



Sluttrapport: Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk (FHF-901181)



Sluttrapport: Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk (FHF-901181)

Forfattere

Mona Dverdal Jansen, Debes H. Christiansen (Heilsufrøðiliga starvsstovan), Torfinn Moldal, Knut Falk

Forslag til sitering

Jansen, M.D, Christiansen, D.H., Moldal, T., Falk, K. Sluttrapport: Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk (FHF-901181). Vi rapport. Veterinærinstituttet 2021. © Veterinærinstituttet, kopiering tillatt når kilde gjengis

Kvalitetssikret av

Edgar Brun, Director of Aquatic Animal Health and Welfare, Norwegian Veterinary Institute

Publisert

2021 på www.vetinst.no
ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)
© Veterinærinstituttet 2021

Oppdragsgiver eller Samarbeidspartner

Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)

Kolofon

Design omslag: Reine Linjer
Foto forside: Colourbox
www.vetinst.no

Innhold

1	Sammendrag	3
2	Innledning	5
	2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet	5
	2.2 Prosjektets omfang og organisering	6
3	Problemstilling og formål	8
4	Prosjektgjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon	9
	4.1 Arbeidspakke 1: Dokumentere forekomst av ILAV på lokaliteter ved hjelp av ikke-destruktiv prøvetaking (svabring).....	9
	4.2 Arbeidspakke 2: Undersøke forekomst av ILAV ved slakt ved hjelp av svabring	15
	4.3 Arbeidspakke 3: Undersøke om ILAV HPR0 smitter vertikalt fra stamfisk til settefisk.....	19
	4.4 Arbeidspakke 4: Dokumentere infeksjon med ILAV hos regnbueørret	21
	4.5 Arbeidspakke 5: Undersøke om ILAV kan persistere innen et område over tid.....	24
5	Hovedfunn.....	27
6	Leveranser	28
7	Referanser.....	30

1 Sammendrag

Norsk sammendrag

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en alvorlig virussykdom forårsaket av infeksiøs lakseanemi virus (ILAV). ILA er listeført i Norge (liste 2), i EU og av Verdens Dyrehelseorganisasjon (OIE), og en ny forvaltningsplan for ILA er under utarbeidelse på grunn av innføringen av en ny dyrehelseforordning i EU i 2021. At antallet stadfestede ILA-tilfeller i Norge i 2020 var det høyeste siden 1992 viser at ILA er en sykdom som fortsatt må tas på alvor. Dette prosjektet ble satt i gang for å gi økt kunnskap om forekomst og distribusjon av ILAV i infiserte populasjoner, noe som er av betydning ved biosikkerhetsvurderinger.

For å undersøke forekomst av ILAV i ulike fiskegrupper på en infisert lokalitet (AP1) ble tre fiskegrupper på fem ulike lokaliteter undersøkt og vevsprøver fra nyre og svabring av overflate (gjelle og hud) ble undersøkt med RT-qPCR. Resultatene viser at det selv i kjent infiserte populasjoner kan være svært utfordrende å finne ILAV-smittet fisk, særlig ved mangel på klinikk. Dette betyr at det selv ved bruk av en sensitiv RT-qPCR metode er vanskelig å sikkert skille smittede populasjoner fra usmittede populasjoner. Svabring av gjelle og hud ble funnet å være velegnet til å identifisere tilstedeværelse av ILAV på populasjonsnivå, spesielt i fisk uten kliniske tegn på ILA. Svabring kan dermed være et nyttig supplement for å overvåke ILAV-status i en populasjon. Tilsvarende ble hudsvabring på slaktelinje undersøkt (AP2), og metoden var tilstrekkelig sensitiv til å påvise både sykdomsfremkallende ILAV (ILAV HPRdel) og ikke-sykdomsfremkallende ILAV (ILAV HPR0) på populasjonsnivå. Metoden kan derfor være et tilleggsverktøy til risikovurdering ved slakt av fisk for eksport til land med særskilte dokumentasjonskrav på ILA-status.

Selv om det er kjent at ILAV HPR0 forekommer i alle de tre produksjonsfasene (stamfisk, settefisk, matfisk) er det begrenset med studier om smitteveier mellom produksjonsfasene. Ved å benytte færøyske data fra perioden 2008 til 2014 fra landbaserte stamfiskanlegg, smoltanlegg med RAS og sjølokaliteter ble det undersøkt om ILAV HPR0 ble overført vertikalt fra stamfisk til avkom (AP3). Resultatene viste ingen genetisk sammenheng mellom HPR0 funnet i stamfisk og HPR0 funnet i avkom. Funnene støtter dermed at horisontal smitte er smitteveien av betydning for ILAV HPR0. Videre ble det funnet at det etablerte seg såkalte «husstammer» av ILAV HPR0 i de undersøkte RAS-anleggene, der sekvensene innad i settefiskanlegg var mer lik hverandre enn sekvensene mellom ulike settefiskanlegg, og at disse forskjellene økte over tid.

Det har vært begrenset dokumentasjon på ILAV-infeksjoner i regnbueørretpopulasjoner. AP4 utnyttet historiske prøver fra ILA-utbrudd på to lokaliteter med både regnbueørret og atlantisk laks, der laksen hadde blitt slaktet ut mens regnbueørreten fortsatt sto i sjøen. Det ble gjennomført analyser av svaberprøver med RT-qPCR og mRNA-spesifikk RT-qPCR og analyser av vevsprøver med RT-qPCR, histologi og immunohistokjemi. Resultatene viste at regnbueørretpopulasjonene opprettholdt ILAV-infeksjonene mange måneder etter at laksen var fjernet fra lokaliteten. Dette betyr at regnbueørret må anses som et reservoar for ILAV, noe som må hensyntas ved forvaltning av ILA-utbrudd.

Summary in English

Infectious salmon anaemia (ISA) is a serious viral disease caused by infectious salmon anaemia virus (ISAV). ISA is listed in Norway (list 2), in the EU and by the World Organisation of Animal Health (OIE). A new management plan for ISA is being prepared due to the introduction of a new animal health law in the EU in 2021. The number of confirmed ISA cases in Norway in 2020 was the highest since 1992, showing that ISA still must be prioritised. This project was initiated to provide increased knowledge about the prevalence and distribution of ISAV in infected populations, which is an important aspect in conjunction with of biosecurity assessments.

To investigate the presence of ISAV in different fish groups at an infected site (AP1), three fish groups at five different sites were studied, and tissue samples from kidney and swabs from gill and skin were examined with RT-qPCR. The results show that it can be very challenging, even in populations known to be infected, to identify ISAV-infected fish. This is particularly the case in the absence of clinical signs. This means that it is difficult to distinguish infected populations from uninfected populations, even when using a sensitive RT-qPCR method. Gill- and skin swabs were found suitable for identifying ISAV-presence at the population level, especially in fish without clinical signs of ISA. Swabs may therefore be a useful supplement for monitoring the ISAV status of a population. Similarly, skin swabs at the slaughter line (AP2) was found to be sufficiently sensitive to detect both virulent ISAV (ISAV HPRdel) and non-virulent ISAV (ISAV HPR0) at the population level. The method can therefore be an additional tool in risk assessments when slaughtering fish destined for export to countries with special documentation requirements in relation to ISA-status.

Although it is known that ISAV HPR0 occurs in all three production phases (broodstock, hatchery, food fish) there are limited studies on transmission routes between the production phases. Using Faroese data from the period 2008 to 2014 from land-based broodstock facilities, RAS smolt facilities and marine sites, it was investigated whether ISAV HPR0 was transferred vertically from broodstock to offspring (AP3). The results showed no genetic relationship between the ISAV HPR0 found in broodstock and ISAV HPR0 found in offspring. The findings thus support that horizontal infection is the transmission route of significance for ISAV HPR0. Furthermore, it was found that so-called "house strains" of ISAV HPR0 were established in the investigated RAS facilities, where the sequences within hatcheries were more similar to each other than the sequences between hatcheries. These differences increased over time.

There has been limited evidence of ISAV infections in rainbow trout populations. AP4 exploited historical samples from ISA outbreaks at two sites with rainbow trout and Atlantic salmon, where the salmon had been slaughtered while the rainbow trout remained at the site. Analyses of skin swabs with RT-qPCR and mRNA-specific RT-qPCR and of tissue samples with RT-qPCR, histology and immunohistochemistry were performed. The results showed that the rainbow trout populations maintained the ISAV infections several months after the salmon were removed from the site. This means that rainbow trout must be considered a reservoir for ISAV and should therefore be taken into account in when managing ISA outbreaks.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en alvorlig virussykdom forårsaket av infeksiøs lakseanemi virus (ILAV). ILA er listeført både i Norge (liste 2), i EU og av Verdens Dyrehelseorganisasjon (OIE). Som følge av at EU innfører en ny dyrehelseforordning i april 2021 er en ny forvaltningsplan for ILA i Norge under utarbeidelse.

Under den norske ILA-epidemien på slutten av 80-tallet og begynnelsen av 90-tallet ble det offisielt registrert opptil 80 årlige tilfeller av ILA. Gjennom målrettet arbeid og tett samarbeid mellom næringen, myndighetene og forskningsinstitusjonene ble ILA bragt under kontroll. I perioden mellom 1993 og 2019 ble det offisielt stadfestet mellom ett (1994, 2011) og 20 (2001) årlige ILA-tilfeller, med et gjennomsnitt på ti årlige tilfeller. I 2020 ble det imidlertid stadfestet 23 ILA-tilfeller, det høyeste siden 1992 (Sommerset *et al.*, 2021). Selv om det er for tidlig å si om dette betyr en vedvarende økning i antallet ILA-tilfeller viser situasjonen at ILA er en sykdom som fortsatt må tas på alvor.

Innføring av generelle biosikkerhetsrutiner og etablering av virusspesifikke diagnostiske metoder var sentrale i å få ILA-epidemien under kontroll, og er fortsatt et essensielt prinsipp innen sykdomskontroll i akvakultur. OIE definerer bioikkerhet som «a set of management and physical measures designed to reduce the risk of introduction, establishment and spread of animal diseases, infections or infestations to, from and within an animal population» (OIE, 2019). Kort oppsummert: overvåke, begrense/hindre spredning og redusere smittepress. For å kunne ivareta god biosikkerhet og gode biosikkerhetsrutiner er det essensielt å kunne skille eksponerte og infiserte populasjoner fra ikke-eksponerte og uinfiserte populasjoner. God og effektiv overvåking er et kjerneprinsipp i denne sammenhengen. Dette forutsetter imidlertid at man har kunnskap om hvordan smittestoffet man er interessert i fordeler seg i infiserte populasjoner og hvilket prøvetakingsregime som med høyest sikkerhet gir et korrekt bilde av populasjonens eksponeringsstatus og infeksjonsstatus.

De siste årene har det vært lokaliteter som har blitt båndlagt på grunn av mistanke om ILA som følge av PCR-påvisning av ILAV, men der mistankestatus eller stadfesting av klinisk ILA ikke har blitt verifisert på grunn av påfølgende negative prøver. Lokalitetene blir i slike tilfeller båndlagt med krav om gjentatt prøvetaking i minst ett år før en mistanke eventuelt kan oppheves. Det er ofte uavklart i hvilken grad populasjonen på slike lokaliteter faktisk utgjør en smitterisiko for omkringliggende lokaliteter.

I dag er det spesifikke dokumentasjonskrav av ILAV-status knyttet til eksport til enkelte land (Kina, Australia, New Zealand). Det er forventet at dokumentasjonskrav kan øke i fremtiden, særlig som følge av etablering av landbasert lakseoppdrett i flere land. Ved testing av eksportert fisk for ILAV ved ankomst til mottakerland er det i henhold til OIE regelverket ikke nødvendig å skille mellom ILAV HPR-del eller ILAV HPR0, noe som dermed kan medføre behov for hyppigere testing før eksport fra Norge. Konsekvenser av funn ved importkontroll ble eksemplifisert da Kina i 2015 påviste sykdomsfremkallende ILAV i norsk laks ved importkontroll (Xiao *et al.*, 2018).

For ILAV skilles det mellom ikke-sykdomsfremkallende ILA-virus (ILAV HPR0) og sykdomsfremkallende ILA-virus (ILAV HPR-del). Opprinnelsen til ILAV HPR-del er ILAV HPR0. ILAV HPR0 er utbredt, og forbigående infeksjonsepisoder med ILAV HPR0 er vanlig både hos settefisk og hos stamfisk og matfisk i sjø. Kunnskap om risiko knyttet til utvikling av ILAV HPR-del ved funn av ILAV HPR0 er mangelfull, både når det gjelder ILAV HPR0 reservoarer, hvor ofte en overgang skjer og hva som driver denne utviklingen. Et viktig tema for iverksetting av effektive biosikkerhetstiltak er hvorvidt ILAV smitter fra stamfisk til avkom. Vertikal smitte av ILAV har blitt beskrevet (Marshall et al. 2014, Nylund *et al.* 2007, 2019; Vike *et al.* 2009).

FHF-prosjekt 901181 «Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk» ble satt i gang for å gi økt kunnskap om ILA virusets forekomst og distribusjon i infiserte populasjoner, inkludert vertikal overføring av ILAV HPR0.

2.2 Prosjektets omfang og organisering

Prosjektet hadde oppstart i januar 2016 og ble avsluttet ved utgangen av april 2021. Det overordnede budsjettet var på 5 425 000 kroner, hvorav 350 000 kroner ble bevilget i 20.05.2019 for å støtte opp om arbeide knyttet vertikalsmitte-arbeidet (AP3) og til utvikling av en mRNA-spesifikk RT-qPCR ved Heilsufrøðiliga starvsstovan på Færøyene. Hele budsjettet ble finansiert av FHF.

Prosjektet var opprinnelig organisert i tre arbeidspakker. Ved prosjektrevidering i januar 2019 ble den opprinnelige Arbeidspakke 3 «Etablering av en standardisert smitemodell for ILA» erstattet av en ny arbeidspakke «Generell smittespredning og vertikal smitte». I tillegg ble det lagt til to nye arbeidspakker («Dokumentasjon av ILAV i regnbueørret» og «undersøkelse av ILAV persistens»), slik at prosjektet til slutt besto av totalt fem arbeidspakker.

Prosjektet ble ledet av Veterinærinstituttet, og hadde følgende prosjektgruppe:

- Knut Falk, Veterinærinstituttet, prosjektleder fra våren 2018 til 30.06.2019
- Mona Dverdal Jansen, Veterinærinstituttet, fra 2019. Prosjektleder fra 01.07.2019
- Torfinn Moldal, Veterinærinstituttet
- Siw Larsen, Veterinærinstituttet
- Lisa Furnesvik, Veterinærinstituttet
- Johanna Hol Fosse, Veterinærinstituttet, fra høsten 2019
- Debes H. Christiansen, Heilsufrøðiliga starvsstovan, fra mai 2019 (i referansegruppen inntil mai 2019)
- Petra E. Petersen, Heilsufrøðiliga starvsstovan, fra mai 2019
- Maria Aamelfot, Veterinærinstituttet, fratrudd januar 2019
- Marta Alarcon, Veterinærinstituttet, fratrudd september 2017
- Edgar Brun, Veterinærinstituttet, prosjektleder frem til våren 2018

Styringsgruppen besto av representanter fra to oppdrettselskap og en fiskehelsetjeneste:

- Bjarne B. Johansen, Nordlaks Oppdrett AS
- Karl Fredrik Ottem, Cermaq Norway AS
- Christine Thomassen, tidligere Vesterålen Fiskehelsetjeneste nå Andfjord Salmon AS

I tillegg var det opprettet en referansegruppe med følgende medlemmer:

- Debes H. Christiansen, Heilsufrøðiliga starvsstovan, til mai 2019. Deretter medlem i prosjektgruppen.
- Birgit C. Oidtmann, CEFAS
- Niels Jørgen Olesen, DTU
- Edmund Peeler, CEFAS

Observatør fra FHF: Sven Martin Jørgensen

3 Problemstilling og formål

Prosjektets overordnede mål var å fremskaffe forvaltningsrelevant kunnskap om ILA-viruset av betydning for biosikkerhetsvurderinger hos næring og forvaltning.

Prosjektets fem arbeidspakker hadde følgende delmål:

- Undersøke egnetheten av ikke-destruktiv testmetode (svabring) for påvisning av ILAV på infisert lokalitet (AP1)
- Undersøke forekomst av ILAV i ulike fiskegrupper på en infisert lokalitet (AP1)
- Undersøke om svabring på slaktelinja var egnet for å korrekt identifisere smittestatus på populasjonsnivå (AP2)
- Undersøke vertikal overføring av ILAV HPR0 fra stamfisk til avkom i materiale fra Færøyene (AP3)
- Undersøke og beskrive ILAV hos regnbueørrepopulasjoner i oppdrett over tid (AP4)
- Undersøke en indikasjon på mulig persistens av ILAV (AP5)

4 Prosjektgjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon

4.1 Arbeidspakke 1: Dokumentere forekomst av ILAV på lokaliteter ved hjelp av ikke-destruktiv prøvetaking (svabring)

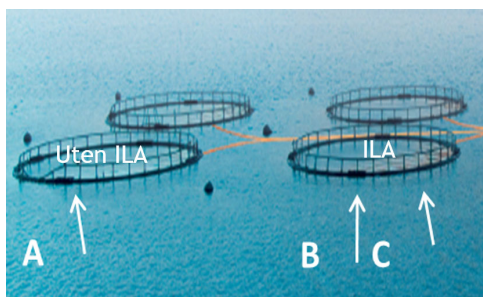
Fremgangsmåte

Målsetningen med AP1 var:

- å undersøke egnetheten av svabring for påvisning av ILAV på infisert lokalitet
- å undersøke forekomst av ILAV i ulike fiskegrupper på en infisert lokalitet

På hver lokalitet var målet å prøveta tre fiskegrupper, en gruppe fra en merd uten ILA-diagnose og to grupper fra en merd med ILA diagnose (Figur 1):

- tilsynelatende friske fisk fra merd uten mistanke om ILA (gruppe A)
- tilsynelatende friske fisk fra merd med ILA-diagnose (gruppe B)
- fisk med klinisk ILA fra merd med ILA-diagnose (gruppe C)



Figur 1: Gruppefordeling ved prøvetaking i AP1

For å kunne identifisere en tilsynelatende prevalens av ILAV på minimum 10% med 95% sikkerhet var målsetningen å prøveta 30 fisk fra hver gruppe. Fra hver fisk ble det tatt ut svaberprøver på RLT buffer fra gjelle, hud ved brystfinnebase (brystfinesvaber) og hud ved ryggfinnebase (ryggfinesvaber). Vevsprøver fra nyre på RNAlater ble tatt ut som kontrollorgan. Prøvene ble analysert med real-time RT-PCR med primere og probe for segment 8 beskrevet av Snow *et al.* (2006), med Ct-verdi på 40 som cut-off.

Resultater

Fem lokaliteter med stadfestet ILA var villige til å delta i denne arbeidspakken (Tabell 1). Lokalitetene ble prøvetatt fra 4 dager (lokalitet 4) til 45 dager (lokalitet 1) etter offisiell ILA mistanke, med en median på 10 dager. Lokalitetene oppgir dato for første mistanke på lokalitet til å være fra 0 til 28 dager før Mattilsynets dato for ILA mistanke, med en median på

6 dager. De prøvetatte lokalitetene inkluderte lokaliteter med ILA både tidlig og sent i produksjonsperioden.

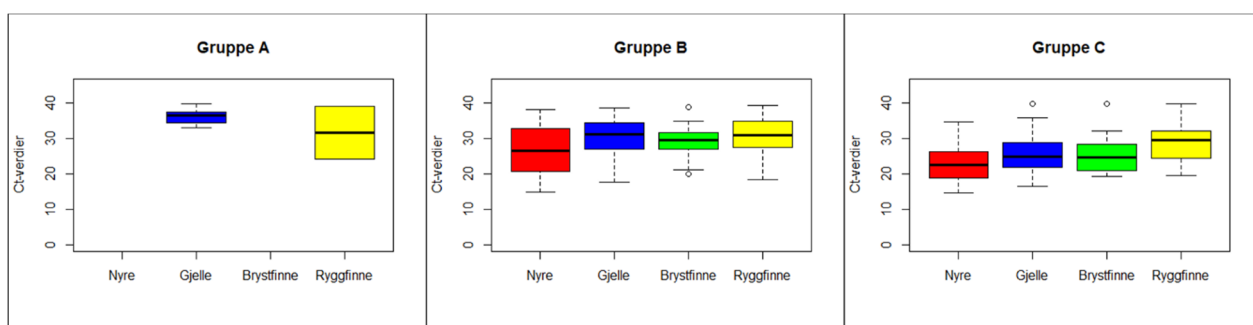
Tabell 1: Oversikt over deltagende lokaliteter.

Dato for ILA-mistanke/påvisning er Mattilsynets offisielle datoer. Gjennomsnittsvekt for lokalitetene er hentet fra Havbruksdata.

Lokalitet	PO	ILA Mistanke (MT)	ILA Påvist (MT)	Prøvetatt	Gj.vekt (kg)	Kommentar om prøveuttak
1	8	11.04.2016	19.04.2016	26.05.2016	5,6	28 fisk i Gruppe A. Ingen svimere/klinisk syke fisk i ILA-merd dermed 60 fisk i Gruppe B, 0 i Gruppe C.
2	8	13.06.2016	28.06.2016	06.07.2016	3,9	Kun 9 svimere/klinisk syke fisk funnet fra hele anlegget (Gruppe A).
3	6	09.09.2016	16.09.2016	19.09.2016	0,4	Ingen.
4	8	03.10.2016	11.10.2016	07.10.2016	0,2	Ingen. Sjøsett August 2016.
5	9	02.07.2019	12.07.2019	12.07.2019	5,0	Ingen klinisk friske fisk i ILA-merd. Fisk til Gruppe B tatt fra nabomerd (merd med økt dødelighet som merden med ILA-diagnose).

Resultatene fra PCR analysene viser en stor variasjon i andel prøver som testet positivt, både mellom gruppene (Gruppe A, B og C) og mellom prøvemateriale (nyrevev og ulike svaberpunkter) innad i gruppene. Oversikt over antall og andel positive prøver og respektive Ct verdier er vist i Tabell 2. Ryggfinesvaber var den metoden som ga høyest andel positive test resultater (42%), tett fulgt av gjellesvaber (38% positive). Nyrevev og brystfinesvaber ga begge 21% positive testresultater.

Boksplot av Ct-verdiene ved ulike prøvetakingsmetoder er vist i Figur 2. Det er ikke statistisk signifikante forskjeller mellom resultatene, hverken innad eller mellom de fiskegruppene eller prøvetakingspunktene.



Figur 2: Ct-verdier fra RT-qPCR analyse for ILAV med de ulike prøvetakingspunktene for Gruppe A (tilsynelatende friske fisk i merd uten ILA diagnose), Gruppe B (tilsynelatende friske fisk i merd med ILA diagnose) og Gruppe C (klinisk syk fisk fra ILA merd).

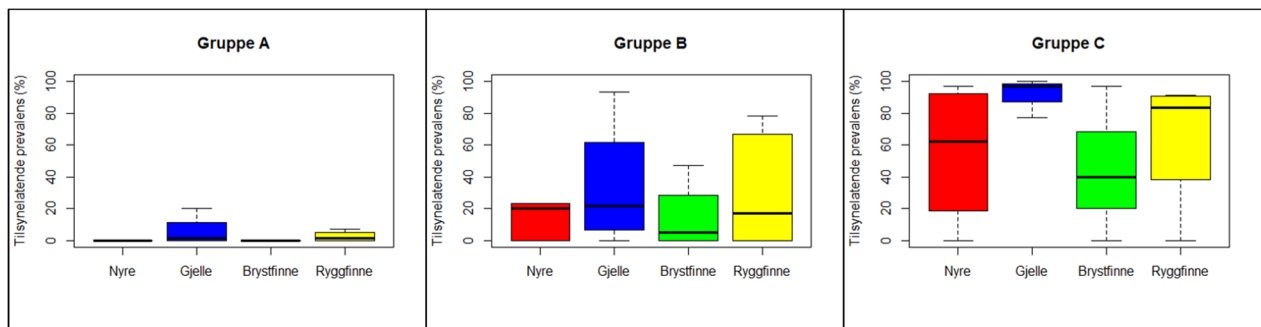
Tabell 2: Analyseresultater fra real-time RT-PCR analyser.

ID	Grp	N	Nyre pos. n (%)	Nyre Ct Gj.snitt (min,maks)	Gjelle Pos. n (%)	Gjelle Ct Gj.snitt (min,maks)	Bryst Finne Pos. n (%)	Bryst finne Ct Gj.snitt (min,maks)	Rygg Finne Pos. n (%)	Rygg finne Ct Gj.snitt (min,maks)
1	A	28	0		0		0		0	
1	B	60	14 (23%)	27.7 (15.0-38.3)	18 (30%)	27.4 (17.7-38.8)	28 (47%)	29.8 (20.0-38.9)	47 (78%)	29.1 (18.4-39.5)
1	C	0	n/a	n/a	n/a		n/a		n/a	
2	A	30	0		n/a		0		n/a	
2	B	30	0		n/a		0		n/a	
2	C	9	0		n/a		0		n/a	
3	A	30	0		6 (20%)	36.0 (33.0-39.9)	0*		1 (3%)	24.2
3	B	30	6 (20%)	25.3 (18.5-35.8)	4 (13%)	24.0 (22.6-27.1)	3 (10%)	26.2 (25.8-27.3)	5 (17%)	27.6 (24.8-28.5)
3	C	30	29 (97%)	20.5 (14.7-27.9)	29 (97%)	21.8 (16.6-39.8)	29 (97%)	22.4 (19.7-30.1)	27 (90%)	22.4 (19.7-37.0)
4	A	30	0		0		0		0	
4	B	30	0		0*		0		0*	
4	C	30	11 (37%)	22.0 (17.6-34.7)	23 (77%)	29.8 (22.0-35.8)	12 (40%)	28.8 (19.3-39.9)	23 (77%)	31.6 (22.0-39.8)
5	A	29	0		2 (7%)	36.7 (36.1-37.4)	n/a		1 (3%)	39.1
5	B	30	7 (23%)	25.6 (21.6-29.8)	28 (93%)	32.8 (25.1-36.3)	n/a		20 (67%)	35.6 (30.8-37.6)
5	C	23	20 (87%)	26.1 (14.7-32.7)	23 (100%)	25.5 (20.9-32.7)	n/a		21 (91%)	31.7 (27.4-35.8)
Antall testet			419		349*		335*		349*	
Antall positive			87		133		72		145	
% positive			21%		38%		21%		42%	

n/a = ikke prøvetatt

* For brystsvaber var det 28 analyserte prøver for lokalitet 3, Gruppe A. For gjellesvaber og ryggsvaber var det 29 analyserte prøver for lokalitet 4 Gruppe B.

Når man ser på den tilsynelatende prevalensen (andelen fisk som tester positivt med en ikke-perfekt test) per fiskegruppe er det noen forskjeller mellom gruppene, selv om forskjellene ikke er statistisk signifikante. For Gruppe A (tilsynelatende friske fisk uten ILA diagnose) var alle prøvene fra tre av fem lokaliteter negative for ILAV på alle prøvetypene. Ved én lokalitet (lokalitet 3) var 6 av 30 prøver (20%) positive for ILAV på gjellesvaber og 1 av 30 (3%) positive for ILAV på ryggfinesvaber. Tilsvarende tall for lokalitet 5 var henholdsvis 7% og 3%. Ingen av de 148 prøvene var positive for ILAV på nyrevev eller ved brystfinesvaber. Detaljerte resultater er vist i Figur 3 og Tabell 2. Alle 5 lokalitetene ble prøvetatt med nyrevev, mens 4 lokaliteter ble prøvetatt med hver av svabermetodene.



Figur 3: Tilsynelatende prevalens (%) av ILAV med de ulike prøvetakingspunktene for Gruppe A (tilsynelatende friske fisk i merd uten ILA diagnose), Gruppe B (tilsynelatende friske fisk i merd med ILA diagnose) og Gruppe C (klinisk syk fisk fra ILA merd).

For Gruppe B (tilsynelatende friske fisk i merd med ILA-diagnose) ble det på gruppenivå avdekket en høyere tilsynelatende prevalens ved alle prøvetakingsmetodene, sammenlignet med Gruppe A. Innad i gruppen ble det avdekket høyest tilsynelatende prevalens ved hjelp av svabring enn ved nyrevevsprøve (Figur 3, Tabell 2). Ved lokalitet 2 og lokalitet 4 testet alle fiskene negativt ved alle prøvetakingsmetodene de ble testet med. Alle de 5 lokalitetene ble prøvetatt med nyrevev og ryggfinesvaber, mens 4 lokaliteter ble prøvetatt med gjellesvaber og/eller brystfinesvaber.

Til sammenligning testet en relativt sett høy andel av prøvene for gruppe C (klinisk syk fisk i ILA merd) positivt ved de lokalitetene der det ble gjort positive funn av ILAV (Figur 3, Tabell 2). Alle svaberprøvene fra gjellevev testet positivt ved lokalitet 5, og metoden ble ikke benyttet ved lokalitet 2. På denne lokaliteten (lokalitet 2) var det kun 9 klinisk syke fisk å finne på hele lokaliteten, og alle fiskene testet negativt ved alle prøvemethodene. Totalt 4 lokaliteter ble prøvetatt i denne gruppen da det ikke var mulig å identifisere klinisk syk fisk i merden med ILA diagnose for lokalitet 1. Lokalitet 1 og 2 hadde startet utslakting på prøvetakingstidspunktet, noe som påvirket forekomsten av klinisk syke fisk på disse lokalitetene. Alle de 4 lokalitetene ble prøvetatt med nyrevev og ryggfinesvaber, mens 3 lokaliteter ble prøvetatt med gjellesvaber og/eller brystfinesvaber.

Diskusjon av funn i AP1

I utgangspunktet var målet med denne arbeidspakken å undersøke hvordan svaberprøver fungerer i forhold til «tradisjonelle» vevsprøver ved RT-qPCR analyser i en kjent ILAV-positiv populasjon (en lokalitet med offisiell ILA-diagnose). Generelt viste resultatene god overensstemmelse mellom svaberprøver og vevsprøver av nyre, og som forventet var det til dels lavere tilsynelatende prevalens ved bruk av nyreprøver enn ved svaberprøver (Figur 3). På grunn av relativt få observasjoner i hver gruppe kunne det ikke påvises statistisk signifikante forskjeller mellom testmetodene i de ulike gruppene. Imidlertid kan det mest interessante funnet i denne arbeidspakken anses å være relatert til de test-negative resultatene.

Resultatene viser at det kan være utfordrende å påvise ILAV med tradisjonell metode (analyse av nyrevev) både i klinisk frisk fisk (Gruppe A) og i fisk fra merd med stadfestet ILA (Gruppe B og Gruppe C). Dette er biologisk plausibelt da påvisning i nyrevev krever en systemisk infeksjon. Spesielt for klinisk friske fisk i merd med antatt høyest smittepress av de prøvetatte merdene (Gruppe B, fra ILA-merd) var svabring ofte i stand til å påvise ILAV i en høyere andel

fisk enn analyse av nyrevev er. For klinisk friske fisk fra merd med antatt lavere smittepress (Gruppe A, fra merd uten påvist ILA) var det kun svabring som avdekket tilstedeværelse av ILAV i to av populasjonene. Lokalt 2, der all fisk testet negativt med alle testmetodene, understreker utfordringene med å påvise ILA i en lokalitet der smittepresset kan antas å være lavt. Den relativt lave totalandelen av positive tester ved brystfinnesvaber (21%) antas å ha delvis sammenheng med at metoden kun ble benyttet på Lokalt 1 til 4 (Tabell 2). Det er ikke statistisk signifikant variasjon mellom svabringmetodene innad i gruppene, men resultatene tyder på at både gjellesvaber og hudsvaber er egnet, og hudsvaber (ved ryggfinnebase) anses som spesielt velegnet da den er særlig enkel å utføre og vil ha minimal påvirkning på fisken i etterkant av prøvetaking.

Siden svabring tester overflatevev som er i kontakt med vannmassene er metoden kun i stand til å si noe om eksponering av populasjonen for et smittestoff. Uttak av svaberprøver er rimelig, tidseffektivt og ikke-destruktivt, noe som gjør testmetoden spesielt egnet for populasjonsstudier av tilsynelatende klinisk friske fisk (representert ved studiens Grupper A og B) for å avdekke tilstedeværelse av ILAV. Dette åpner for mer kunnskapsbasert utvikling av gode forebyggende helseplaner både for enkeltlokaliteter og større områder.

Et ankepunkt ved svabring som metode har vært at det ved standard PCR-protokoller ikke har vært mulig å skille ikke-smittende viruspartikler (f.eks. virusfragmenter) fra smittende viruspartikler som utgjør en smitterisiko for populasjonen. Gjennom dette prosjektet har det blitt utviklet en mRNA-spesifikk RT-qPCR som er i stand til å identifisere transkripsjonsaktivitet og som dermed kan brukes som et supplement til standard PCR for svaberprøver (se AP2 og AP4).

Som forventet var nyrevev det vevet som totalt sett ga lavest tilsynelatende prevalens. Dette funnet er i kontrast til et tidligere studie utført av Giray *et al.* (2005) i USA der de fant at hudsvaber (uspesifisert prøvetakingssted) var mindre sensitiv enn nyrevev for påvisning av ILAV. Dette kan sannsynligvis forklares av at virusdyrking ble brukt som sammenlignende testmetode, samt en mulig raskere degenerering av svaberprøver på PBS sammenlignet med RLT buffer. Under norske feltforhold har det i en del tilfeller vært utfordrende å få bekreftet tilstedeværelse av ILAV med to uavhengige deteksjonsmetoder, selv ved repeterte prøveuttak. Kravet om bruk av to uavhengige testmetoder betyr at det i praksis ofte krever at man er i stand til å finne og prøveta fisk med klinisk ILA (risikobasert overvåking). Som observert blant studielokalitetene, der det ved lokalitet 1 og 2 var ingen/svært få fisk med klinikk å prøveta, kan dette være en ikke gjennomførbar forutsetning.

Selv om svabring som diagnostisk test ikke er validert med tanke på diagnostisk sensitivitet og spesifisitet viser resultatene at svabring kan være et nyttig supplement til avdekking av eksponering og potensiell smittestatus. I motsetning til akvamedisin er svabring av slimhinneoverflater en veletablert testmetode hos landdyr og innen humanmedisin (inkludert for influensavirus og SARS-CoV-2).

Det er uavklart i hvilken grad lokaliteter med ILA-mistanke som ikke lar seg stadfeste, eller ILA-lokaliteter der klinisk syk fisk slaktes ut og tilsynelatende frisk fisk blir stående i sjø, utgjør en smitterisiko for omkringliggende anlegg. I henhold til dagens forvaltningskrav gjennomføres det jevnlig prøvetaking av hjerte- og nyrevev (dagens standardmetode) for overvåking av ILAV i lokaliteter innen bekjempelses- og observasjonssoner. Selv om kun

nyrehev ble prøvetatt i denne studien indikerer resultatene at sannsynligheten for å påvise ILAV i merder uten ILA-klinikk kan være lav. Det kan derfor stilles spørsmål om hvorvidt potensielt mer sensitive metoder som svabring bør tas i bruk som supplerende testmetode. Selv om det ikke oppfyller offentlige krav til verifisering vil undersøkelser av svaberprøver, spesielt ved kombinasjon av standard PCR-protokoller og mRNA-spesifikk PCR, øke sannsynligheten for at overvåkingsaktiviteten gir et korrekt bilde av smittestatus og smitterisiko. Her kan i tillegg analyse av vannprøver for tilstedeværelse av ILAV og analyser av dødelighetsdata fra lokaliteter innen bekjempelses- og observasjonssoner være ytterligere supplement.

Den praktiske hovedutfordringen ved å bruke ikke-destruktive testmetoder som har en potensielt høyere sensitivitet enn dagens testregime er de økonomiske konsekvensene positive funn av meldepliktig ILAV HPRdel får. Manglende kompensasjon for tap som følge av pålagt utslakting betyr effektivt sett at selskaper som eventuelt velger å ta i bruk de metoder (enkeltvis eller i kombinasjon) som anses å kunne avdekke smitte på et tidligst mulig tidspunkt og minimere smittepress i et område blir økonomisk straffet. Fra et biosikkerhets-ståsted ville kompensasjonsordninger sannsynligvis kunne resultere i raskere oppdagelse av ILAV og reduksjon av smittepress. Dette ville åpne for utvidet bruk av kombinasjoner av testmetoder. Det er per i dag ikke kjent hvilken betydning ny forvaltningsplan for ILA kan få i denne sammenhengen.

Konklusjon fra AP1

- 1) Svabring av gjelle og hud er velegnet til å identifisere tilstedeværelse av ILAV på populasjonsnivå. Dette gjelder spesielt for fisk uten kliniske tegn på ILA.
- 2) Selv i kjente infiserte populasjoner kan det være utfordrende å finne ILAV-smittet fisk, særlig ved mangel på klinikk. Dette gjør at det selv med en sensitiv RT-qPCR metode er vanskelig å sikkert skille ILAV-smittede populasjoner fra usmittede populasjoner ved prøvetaking basert på generelle utvalgskriterier.

Leveranser fra AP1

Resultatene fra AP1 er presentert i en artikkel i Norsk Fiskeoppdrett 9-2021.

I tillegg har resultater fra AP 1 har blitt presentert på følgende konferanser:

- Jansen, M.D (2021) Chasing ISAV: the challenge of detecting ISAV in infected populations. EAFP 2021.
- Jansen, M.D. (2019) Can skin and gill swabs be used as a screening method for infectious salmon anaemia virus in Norwegian salmon farming. AquaEpi II 2019.
- Aamelfot, M. (2018) ILAV påvisning - kan svabring erstatte testing av indre organer? Havbrukskonferansen 2018.

Et manuskript til en vitenskapelig artikkel er under utarbeidelse, og de norske dataene vil sannsynligvis komplementeres med data fra repeterte uttak på en lokalitet med ILA-utbrudd på Færøyene.

4.2 Arbeidspakke 2: Undersøke forekomst av ILAV ved slakt ved hjelp av svabring

Fremgangsmåte

Målsetningene med AP2 var å undersøke om:

- svabring på slaktelinja er egnet for å korrekt identifisere smittestatus på populasjonsnivå

For å undersøke om svabring av hud på slaktelinje var tilstrekkelig sensitiv til å korrekt identifisere ILAV-statusen til en populasjon ble en slaktefiskgruppe fra hver av åtte lokaliteter prøvetatt.

Fire av anleggene hadde stadfestede ILA-diagnoser, to fra PO2 (ILA2, ILA4) og to fra PO10 (ILA1, ILA3). Lokalitetene utgjorde et bekvemmelighetsutvalg basert på velvillighet fra eierselskap til deltagelse og praktisk mulighet for gjennomføring av prøveuttak på dato for slakting. To av prøveuttakene ble gjort på to ulike slaktebåter direkte på lokalitetene (ILA1, ILA2) mens de to resterende prøveuttakene ble gjort på to forskjellige landbaserte slakterier (ILA3, ILA4). Antall dager mellom Mattilsynets offisielle dato for mistanke om ILA til dato for prøvetaking varierte fra 10 til 74 dager. For tre av slaktefiskgruppene var ILA stadfestet i samme merd før eller kort tid etter prøveuttak, mens en slaktefiskgruppe kom fra en merd uten ILA på en lokalitet med stadfestet ILA (Tabell 3).

Fire av slaktefiskgruppene var kontrollgrupper fra lokaliteter uten mistanke om ILA (ILAV HPRdel), to fra PO9 (Ktr1, Ktr 4) og to PO10 (Ktr 2, Ktr 3). Lokalitetene var et bekvemmelighetsutvalg av fire lokaliteter som skulle slakte fisk høsten 2019 på et slakteri som var villig til å gi prøvetakingsteamene gjentatt tilgang til slakteriet.

Fra alle slaktefiskgruppene ble det tatt ut 150 hudsvaber prøver for med 95% sikkerhet å kunne detektere en prevalens på minimum 2% dersom ILAV er tilstede. Dette er tilsvarende det kravet som normalt settes i forbindelse med standard OIE-krav til dokumentasjon av frihet. Alle svaberprøver ble analysert med en RT-qPCR analyse for ILAV segment 8 (Snow et al., 2006), med Ct-verdi på 40 som cut-off. I tillegg ble prøver fra ILA1, ILA2, ILA3 og Ktr1 analysert på Færøyene for ILAV segment 8 med RT-qPCR og en nyutviklet mRNA-spesifikk RT-qPCR for deteksjon av transkripsjonsaktivitet (indikasjon på infiserte celler).

Resultater

Alle slaktefiskgruppene fra ILA-lokalitetene testet positivt for ILAV, men det var stor variasjon i tilsynelatende prevalens. Denne varierte fra 100% (alle prøvene positive) til under 1% (en prøve positiv). For de to slaktefiskgruppene med tilsynelatende høyest prevalens (ILA1 og ILA2) ble samme delesjon som den som var funnet i forbindelse med stadfesting av ILA-diagnosen påvist. For fiskegruppen med lavest tilsynelatende prevalens (ILA4) var det ikke mulig å få opp en sekvens for sammenligning. For slaktefiskgruppen som kom fra ILA-positivt anlegg men der ILA ikke hadde blitt påvist i merden gruppen kom fra (ILA3) var det imidlertid kun HPR0 som ble påvist.

Resultatene fra kontrollgruppene viste at metoden også var egnet til å avdekke tilstedeværelse av ILAV HPR0 i antatt negative populasjoner (Ktr1). Det var ikke tidligere påvist ILAV HPR0 på lokaliteten.

Resultatene fra segment 8 RT-qPCR-analysene fra Veterinærinstituttet er vist i Tabell 3, og andelen positive ved henholdsvis segment 8 RT-qPCR og mRNA spesifikk RT-qPCR analyser på Færøyene er vist i Tabell 4.

Tabell 3: Resultater fra segment 8 RT-qPCR analyse av svaberprøver (ryggfinnebase) tatt på slaktelinja. Ct 40 ble brukt som cut-off verdi.

ID	ILA-status	ILA mistanke (MT)	Dato Prøvetatt	Ant dager mistanke - prøvetaking	Prøvetakings-Sted	qPCR ant. positive/ ant. testet	Ct-verdier median (min-maks)	Sekvensering
Ktr 1	Uten ILA	Ikke relevant	12.09.2019	Ikke relevant	Landbasert Slakteri	38/150	33,9 (25,6-39,7)	ILAV HPR0
Ktr 2	Uten ILA	Ikke relevant	12.09.2019	Ikke relevant	Landbasert Slakteri	0/150	-	Ikke relevant
Ktr 3	Uten ILA	Ikke relevant	19.09.2019	Ikke relevant	Landbasert Slakteri	0/150	-	Ikke relevant
Ktr 4	Uten ILA	Ikke relevant	11.10.2019	Ikke relevant	Landbasert slakteri	0/150	-	Ikke relevant
ILA 1	ILA påvist i merd (3d etter)	07.11.2019	19.11.2019	12	Slaktebåt	156/156	22,0 (16,0-27,6)	ILAV HPRdel Samme delesjon som ved stadfestelse
ILA 2	ILA påvist i merd	18.11.2019	28.11.2019	10	Slaktebåt	78/150	32,1 (24,1-38,3)	HPRdel Samme delesjon som ved stadfestelse
ILA 3	ILA påvist på anlegg ikke i merd	11.11.2019	29.11.2019	18	Landbasert slakteri	38/150	35,5 (30,3-39,6)	ILAV HPR0
ILA 4	ILA påvist i merd	04.10.2019	17.12.2019	74	Landbasert slakteri	1/150	34,5	Ingen sekvens

- = ingen Ct verdi (kun negative prøver)

Tabell 4: Resultater fra analyse av svaberprøver på Færøyene med henholdsvis segment 8 RT-qPCR og mRNA spesifikk RT-qPCR

	Ktr1	ILA1	ILA2	ILA3
N	39	138	78	38
Positive (seg8/mRNA)	21/12	138/138	61/36	13/3
% positive (seg8/mRNA)	54/31	100/100	78/47	34/8

Diskusjon av funn i AP2

Som forventet viser resultatene stor variasjon i den tilsynelatende prevalensen av ILAV i de ulike populasjonene. Dette kan ha sammenheng med tid fra mistanke til prøvetaking (anleggene med kortest tid fra mistanke til prøvetaking hadde høyest tilsynelatende prevalens) og avbøtende tiltak som påbegynt utslakting av lokalitet, men vil også kunne påvirkes av en rekke andre, utenforstående faktorer inkludert grad av «fanging» av slim og celler på svaber under prøvetaking i høyt tempo på slaktelinja.

Når prøvetaking gjennomføres på slaktelinje er det kun mulig å avdekke tilstedeværelse på populasjonsnivå gitt den store graden av krysskontaminering mellom individer i forbindelse med slakteprosessen. Resultatene viser at metoden i alle tilfeller var i stand til å avdekke tilstedeværelse av ILAV fra kjente positive anlegg. I tillegg avdekket metoden tilstedeværelse av ILAV HPR0 i en slaktefiskgruppe som ikke hadde kjent tilstedeværelse av ILAV HPR0 i forkant av prøvetaking. Resultatene fra den mRNA-spesifikke RT-qPCR analysen viser at ILAV-replikasjon har blitt initiert i alle de undersøkte slaktefiskgruppene, inkludert kontrollgruppen med ILAV HPR0. Dette indikerer at de svaber-positive fiskegruppene med ILAV HPRdel-historikk bør anses som infeksjose.

Selv om metoden per i dag ikke er vitenskapelig evaluert for diagnostisk sensitivitet og spesifisitet viser resultatene at metoden bør kunne anses som et supplement i screeningsverktøykassen. Mangel på full validering betyr at metoden ikke kan benyttes som eneste metode for å bevise fravær av ILAV/sannsynlig frihet for ILAV i forbindelse med eksport til land med særskilte krav. Den logistikkmessig enkle prøvetakingen gjør for øvrig metoden godt egnet til å fremskaffe tilleggsinformasjon om ILAV-status ved slaktetidspunktet. Metoden kan derfor være av relevans for risikovurdering ved slakt og opprettholdelse av høy internasjonal aksept for at norsk slaktet laks er trygg når det gjelder ILAV-smitte.

Konklusjon fra AP2

Resultatene viser at svabring på slaktelinje er tilsynelatende tilstrekkelig sensitiv til å påvise ILAV på fiskegruppenivå, og er dermed egnet som en tilleggs metode for å dokumentere ILAV-status på fiskegruppenivå.

Leveranser fra AP2

Resultatene fra AP2 er presentert i en artikkel i Norsk Fiskeoppdrett 9-2021.

Et manuskript til en vitenskapelig artikkel som beskriver den mRNA spesifikke RT-qPCRen er innsendt til tidsskriftet *Viruses* for fagfelle vurdering (Petersen, P.E.; Christiansen, D.H.; Dahl, M.M.; Vest, N.; Jansen, M.D.; Fosse, J.H.; Falk, K. Detection of active viral transcription by a TaqMan real-time RT-PCR assay targeting ISAV segment 7 spliced mRNA. *Viruses*, 2021, innsendt)

4.3 Arbeidspakke 3: Undersøke om ILAV HPR0 smitter vertikalt fra stamfisk til settefisk

Fremgangsmåte

Målsetningen med AP3 var å:

- undersøke vertikal overføring av ILAV HPR0 fra stamfisk til avkom i materiale fra Færøyene

Studien benyttet data fra 2008 til 2014, hovedsakelig fra Færøyene. Data fra tre landbaserte stamfiskanlegg (to på Island med leveranser til Færøyene og ett på Færøyene), seks smoltanlegg med RAS og 25 sjølokaliteter var inkludert i studien. Vevsprøver fra gjelle, nyre og hjerte på RLT buffer ble analysert med en duplex RT-qPCR (ILAV og ELF) og full-lengde sekvensert for segment 6 for bestemmelse av genotype og genogruppe (Christiansen *et al.*, 2011; Christiansen *et al.* 2017).

Resultater

Oppsummert viser resultatene av studien følgende:

- ILAV HPR0 var tilstede i alle produksjonsstadiene (stamfisk, settefisk, matfisk)
- Infeksjon med ILAV HPR0 er kortvarig og forbigående
- Stor variasjon i årlig prevalens, spesielt hos stamfisk ved stryking
- Statistisk signifikant forskjell i prevalens mellom smoltanlegg med lav årlig prevalens og smoltanlegg med høy årlig prevalens ($p < 0.001$)
- HPR0 identifisert i settefiskanleggene er av en annen genogruppe enn de som ble funnet hos stamfisken
- Sekvensene innad i settefiskanlegg var likere hverandre enn sekvensene fra andre settefiskanlegg ($p < 0.001$), og forskjellene økte over tid.
- Likhet mellom HPR0 funnet i settefisk og matfisk, samt matfisk og stamfisk

Diskusjon av funn i AP3

Som opphav til virulent ILAV (ILAV HPRdel) utgjør ILAV HPR0 et viktig kilde for nye HPRdel varianter (Christiansen *et al.* 2017; Lyngstad *et al.* 2012). Selv om det er kjent at ILAV HPR0 forekommer i alle tre produksjonsfasene (stamfisk, settefisk, matfisk) er dette lite beskrevet i litteraturen, og det er begrenset med studier om smitteveier mellom produksjonsfasene selv om vertikal smitte av ILAV er har blitt beskrevet (Marshall *et al.* 2014, Nylund *et al.* 2007, 2019; Vike *et al.* 2009).

Dataene fra Færøyene viste ingen genetisk sammenheng mellom HPR0 funnet i stamfisk og HPR0 funnet i avkom. Andre faktorer som tilsier at horisontal smitte er smitteveien av betydning for ILAV HPR0 inkluderer at ILAV HPR0 gir lokal infeksjon i gjellevev og hud (Aamelfot *et al.* 2016) og at infeksjonen er relativt kortvarig og forbigående (Christiansen *et al.* 2011 og denne studien). Det at infeksjonene er forbigående gjør screening mer komplisert og uforutsigbart, da jevnlig prøvetakinger i alle epidemiologiske enheter er nødvendig for å redusere usikkerheten i resultatene. Både i Norge og på Færøyene har analyse av vannprøver vist seg å være i stand til å påvise ILAV HPR0, og vannanalyser kan derfor utgjøre et

supplement til mer tradisjonelle prøvetakingsmetoder for å avdekke tilstedeværelse av ILAV HPR0 i settefiskpopulasjoner.

Studien fant også at det etablerte seg såkalte «husstammer» av ILAV HPR0 i de undersøkte RAS anleggene. Sekvensene innad i settefiskanlegg var likere hverandre enn sekvensene fra andre settefiskanlegg, og disse forskjellene økte over tid. Betydningen av etableringen av husstammer for frekvensen av påvist ILAV HPR0 har foreløpig ikke blitt avklart.

Konklusjon fra AP3

Denne studien fant ikke støtte for vertikal smitte av ILAV HPR0 fra stamfisk til avkom basert på studiematerialet fra Førøyene. Imidlertid ble det vist at ILAV HPR0 utvikler «husstammer» i settefiskanlegg.

Leveranser fra AP3

Det har blitt skrevet en artikkel til Norsk Fiskeoppdrett og Norsk Veterinærtidsskrift på ILAV HPR0.

Et manuskript til vitenskapelig artikkel på resultatene fra AP3 innsendt til tidsskriftet Viruses for fagfellevurdering (Christiansen, D.H., Petersen, P.E., Dahl, M.M., Vest, N., Aamelfot, M., Kristoffersen, A.B., Jansen, A.B., Fosse, J.H., Matejustova, I., Gallagher, M., Jónsson, G., Rodriguez, E., Falk, K. No evidence of vertical transmission of nonvirulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) in farmed Atlantic salmon. Viruses, 2021, innsendt).

Når den vitenskapelige artikkelen er antatt planlegges det en separat artikkel fra AP3 i Norsk Fiskeoppdrett for å formidle mer detaljerte resultater direkte til næringen og andre interessenter.

4.4 Arbeidspakke 4: Dokumentere infeksjon med ILAV hos regnbueørret

Fremgangsmåte

Formålet med AP4 var:

- Å undersøke og beskrive ILAV hos regnbueørretpopulasjoner i oppdrett over tid

Arbeidspakken benyttet arkiverte data og prøver fra to lokaliteter i Lofoten som hadde både regnbueørret og atlantisk laks. Begge lokalitetene hadde samme eier og lå i en bekjempelsessone for ILA som følge av ILA-utbrudd på andre lokaliteter.

Den ene lokaliteten, Lokalitet A, fikk en ILA-diagnose på laksen i februar 2015, og mens det ble observert akutt dødelighet hos laks var det ingen klinikk eller dødelighet hos regnbueørret. Laksen ble utslaktet i begynnelsen av mars 2015, og gjenværende regnbueørret ble prøvetatt i henholdsvis midten av mars og midten av mai (Figur 4). Gjennomsnittsvekt ved første prøvetaking var 0.8kg.

Den andre lokaliteten, Lokalitet B, lå to kilometer unna Lokalitet A. Her ble laksen utslaktet i oktober 2014, oppgitt å være som følge av akutt dødelighet forårsaket av lusebehandling. Det forelå ingen ILA-mistanke, men ILA-virus ble funnet i eksporterte laksefileter ved importinspeksjon i Kina (Xiao et al., 2018). Påfølgende RT-qPCR analyser ved Veterinærinstituttet av frosne fileter bekreftet det kinesiske funnet. Fire månedlige prøveuttak (midten av februar til begynnelsen av juni 2015) av gjenværende regnbueørret ble gjennomført frem til slaktetidspunktet (Figur 4). Med unntak av noen svimere på overflaten ved første prøvetaking ble det ikke observert klinikk eller dødelighet på regnbueørreten. Gjennomsnittsvekt ved første prøvetaking var 4.2kg.

Alle vevs- og svaberprøver ble analysert med en RT-qPCR analyse for ILAV segment 8 (Snow *et al.*, 2006), med Ct-verdi på 40 som cut-off. Et utvalg prøver ble undersøkt ved histologi og immunohistokjemi. I tillegg ble 20 prøver analysert på Færøyene med ILAV segment 8 RT-qPCR og mRNA-spesifikk RT-qPCR.

Resultater

Det ble avdekket PCR-positive prøver ved alle prøvetakingstidspunktene i begge anleggene (Figur 4). Totalt 32 prøver (20 fra om Lokalitet A and 12 fra Lokalitet B) ble i tillegg undersøkt med histologi og immunohistokjemi (Aamelfot *et al.*, 2012). Det ble kun observert milde, ikke-spesifikke lesjoner, og det ble ikke påvist merking ved immunohistokjemisk undersøkelse for virusprotein. Målt hematokrit var innenfor normale nivåer. For de 20 prøvene analysert på Færøyene, testet 13 (65%) prøver positivt for segment 8 mens 5 (25%) testet positivt på den mRNA-spesifikke analysen. En eller flere positive prøver ble funnet ved den mRNA-spesifikke analysen på hver av de tre prøveuttakene der hudsvaber ble tatt ut (første prøveuttak ved Lokalitet A, andre og fjerde prøveuttak på Lokalitet B).


2 | **WILEY** *Journal of Fish Diseases* 

TABLE 1 Overview of rainbow trout sampling schemes and laboratory results

Farm	Average weight	Sampling date	ISAV RT-qPCR ^a Positive/analysed (Ct value ^b)							
			Kidney (RNA later)	Heart (RNA later)	Pooled heart & kidney (RNA later)	Plasma (RNA later)	Gill tissue (RNA later)	Gill swab (RLT-buffer (QIAGEN))	Skin swabs (RLT-buffer (QIAGEN))	Sequencing
A	0.8 kg	16/3-2015	1/20 (29)	1/20 (30)		1/20 (38)	6/20 (27-37, median 30)	8/20 (32-38, median 36)	ISAV-HPR-deleted	
		18/5-2015			7/10 (15-38, median 35)				ISAV-HPR-deleted	
B	4.2 kg	13/2-2015			10/29 (12-36, median 33)				ISAV-HPR-deleted	
		16/3-2015	0/10	0/10		0/10	0/10	7/10 (32-38, median 35)	Not performed	
		18/5-2015			9/20 (29-38, median 32)				ISAV-HPR-deleted	
		4/6-2015 (at slaughter)	0/25	0/25		0/25	0/25	7/25 (33-36, median 35)	ISAV-HPR-deleted	

^aRT-qPCR targeting the matrix gene (segment 8) of ISAV.
^bThe range of positive Ct values where more than one positive sample were recorded are included in brackets.

Figur 4: Oversikt over prøvetaking og resultater for AP4 (fra Alarcon et al., 2021)

Diskusjon av funn i AP4

Mens naturlige ILA-utbrudd kun har blitt observert i atlantisk laks har ILAV blitt påvist i vill, sjøørret uten tegn på klinisk sykdom (Raynard *et al.*, 2001). I tillegg har replikasjon av ILAV, med og uten sykdomsutvikling, blitt demonstrert i eksperimentelt infisert regnbueørret (Biacchesi *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2012). Det er også blitt antydnet at denne arten kan fungere som friske bærere og reservoarer av ILAV (Nylund *et al.*, 1997; Snow *et al.*, 2001), men dette har ikke blitt dokumentert.

Selv om resultatene fra RT-qPCR analysene viste at det kunne påvises ILAV RNA i prøvene fra regnbueørret henholdsvis to- og syv måneder etter at laksen på lokalitetene var utslaktet gjorde mangelen på positive funn på histologi og immunohistokjemi at det ikke kunne fastslås om det var en aktiv infeksjon i de to regnbueørret populasjonene eller om det kun var deteksjon av virusfragmenter. Selv om det var relativt få prøver som testet positivt ved den mRNA-spesifikke RT-qPCR analysen viser de positive funnene ved alle hudsvaber-uttakene imidlertid at det med stor sannsynlighet var aktiv transkripsjon av ILAV i populasjonene. Det at andre nærliggende lokaliteter i ILA-bekjempelsessonen var tømt for fisk støtter ytterligere konklusjonen om at det var regnbueørretpopulasjonene selv som opprettholdt virusinfeksjonen. Det anses dermed som sannsynlig at det var en aktiv, subklinisk infeksjon med utskillelse av infeksiose viruspartikler i begge regnbueørretpopulasjonene.

Funn av ILAV i svaberprøver fra hud antyder en replikasjon i slimhinneepitel hos regnbueørret, noe som i så fall gir en celletropisme som ligner det som tidligere er beskrevet for atlantisk laks infisert med ILAV HPR0 (Aamelfot *et al.*, 2016) samt ved tidlige infeksjonsstadier med ILAV HPR-del (Aamelfot *et al.*, 2015). Manglende funn av positive celler ved immunohistokjemi, samt manglende tegn på ILA på histologi, indikerer fravær av aktiv infeksjon og sannsynliggjør at de positive RT-qPCR-funnene for indre organer skyldes kontaminering fra hudslim under prøveuttak. Korrelasjonen mellom positive funn og prøvetakingsteam (poolede hjerte- og nyreprøver vs individuelle organprøver) ytterligere sannsynliggjør denne konklusjonen.

Konklusjon fra AP4

Opprettholdelsen av ILAV-infeksjon over tid i begge regnbueørretpopulasjonene viser at regnbueørret må anses som et reservoar for ILAV, noe som bør hensyntas i forbindelse med forvaltning av ILA-utbrudd.

Leveranser fra AP4

Resultatene fra AP4 er presentert i en artikkel i Norsk Fiskeoppdrett 9-2021.

En short communication vitenskapelig artikkel er publisert i Journal of Fish Diseases (Alarcon *et al.*, 2021).

4.5 Arbeidspakke 5: Undersøke om ILAV kan persistere innen et område over tid

Fremgangsmåte

Formålet med AP5 var:

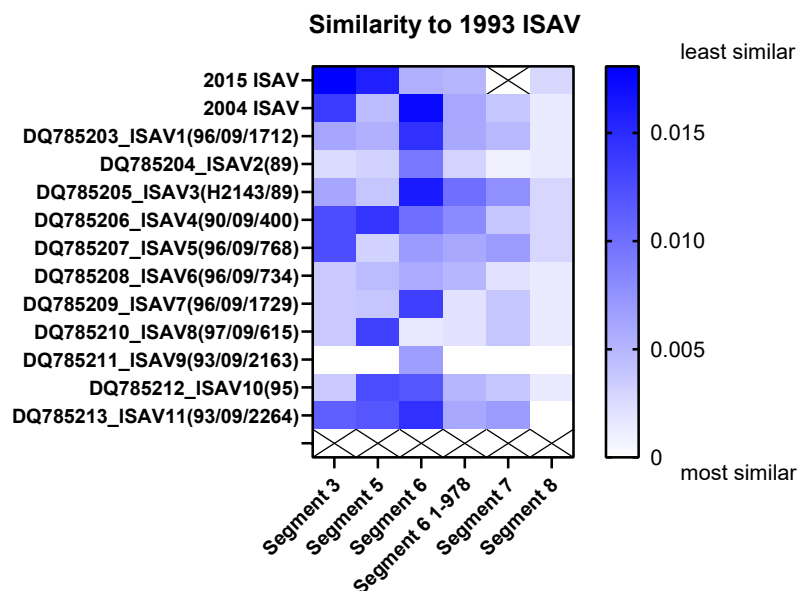
- Å undersøke en indikasjon på mulig persistens av ILAV

Bakgrunnen for innlemmelse av AP5 i prosjektet var at det ble oppdaget en stor grad av sekvenslikhet i HE-genet knyttet til ILA-utbrudd i ett enkelt geografisk område (Leknes) over et tidsrom på 25 år. Da identifisering av en eventuell persistens av ILAV ville være av stor forvaltningsmessig betydning ble det gjennomført sekvensering av flere segmenter i isolater fra 1993, 2004 og 2015.

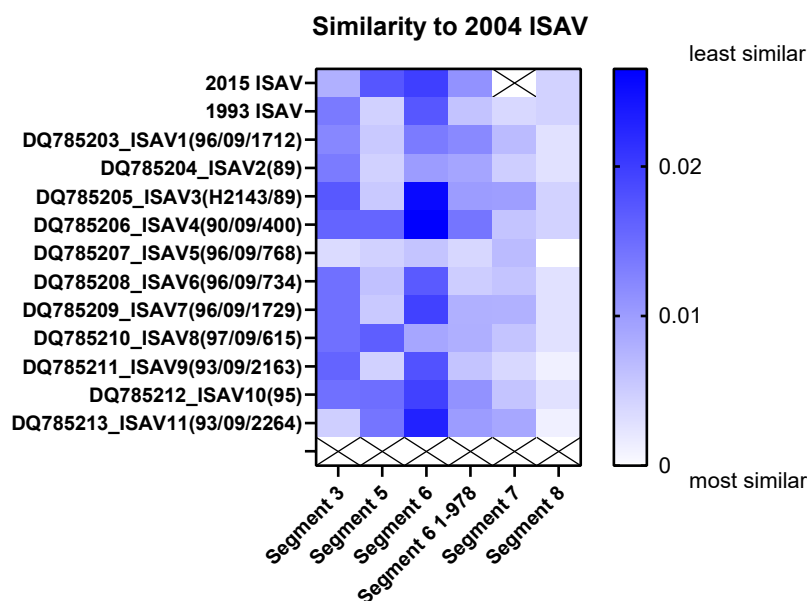
Segment 3A, 5, 6, 7 og 8 ble vurdert til å ha høyest kvalitet og ble brukt som basis for sammenligningene ved parvis distanse til 1993 ILAV og maximum likelihood fylogenetiske trær. Et panel med 11 publiserte fullgenom norske ILAV, isolert i perioden 1980 til 1997, dannet referansen for normal variasjon.

Resultater

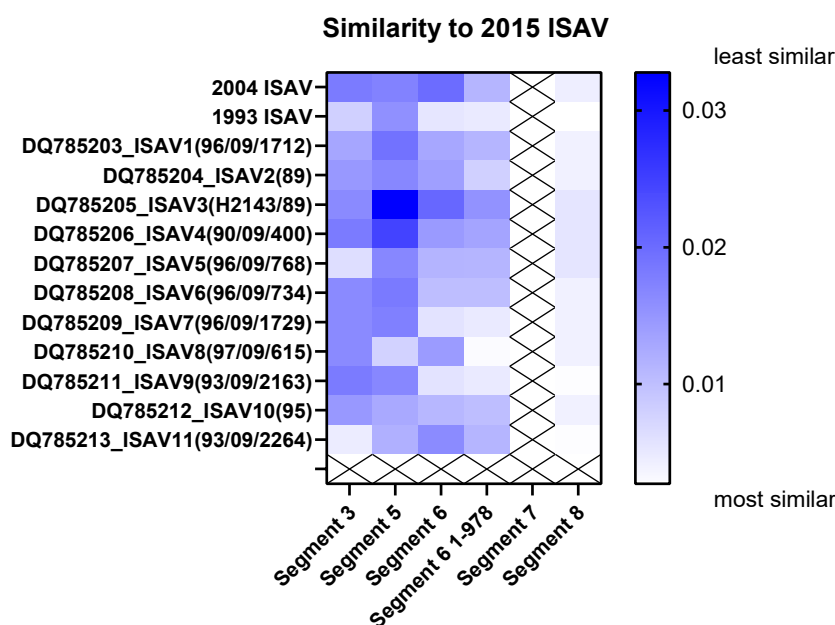
Resultatene viser at 2015- og 1993-isolatene har den samme HPR-delesjonen mens F-genmutasjonen er ulik. Totalt sett er 2004- og 2015-isolatene er relativt like 1993-isolatet, men det er også likhet med ILAV fra andre lokaliteter i samme periode. Resultatene er illustrert ved «heatmaps» i Figur 5 til Figur 7. Variasjonen var minst for segment 8.



Figur 5: Likhet med 1993-isolatet fra Leknes-området. Norske referanseisolater har navn med DQ-prefix.



Figur 6: Likhet med 2004-isolatet fra Leknes-området. Norske referanseisolater har navn med DQ-prefix.



Figur 7: Likhet med 2015-isolatet fra Leknes-området. Norske referanseisolater har navn med DQ-prefix.

Diskusjon av funn i AP5

Sekvensdataene gir ikke grunnlag til å konkludere med at virusene innad i dette området er mer like seg imellom enn det de er med virus fra andre områder i samme tidsrom. Homologien i F-genet var mindre uttalt enn i HE, og det kan stilles spørsmål om dette kan skyldes reassortering med for eksempel lokal HPR0 eller en ny delesjon i et lokalt HPR0.

I tillegg viste de parvise sammenligningene, illustrert ved «heatmaps» i Figur 5 til Figur 7, at det var minst genetisk variasjon i segment 8. Dette siste er av vesentlig betydning da det er dette segmentet som brukes i den diagnostiske RT-qPCR analysen.

Konklusjon fra AP5

Resultatene støtter den gjeldende forståelsen av at ILAV ikke persisterer i et område etter brakklegging, og gir dermed ikke grunnlag for endring av nåværende forvaltningspraksis. Den parvise sammenligningen viste at det var minst variasjon i segment 8. Dette er viktig kunnskap da det er dette segmentet som brukes i den diagnostiske RT-qPCR analysen.

Leveranser fra AP5

Det er ingen separate leveranser fra AP5 utover det som er dokumentert i denne sluttrapporten.

5 Hovedfunn

Prosjektet har gitt følgende hovedfunn:

- Det kan være vanskelig å påvise ILAV selv i merder med ILA diagnose
- Svabring av overflate er velegnet til å identifisere tilstedeværelse av ILAV på populasjonsnivå. Dette gjelder også på slaktelinja. Metoden er spesielt velegnet ved mangel på kliniske tegn på ILA.
- Det ble ikke funnet indikasjoner på vertikal smitte av ILAV HPR0 fra stamfisk til avkom på Færøyene
- ILAV HPR0 etablerer «husstammer» i settefiskanlegg
- Regnbueørret må anses som et potensielt reservoar for ILAV HPRdel ved forvaltning av ILA-utbrudd
- Det ble ikke funnet indikasjoner på persistens av ILAV etter brakklegging. Ved sammenligning av gensekvenser over tid ble det funnet minst variasjon i segment 8 (segmentet som er målet for den diagnostiske PCR analysen)

6 Leveranser

Dette prosjektet har vært et viktig bidrag i forbindelse med samarbeid i det internasjonale ILA-forskernettverket. De første årene av prosjektperioden foregikk dette i ScoFoNo-gruppen (forskere fra Skottland, Færøyene og Norge). I de siste par årene har forskersamarbeidet hovedsakelig vært videreført i FoNo-gruppen, bestående av Debes H. Christiansen og Petra E. Petersen fra Færøyene og Knut Falk, Johanna Hol Fosse og Mona Dverdal Jansen fra Veterinærinstituttet.

Publikasjoner:

- Jansen, M.D., Moldal, T., Falk, K. (2021) Kan vi bli mer effektive i jakten på ILA-viruset? Norsk Fiskeoppdrett, 9-2021.
- Alarcón, M., Moldal, T., Jansen, M. D., Aamelfot, M., Sindre, H., Lyngstad, T. M., Falk, K. (2021) Infectious salmon anaemia virus detected by RT-qPCR in Norwegian farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Fish Diseases*, 44, 479-481. <https://doi.org/10.1111/jfd.13315>
- Fosse, J.H., Falk, K. (2021) Hvordan oppstår sykdomsfremkallende ILA-virus? Norsk Fiskeoppdrett, 1-2021, 56-59.
- Falk, K., Fosse, J.H., Jansen, M.D., Christiansen, D.H. (2020) Hva vet vi om HPR0 i dag? Norsk Fiskeoppdrett, 2-2020, 58-60.
- Falk, K., Fosse, J.H., Jansen, M.D., Christiansen, D.H. (2020) Hva vet vi om HPR0 i dag? Norsk Veterinærtidsskrift, 4-2020, 218-220.
- Christiansen, D.H., McBeath, A.J.A., Aamelfot, M., Matejusova, I., Fourrier, 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. *Journal of General Virology*, 98, 595-606. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000741>
- Falk, K., Aamelfot, M. (2017) Infectious Salmon Anaemia. In: *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection* (Eds. P.T.K. Woo & R.C. Cipriano) CAB International, Oxfordshire, UK (pp 68-78) ISBN-13: 978 1 78064 778 4 doi:10.1079/9781780647784.0068

Konferansepresentasjoner:

- Jansen, M.D (2021) Chasing ISAV: the challenge of detecting ISAV in infected populations. EAFP 2021.
- Falk, K. (2019) Erfaring med ILA fra Norge. Oppstartsmøtet for ny ILA-bekjempelsesplan 20.3.2019
- Christiansen, D.H. Erfaring med ILA på Færøyene. Oppstartsmøtet for ny ILA-bekjempelsesplan 20.3.2019
- Jansen, M.D. (2019) Can skin and gill swabs be used as a screening method for infectious salmon anaemia virus in Norwegian salmon farming. AquaEpi II 2019, Thailand.
- Aamelfot, M. (2018) ILAV påvisning - kan svabring erstatte testing av indre organer? Havbrukskonferansen 2018, Oslo.
- Alarcon, M. (2017) Infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in Norwegian farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). EAFP 2017, Nord-Irland.

- Falk, K. (2017) Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV): Evolution from non-virulent HPR0 type to virulent HPR-deleted virus. 58th Western Fish Disease Workshop, USA.
- Falk, K. (2016) Significance of HPR0 in relation to ISA disease caused by HPR-deleted ISA variants. Atlantic Canada fish farmers association conference, Canada.

7 Referanser

Aamelfot, M., Dale, O. B., Weli, S. C., Koppang, E. O., & Falk, K. (2012). Expression of the infectious salmon anemia virus receptor on Atlantic salmon endothelial cells correlates with the cell tropism of the virus. *Journal of Virology*, 86, 10571-10578. <https://doi.org/10.1128/JVI.00047-12>

Aamelfot, M., McBeath, A., Christiansen, D. H., Matejusova, I., & Falk, K. (2015). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) mucosal infection in Atlantic salmon. *Veterinary Research*, 46, 120. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0265-1>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151723>

Alarcón, M., Moldal, T., Jansen, M. D., Aamelfot, M., Sindre, H., Lyngstad, T. M., Falk, K. (2021) Infectious salmon anaemia virus detected by RT-qPCR in Norwegian farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Fish Diseases*, 44, 479-481. <https://doi.org/10.1111/jfd.13315>

Biacchesi, S., Le Berre, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., Brémont, M., Quillet, E., & Boudinot, P. (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *Journal of Fish Diseases*, 30, 631-636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00854.x>

Christiansen, D. H., Ostergaard, P. S., Snow, M., Dale, O.B., Falk, K. (2011) A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV-HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands." *Journal of General Virology*, 92, 909-918.

Christiansen, D. H., McBeath, A. J. A., Aamelfot, M., Matejusova, I., Fourrier, 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. *Journal of General Virology*, 98, 595-606.

Lyngstad, T.M., Kristoffersen, A.B., Hjortaa, M.J., Devold, M., Aspehaug, V., Larssen, R.B., Jansen, P.A. (2012) Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101, 197-206. doi: 10.3354/dao02520

Marshall, S.H., Ramírez, R., Labra, A., Carmona, M., Muñoz, C. (2014) Bona fide evidence for natural vertical transmission of infectious salmon anemia virus in freshwater brood stocks of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Southern Chile. *Journal of Virology*, 88, 6012-8. doi: 10.1128/JVI.03670-13.

Nylund, A., Kvenseth, A. M., Krossøy, B., & Hodneland, K. (1997). Replication of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 20, 275-279. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00300.x>

Nylund, A., H. Plarre, M. Karlsen, F. Fridell, K. F. Ottem, A. Bratland and P. A. Saether (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Archives of Virology*, 152, 151-179.

Nylund, A., Brattespe, J., Plarre, H., Kambestad, M., Karlsen, M. (2019) Wild and farmed salmon (*Salmo salar*) as reservoirs for infectious salmon anaemia virus, and the importance of horizontal- and vertical transmission. *PLoS ONE*, 14(4): e0215478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215478>

OIE (World Organisation for Animal Health) (2019a) The Aquatic Animal Health Code Glossary. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_glossaire.htm

Olsen, C. M., Braanen, S., Falk, K., & Rimstad, E. (2012). Multiple passage of infectious salmon anaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), did not induce increased virus load. *Journal of Fish Diseases*, 35, 827-838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01403.x>

Raynard, R. S., Murray, A. G., & Gregory, A. (2001). Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 93-100. <https://doi.org/10.3354/dao046093>

Sommerset, I., Bang Jensen, B., Bornø, G., Haukås, A., Brun, E. (2021) Fiskehelserapporten 2020. Veterinærinstituttet rapportserie 41a/2021. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2021/fiskehelserapporten-2020>

Snow, M., McKay, P., McBeath, A. J., Black, J., Doig, F., Kerr, R., Cunningham, C. O., Nylund, A., & Devold, M. (2006). Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Development in Biologicals (Basel)*, 126, 133-145.

Vike, S., Nylund, S., Nylund, A. (2009) ISA virus in Chile: evidence of vertical transmission. *Archives of Virology*, 154, 1-8.

Xiao, L., Lin, H., Yang, M., Chen, S., An, W., Wu, X., Liu, H., Li, D., Yan, Y., Hu, J., Wang, J., & Sun, Y. (2018). The first instance of HPR-deleted ISAV detection in eviscerated, fresh salmon at a Chinese entry-exit port. *Aquaculture*, 485, 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.001>

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Ås

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no