

Betydning av ILAV HPR0 for utbrudd av ILA



Betydning av ILAV HPR0 for utbrudd av ILA

Innhold

Sammendrag	3
Summary	4
Innledning	5
Metode	6
Delprosjekt 1:.....	6
Delprosjekt 2:.....	6
Delprosjekt 3.....	6
Resultater	7
Delprosjekt 1.....	7
Delprosjekt 2.....	14
Delprosjekt 3.....	17
Diskusjon	19
Leveranser av resultater fra prosjektet	20
Oppsummering	22
Acknowledgement	22
Referanser	22

Prosjektgruppe/ Forfattere

Edgar Brun (prosjektleder)
 Maria Aamelfot
 Lars Qviller
 Trude Marie Lyngstad
 Anja Bråthen Kristoffersen
 Hilde Sindre
 Knut Falk

Oppdragsgiver: FHF (Fiskeri- og
 havbruksnæringens forskningsfond)

Design omslag/Design Cover: Reine Linjer
 Foto forside / Photo front page: Rudolf Svendsen,
 UW Photo

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2018

Sammendrag

Prosjektet støtter hypotesen om at ILAV HPR0 kan gi opphav til ILAV HPR-del, altså at den ikke-virulente varianten kan mutere og tilegne seg virulente egenskaper. Dette skjer sannsynligvis i en trinnvis prosess hvor virulensen gradvis økes. Endring i celletropisme hos ILAV representerte en nøkkelfaktor for denne virulensutviklingen, og lav virulens kan sannsynligvis knyttes til virusets evne til effektiv replikasjon.

Prosjektet hadde som en av sine målsetninger å finne dyrkningsmetode for HPR0 ILAV -varianten. Dette greide vi ikke å oppnå. Til tross for dette er det i prosessen etablert en rekke nye cellelinjer fra ulike organer, hvorav to er mottakelige for virulent ILAV. Flere av disse er nå tatt i bruk som redskaper i in vitro-studier på laks, og virker også lovende i tilknytning til transfeksjonsstudier som ble igangsatt som et alternativ for dyrking av HPR0 ILAV. Prosjektet har gitt Veterinærinstituttet god erfaring i å jobbe med problemstillingen knyttet til HPR0 ILAV-dyrking, noe som er viktig for instituttets arbeid for å være i forkant med dyrkningsmetoder for ulike virus/virusvarianter inkl. HPR0, opprettholde et stort cellebibliotek og ha høy kompetanse på celledyrking.

Etablering av smittemodell for HPR0 ILAV ble mislykket pga. Saprolegnia-kontaminasjon. Forsøket ble igangsatt sent i prosjektperioden, og kunne av tidsmessige årsaker ikke gjentas.

I vårt ILA-materiale er mindre enn én prosent av alle registrerte ILA-tilfeller mellom 2004- 2016 knyttet til ukjent smitteopphav, såkalte primærutbrudd, dvs. utbrudd som ikke direkte er forårsaket av nabosmitte eller annen kjent smittekontakt. Denne prosentandelen kan derved legges i kategorien «ikke-kjent smittekilde» som vil si ukjent reservoar og/eller et resultat av at HPR0 ILAV har mutert til virulent ILAV. Prosjektet har framskaffet dokumentasjon om risikofaktorer som er assosiert med slike primærutbrudd. I vårt materiale er slike faktorer knyttet til langvarig stress og høye tettheter, blanding av populasjoner og tidligere virusinfeksjoner i fiskegruppen som for eksempel IPN (immunsuppresjon), som kan være med skape gunstige forhold for viruset på bekostning av verten.

Prosjektet dokumenterer igjen de smitemessige konsekvensene ved bruk av ulike slaktestrategier ved utbrudd. Erfaring har vist at de bekjempelsestiltakene som er vanlig i dag, fungerer godt dersom alle prosedyrer følges fra starten av. Dette innebærer bl.a. tidlig påvisning og tidlig reaksjon for å stoppe et utbrudd og hindre videre spredning til nabolokaliteter. Fremtidig håndtering av ILA bør derfor ha fokus på å oppdage utbrudd så tidlig som mulig, og deretter følge opp med effektive tiltak for å hindre horisontal smitte. Prosjektet har i denne sammenhengen utviklet en nettapplikasjon som vil kunne bidra raskt å identifisere hvilket risikonivå et anlegg har i forhold til en utbruddslokalisitet.

To interessante problemstillinger i denne sammenhengen kom fram i arbeidsgruppemøtet som ble avholdt i regi av prosjektet i april -17; Det ene er manglende kunnskap om ILA som bl.a. inkluderer erfaring med å gjenkjenne kliniske/patologiske tegn som del av den primære felt-diagnostikken av ILA. Videre ble det påpekt den potensielt lange forvaltningsmessige runden som lov-verket innbyr til ved forvaltningsvedtak. Dette er forhold som begge bidrar til at ILA kan utvikle seg i lengre tid på en lokalitet før smittebegrensende tiltak iverksettes.

Prosjektet har i stor grad greid å utnytte parallelle prosjekt og ressurser slik at produksjonen assosiert til dette prosjektet har vært betydelig. Det er publisert fire artikler i internasjonale peer-review tidsskrift, en er sendt til publisering og en er i manus-form og vil sendes til publisering i løpet av kort tid. Det planlegges ytterligere 2- 3 artikler i denne kategorien. Prosjektet har publisert to artikler i Norsk Fiskeoppdrett og avhold en workshop med ca. 90 deltakere. Prosjektet har hatt 16 orale presentasjoner i inn- og utland.

Summary

The project supports the hypothesis that HPR0 ISAV can give rise to the HPR del ISAV, i.e. the non-virulent variant can mutate and acquire virulent properties. This is likely to happen in a step-by-step process where virulence is gradually increased. The change in cellular tropism of ILAV represented a key factor for this virulence development, and virulence is likely to be linked to the virus' ability to replicate efficiently.

One of the objectives in the project was to find a way to cultivate the HPR0 ISAV variant. We did not manage to achieve that. Despite this, the process has established a number of new cell lines from different organs, two of which are susceptible to virulent ISAV. Several of these cell lines have now been used as tools for in vitro studies on salmon, and they are also promising in connection with transfection studies initiated as an alternative to the cultivation of HPR0 ISAV.

The project has given the Norwegian Veterinary Institute valuable experience in working with HPR0 ISAV cultivation, which is important for the Institute's efforts to be in the lead of developing cultivation methods for various viruses / virus variants including HPR0, maintaining a large cell library and high expertise in cell cultivation.

Our trial to establish an infection model for HPR0 ISAV failed due to Saprolegnia contamination. The trial was initiated late in the project period and could not be repeated for reasons of time.

In our ISA material, less than one percent of all registered ISA cases between 2004 and 2016 are associated with unknown infected origin, so-called primary outbreaks, ie outbreaks that are not directly caused by neighbor contact or other known infectious contact. This percentage thus covers unknown reservoirs and / or HPR0 ISAV mutating to virulent ISAV. The study did not aim to differentiate between these categories.

The project has provided risk factors that are associated with primary outbreaks. In our material, such factors are associated with prolonged stress and high fish density, mixing of populations and preceding viral infections in the fish group, such as IPN (immunosuppression), which all may create favorable conditions for the virus on the expense of the host.

The project documents the consequences of using different slaughter strategies for ISA outbreaks. Experience has shown that measures commonly known and used today work well if all procedures are followed from the start. This implies, inter alia, early detection and early reaction to stop an outbreak and initiating measures to prevent further spread to neighboring locations. Future management of ISA should therefore focus on detecting outbreaks as early as possible and then follow up with effective measures to prevent horizontal transmission. In this context, the project has developed a web application that will quickly identify the level of risk a site has in relation to an outbreak site.

Two interesting issues in this context emerged during the workshop held in April -17; firstly, the lack of knowledge about ISA, which includes lack of experience with clinical / pathological signs as part of the primary field diagnostics of ISA. Secondly, the consequences of "unnecessary" spreading due to long-term administrative procedures to reach a final conclusive decision were pointed out. Both these issues contribute to allowing the stock keep spreading virus for a long period of time before controlling measures are agreed on and implemented.

The project has largely managed to exploit parallel projects and resources so that the production associated with this project has been significant. Already four articles are published in international peer review journals, one is submitted and one is in script form and will be submitted for publication shortly. Additional 2-3 papers are planned in this category. More directed to the industry, the project has published two articles in the Norwegian industry journal "Norsk Fiskeoppdrett" and arranged a workshop with approx. 90 stakeholder participants. The project has given 16 oral presentations at home and abroad.

Innledning

Infeksiøs laksanemi (ILA) oppstod som et sykdomsproblem på midten av 80-tallet, og var sammen med kaldtvannsvibriose, av de første nye sykdommene som ble beskrevet i den norske voksende lakseoppdrettsindustrien.

Da en tidlig så den potensielt katastrofale effekten ILA kunne påføre industrien, ble det på slutten av -80 tallet satt opp en koordinert innsats for å begrense skadeomfanget av ILA, som inkluderte industrien selv, myndigheter og forskningsinstitutter gjennom prosjektet "Stopp ILA-kampanjen". Et trepartssamarbeid som senere har blitt ett kjennetegn for norsk akvakultur og sykdomsbekjempelse.

Kampanjen inkluderte forsterket forskningsinnsats og utarbeidelse og innføring av en rekke epidemiologiske og biosikkerhetsmessige tiltak som fokuserte bla. på brakklegging, flytting av fisk, generasjonsadskillelse, helseattester og innføring av kontroll- og bekjempelsessoner. ILA ble først knyttet til et ukjent infeksiøst agens, og som i 1995 ble isolert i cellekultur og noe senere ble karakterisert som et akvatisk orthomyxovirus tilhørende samme familie som influensavirus (ILA virus (ILAV)).

Helt fra begynnelsen av skulle bekjempelse av ILA hindre smittespredning fra syk og infisert fisk, og generelt begrense smittespredning mellom anlegg og fiskegrupper i sjø. Det ble ikke iverksatt tiltak med målsetning å utrydde viruset. Gjennom de snart 35 årene som har gått siden ILA først ble påvist, har derfor sykdommen vært å anse som endemisk hos norsk oppdrettslaks. ILA som klinisk sykdomsproblem i næringen opptrer derfor årlig, fra ett eller noen få enkeltstående, isolerte utbrudd til lokale epidemier som kan involvere flere lokaliteter.

Ett av de store spørsmålene i forbindelse med ILA-utbrudd har vært hvordan de enkeltstående, isolerte utbruddene oppstår. I 2002 ble det rapportert at det finnes to hovedvarianter av ILA-virus (Carrey et al 2002, Mjaaland et al, 2002). Den ene varianten isoleres alltid i forbindelse med sykdom, og er en virulent (patogen) form av viruset (HPR-del ILAV) hvor den hypervariable regionen i segment 6 i virusgenomet har mistet en eller flere aminosyrer. Den andre varianten (HPR0 ILAV) knyttes ikke til klinisk ILA-sykdom, og ansees som en ikke-virulent form av viruset. Denne varianten har alle basepar på plass i den hypervariable HPR-delen av segment 6. ILAV-HPR0 er en variant som er spesielt godt beskrevet fra lakseoppdrett på Færøyene, og er hyppig isolert fra gjeller hos oppdrettslaks også i Norge. Det ble postulert at denne ikke-virulente formen er opphavet til de ulike virulente formene, og at mange av de isolerte utbruddene har sitt opphav i HPR0-ILAV som utvikles (muteres) til den virulente varianten (HPR-del ILAV). Differensiering mellom disse variantene skjer i dag ved gensekvensering. Mens HPR-del ILAV-varianten lett lar seg dyrke i cellekultur, har en så langt ikke greid å holde HPR0-ILAV aktivt i kultur over flere passasjer.

Hypotesen om at HPR0 ILAV kan mutere til HPR-del ILAV har fått gjennomslag i OIE, som besluttet å gjøre HPR0 ILAV internasjonalt rapporteringspliktig fra og med 2014. OIE er verdens dyrehelseorganisasjon (www.oie.int) som vedtar internasjonalt godkjente retningslinjer og prosedyrer med formål å redusere risikoen knyttet til handel med dyr og dyreprodukter (inkludert akvatiske dyr). Smittestoff som blir tatt opp på OIE sine lister, gir enkeltland mulighet til å implementere handelsregulerende restriksjoner på import fra land som ikke kan dokumentere fravær av aktuelle smittestoff. Dette betyr en betydelig økt handelsmessig trussel for norsk eksport fordi HPR0 ILAV synes å være hyppig forekommende også i norsk oppdrettslaks.

Bedre kunnskap om HPR0 ILAV er derfor viktig, og ikke minst kunnskap om drivere for eventuelle mutasjonsprosesser (for eksempel lokalitetsrelatert forhold, driftsmessige forhold, stressdrivende faktorer osv.), mekanismer og utviklingstrinn vil være av stor betydning for den praktiske forståelsen av risiko knyttet til HPR0 ILAV og eventuelt forebygging av ILA-utbrudd utløst av HPR0 ILAV.

Dette prosjektet hadde som mål å belyse noen av disse områdene; legge grunnlag for en bedre forståelse av HPR0 ILAV som mulig forløper til den virulente utgaven av viruset (HPR-del ILAV), i hvilken grad denne mutasjonshypotesen kan etterprøves og støttes, utvikle modell for dyrking av HPR0 og smitteforsøk, samt

evaluere den epidemiologiske risikoprofilen til enkeltlokaliteter og mulighet for tidlig påvisning av gryende ILA utbrudd (early detection).

Metode

Prosjektet ble delt inn i tre ulike delprosjekt med følgende oppgaver

Delprosjekt 1

- Samle inn HPR0-positivt materiale egnet for laboratoriestudier (usikker kvalitet på allerede tilgjengelig materiale)
- Fullgenomsekvensere lavvirulent HPR-deletert ILA virus og korresponderende HPR0-variant, sammenligne disse, og vurdere ulikheter i forhold til et høyvirulent HPR-deletert ILA virus. Identifisere genetiske markører som kan si noe om hvor langt et virus er kommet med tanke på utvikling til høyvirulent HPR-deletert ILA virus og hvilke strukturer som endres.
- Utvide analyseringen av data fra et gjennomført smitteforsøk for å se på fellestrekk ved patogenesen/infeksjonsevnen knyttet til HPR0- infeksjon og infeksjon med det lavvirulente HPR-deleterte ILA virus.
- Passere det lavvirulente HPR-del ILA viruset både i cellekultur og i smitteforsøk under ulike betingelser for å fremprovosere en virulensøkning, og undersøke faktorer som påvirker overgangen fra HPR0/ lavvirulent HPR-del ILA virus til høyvirulent ILAV.
- Smitteforsøk med HPR0 for å karakterisere viruset og infeksjonen; Injeksjonssmitte med ILAV HPR0-materiale vil kombineres med *in vivo*-transfeksjon av fisk. Denne metoden er allerede etablert på Veterinærinstituttet i tilknytning til et annet prosjekt finansiert av FHF.
- Isolering av HPR0 i cellekultur; Våre langtidscellekulturer vil inokuleres med ILAV HPR0-positivt materiale under ulike betingelser. Hvis virus oppformerer i cellene, vil dette følges over tid for å karakterisere eventuelle endringer i virusgenomet.

Delprosjekt 2

- Analyse og karakterisering av faktorer som kan assosieres med at ILA utbrudd (uten kjent smittekilde) oppstår; for eksempel mangelfulle brakklegging rutiner, lokal biomassetetthet, dødelighet, sjøtemperatur, avstand til slakteri, avstand til transport led, andre sykdommer, lusebehandling osv. Analysen vil ta utgangspunkt i historiske ILA utbrudd fra 2004 til 2016, havbruksdata og journaldata fra Veterinærinstituttet
- Analyse av risiko for videre lokal spredning av virulent HPR-deletert ILAV for perioden 2004-2016, herunder vurdering av mulighet for å kunne begrense spredning ved rask utslakting av merd og hele anlegg (samarbeid med Biosikkerhetsprosjektet ved Veterinærinstituttet).
- Utvikle en metode for rangering av enkelt-lokaliteters risiko for å få ILA gjennom å beregne et kvantitativt risikoestimat for hver lokalitet. Grunnlaget for metoden vil fare for videre lokal spredning (introduksjon/ utslipp) av virulent HPR-del ILAV når det oppstår nye ILA utbrudd gjennom videreutvikling av ILA spredningsmodell (Aldrin et. al 2011), og kunnskap generert gjennom analyse av risiko som nevnt over.

Delprosjekt 3

Invitere ulike stakeholders fra myndigheter, næring og forskningsmiljø til faglige innlegg, aktivt diskusjons- og arbeidsmøte på temaer av betydning for kontroll av ILA. Det ble opprettet en programkomité bestående av; Trude M Lyngstad, Maria Aamelfot, Edgar Brun (alle Veterinærinstituttet), Bjarne Johansen (Nordlaks), Magnhild Daltveit (Mattilsynet) og Eirik Sigstadstø (FHF).

Resultater

Delprosjekt 1

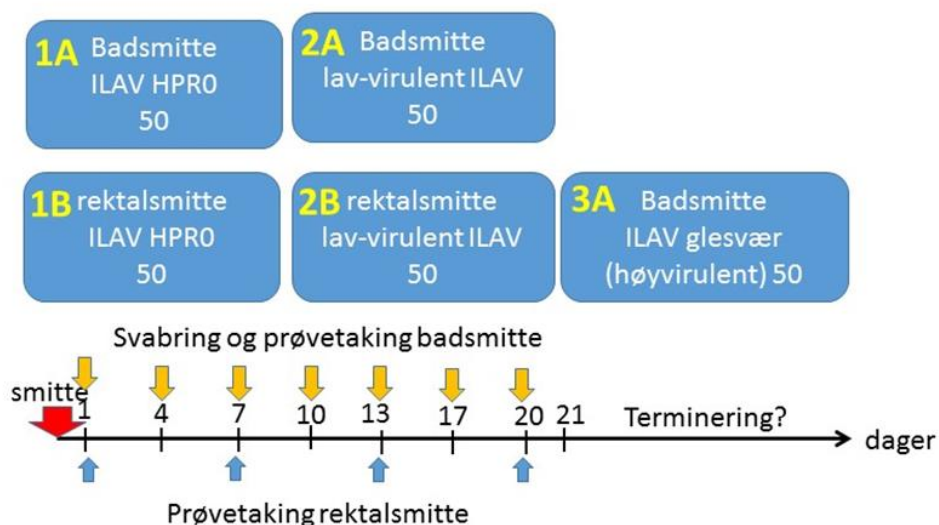
Samle inn HPR0-positivt materiale egnet for laboratoriestudier

I løpet av prosjektperioden er det samlet inn vev på transportmedium (gjelle, hjerte, nyre) fra til sammen 6 anlegg hvor ILAV HPR0 var påvist gjennom screening/diagnostikk. For 2 av disse anleggene kunne ILAV HPR0 påvises i det innsamlede vevet. Det innsamlede materialet er benyttet både til smitteforsøk og til *in vitro*-infeksjon av ulike cellekulturer.

Smitteforsøk med HPR0 for å karakterisere viruset og infeksjonen

En har til nå ikke greid å dyrke lavvirulente infeksjøs lakseanemivirus HPR0 på celler i laboratoriet og det er derfor vanskelig å studere effekten viruset har på fiskeceller. Til nå har vi brukt materiale fra kjente utbrudd av infeksjonen i felt, men for å kunne studere infeksjonen bedre har vi behov for en smittemodell. Tidligere forsøk på injeksjonssmitte med HPR0 virus har ikke vært suksessfulle. Vi tester derfor ut 2 nye måter å smitte fisken på basert på kunnskap vi har tilegnet oss fra feltmateriale, fra arbeid med mer virulente former av ILA-virus og fra utvikling av smittemodeller for andre virussykdommer hos laks. Et skjematisk oppsett for smitteforsøket er presentert i Figur 1.

Smitteforsøk - oppsett

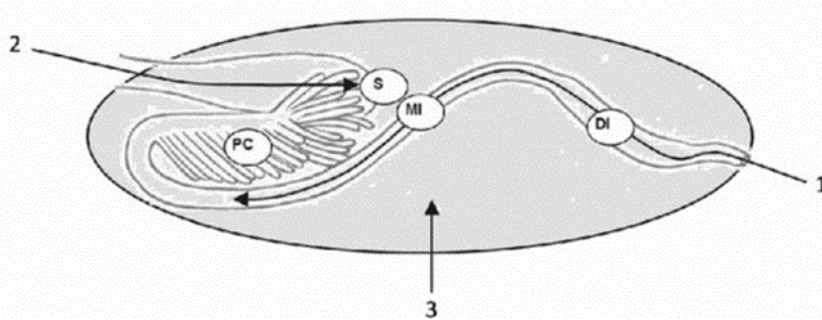


Figur 1. Forsøksdesign for gjennomføring av smitteforsøk.

Badesmitte ble utført ved å tilsette oppformert virus i et kar med ca. 60 liter vann. Fiskene ble utsatt for smitte i 2 timer, uten tilførsel av nytt vann. Vannet ble luftet via en slange for å sørge for tilstrekkelig oksygenering under smitten. Etter 2 timer ble vanntilførsel og avløp åpnet og vannivået ble justert til normalt nivå, ca. 150 liter. Virus som ikke hadde festet seg på fisken vil dermed forsvinne med avløpsvannet raskt. Dette gjør at smittetidspunktet er kjent (+/- 1time).

For ILAV HPR0 var det ikke mulig å titrere virus i forkant av infeksjon, men mengden virus tilsatt i badet innebar en 1:10 000 fortykning av en utgangssuspensjon med Ct-verdi på 25. Smittedosen for det lavvirulente- og det høyvirulente ILA-viruset var 10^4 TCID₅₀. Dosen er basert på beregninger før smitten ble utført og konfirmert ved titrering av selve badevannet.

Rektalsmitte ble utført som beskrevet i Hauge et al, Vet Res 2016 (Figur 2). 100 µl av virussuspensjon (av samme konsentrasjon som ble tilsatt til vannet i badesmitte) ble deponert i midttarm (MI) gjennom bruk av føringstube for mus.

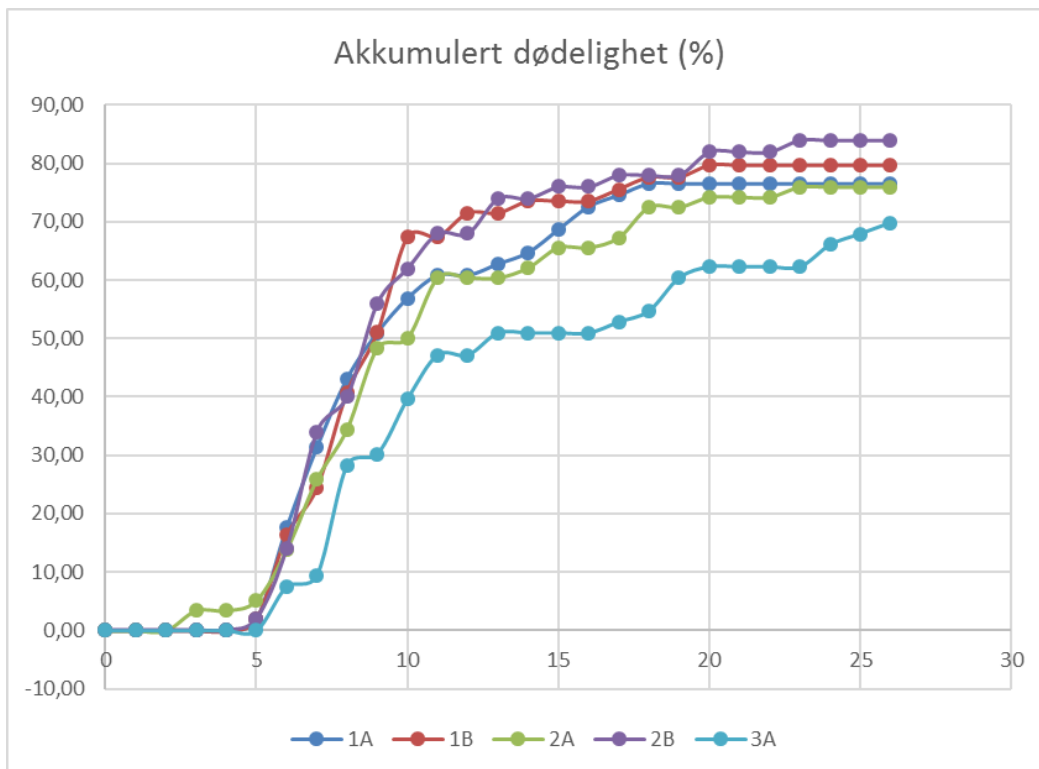


Figur 2. Metode for gjennomføring av rektalsmitte. (ref. Hauge H et al, 2016).

Det ble i utgangspunktet lagt opp til prøvetaking hver 3. dag med start 1 dag etter infeksjon med ILA virus. For svaberprøver skulle 10 fisk fra hvert kar håves, lett sederes og svabres langs sidelinjen på fisken, og deretter settes tilbake i samme kar. I tillegg skulle 4 fisk prøvetas for diverse organer hver 3. dag fra de badesmittede karene og hver 6. dag for de rektalinfiserte karene. (Organer for prøvetaking på RNAlater var svaber, blod, gjelle, hjerte/nyre, milt, midttarm, baktarm, mens det ble tatt ut full organpakke på formalin for histologi).

Resultater

Til tross for forebyggende tiltak, begynte laksen i forsøket ganske raskt å vise tegn på saprolegnia-infeksjon i form av sår i huden. Etter 3 dager ble det også detektert dødelighet. Denne dødeligheten oppsto altfor tidlig til å kunne relateres til ILAV (Figur 3).



Figur 3. Dødelighetskurver fra ulike kar i smitteforsøkt. 1A: badesmitte med HPR0 ILAV; 2A: badesmitte med lavirulent ILAV; 1B rektalsmitte med HPR0 ILAV; 2B rektalsmitte med lavvirulent ILAV; 3A badesmitte med høyvirulent ILAV (jfr Figur 1)

På grunn av den observerte dødeligheten og sårskadene, ble det på dag 11 gjennomført flere ulike tiltak. Alle fisker med synlige sårskader ble fjernet fra karene, og et regime med intensiv behandling med malakittgrønt ble igangsatt for å redusere smittepress med saprolegnia. I tillegg ble svabring og prøvetaking begrenset til svimere og fersk dødfisk for å redusere stressnivået for de gjenlevende fiskene. Forsøket gikk fram til dag 26 etter infeksjon. På dette tidspunktet ble alle gjenlevende fisker fra samtlige kar avlivet og prøvetatt.

Virus kunne påvises ved realtime RT-PCR i slimlaget fra alle badesmittede grupper etter 1 døgn (kar 1A, 2A og 3A). Dette gjaldt også HPRO ILAV-gruppen (1A), selv om fortynningsfaktoren innebar at virus ikke kunne påvises ved RT-PCR av selve vannet ved infeksjonstidspunktet. Dette kan forklares ved at HPRO virus har en høy affinitet for hud og gjelleceller hos laks. Virus i vannet vil dermed festes til epitelcellene på huden og på gjellene. Ved svabring er det disse cellene som undersøkes. Det er derimot ikke mulig med standard RT-PCR å si noe om vi har en aktiv replikasjon av virus eller om vi kun detekterer viruset som ble brukt i forsøket. (En mulig tilnærming her kunne vært å kjøre en PCR for å se etter spleising av segment 7 eller bruke spesifikk mRNA PCR. Sistnevnte metode har imidlertid lav sensitivitet sammenlignet med vanlige PCR).

Etter dag 4 var gjennomgående alle ILAV HPRO-infiserte fisk (både bad- og rektalgruppe) negative for virus fram til noen påvisninger i gjelle og svaber på dag 25-26 med til dels høye Ct-verdier. Det ble heller ikke påvist patologi eller virus i gjelle ved immunhistokjemi. Prøvene blir nå undersøkt nøyere ved sekvensering for å utelukke eventuell kontaminering av virulent virus. For gruppe 2A og 3A som var badesmittet med hhv. lav-virulent og høyvirulent ILA-virus, kunne virus påvises ved realtime RT-PCR i både hjerte/nyre, blod og svaber utover i smitteforsøket. Histologiske undersøkelser viste forandringer typiske for de ulike virusvariantene og immunhistokjemi spesifikk for ILAV var positiv. Til sammenligning ble virus kun påvist sporadisk i den rektalinfiserte lavvirulente gruppen (2B) og ingen ILAV-typisk histologi eller ILAV-positiv immunhistokjemi ble funnet.

Konklusjon smitteforsøk

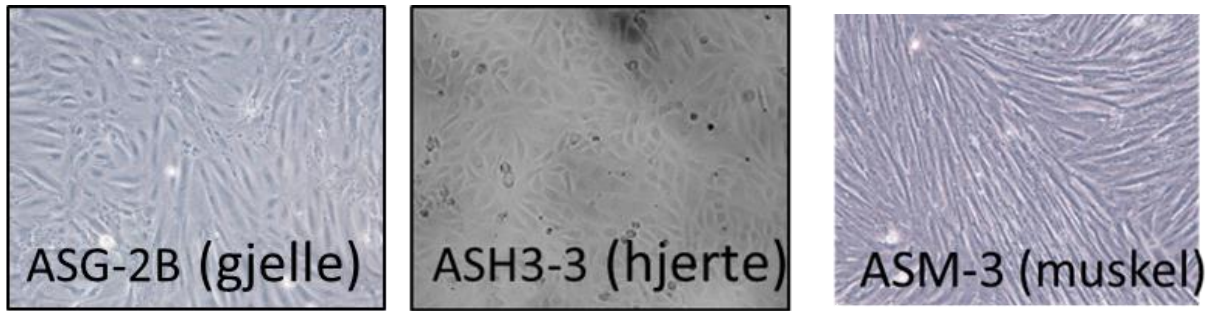
Resultatene for de 2 lavvirulente gruppene, indikerer at rektalsmitte ved fôringstube ikke er en gunstig smitteintroduksjon for ILAV sammenlignet med badesmitte. Siden smittedosen for HPRO ILAV var forholdsvis lav sammenlignet med de andre gruppene, og vi fikk betydelig dødelighet knyttet til saprolegnia i forsøket, er det dessverre vanskelig å utelukke bad- eller rektalsmitte som smittemodell for å introdusere HPRO ILAV til laks. Sekvensanalyser vil gjennomføres for å bekrefte/avkrefte funn av de ulike ILAV-variantene og for å sammenligne virussekvenser før og etter smitte. Vi regner med at arbeidet vil resultere i en publikasjon.

In vitro-modell for dyrkning av ILAV HPRO

Det er kun publisert noen få cellerlinjer fra atlantisk laks som er mottakelige for ILAV, og disse er hovedsakelig etablert fra nyrehev. Man har ikke lyktes å dyrke ILAV HPRO virus i de tilgjengelige cellekulturene. Tidligere studier viser at endotelceller er hovedmålceller for høyvirulent ILAV (Aamelfot et al, 2012) mens det for HPRO ILAV er vist en lokalisert infeksjon i epitelceller i gjelle og hud (Aamelfot et al, 2016).

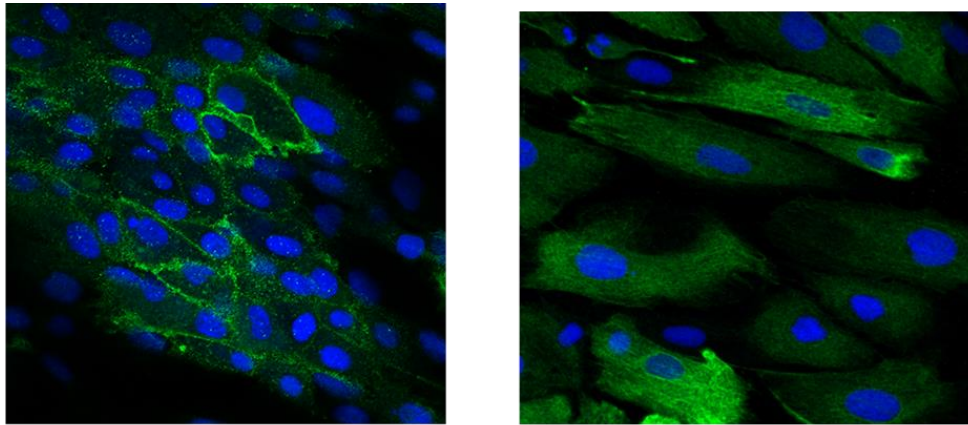
En mulig forklaring på manglende suksess i *in vitro* dyrkning av HPRO ILAV kan være at de tilgjengelige cellekulturene mangler egenskaper nødvendige for effektivt opptak eller uttrykk av HPRO ILAV virus. Det var derfor ønskelig å øke panelet av tilgjengelige cellekulturer fra laks, både i forhold til celletyper og organer.

Gjennom prosjektet og i synergier med andre aktiviteter på Veterinærinstituttet, er det etablert og karakterisert nye cellekulturer fra gjelle, hjerte, hud og muskel (se Figur 4).



Figur 4. Bilder av cellekulturer fra 3 av ulike organer som er etablert i prosjektet. Samtlige av kulturene er passert >20 passasjer og kan nå betraktes som forholdsvis stabile langtidskulturer.

For å karakterisere cellene videre spesielt med hensyn på å fange opp mulig ILAV HPR0-mottakelige epitelceller, ble spesifikk farging med antistoffer mot E-cadherin (tight junction) og cytokeratin gjennomført (Figur 5).

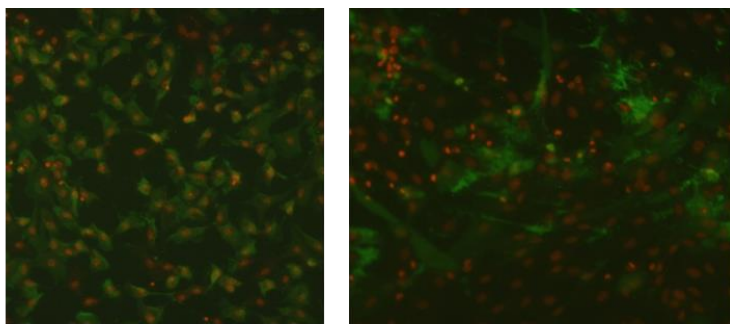


Figur 5 Bilder av cellekultur etablert fra hud (ASS-1) farget med antistoffer mot 2 epitelspesifikke markører (E-cadherin og cytokeratin)

Positiv farging mot både E-cadherin og cytokeratin viser med ganske stor sikkerhet at cellekulturen etablert fra hud inneholder epitelceller (Tabell 1). Deretter ble de ulike cellekulturene undersøkt for mottakelighet for virulent ILAV. Det viste seg at begge cellelinjene som ble anlagt fra hjerte var mottakelige for ILAV, mens vi foreløpig ikke har lyktes i å dyrke virulent ILAV i de andre kulturene (Figur 6).

Tabell 1. Oversikt over etablerte cellekulturer som enten hovedsakelig eller delvis besto av epitelceller.

Cellekultur	E-cadherine/cytokeratin	celletype
ASH3-3 (hjerte)	+/+	Hovedsakelig epitelceller
ASH2-2 (hjerte)	Delvis farging	Innslag av epitelceller
ASS-1 (hud)	+/+	Hovedsakelig epitelceller
ASM-2A (muskel)	+/+	epitelceller
ASM-2B (muskel)	+/+	epitelceller



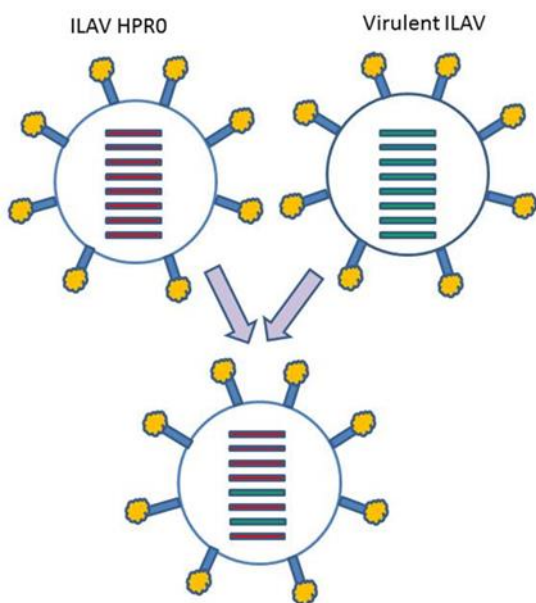
Figur 6: Celler fra hjerte laks infisert med virulent ILAV (ILAV-positive er visualisert med mAb+FITC-farging)

Samtlige cellekulturer er undersøkt for mottakelighet for ILAV HPR0. Vi har ikke lyktes å oppformere virus i noen av de nye cellekulturene, selv om det ser ut til at virus blir tatt opp til en viss grad i celler spesielt fra gjelle. Det er gjennom prosjektet innledet et samarbeid med OIE referanselaboratorium for ILA i Chile, og mottakelighet for både virulent ILAV og ILAV HPR0 vil bli undersøkt videre, spesielt i cellene fra hjerte. De nyetablerte cellene er allerede tatt i bruk i tilknytning til andre prosjekter hvor vi etablerer in vitro assays for å karakterisere effekten av ulike smittsomme agens på lakseceller, og vi håper de kan bli nyttige redskaper framover. Arbeidet med å etablere og karakterisere cellekulturene planlegges publisert.

Vi ser det som viktig å arbeide videre med manipulering av dyrkningsbetingelser for å se om vi kan greie å etablere de rette dyrkningsbetingelsene.

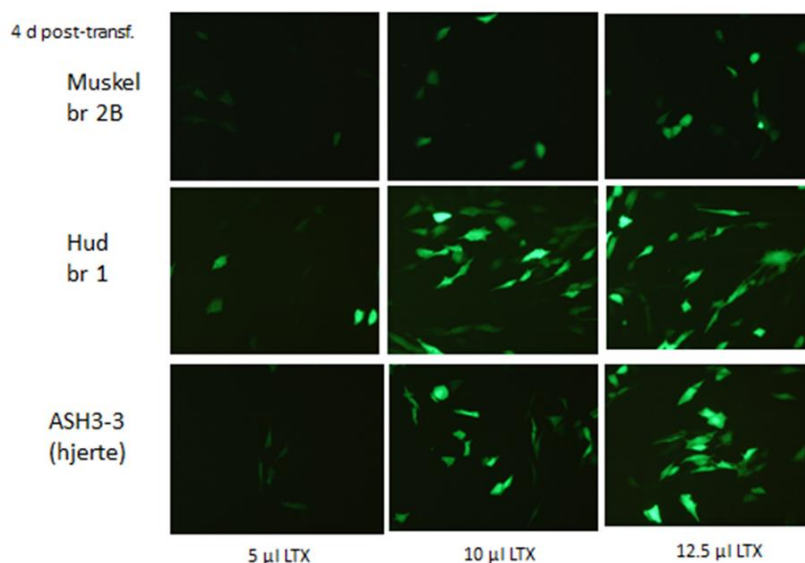
Revers genetikk - reassortering

Siden vi ikke lykkes med å dyrke ILAV HPR0 ved normal infeksjon av lakseceller, har vi også forsøkt å nå målet ved andre strategier. Avirulent ILAV HPR0 skiller seg fra virulent ILAV ved spesifikke endringer i 2 av 8 gensegmenter (seg5 og seg6). ILAV er et orthomyxovirus og er et RNAvirus hvor genomet består av 8 ulike gensegmenter. Orthomyxovirus har evne til reassortering av gensegmenter mellom ulike virusisolater ved samtidig infeksjon og man regner med at dette også gjelder ILAV (Figur 8). Helena Hauge (Veterinærinstituttet) har allerede laget plasmidkonstrukt som inneholder alle 8 gensegmenter fra virulent ILAV-variant. En kombinasjon av vanlig infeksjon og transfeksjon med disse konstruktene kan produsere såkalte kimære viruspartikler hvor 1 eller flere gensegmenter er byttet ut med gensegmenter fra konstruktene.



Figur 7. Reassortering av gensegmenter mellom ulike virusvarianter

Det er gjennomført omfattende undersøkelser av transfeksjonsfrekvens ved ulike betingelser med kontrollplasmider som uttrykte Green Fluorescent Protein (GFP) for de ulike cellekulturene, og kulturene med best transfeksjonsfrekvenser ble valgt ut til videre analyser (Figur 8).



Figur 8. Bildet av transfekterte celler som uttrykker Green Fluorescent Protein (GFP).

Oppsett hvor ILAV HPR0 fra felt ble inokulert på cellekulturer og deretter transfektert med segment 5 og segment 6 fra en virulent virusvariant ble forsøkt uten at vi lyktes å få opp levedyktig virus. Samtidig ble det forsøkt å inokulere en lavvirulent virusvariant med samtidig transfeksjon med de samme konstruktene, for å undersøke om vi kunne få opp reassortanter mellom de 2 virusvariantene. Dette arbeidet pågår fremdeles og vi er i en prosess med å undersøke en rekke virusisolater for å bekrefte/avkrefte reassortering av disse.

Konklusjon

Det er etablert en rekke nye cellekulturer fra ulike organer, hvorav 2 er mottakelige for virulent ILAV. Vi har til nå ikke lyktes å oppformere HPR0 ILAV i noen av cellekulturene, men dette arbeidet vil fortsette. Flere av kulturene er allerede tatt i bruk som redskaper i in vitro-studier på laks, og virker også lovende i tilknytning til transfeksjonsstudier. Forsøk med å etablere kimære viruspartikler med kombinasjon av gensegmenter fra ILAV HPR0 og virulent ILAV pågår fremdeles.

Karakterisering av, og infeksjon med ILAV HPR0

Denne delen av prosjektet ble gjennomført i samarbeid med andre prosjekter ved VI som hadde fokus på ILA HPR0 problemstillinger inkludert et større NFR-finansiert prosjekt, «Characterisation of ISA HPR0 virus- and infection in Atlantic salmon», egenfinansiert forskningsvirksomhet, inkludert virksomhet knyttet til et internasjonalt ILA-forskernettverk, ScoFoNo-gruppen. ScoFoNo-gruppen består av forskere fra Marine Laboratory, Aberdeen, Skottland (Alastair McBeath, Mickael Fourrier og Iveta Matejusova), fra Food and Veterinary Authority på Færøyene (Debes Christiansen) og fra Veterinærinstituttet (Knut Falk og Maria Aamelfot).

Å forstå hvorfor, hvordan og konsekvenser av utviklingen av ILAV fra HPR0-type til HPR-del type er viktig forvaltningsmessig, og har vist seg å være en særdeles kompleks problemstilling. Det er et komplisert puslespill som skal legges og der vi nå begynner å ane et bilde av hva som skjer. Vi har derfor de siste årene undersøkt flere ulike aspekter knyttet til denne virustypen.

Molekylær karakterisering av HPRO ILAV

Utvikling av virulente HPR-del ILAV fra Ikke-virulente HPRO ILAV, har tidligere vært knyttet til delesjoner i hemagglutin-esterease (HE) proteinets HPR-område, og til mutasjoner nær fusjonsproteinets (F) proteolytiske aktiveringssete. Denne kunnskapen har i all hovedsak vært basert på sekvenssammenligninger av ILA-virusets overflate glykoproteiner, dvs HE-, og F proteinene.

Vi har vært involvert i 2 rapporter/publikasjoner der det vha laboratorieforsøk (transfeksjon) er demonstrert at delesjoner i HE kombinert med mutasjon(er) i F nær aktiveringssetet virker inn på fusjonsaktivering, og fusjonsaktivitet (se Fourrier et al. 2014, 2015). Virusets fusjonsaktivitet er knyttet til virusopptak i mottakelige celler, men er også en faktor som er med å bestemme hvilke celler som infiseres (celletropisme). Selv om vi mener at det trolig også er andre faktorer virker inn på økningen i virulens ved overgang fra HPRO til HPR-del, er nok denne påvirkningen av fusjonsaktiviteten en nøkkelfaktor knyttet til virulensutviklingen.

Epitelotropisme inkl. mucosal infeksjon og badesmitte

Vi har i flere studier de siste årene undersøkt aspekter knyttet til patogenesen ved ILA. Et aspekt vi har undersøkt er virusets vevs og celle tropisme og mekanismene knyttet til denne. Dette har også vært viktig for å forstå patogenesen ved HPRO ILAV infeksjon og dermed også virulensutvikling. Deler av disse studiene ble gjort med støtte av dette prosjektet.

Vi etablerte først en badesmittemodell (McBeath et al 2014). Basert på denne undersøkte og karakteriserte vi så spesielt det tidlige infeksjonsforløpet ved ILAV (Aamelfot et al. 2015). Her fant vi at infeksjonen først etablerte seg i slimhinneepitel før den spredte seg systemisk til karendotel. Ved infeksjon med lavvirulent virus var varigheten av denne epitel infeksjonsfasen lenger. Det var tidligere kjent at ILAV HPRO, av undersøkte organ, primært kunne påvises i gjellevev vha qPCR. Imidlertid kjente vi ikke til hvordan patogenesen til HPRO ILAV infeksjon skiller fra infeksjon med virulent HPR-del virus. Ved undersøkelse av vev fra HPRO ILAV -infisert fisk vha immunhistokjemi (IHC) og immunfluorescense (IF), fant vi bare infeksjon i slimhinneepitel, dvs på gjelle og hud (Aamelfot et al. 2016). Vi fant også relativt store mengder HPRO virus ved qPCR undersøkelser av svabre fra både hud og gjelle. Hos ILAV HPRO infisert fisk var vi ikke i stand til å påvise virusinfiserte celler i indre organ hverken vha IHC eller IF. Spørsmålet vi da stilte oss var da hva det er som gjør at virus ser ut til å skifte celletropisme når det blir virulent og HPR-del? Det syntes åpenbart at dette skiftet i celletropisme representerte en nøkkelfaktor for virulensutviklingen.

Overgang HPRO til HPR-del

Spørsmålet knyttet til overgangen fra HPRO ILAV til HPR-del ble studert i et feltmateriale fra Færøyene. Her kunne vi for første gang dokumentere overgangen fra HPRO ILAV til HPR-del, et arbeid som er publisert i prosjektperioden (Christiansen et al. 2017). Det nye HPR-del viruset hadde lav virulens noe som ble knyttet opp mot lavere formeringsevne både ved smitteforsøk og i cellekulturer. Ved sekvensering av hele virus genomet til både det opprinnelige HPRO viruset og det nye HPR-del viruset, fant vi at forskjellene utgjorde bare en delesjon i HE HPR-området og én enkelt mutasjon i F-genet. Ut fra disse funnene, funn rapportert tidligere av Fourrier et al. (2014, 2015), og funn knyttet til smitteforsøk gjort med det nye HPR-del viruset, konkluderte vi at disse 2 forandringene i HE og F proteinet er nødvendige og et minimum for overgangen til virulent ILAV. Slike forandringer kan være årsak til tidligere påviste forandringer i celletropisme fra en epitelial infeksjon til en systemisk infeksjon av endotel i karsystemet (Aamelfot et al. 2012, 2016). Smitteforsøk viste imidlertid at det nye viruset hadde svært lav virulens og at det er nødvendig med flere (ukjente) mutasjoner for å utvikles til et fullt virulent ILAV. Basert på observasjonene våre, foreslår vi at overgangen fra HPRO ILAV til fullt virulent ILAV er en stegvis prosess som også involverer andre ukjente virulensfaktorer. En slik hypotese støttes av observasjoner fra ILA diagnostikk de siste årene der ILA ofte ikke har presentert seg ved «klassiske» funn og dermed har vært vanskelig å oppdage i felt. Hypotesen understreker også viktigheten av gode rutiner for biosikkerhet som

kan hindre at lavvirulent infeksjon overføres til nye populasjoner og generasjoner hvor fullt virulente ILAV kan oppstå.

Når det gjelder faktorer som driver utviklingen fra HPRO til HPR-del, vil ulike stressinduserende forhold kunne være utslagsgivende (se delprosjekt 2).

Passering av lavvirulent i celler og i fisk

I forbindelse med arbeidet knyttet til overgang av HPRO til HPR-del (Christiansen 2017) fant vi indikasjoner på at den lavere virulensen av det nye HPR-del virusets skyltes lavere replikasjons- effektivitet hos denne varianten.

Vi undersøkte om replikasjonsevnen kunne økes ved å passere dette virus i cellekultur. Viruset ble passert 10-ganger etter hverandre i ASK-celler, men vi var ikke i stand til å påvise noen økt replikasjonsevne (målt ved en nyutviklet enzym plakk-test for kvantifisering av ILAV).

Imidlertid gjorde vi en observasjon under smittetesten med det nye lavvirulente HPR-del viruset fra Færøyene som kunne tyde på en økt replikasjonsevne hos virus som var re-isolert fra syk fisk i forsøket. Virus-titeret var økt ca 10-fold (1 log) ved TCID₅₀ bestemmelse. Dette funnet ble ikke fulgt opp i herværende prosjekt.

Siden vi ikke greide i prosjektet å utvikle eksperimentelle systemer (dyrking eller smitte modeller) har vi fremdeles store utfordringer i forhold til å beskrive nærmere overgangen fra HPRO til HPR-del virus.

Et full-genom sekvensering arbeid er imidlertid på gang sammen med samarbeidspartnere på Færøyene og Marine Lab i Aberdeen (ScoFoNo-gruppen) som vil kunne bringe oss noe videre ved å identifisere ytterligere virulensmarkører.

Delprosjekt 2

Dette delprosjektet har tre underdeler. Den første delen er en risikofaktorstudie der vi leter etter faktorer som øker risiko for at det oppstår utbrudd av ILA uten kjent smittekilde, slik at vi bedre kan forutse og evt. forstå slike utbrudd.

Risikofaktorer knyttet til ILA-utbrudd med ukjent smittekilde

Målet med denne studien var å identifisere faktorer som er assosiert med de enkeltstående ILA utbrudd (dvs. utbrudd uten kjent smittekilde). En forklaring på at det kan oppstå slike enkeltstående utbrudd av ILA er at en lavvirulent variant av viruset (HPR0 ILAV) muterer til en virulent variant (HPR-del ILAV). En annen forklaring kan være at fisken smittes med HPR-del ILAV fra ukjent smitte. Hypotesen om at HPR0 ILAV kan endres til HPR-del ILAV er allment akseptert, men kunnskapen om hvorfor dette skjer mangelfull. En rådende oppfatning er at mangelfulle biosikkerhetsrutiner og stress kan være en medvirkende faktor. Vi startet med å identifisere fiskegrupper som er en gruppe fisk fra den settes på sjølokaliteten og frem til slakt. Vi inkluderte grupper som hadde hatt fisk sammenhengende på samme sjølokalitet i 6 måneder eller mer over en 10 års periode. Deretter brukte vi ILA spredningsmodellen som beskrevet av Aldrin et. al (2011) for å identifisere utbrudd hvor smitte fra nabo ikke var sannsynlig. Kontrollgruppen i analysen var alle andre grupper med fisk i studieperioden. Deretter koblet vi på informasjon fra havbruksdata, blant annet; antall fisk i hver gruppe, vekt, tetthet (biomasse/volum), dødelighet, temperatur, breddegrad, og opplysninger om sykdom på fiskegruppen (PD, HSMB og IPN) fra Veterinærinstituttet journaldatasystem. Ved hjelp av regresjonsanalyse lette vi etter mulige forklaringer på at utbrudd uten kjent smittekilde oppstår. Vi fant at slike utbrudd knyttet til følgende forhold; anlegg med geografisk beliggenhet i Nord-Norge, at forekomst av IPN synes «å prime» ILA-utbrudd, bruk av lang tid å fylle opp en lokalitet med smolt, og om fisken hadde vært utsatt for høye tettheter i løpet av de første månedene i sjøfasen. Målet med studien var å undersøke om det finnes faktorer som økte sannsynlighet for at det oppstår ILA, noe

som disse resultatene våre støtter. Resultatene kan brukes i forbindelse med målrettet overvåking slik at en oppdager nye utbrudd tidligst mulig, og støtter oppfatningen om at mangelfulle biosikkerhetsrutiner og stress kan øke risiko for å få ILA.

Denne delen av prosjektet har resultert i en vitenskapelig artikkel («Risk factors associated with infectious salmon anemia (ISA) outbreaks in Norway from 2004-2016 where the source of infection is unknown») som i uke 8/18 ble sendt til publisering hos *Frontiers of Veterinary Science*.

ILA og slaktestrategier

Denne delen av prosjektet har vært gjort i samarbeid med «Biosikkerhetsprosjektet» på Veterinærinstituttet. Målsetningen har vært å vurdere spredning av HPR-del ILAV i forhold til hvor lang tid enkeltmerder med påvist ILA får stå før de slaktes ut, og deretter hvor lang tid som brukes før hele anlegget med ILA er slaktet ut.

Bekjempelse av ILA innebærer som oftest utslakting av infiserte merder eller hele anlegg der infeksjon er påvist i en eller flere merder. Dette er tiltak som kan påføre oppdretter store kostnader gjennom tapte salgsinntekter, permitteringer og perioder med inaktivitet på lokaliteten. De store kostnadene fører til at det kan være ønskelig å utsette tiltak, eller å begrense omfanget av tiltakene så mye som mulig. På den andre siden kan en feil vurdering av preventive tiltak føre til at sykdommen sprer seg til nye anlegg, med store konsekvenser for økonomi og dyrevelferd. Denne studien søker svar på om utsatt utslakting fører til økt sannsynlighet for spredning, samt at den forsøker å belyse om utslakting av hele oppdrettsanlegg gir mindre risiko for spredning enn om man bare slakter ut infiserte merder.

Arbeidet baserer seg på en tidligere publisert modell for spredning av ILA-smitte som estimerer smittenettverk, der opprinnelsen til alle ILA-utbrudd blir sannsynliggjort (Aldrin et al., 2011). Modellen gir dermed også informasjon om hvor mange nye utbrudd hvert enkelt utbrudd har ført til. Et ledd i analysen er å beregne potensiell smittekontakt mellom lokaliteter, basert på sjøavstander mellom, og antall fisk på lokalitetene.

Vi viser at antall lokaliteter som blir smittet fra hvert enkelt utbrudd øker jo lengre tid man bruker på å slakte ut infiserte merder. Dette indikerer at tiltak for å hindre spredning må settes inn så raskt som mulig. Vi greier imidlertid ikke å skille ut noen tilleggs effekt av å slakte ut hele infiserte anlegg, men vi har et veldig begrenset datamateriale og derfor også svært liten sensitivitet i analysene våre. Vi har derfor ikke nok tilgjengelige data til å avgjøre om det er en ekstra gevinst av å slakte ut hele anlegg framfor bare de infiserte merdene.

Denne studien bekrefter den tidligere publiserte modellen fra Aldrin et al. (2011). Modellen viser at sjøavstand mellom infiserte og mottakelig enheter er den aller viktigste faktoren for spredning, og smitte mellom merder på lokaliteter blir svært sannsynlig. Vi argumenterer for at utslakting av hele anlegg fortsatt er det sikreste tiltaket mot spredning. Hvis man likevel velger å begrense tiltak til kun merder med bekreftet diagnose anbefaler vi intensiv overvåking av den gjenværende fisken slik at en eventuell oppblomstring av sykdommen kan oppdages så tidlig som mulig. Vi foreslår også at man i framtiden forsker på hvor omfattende en slik overvåking må være for å avsløre oppblomstring med tilfredsstillende sannsynlighet.

Dette arbeidet har resultert i den vitenskapelige artikkelen «Infectious salmon anemia and culling strategies» som forventes publisert i «*Frontiers of Veterinary Science*» i løpet av våren.

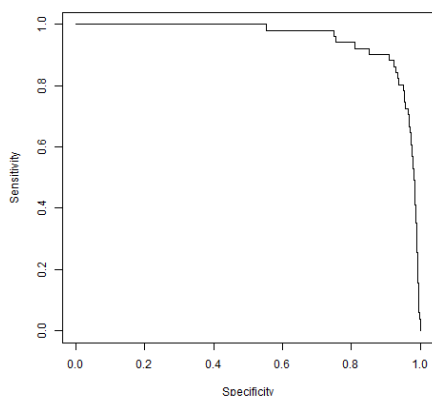
Nettbasert applikasjon som identifiserer lokaliteter med økt risiko for utbrudd.

Dette delprosjektet har utviklet en nettbasert applikasjon som estimerer sannsynlighet for at norske oppdrettslokaliteter får ILA, basert på sannsynligheten for smitte fra eventuelt infiserte nabolokaliteter.

I tillegg til å slakte ut syk fisk er overvåkning av lokaliteter innenfor et kontrollområde rundt den infiserte lokaliteten et viktig tiltak for å begrense spredning. Lokalitetene innenfor kontrollområdet pålegges ofte restriksjoner på sin drift, og det er i utgangspunktet forbudt å sette ut ny fisk i kontrollområdet. Ut over noen veiledende avstander i luftlinje finnes det få objektive kriterier for etablering disse kontrollområdene i dag. Tiltakene kan dermed i noen tilfeller ramme for hardt, mens i andre tilfeller kan lokaliteter med høy smittekontakt unngå sanksjoner.

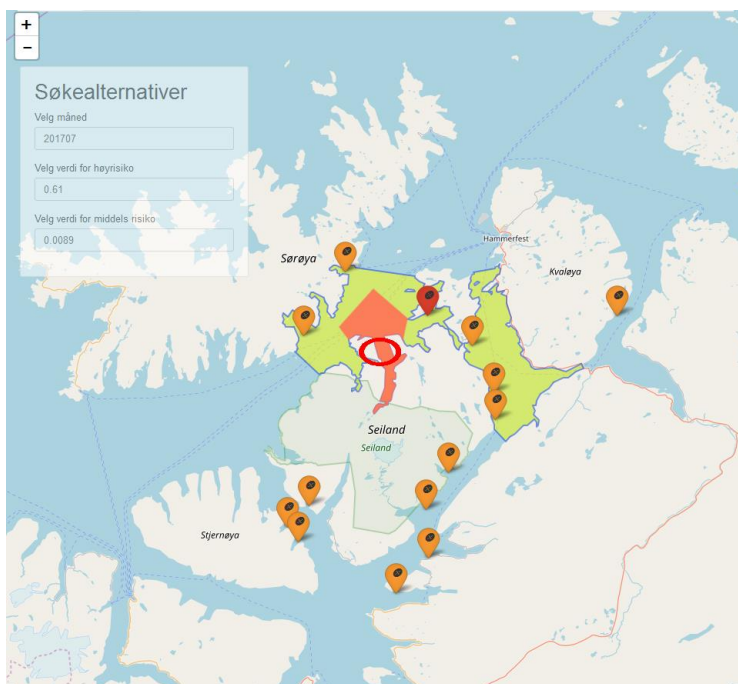
Med utgangspunkt i den tidligere omtalte spredningsmodellen (Aldrin et al., 2011) identifiserer applikasjonen hvor mye smitte de omkringliggende lokalitetene har blitt utsatt for på bakgrunn av sjøavstander mellom lokalitetene, antall fisk hos den infiserte lokaliteten, antall fisk hos de mottakelige lokalitetene rundt, samt praksis rundt utsett og flytting av fisk hos de mottakelige lokalitetene.

Avhengig av hvordan man setter grenseverdier kan modellen oppnå høy sensitivitet, dvs at man kan identifisere en gruppe som inneholder nesten alle lokaliteter som blir smittet av det aktuelle utbruddet, men gruppen vil også inneholde lokaliteter som ikke vil bli infisert. Modellen har imidlertid begrenset spesifisitet. Det vil si at en gruppe lokaliteter som inneholder nesten alle lokaliteter som blir smittet av det aktuelle utbruddet også inneholder en del lokaliteter som ikke blir smittet. Grenseverdiene kan justeres til å gi en avveining mellom hvor mange nye relaterte utbrudd man aksepterer å gå glipp av, og hvor mange lokaliteter man pålegger sanksjoner som likevel ikke mottar smitte fra det aktuelle utbruddet. Det kan settes to slike grenseverdier i applikasjonen, slik at man identifiserer lokaliteter med høy og middels risiko for å bli smittet. Forholdet mellom spesifisitet og sensitivitet er illustrert i figur 9.



Figur 9: Forholdet mellom sensitivitet og spesifisitet. Verdien 1 for sensitivitet betyr at utvalget inneholder alle lokaliteter som blir smittet av det aktuelle utbruddet, mens verdien 1 for spesifisitet betyr at utvalget bare inneholder lokaliteter som blir infisert. Figuren viser at en sensitivitet på 0,98 gir en spesifisitet på ca 0,55, det vil si at nesten halvparten av utvalget ikke blir infisert, men bare 2% av de infiserte ikke blir valgt. Hvis sensitiviteten går mot 1, synker spesifisiteten asymptotisk mot 0.

Modellen bak applikasjonen har sine begrensninger, og den inneholder ikke informasjon om delt utstyr, båtkontakt, eller andre lokale faktorer som påvirker smittekontakt ut over det som er beskrevet. Den tar heller ikke hensyn til lokale strømforhold. Det vil derfor fortsatt være rom for utøvelse av skjønn i fastsettelse av sonene, men applikasjonen gir mulighet for en betydelig mer objektiv vurdering. Selv om modellrammeverket bak applikasjonen er ferdig utarbeidet gjenstår det fortsatt en del arbeid med selve applikasjonen. Vi har imidlertid laget en prototyp, og figur 10 illustrerer hvordan applikasjonen identifiserer lokaliteter med høy og middels risiko for smitte i forbindelse med et utbrudd i Altafjorden i fjor sommer.



Figur 10. Eksempel på utsnitt fra applikasjonen. Den røde og den grønne sonen viser kontrollområde gitt av Mattilsynet med bekjempelses- og overvåkningszone rundt det aktuelle ILA utbrudd. Applikasjonen viser bare lokaliteter som har rapportert fisk (dvs. aktive lokaliteter) Den røde markøren indikerer en lokalitet med høy risiko, mens de oransje indikerer lokaliteter med middels risiko for å motta smitte fra det aktuelle utbruddet. Det aktuelle utbruddet er merket med en rød sirkel (utslaktet ILA lokalitet).

Dette arbeidet har ikke tatt form som en artikkel enda, men det er ønskelig å publisere dette arbeidet i sammenheng med de to ovenstående arbeidene.

Delprosjekt 3

Den 3. - 4. april 2017 samlet ca. 90 personer seg til ILA workshop på Hell hotell, Værnes. Sammendrag fra møtet ble publisert i Norsk Fiskeoppdrett (Lyngstad et al, 2017). Noen av hovedkonklusjoner fra møtet var;

- Næringen mener selv den har betydelig forbedringspotensiale når det gjelder generell biosikkerhet- både i forståelse og grad av implementering
- Det framlegges stadig flere indikasjoner på sammenhengen mellom HPRO ILAV og HPR -del ILAV
- Det kan finnes ulike varianter av HPR-del ILAV med ulik virulens - det skjer en stegvis utvikling fra lavvirulente til høyvirulente varianter
- Det er uklart om avl mot ILA vil kunne gi ønsket effekt
- Framtidig bruk av vaksine mot ILA krever en sikker og effektiv vaksine
- Kontroll med ILA krever gode beredskapsplaner og rask og god kommunikasjon mellom aktørene
- Næringen etterlyste informasjon og opplæring
- Screening vil kunne oppdage ILA tidligere enn i dag og bidra til raskere igangsatte tiltak
- Det ble stilt spørsmål ved om utslaktning av enkeltmerder ved utbrudd er formålstjenlig
- Mattilsynet så utfordringer i forhold til diagnostikk og kontroll knyttet til større driftsenheter
- Det smitteforebyggende konseptet rundt generasjonsskille er utfordret pga. mer kontinuerlig drift av lokalitetene
- Kontinuerlig drift kan også legge til rette for utvikling av virulente ILA-virus varianter (HPR-del)
- Mattilsynet opplever at det samlede forvaltningssystemet har fått en økende grad av byråkratisering og at tiden fram til endelige vedtak blir lang

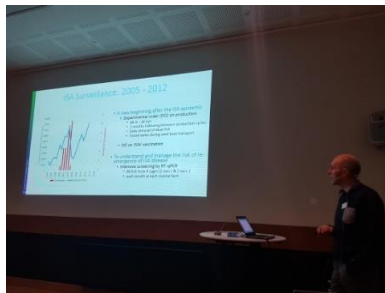
Bilder fra ILA workshop (foto: Sven Martin Jørgensen, FHF)



Figur 11. Et vært engasjert og hyggelig deltakergjeng



Figur 12. Magnhild Daltveit, Mattilsynet



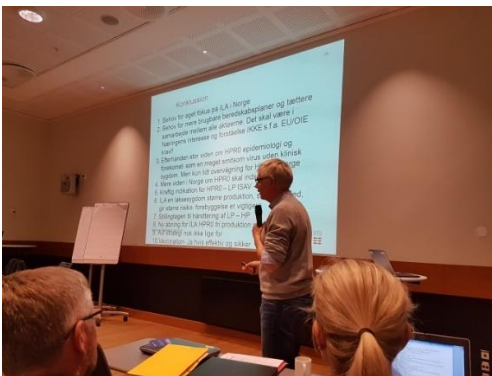
Figur 13. Debes Christinansen, Food And Veterinary Agency, Færøylene



Figur 14. En lydør forsamling



Figur 15. Gruppediskusjoner



Figur 16. Niels Jørgen Olesen, DTU, EU fish reference laboratory, Danmark summerte opp inntrykkene og konklusjoner fra møtet.

Diskusjon

I vårt materiale er mindre enn en prosent av alle registrerte ILA-tilfeller mellom 2004- 2016 knyttet til ukjent smitteopphav, dvs. ikke direkte forårsaket av nabosmitte eller annen kjent smittekontakt. Denne prosentandelen kan derved skyldes en ikke-kjent smittekilde (ukjent reservoar i sjøen) og/eller være et resultat av at HPR0 ILAV har mutert til virulent ILAV.

Prosjektet har bidratt til å underbygge hypotesen om at ILAV HPR0 kan gi opphav til ILAV HPR-del, altså at den ikke-virulente varianten kan mutere og tilegne seg virulente egenskaper. Videre finner vi at en endring i virulens kan tenkes å skje gjennom en prosess på flere trinn, hvor viruset gradvis erverver seg økende virulente egenskaper. Et skifte i viruset sin celletropisme synes å representere en første og nødvendig nøkkelfaktor for denne virulensutviklingen. Vi tenker oss at dette skiftet i celle- og organotropisme medfører at viruset endrer seg fra å være en epitelinfeksjon av slimhinner til en generalisert infeksjon. Andre tilleggs-mutasjoner for å oppnå høygradig virulens er ukjent. Lav virulens kan sannsynligvis knyttes til virusets dårlige evne til replikasjon. Flere cellepassasjer av et lav-virulent virus ga imidlertid ikke økt replikasjon, men en re-isolering etter in-vivo-infeksjon tydet på at viruset replikerte mer effektivt enn ved første gangs isolering. Disse funnene er viktige å videreføre for å kunne komme nærmere en forståelse av virulensutviklingen hos ILAV.

Tanken om en gradvis økende virulens hos ILA viruset kan bety at det har vært/er tilfeller hvor ILA -tegnene er svake (sub-klinisk ILA) og lokaliteter kan ha fungert som ikke-registrerte lokale smittekilder. Slike tilfeller kan evt. også ha bidratt til smittekontakt via brønnbåter når «sykdomsfri» fisk har blitt slaktet uten at noe ILA diagnose eller mistanke om HPR-del ILAV. Denne *mulige* «underskogen» av tilfeller krever gode diagnostiske rutiner for å bli fanget opp både i felt og på laboratoriet, og er noe vi ikke har oversikt over i dag.

Prosjektet hadde som en av sine målsetninger å finne dyrkningsmetode for HPR0 ILAV -varianten. Dette greide vi ikke å oppnå. Dyrking av HPR0 vil kunne gi muligheter for mer detaljerte patogenesestudier og eksperimentelle forsøk (smitteforsøk eller forsøk med cellelinjer) som vil kunne gi bedre forståelse av overgangen fra ikke-virulent via lav virulent til høy-virulente virusvarianter. I forkant av prosjektet ble det publisert lovende resultater fra Chile, men prosjektet greide ikke å følge opp disse mulighetene gjennom det planlagte samarbeidet med det chilenske universitetet. Dette til tross for at vedkommende forsker ble inkludert i referansegruppa. Det har i prosjektets levetid heller ikke kommet resultater fra dette miljøet eller fra andre miljø, som tilsier noe gjennombrudd i forhold til dyrkningsmetoder for HPR0. Veterinærinstituttet ser det imidlertid som sin oppgave å være i forkant med dyrkningsmetoder for ulike virus/virusvarianter inkl. HPR0, ved å opprettholde et stort cellebibliotek og en høy kompetanse på celledyrking.

Til tross for at prosjektet ikke oppnådde å etablere dyrkingsbetingelser for HPR0 ILAV, ble det i prosjektet etablert en rekke nye cellelinjer fra ulike organer, hvorav 2 er mottakelige for virulent ILAV. Flere av disse kulturene er nå tatt i bruk som redskaper i in vitro-studier på laks, og virker også lovende i tilknytning til transfeksjonsstudier. Transfeksjonsarbeidet ble igangsatt som et alternativ for å dyrke fram og etablere HPR0 -varianter i laboratoriet. Forsøk med å etablere kimære viruspartikler med kombinasjon av gensegmenter fra HPR0 ILAV og virulent ILAV pågår fremdeles. Prosjektet har gitt instituttet nye erfaringer som grunnlag for å jobbe videre med denne spesielle problemstillingen.

Etablering av smittemodell ble mislykket pga. kontaminerende smitte med *Saprolegnia*. Planen innebar både å se om vi greide å etablere en HPR0-smitte hos laks og samtidig sammenligne to smitteintroduksjoner (bad og rektalsmitte). Forsøket ble igangsatt sent i prosjektperioden, og da det ble delvis mislykket, kunne det av tidsmessige årsaker ikke gjentas.

Prosjektet har framskaffet dokumentasjon om risikofaktorer som er assosiert med utbrudd av ILA hvor smittekilden ikke er kjent, såkalte primærutbrudd. Slike risikofaktorer er ikke ensbetydende med kausalitet, men gir indikasjoner om faktorer som medvirker til det utkomme (ILA -utbrudd) en ønsker å undersøke. I vårt materiale ser en at faktorer knyttet til (langvarig) stress og høye tettheter, blanding av populasjoner og tidligere virusinfeksjoner som for eksempel IPN (immunsuppresjon) kan være med skape

gunstige forhold for at en eventuell tilstedeværelse av HPR0-ILAV kan få betingelser til å endre seg i virulent retning. Dette er ingen ny kunnskap (Vågsholm et al 1994, Jarp et Karlsen 1997), men er viktig å understreke også i dag ettersom laks kanskje utsettes for enda større stressbelastninger nå enn for 20-30 år siden. Dette er en generell betenkning som kan være relevant også for andre sykdommer enn ILA.

For å stoppe spredning av virus og virulensutvikling understreker funnene våre at biosikkerhet inkludert generasjonsskille, er svært viktig. Videre er det naturligvis viktig å oppdage/påvise disse HPR-del infeksjonene. Tiltak som er med på å redusere de kliniske effektene av ILA (vaksiner, avl) har selvfølgelig mange positive sider ved seg. Men under workshopen som ble avholdt i prosjektets regi, kom det også fram at dette kan bidra til at ILAV får spre seg gjennom oppdrettspopulasjonen uten at viruset oppdages. ILAV er rapporteringspliktig i OIE og EU, og en gjennominfisert populasjon kan ha store negative konsekvenser for lakseeksporten på sikt.

Prosjektet dokumenterer igjen de smittemessige konsekvensene ved bruk av ulike slaktestrategier ved utbrudd. Erfaring har vist at de bekjempelsestiltak som er vanlig i dag, fungerer godt dersom alle prosedyrer følges fra starten av. Dette innebærer bl.a. tidlig påvisning og tidlig reaksjon for å stoppe et utbrudd og hindre videre spredning til nabolokaliteter. Et utbrudd vil både før og under den kliniske fasen skille ut virus til omgivelsene.

For å styrke beredskapen i forhold til naboer til en utbruddslokalitet, har prosjektet utviklet en nettapplikasjon som raskt vil kunne identifisere hvilket risikonivå et anlegg har i forhold til utbruddslokaliteten.

Vi ser at smittesituasjonen fort kan komme ut av kontroll når tiltakene ikke er tilstrekkelige eller settes inn for sent. Fremtidig håndtering av ILA bør derfor ha fokus på å oppdage utbrudd så tidlig som mulig og deretter følge opp med effektive tiltak for å hindre horisontal smitte. To interessante problemstillinger i denne sammenhengen kom fram i arbeidsgruppemøtet som ble avholdt i regi av prosjektet i april -17; Det ene er manglende kunnskap om ILA som bl.a. inkluderer felttjenesten og deres manglende erfaring med kliniske/patologiske tegn som del av den primære felt-diagnostikken av ILA. Videre ble det påpekt den potensielt lange forvaltningsmessige runden som lov-verket innbyr til ved forvaltningsvedtak. Dette er forhold som begge bidrar til at ILA kan utvikle seg i lengre tid på en lokalitet før smittebegrensende tiltak iverksettes.

Prosjektet har i sin helhet bidratt til mer kunnskap om ILAV og ILA som sykdom, og det er produsert informasjon og verktøy til bruk ved risikovurdering i forbindelse med ILA utbrudd. Leveransene i prosjektet forventes å ha god nytteverdi, både for bedre å kunne forstå sykdommens utvikling og spredningsdynamikk, og som premiss for en god kontroll og forvaltning av ILA.

Som det framgår av rapporten har prosjektet i stor grad greid å utnytte parallelle prosjekt og ressurser slik at produksjonen assosiert til dette prosjektet har vært betydelig. Dette har til nå bidratt til foreløpig 6 internasjonale publikasjoner, 2-3 i planlegging, 2 nasjonale og 16 orale presentasjoner.

Leveranser av resultater fra prosjektet

Publikasjoner

- Aamelfot M., Christiansen D.H., Dale O.B., McBeath A., Benestad S.L., Falk K. (2016) Localised Infection of Atlantic Salmon Epithelial Cells by HPR0 Infectious Salmon Anaemia Virus. PLoS ONE 11(3): e0151723. doi:10.1371/journal.pone.0151723
- Aamelfot Maria, Debes H. Christiansen, Alastair J. A. McBeath, Iveta Matejusova, Mickael Fourier, Patricia White, Petra E. Petersen, Knut Falk. (2017) Utvikling fra HPR0 til et virulent ILAV. Norsk Fiskeoppdrett 4
- Christiansen D.H., McBeath A.J.A., Aamelfot M., Matejusova, I., Fourier, M., White, P., Petersen, P.E., Falk K. (2017) First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. J Gen Virol 98; 595-606. DOI 10.1099/jgv.0.000741

- Falk, K. and Aamelfot, M. (2017) Infectious Salmon Anaemia. In: Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection (Eds. P.T.K. Woo and R.C. Cipriano) CAB International, Oxfordshire, UK (pp 68-78) ISBN-13: 978 1 78064 778 4 doi: 10.1079/9781780647784.0068
- Fourrier, M., Lester, K., Markussen, T., Falk, K., Secombes, C., McBeath, Collet, B. (2015) Dual mutation events in the haemagglutinin-esterase and F protein from an Infectious salmon anaemia virus HPR0 genotype promote viral fusion and activation by an ubiquitous host protease. PlosOne 10; e0142020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142020>
- Lyngstad TM, Aamelfot M, Brun E. (2017) Behov for økt fokus på infeksjons lakseanemi (ILA). Norsk Fiskeoppdrett 6/7.
- Lyngstad TM, Qviller L, H Sindre, E Brun, Kristoffersen AB. Risk factors associated with infectious salmon anaemia outbreaks in Norway from 2004-2016 where the source of infection is unknown (sendt til publisering)
- Qviller L. Kristoffersen AB, Lyngstad TM, Lillehaug A. Infectious salmon anemia and culling strategies (manus under utarbeidelse)

Møtepresentasjoner

- Aamelfot Maria, Debes H. Christiansen, Ole Bendik Dale, Alastair McBeath, Sylvie Benestad og Knut Falk. HPR0 ILA virus infiserer epitel hos Atlantisk laks. Frisk Fisk 2017, Bergen
- Brun E. Overvåking og bruk av diagnostiske tester, Kontroll med ILA - workshop 3-4 april 2017.
- Christiansen, D.H., McBeath, A, Aamelfot, M, Matejusova, I, Fourrier, M, White, P, Petersen, P, Falk, K. Evolution of virulent ISAV from a non-virulent ISAV-HPR0 progenitor. EAFP Belfast 2017
- Christiansen, D H., AJA. McBeath, M Aamelfot, I Matejusova, M Fourrier, Knut Falk*. Infectious salmon anaemia virus (ISAV): Evolution from non-virulent HPR0 type to virulent HPR-deleted virus. 58th Western Fish Disease Workshop, Suquamish, WA, USA, June 2017
- Christiansen DH, AJA McBeath, M Aamelfot, I Matejusova, M Fourrier, P White, PE Petersen, K Falk. Transition of ISAV-HPR0 to ISAV-HPR-deleted. Frisk Fisk 2017, Bergen
- Falk, Knut. Significance of HPR0 in Relation to ISA Disease Caused by HPR-Deleted ISA Variants. ACFFA (Atlantic Canada fish farmers association), Aquaculture Research, Science and Technology Forum, NB, Canada, October 2016:
- Falk, Knut. Betydning av HPR0-varianten av ILA-virus for utbrudd av sykdommen ILA. FHF Fiskehelsesamling for Nord-Norge, August 2016:
- Falk, Knut. Utvikling fra HPR0 til sykdomsfremkallende virus - når og hvorfor. ILA-Workshop, Værnes, April 2017
- Lyngstad TM, Qviller L, Sindre H, Kristoffersen AB. Risikofaktorstudie - isolerte ILA utbrudd. Programkonferansen Havbruk, 18-20. april 2016.
- Lyngstad TM. 2016. Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk. FHF Fiskehelsesamling for Nord Norge 24. august 2016.
- Lyngstad TM, Qviller L, Sindre H, Kristoffersen AB. Analysis of risk factors for isolated outbreak of infectious salmon anaemia (ISA) in marine farms with Atlantic salmon. AquaEpi I - 2016, 20-22th Sep, Oslo, Norway.
- Lyngstad TM. Er ILA et spørsmål om biosikkerhet? Kontroll med ILA - workshop 3-4 april 2017.
- Lyngstad TM. ILA - et spørsmål om biosikkerhet. Veterinærinstituttets 125-års jubileum, 12. oktober 2016.
- Moldal T., Alarcon M, Bornø G, Lyngstad TM, Hjortaa MJ og Sindre H. Smittesporing ved ILA utbrudd. Kontroll med ILA - workshop 3-4 april 2017.
- Qviller L., Lyngstad TM, Sindre S, Kristoffersen AB, Lillehaug A. Optimalisert forvaltning av ILA-utbrudd. Programkonferansen Havbruk 18-20. april 2016.
- Qviller L, Lyngstad TM, Sindre H, Kristoffersen AB, Lillehaug A. Controlling the spread of ISA. AquaEpi I - 2016, 20-22th Sep, Oslo, Norway.

Oppsummering

- Prosjektet underbygger hypotesen om HPRO ILAV som forløper til HPR deletert ILAV
- Utvikling av virulens hos HPR deletert ILAV skjer sannsynligvis stegvis med ulike mutasjoner fra lavvirulent til høyvirulent virus
- Endring i organotropisme og replikasjonsevne har betydning for utvikling av virulent virus
- Subklinisk ILA kan forekomme hyppigere enn de kliniske utbruddene tilsier
- Ulike stressfaktorer og infeksjoner kan være drivere for utvikling av virulent ILAV fra HPRO og /eller lavvirulent ILAV.
- Tradisjonelle biosikkerhetsrutiner fungerer godt som forebyggende tiltak dersom de etterleves.
- Det er utviklet en algoritme ("app") som kan benyttes til å vurdere smitterisiko fra utbruddsanlegg til naboanlegg

Acknowledgement

Prosjektet var i sin helhet finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskingsfond - (FHF), prosjektnummer 901051. Takk til Styringsgruppa i prosjektet, ved Christine Thomassen (Vesterålen Fiskehelstjeneste AS), Bjarne Johansen (Nordlaks) og Karl Fredrik Ottem (Cermaq ASA).

Takk også til referansegruppa; Niels Jørgen Olesen, DTU, EU Fish Reference Laboratory, Danmark, Sergio H. Marshall, Valparaiso University, Chile, Debes Christinansen, Food and Veterinary Agency, Færøyene, Edmund Peeler og Birgit C. Oidtmann begge CEFAS, UK,

Referanser

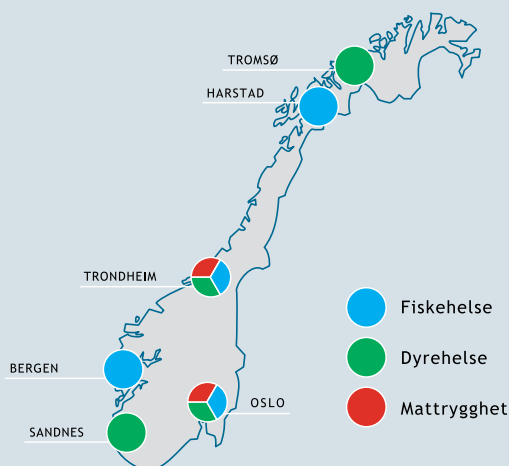
- Aamelfot M, OB Dale, SC Weli, EO Koppang, K Falk (2012) Expression of the Infectious Salmon Anemia Virus Receptor on Atlantic Salmon Endothelial Cells Correlates with the Cell Tropism of the Virus.
- J. Virol. vol. 86, no. 19 10571-10578
- Ammelfot, M, A McBeath, D. Christensen, I Matejusova, K Falk. 2015. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) mucosal infection in Atlantic salmon infection in Atlantic salmon Veterinary Research, 46:120
- Aldrin, M, Lyngstad, T M, Kristoffersen, A B, Storvik, B, Borgan, Ø, & Jansen, P A. 2011. Modelling the spread of Infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. Journal of the royal society interface, 8(62), 1346-1356.
- Cunningham, C.O., Gregory, A., Black, J., Simpson, I. and Raynard, R.S. (2002) A novel variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) haemagglutinin gene suggests mechanisms for virus diversity. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 22, 366-374.
- Fourrier, Mickael, K Lester, E Thoen, A Mikalsen, Ø Evensen, K Falk, B Collet, A McBeath 2014. Deletions in the highly polymorphic region (HPR) of infectious salmon anaemia virus HPRO haemagglutinin-esterase enhance viral fusion and influence the interaction with the fusion protein J Gen Vir 95: 1015-1024, doi: [10.1099/vir.0.061648-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.061648-0)
- Hauge H, M Dahle, T Moldal, E Thoen, AG Gjevne, S Weli, M Alarcón, S Grove 2016 Piscine orthoreovirus can infect and shed through the intestine in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Vet Res 47:57 DOI [10.1186/s13567-016-0343-z](https://doi.org/10.1186/s13567-016-0343-z)
- Jarp J, E Karlsen Infectious salmon anaemia (ISA) risk factors in sea-cultured Atlantic salmon *Salmo salar*. Dis Aquat Org, 1997, 28, 79-86
- McBeath A, YM Ho, M Aarflot, M Hall, D Christensen, T Markussen, K Falk, I Matejusova. 2014. Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV) replicates and initiates the immune response earlier than a highly virulent virus in Atlantic salmon gills. Veterinary Research 45:83 <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0083-x>
- Mjaaland, S., Hungnes, O., Teig, A., Dannevig, B.H., Thorud, K., Rimstad, E., 2002. Polymorphism in the Infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene: importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. Virology 304, 379-391.
- Vågsholm I, HO Djupvik, FV Willumsen, AM Tveit K Tangen Infectious salmon anaemia (ISA) epidemiology in Norway, PVM, Volume 19, Issues 3-4, June 1994, Pages 277-290

Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute