

Melaninflekkar

– eksperimentell tidsstudie hjå laks



Agnar Kvellestad

Elin Valen

Erling Olaf Koppang

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap (Veterinærhøgskolen)

Institutt for basalfag og akvamedisin (BasAm)

Seksjon for anatomi og patologi

FHF's havbrukssamling 13.-14. oktober 2015

Føremål

Undersøke årsaker til melaninflekkar i muskulatur hjå laks ved å

- **Studere utvikling av sjukdomsendringar**
- **Undersøke for ev. sjukdomsframkallande organismar**

hjá laks i forsøk, og så tidleg som mogleg i utviklinga

Forsøk – materiale og prøvetaking

0+ smolt, sjøsett hausten 2013			1+ smolt, sjøsett våren 2013		
Prøvetaking	Fisk	Fôr	Prøvetaking	Fisk	Fôr
2013 aug FV	Uvaks	Kontr	2013 april – FV	Uvaks	Kontr
2013 sept – FV	Uvaks & vaks, 8 & 16°C i FV	Kontr	2013 mai – FV	Uvaks, vaks	Kontr, vit E & Se
2014 jan – SV		Kontr	2013 sept - SV		Kontr, vit E & Se
2014 mars – SV		Kontr	2014 jan – SV		Kontr
2014 juni – SV		Kontr	2014 mars - SV		Kontr
2014 des – SV		Kontr	2014 juni - SV		Kontr, Zn
2015 mars – SV		Kontr, antioks	2014 aug - SV		Kontr, Zn, Cu, antioks

FV – Sunndalsøra, SV – Nofima / Marine Harvest Ekkilsøy

Hovudfokus

**Uvaksinerte og vaksinerte 1-åringar som fekk kontrollfôr
(standardfôr)**

Metodar

- **Obduksjon**
- **Histologi**
- **Analysar av enzym i blod**
- **PCR**

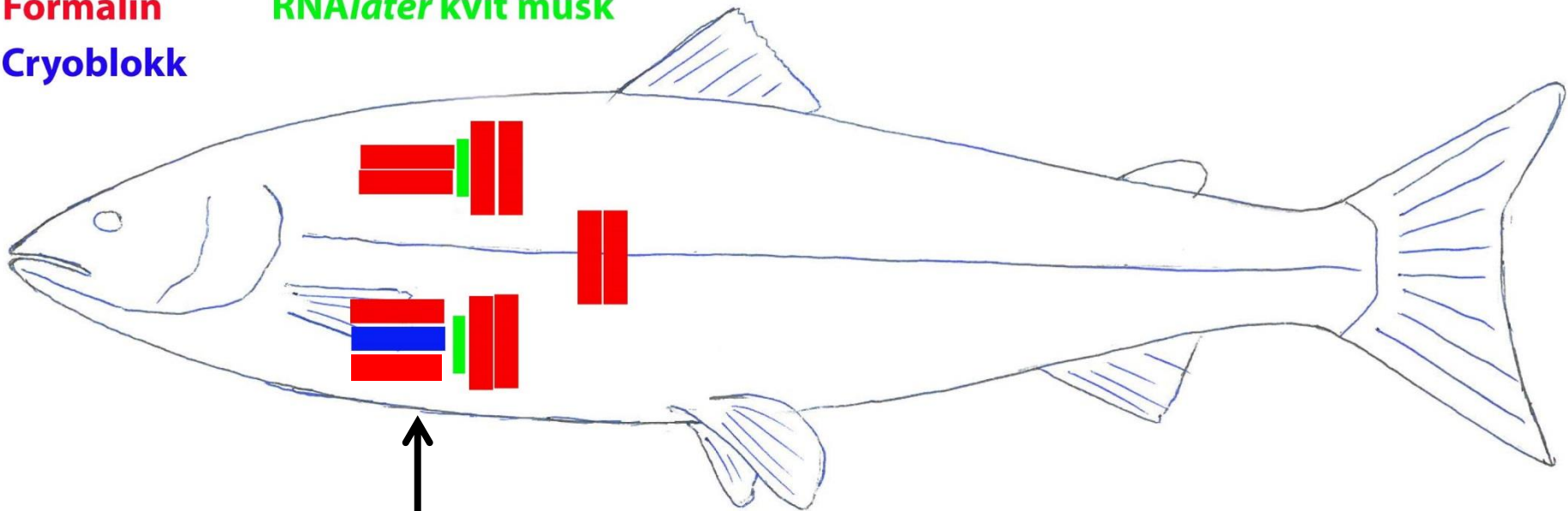
Kontrollfôr, uvaksinert og vaksinert fisk

Prøvetaking i samsvar med forsøksplan

- Muskulatur og andre organ
- Frå melaninflekkar og andre sjukdomsendringar

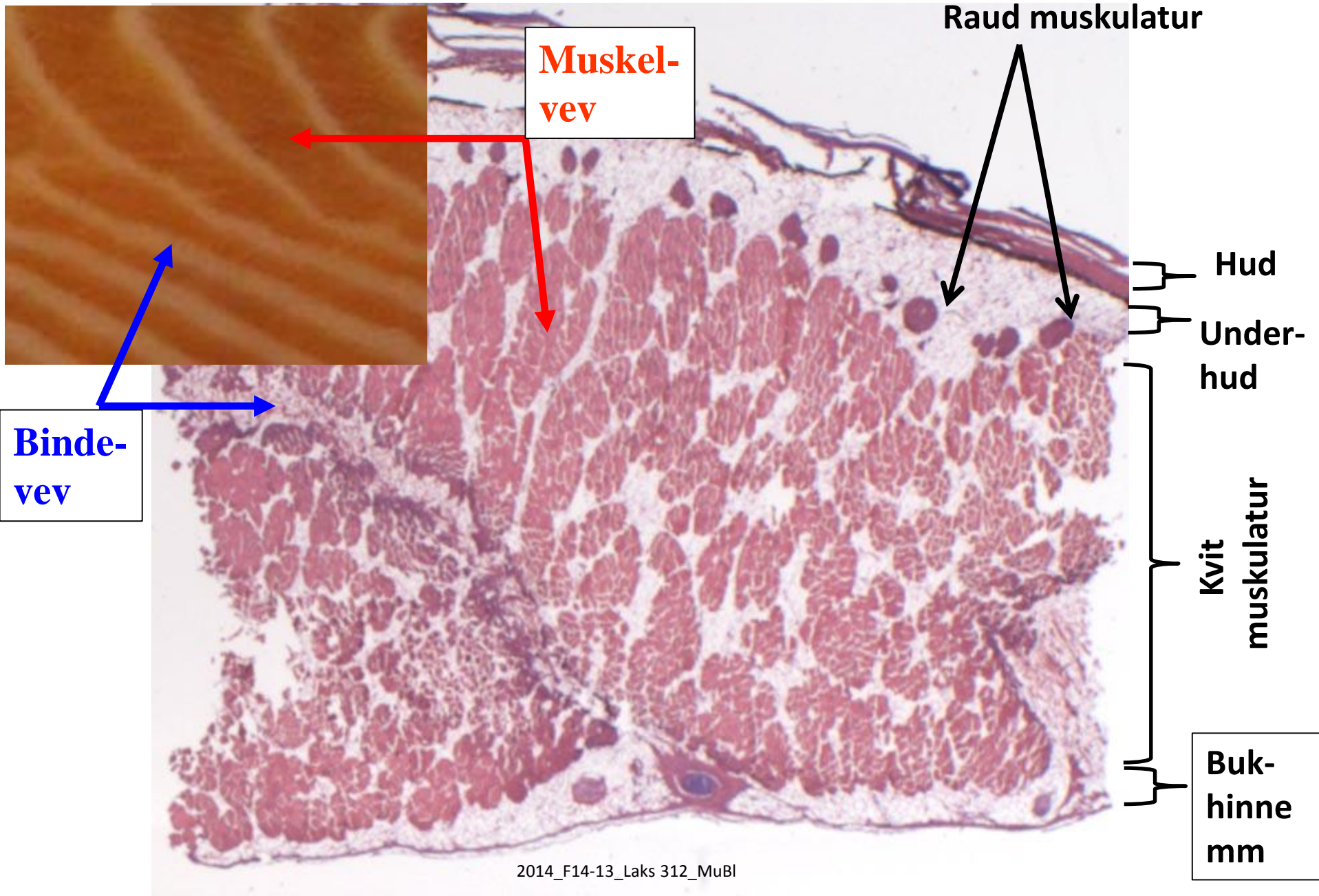
Formalin
Cryoblokk

RNA/ater kvit musk



Histologi mm

Histologisk snitt gjennom bukveggen



Farge på skjelettmuskulatur

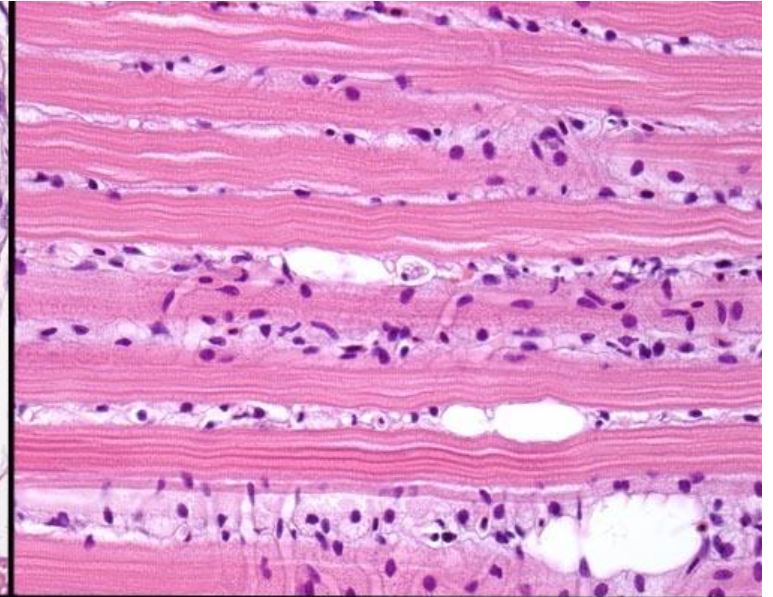
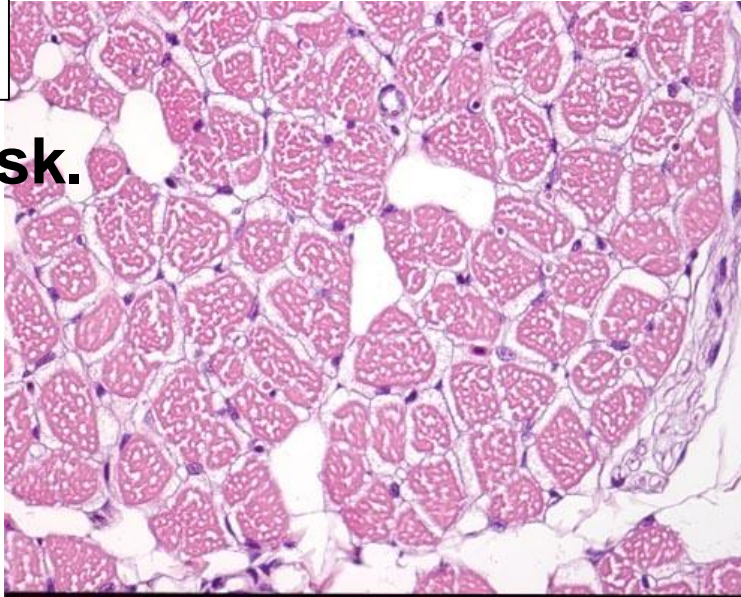
Astaxanthin i fôr	Raud musk.	Kvit musk.
Nei	Brun	Kvit
Ja	Brun	Orange

**Muskel-
vev**

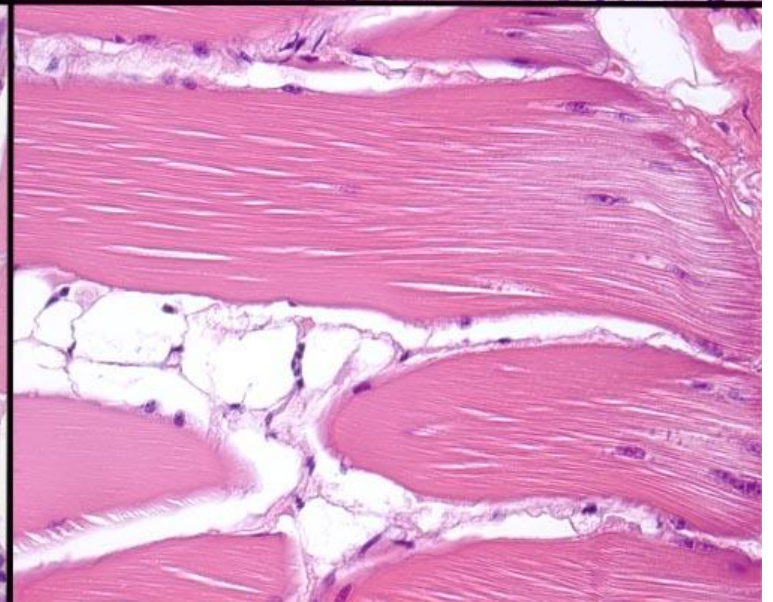
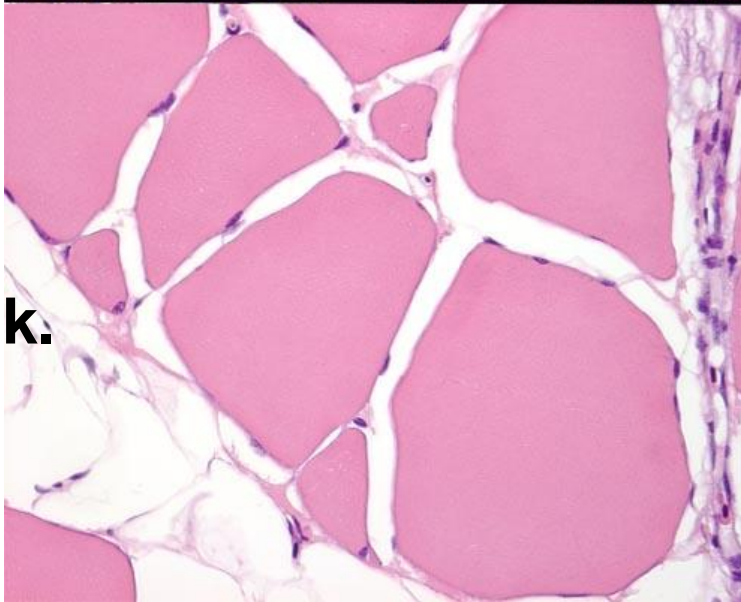
Tverrsnitt

Lengdesnitt

Raud musk.

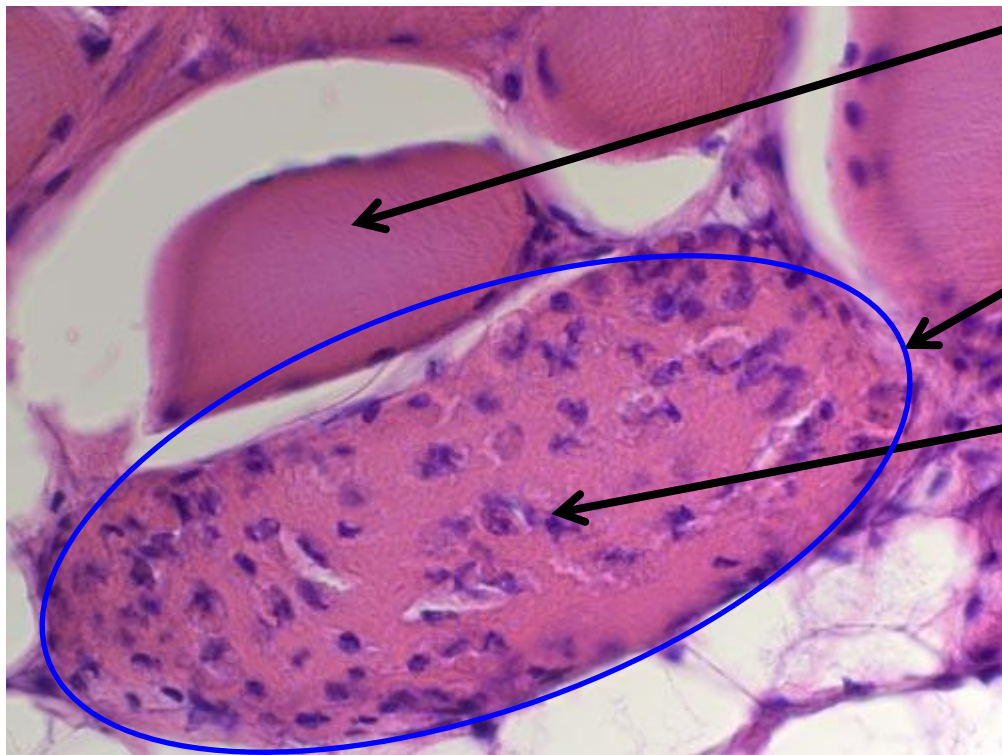


Kvit musk.



Sjukdomsendringer i kvit muskulatur i bukveggen

- **Døde muskelceller med innvandra kvite blodlekamar (makrofagar) som reinskar opp (dvs. betennelse)**
- **Vanlegvis observert svært få slike celler**



Normal muskelcelle i tverrsnitt

Død (degenerert) og betent muskelcelle

Makrofagar som fjernar cellerestane

All fisk undersøkt for slike endringer i bukveggen

Melaninflekkar

Registrert og undersøkt alle som kunne sjåast med auga

Spesielt var det teke prøvar frå dei minste og svakaste, som kan vere dei ferskaste

Histologi og melaninflekkar – 1-åringar

Prøvetakingstid	Celledød og betennelse		Melaninflekkar	
	Uvaksinert	Vaksinert	Uvaksinert	Vaksinert
1 – 2013 apr	0/20	-	0/20	-
2 – 2013 mai	0/10	0/10	0/10	0/10
3 – 2013 sep	1/10	0/10	0/10	0/10
4 - 2014 jan	0/7	0/8	0/10	0/10
5 - 2014 mar	0/7	2/10	0/7	2/10
6 - 2014 jun	3/14	1/13	1/15	1/15
7 - 2014 aug	0/13	1/14	3/15	1/15
Sum	4/81 fisk	4/65 fisk	4/87 fisk	4/70 fisk
Sum		8/146		8/157

Histologiske endringar og melaninflekkar

- Låg førekomst av begge det siste halvåret i sjøen
- Tilsynelatande ingen samanheng mellom desse
- Tilsynelatande ingen samanheng med vaksinasjonsstatus

Histologi og melaninflekkar – 0-åringar

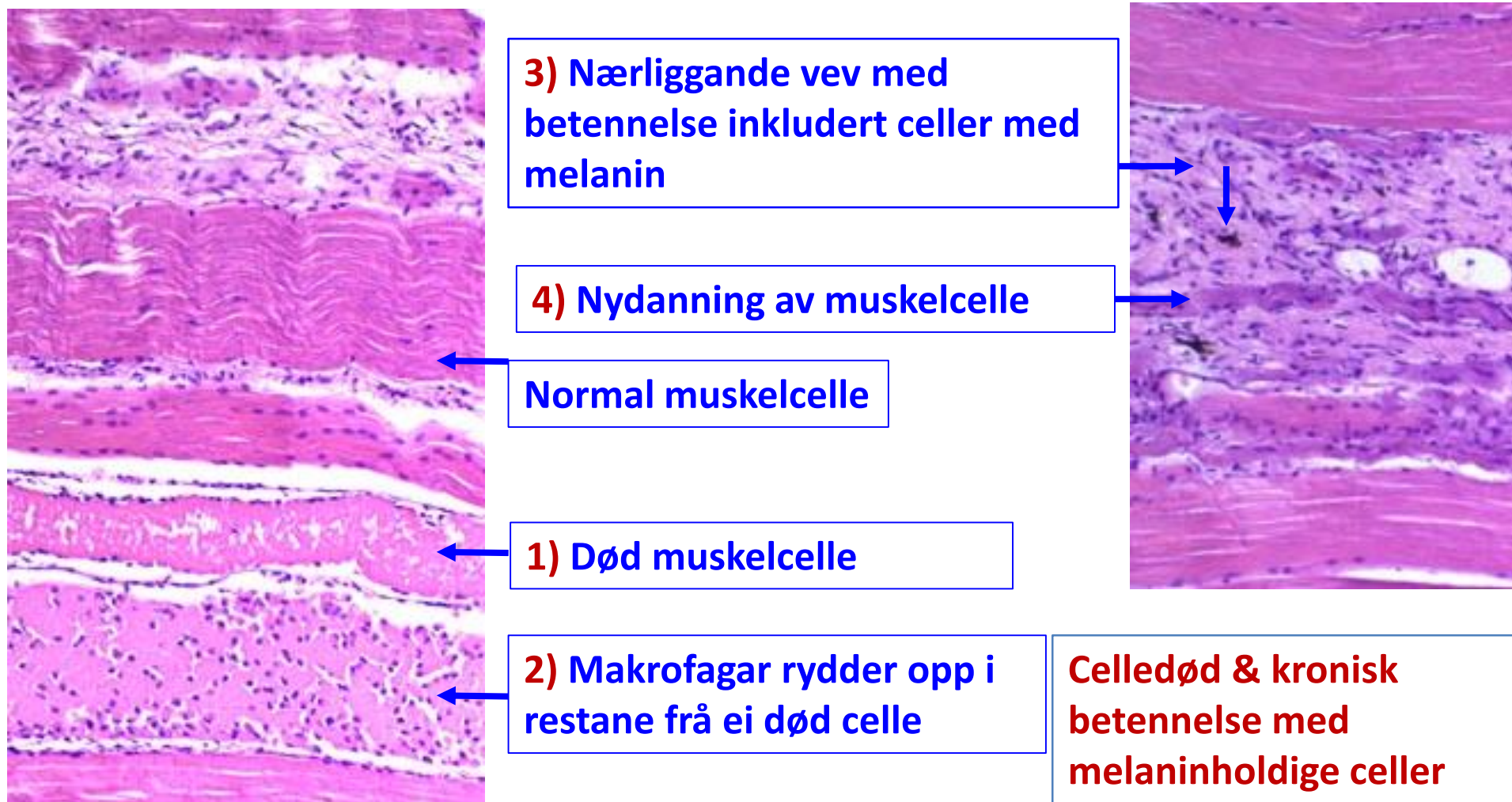
Prøvetakingstid	Celledød og betennelse				Melaninflekkar			
	Uvaksinert		Vaksinert		Uvaksinert		Vaksinert	
	8°C	16°C	8°C	16°C	8°C	16°C	8°C	16°C
1 – 2013 aug	-	-	-	-	0/10	0/10	-	-
2 – 2013 sep	-	-	-	-	0/10	0/10	0/10	0/10
3 – 2014 jan	0/5	0/5	0/5	0/4	0/10	0/10	0/10	0/10
4 - 2014 mar	3/10	3/10	2/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10
5 - 2014 jun	0/10	1/9	0/9	2/9	0/10	0/10	0/10	0/10
6 - 2014 des	1/8	3/8	3/8	2/8	2/8	5/8	2/8	4/8
7 - 2014 mar M	1/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	3/4	1/4
7 - 2014 mar H	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	0/4	1/4	0/4
Sum	5/41	8/40	6/40	7/35	6/66	5/66	6/56	5/56
Sum				25/156				22/244

Histologiske endringar og melaninflekkar

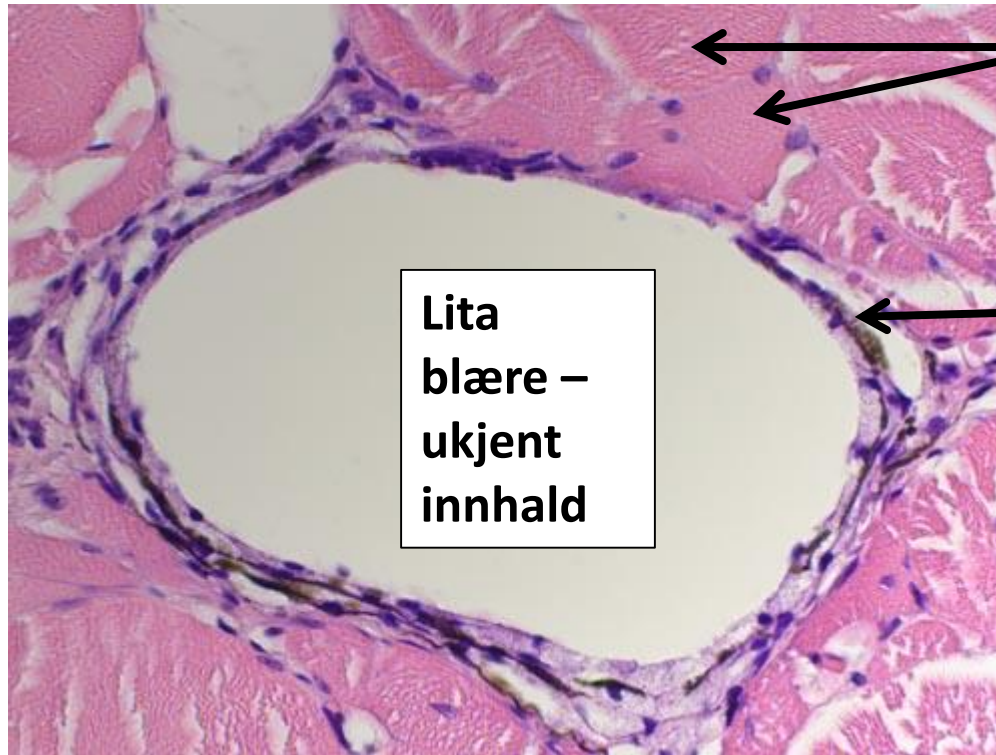
- Degen & myositt hjå ca. 1/6 & melaninflekkar hjå ca. 1/10 og
- Tilsynelatande ingen samanheng mellom desse
- Tils. ingen samanheng med vaksinasjonsstatus eller temp. i FV

Korleis utviklast melaninflekkar?

Histologiske undersøkingar tyder på denne rekkefølga: (1) muskelceller dør, (2) ein type kvite blodlekamar (makrofagar) invaderer disse cellene og ryddar opp, (3) i nærliggande vev oppstår kronisk betennelse med melanomakrofagar, som gjer at det ser svart ut. Her kan det også dannast nye muskelceller.



Melaninflekk i bukvegg



Kvite muskelceller

Melanin-haldige celler
og andre
betennelsesceller

Lita
blære –
ukjent
innhold

Konklusjon ut frå histologi:

Vevsskade i kvit muskulatur medfører ein kronisk betennelse der også melanin-haldige celler (melanomakrofagar) er til stades og resulterer i synleg mørk farge

Dersom denne betennelsen hadde føregått utan melanin hadde problemet vorte oppfatta som vesentleg mindre

Reaksjonar i immunforsvaret set i gang betennelsen

Immunforsvaret – typer av reaksjonar

- Alltid ein viss ståande beredskap
- I tillegg eit mobiliseringsforsvar etter at fisken er smitta med sjukdomsframkallande organismar (dvs. er infiserte)

Immunforsvaret – ulike trinn

- Sansing av smitte
- Går i «genarkivet» etter informasjon for å møte trussel
- Informasjon frå gener omsetjast til ny type informasjon – dette er mål på **genuttrykk** (genekspresjon), som avheng av årsak
 - Genuttrykk kan registrerast og lesast vha. metodar som **PCR**
- Omsett informasjon brukast så til å lage proteinar mm.
 - Proteinar kan påvisast ved t.d. **immuhistokjemi** på snitt
- Proteinar mm kan fungere som signal eller sensorar i immunforsvaret, vere bakteriedrepende (jfr. CRP) eller brukast til å lage fleire og større celler i immunforsvaret
- Immunforsvaret set i gang betennelsen («krigen»)
 - Målretta og tilpassa i styrke
- «Lærer av historia»

Genuttrykk og årsak(er)

- **Genuttrykk avheng av årsaker**
- **For å kunne seie noko om årsak er det difor viktig å undersøke slike **tidlege** reaksjonar**
 - **Det er gjort vha. kvantitativ PCR**

PCR-undersøking av melaninflekkar - 0- og 1-åringar

Normal kvit muskulatur med **bindevev (MYS, myosepta)** og i mellom område med **muskelvev (MYM, myomerar, myotomar)**



Prøvetaking frå område med **muskelvev (MYM)** og område med **bindevev (MYS)**

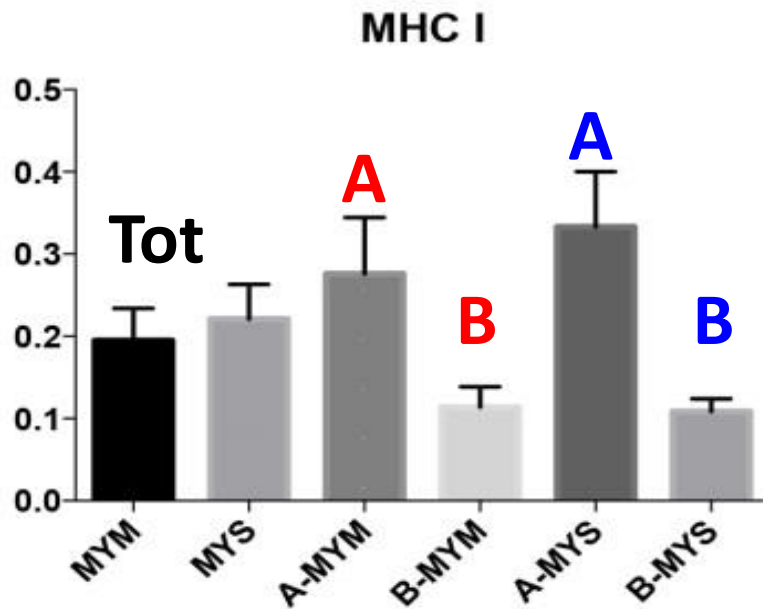


	Ikkje flekk		Flekk	
Type vev	MYM	MYS	MYM	MYS
Tal flekkar	13	10	13	10

Aktuelle gener, som kodar for:

- **MHC I og II (major histocompatibility complex class I & II)**
 - presentasjon av antigen for mobiliseringsforsvaret (adaptive immunsystemet)
 - MHC I – finst i alle celler
 - MHC II – spesielt i makrofagar og andre antigenpresenterende celler (APCs)
- **CD8 & CD4 (cluster of differentiation 8 & 4)**
 - ko-reseptorar for receptorar i T-lymfocytter når desse bind til høvesvis MHC I og II
 - CD8a (cluster of differentiation 8a) i cytotoksiske T-celler
 - CD4-2a i T-hjelpeceller

MHC I - reaksjonsvegen



A – muskelvev i flekk

A – bindevev i flekk

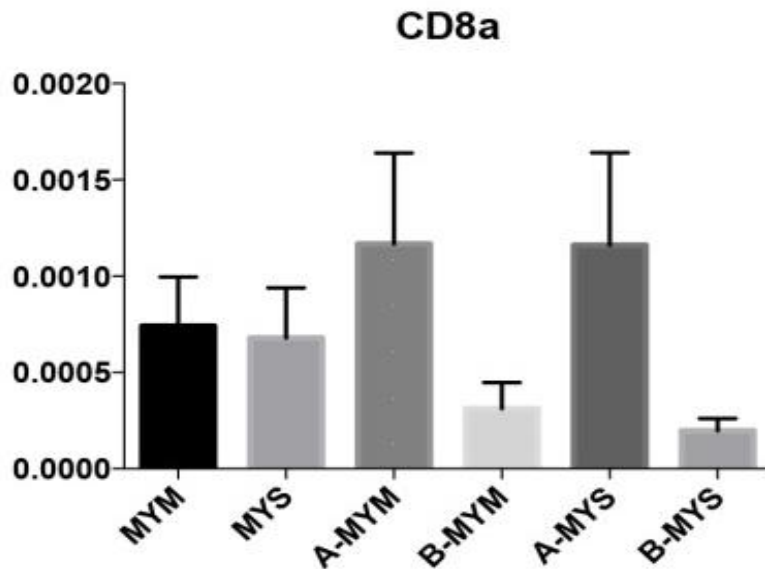
B – muskelvev utanfor flekk

B – bindevev utanfor flekk

Reaksjon mot mikroorganismar inne i celler, t.d. virus

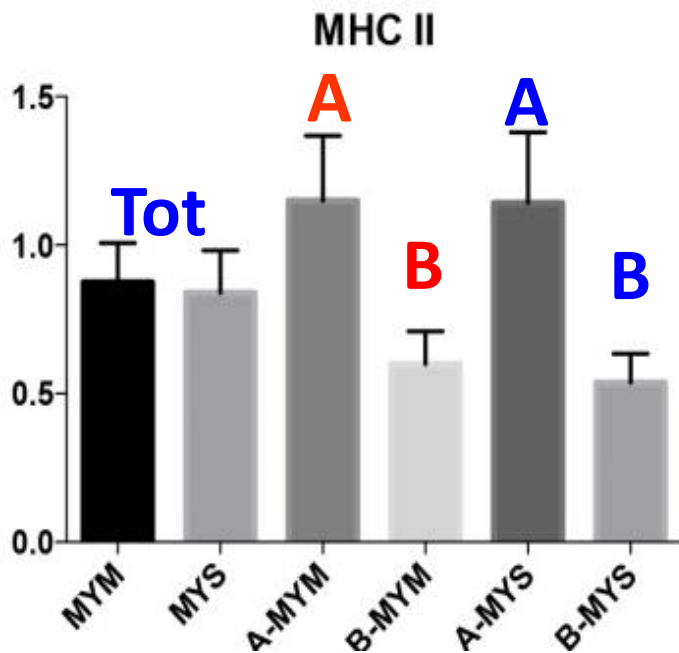
Infiserte celler med MHC I presenter byggesteinar frå mikroorganismar for kvite blodceller (cytotoksiske T-lymfocytar) med CD8

Auka uttrykk av gener for MHC I og CD8 i muskel- og bindevev, og kanskje høgst nivå av MHC I i bindevevet



Indikerer ein el. fleire mikroorganismar eller restar av slike

MHC II - reaksjonsvegen



A – muskelvev i flekk

A – bindevev i flekk

B – muskelvev utanfor flekk

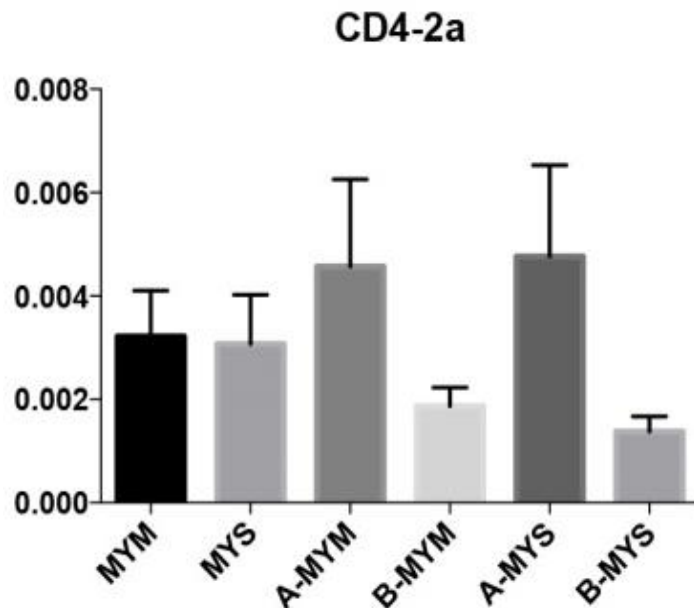
B – bindevev utanfor flekk

Reaksjon mot mikroorganismar eller komponentar av slike i vevsvæsker, dvs. på utsida av celler

Kvite blodceller (makrofagar) med MHC II presenter byggesteinar frå mikroorganismar for kvite blodceller (hjelp-T-lymfocytter, med CD4)

Auka uttrykk av gener for MHC II og CD4 i muskel- og bindevev i flekkar

Indikerer antistoffproduksjon mot ein el. fleire mikroorganismar eller delar av slike

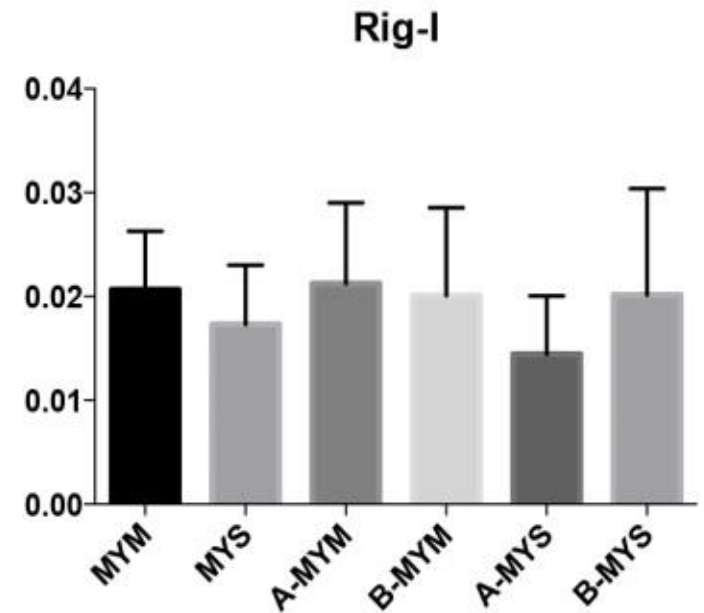
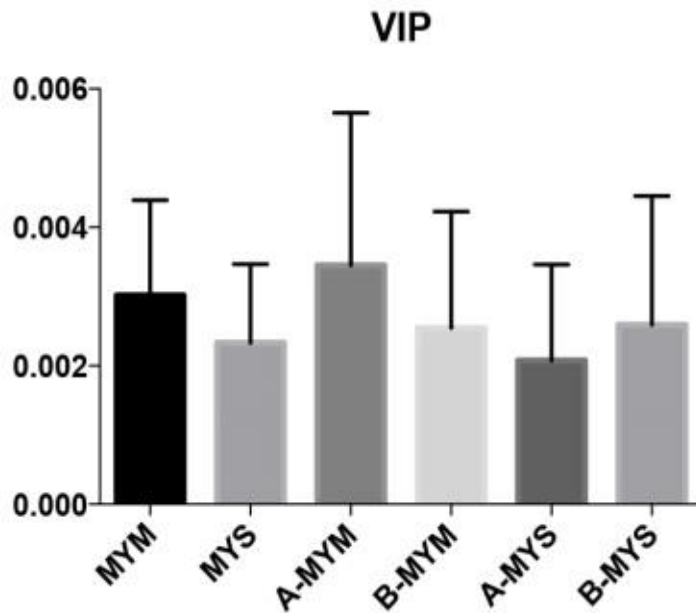


Indikatorar på virusinfeksjon

Viperin (VIP):
Protein som hemmar
fleire virus

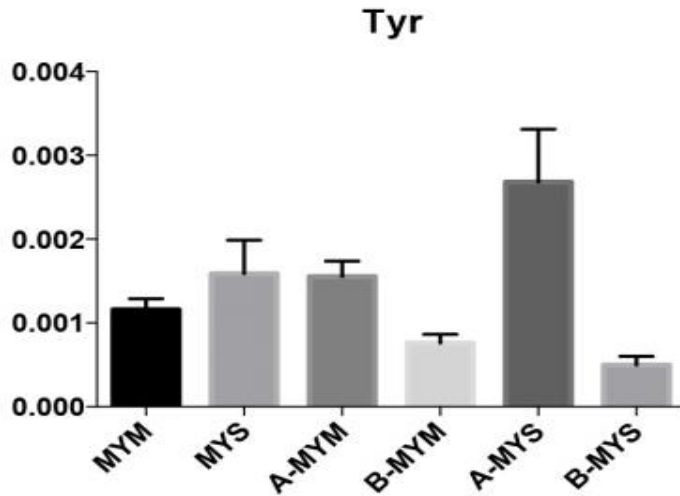
**Retinoic acid inducible gene-I
(RIG-I):**

ein type sensor (PRR) for
dobbelt-tråda RNA-virus hjå
menneske



Ikkje tydeleg endra uttrykk av desse genene

Indikator på melanin-produksjon



Konklusjon:

Genet for enzymet tyrosinase (Tyr) er

- tydeleg uttrykt i melaninflekkar, i spesielt i bindevev, i samsvar med det som er forventet (melaninhaldige celler førekjem i bindevev)

Genuttrykk - konklusjon

**Mikroorganismar eller byggesteinar frå slike (antigenar)
stimulerer immunforsvaret til reaksjon i melaninflekkar i kvit
muskulatur**

Piscine orthoreovirus (PRV)

Blodprøver frå det siste uttaket av 0-åringar i mars 2015.

Raude blodlekamar frå ca. 30 fisk vart undersøkte for PRV

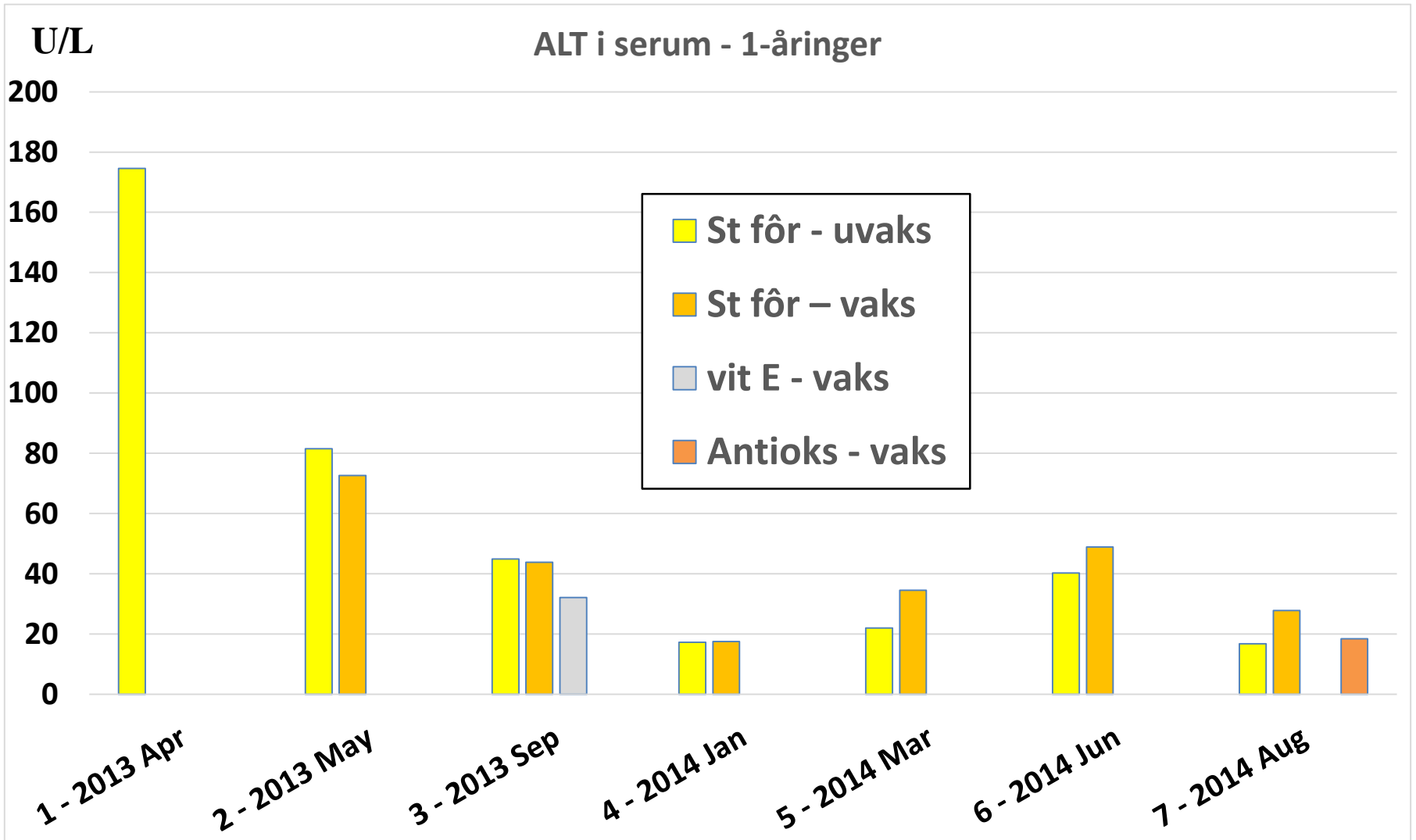
Viruset påvist i alle undersøkte prøvane

Virusinfeksjon er ikkje tilstrekkeleg årsak til melaninflekkar

Enzym i blod

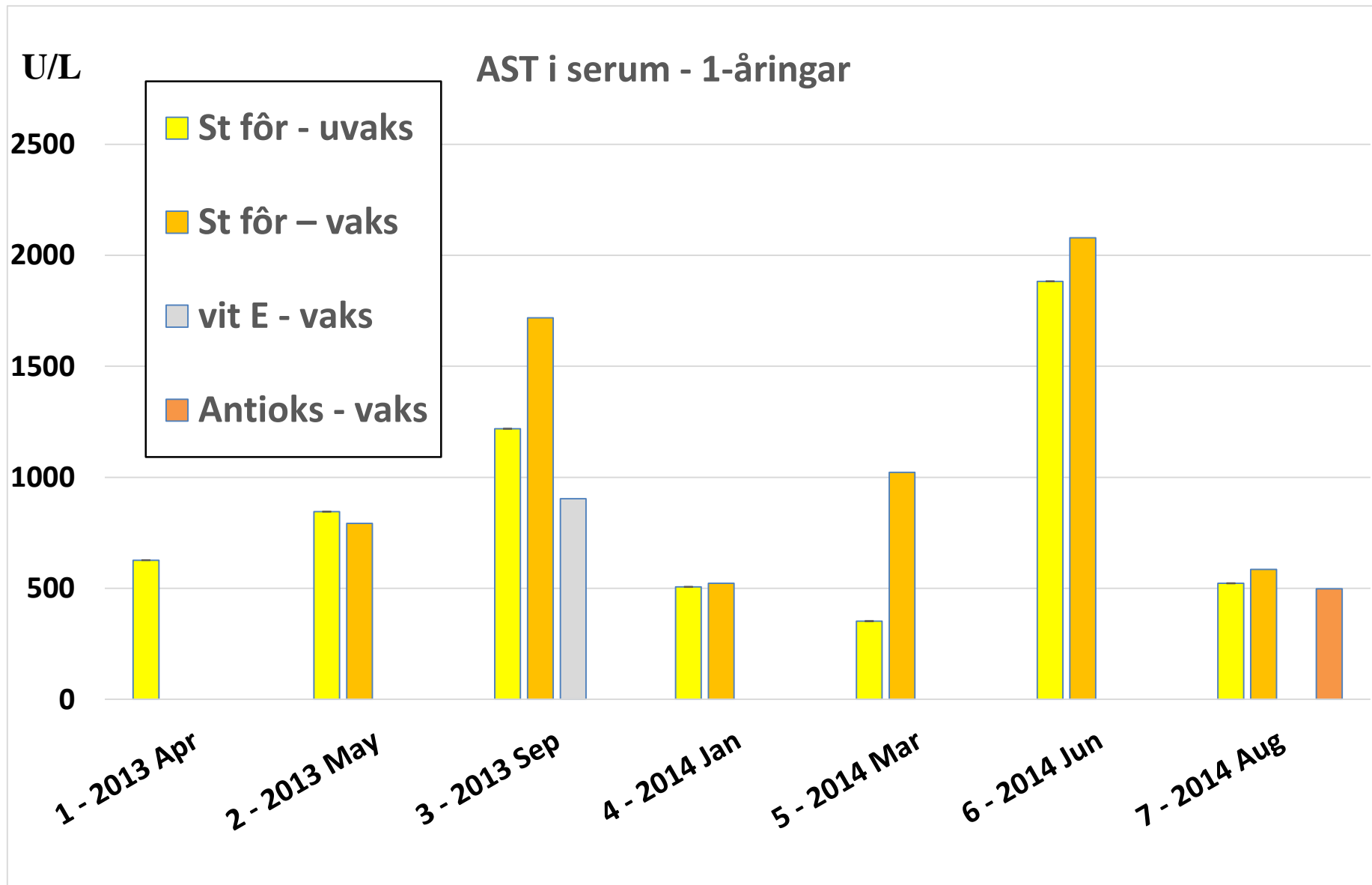
- Ved skade på celler i ulike organ kan enzym eller andre protein frå desse komme over i blodet, der dei kan påvisast ved kjemisk analyse. Jfr. troponin ved hjerteinfarkt
- Aktuelle enzym hjå fisk i denne samanhengen er
 - Aspartataminotransferase (**AST**, ASAT)
 - Alaninaminotransferase (**ALT**, ALAT)
 - Kreatin-kinase (**CK**)

Alaninaminotransferase (ALT)

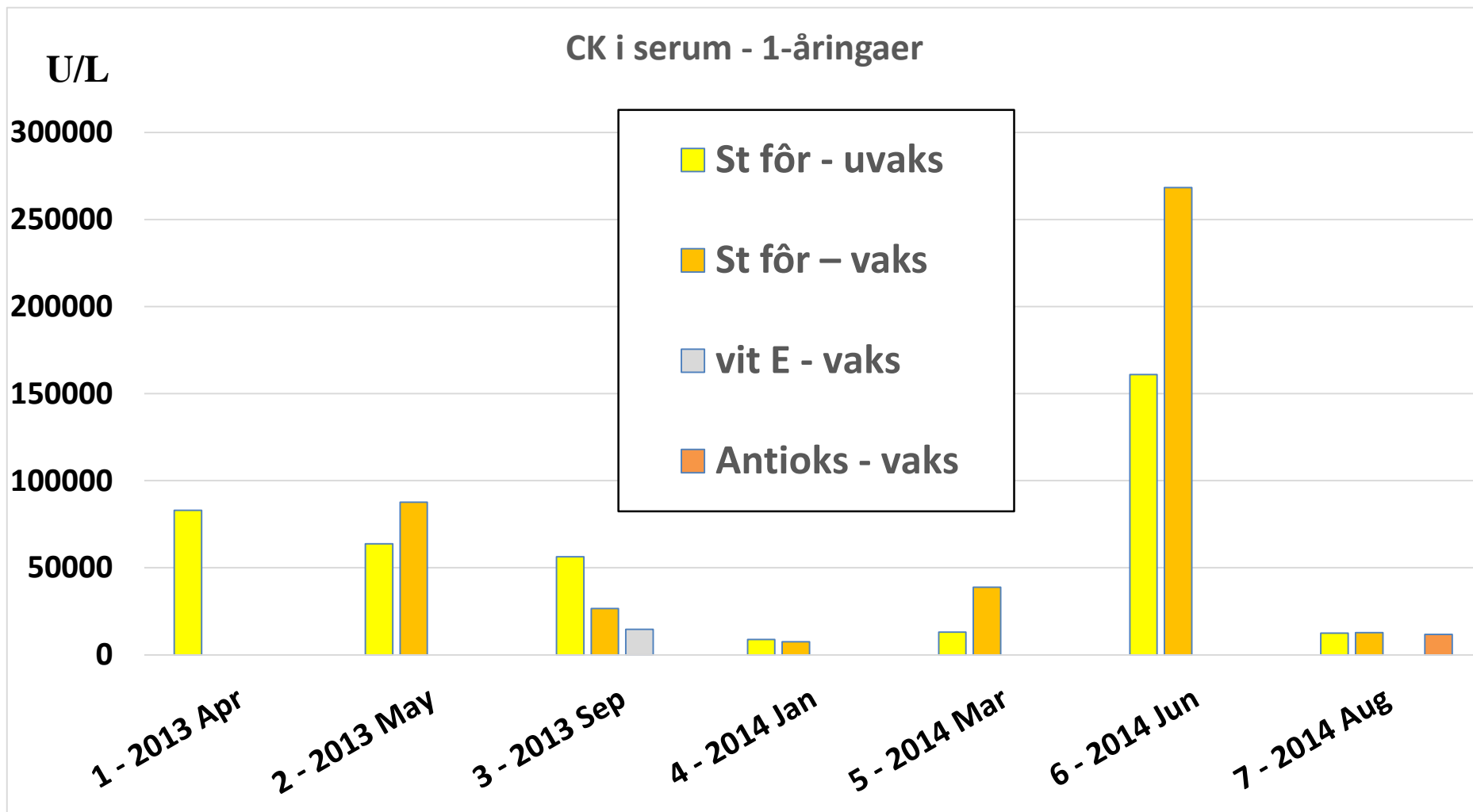


Lever og skjelettmuskulatur (Mommssen 2004)

Aspartataminotransferase (AST, ASAT)



Kreatin-kinase (CK)



Årsak til stiging i juni 2014: Utbrot av CMS?

Oppsummering

Ikkje påvist samanheng mellom melaninflekkar og celledød & betennelse utanom flekkar

Men celledød og betennelse i melaninflekkar

Flekkane har visse fellestrekk uansett lokalisasjon i muskulaturen

Auka uttrykk av gener (MHC I & CD8, MHC II & CD4) i melaninflekkar indikerer ein antigen-driven betennelse. Dvs. at heile mikroorganismar og/eller nokre av deira byggesteinar er til stades og stimulerer immunforsvaret

Høgt uttrykk for tyrosinase i bindevev i flekkar samsvarer med påvising av melaninhaldige celler, og viser melanin-dannelse i flekkane

PRV er tilsynelatande ikkje ei tilstrekkeleg årsak til flekkar

Årsakstriaden:

Infeksjonar, immunreaksjonar, betennelse og sjukdom

er resultat av

vekselverknader mellom

laks og bestemte faktorar (som bestemte virus)

under påverknad av miljøet

Faktorar/årsaker: Naudsynte, tilstrekkelege eller medverkande