de cellen kapot te maken en zo het virus te laten vrijkomen in de suspensie. In geval van kleine visjes worden deze in zijn geheel verwreven voor virusisotatie. Ook visseneieren kunnen op virus worden gecontroleerd. De zo ontstane suspensie wordt verdund met kweekmedium (vloeistofmengsel, waar de vissencellijn goed in groeit). Dan wordt een kleine hoeveelheid van de orgaansuspensie in een steriel flesje met de vissencellijn gebracht, waarin zich op de bodem een volgroeide laag van 1 cel dik van een vissencellijn bevindt en de fles wordt bij de optimale temperatuur bebroed. Het eventueel aanwezige virus kan nu de cellijn in-



★ *Figuur 1. Een elektronenmicroscopische opname van een herpesvirus, 150.000x vergroot. (foto ID-Lelystad).*

fecteren en zichzelf daarmee vermeerderen. Daarbij wordt de cellijn kapot gemaakt en laten de cellen van de bodem los of blazen op. Dit wordt cytopathogeen effect (cpe) genoemd. Als dit het geval is, is dat duidelijk te zien met een omkeermicroscop. Typering van het virus volgt. Als de cellen in de 1^e passage van 7 dagen onaangestast blijven, wordt er een beetje van de 1^e passage in een flesje met een verse volgroeide cellijn gebracht en deze wordt in de 2^e passage weer 7 dagen bebroed. Blijft de cellijn gaaf, dan is daarna de uitslag: geen virus geïsoleerd.

Virusidentificatie

Als er cpe te zien is in een flesje wordt een monster van de inhoud van het flesje bekeken met behulp van de elektronenmicroscop (EM). Dan wordt duidelijk, hoe het virus eruit ziet, dus tot welke groep het behoort. Bedenk wel, dat je, om het virus goed te vinden met de EM minimaal 10⁷ virusdeeltjes per ml kweekmedium moet hebben, anders loop je door de sterke vergroting het virus mis. Als de groep bekend is kan het virus gericht met diverse laboratoriumtechnieken worden getypeerd. Al deze methodes maken gebruik van controleantilichamen die gericht zijn gemaakt tegen het virus A, met de eigenschap, dat ze met virus A zullen binden en niet met virus B t/m Z. De testen, die gebruikt worden zijn: virusneutralisatietest, immunoperoxidase test (IPMA), en immunofluorescentietest (IFT), waarmee je het virus een naam kunt geven als resultaat.

Virusneutralisatietest

Het virus wordt met een voor het virus specifieke antiserum geïncubeerd. De specifieke antisera zullen aan het virus hechten (neutralisatie) zodanig dat dit virus nadat het virus-serummengsel op celkweek is gebracht deze cellen niet meer kan infecteren. Doordat het antiserum het virus wel of niet neutraliseert kan bepaald worden welk virus de vis heeft geïnfecteerd, want de geneutraliseerde suspensies (het virus past bij het antiserum) veroorzaken geen gaten in de cellijn, en de onge-

neutraliseerde (het virus is een ander dan waar het antiserum tegen gericht is) wel. Hier komt geen kleuring aan te pas.

IPMA en IFT

Het virus wordt opgekweekt op een verse cellijn. Na fixatie van de cellen op de bodem worden de cellen met virusspecifieke antisera aangekleurd. Deze sera hechten alleen aan cellen die geïnfecteerd zijn met het corresponderende virus. Viruspositieve cellen kleuren onder een fluorescentiemicroscop specifiek groen (IFT) of rood (IPMA) op. Ongeïnfecteerde cellen of cellen besmet met een ander virus kleuren niet met dit antiserum. Doordat geïnfecteerde cellen wel of niet groen resp. rood aankleuren met een antiserum kan bepaald worden welk virus de vis heeft geïnfecteerd.

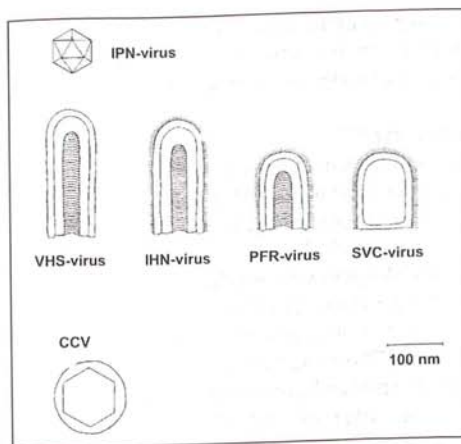
Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tegenwoordig zijn er ook veel snellere testen voor virusbepaling: o.a. de zgn. Polymerase Chain Reaction test. Deze maakt gebruik van een PCR-apparaat, dat de kleinste hoeveelheden van specifieke stukjes DNA of RNA van het virus in een te testen monster al weet op te sporen, doordat stukjes nagemaakt genetisch materiaal (primers) eraan binden, waarna het apparaat deze stukjes kunstmatig gaat vermeerderen tot een meetbare hoeveelheid. De PCR-producten worden aan het eind met gelelektroforese zichtbaar gemaakt in de vorm van eiwitbandjes en dit bandenpatroon wordt vergeleken met dat van een bekend referentievirus. PCR's zijn dus zeer gevoelig, maar de techniek is duur en je hebt er speciale labfaciliteiten voor nodig.

Algemene kenmerken virusinfecties bij vis

Bij een acute virusinfectie zie je vaak de volgende verschijnselen:

- Donkerkleuring en sloom zwemmen van de vis
- Bloedingen aan de vinbases
- Een snel opkomende, hoge sterfte
- Bleke organen met vaak puntbloedingen in het hele lichaam, inclusief de spieren



★ *Figuur 2. Schematische weergave van het uiterlijk van enkele visvirussen (naar: Schlotfeldt, 1985).*

- Bleke, maar niet gezwollen milt
- Bloedarmoede (met name bij chronischer verloop)

Transmissie van virusinfecties

De overdracht (transmissie) van een virus kan horizontaal gaan, dat wil zeggen via het water, contact tussen vissen, schepnetten e.d. Bij sommige virussen bestaat ook een verticale transmissie, van generatie op generatie, bijvoorbeeld bij SVC-virus: het virus bindt in de geïnfecteerde moedervis aan de eieren en het later hatchende broed is direct geïnfecteerd. Bij PFR-virus van de snoek is het virus aan de buitenkant van de eieren gebonden en kun je het kwijtraken, door de afgestroken en bevruchte eieren te desinfecteren met een jodiumoplossing, anders worden de snoekjes als ze ca. 4 cm lang doodziek. Dit wordt bij viskwekerijen toegepast als preventie.

Therapie mogelijk?

Neen. Tegen virusinfecties is geen chemische therapie mogelijk. Wel is het zo, dat virussen elk een optimum groeitemperatuur kennen en daar kun je soms als viskweker zover mogelijk buiten gaan zitten in de kweekhal. Bij vijver-

systemen is de enige oplossing: ruimen en de vijvers en equipment geheel desinfecteren.

Preventie

Om visvirussen op viskwekerijen te voorkomen is het zaak, pootvis te betrekken van een op gezondheid gekeurd (gecertificeerd) bedrijf en verder contact met andere bedrijven te vermijden. Met name bij forel en karper zijn dergelijke keuringen in het buitenland routine. Als je forel uit Denemarken betreft, zit daar al gauw een gezondheidscertificaat bij, omdat de Deense forellenbedrijven verplicht aan keuringen meedoen. In Nederland is keuring, met name het vrijwillig laten onderzoeken van levende vis op de afwezigheid van bepaalde visvirussen, nog niet zo populair, maar wel mogelijk, via de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees. Daarbij wordt een representatieve steekproef van de vispopulatie van het bedrijf genomen, die bij ID-Lelystad tegen bepaalde tarieven wordt onderzocht op door de RVV geefte het gezondheidscertificaat af, als de partij of het bedrijf goedgekeurd is. Het gaat om twee keuringen per jaar. In de volgende afleveringen komen de virussen één voor één aan bod.

Literatuur

1. Noga, E.J., 1995. Fish disease, diagnosis and treatment. Mosby. St. Louis. USA. ISBN 1-55664-374-8.
2. Reichenbach-Klinke, H.-H., 1980. Krankheiten und Schädigungen der Fische. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany. 472 pp.
3. Schlotfeldt, H.-J., 1985. Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany. 425 pp.
4. Schlotfeldt, H.-J. and D.J. Alderman, 1995. What should I do? A practical guide for the fresh water fish farmer. E.A.F.P. 15(4) Suppl. 61 pp.
5. Wolf, K., 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, USA, 476 pp.