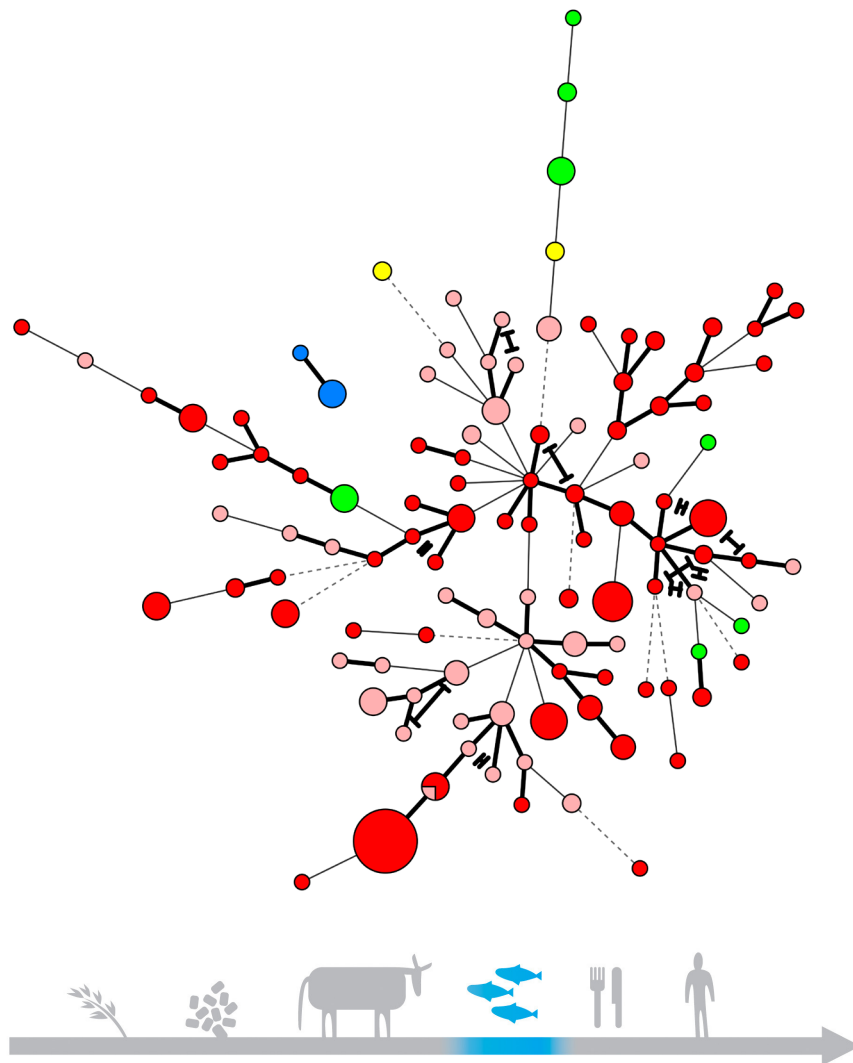


Laksepox: Smittesporing i fisk og miljøprøver, sanering av anlegg og mulig vertikal overføring



Laksepox: Smittesporing i fisk og miljøprøver, sanering av anlegg og mulig vertikal overføring

Innhold

1. Sammendrag	3
2. Summary	4
3. Innledning	5
4. Prosjektorganisering	7
5. Problemstilling og formål	7
6. Bakgrunn og metode	8
AP1: Etablere nye metoder for sporing av smitte og kunne skille virus fra ulike steder og tider vha genetiske markører	8
AP2: Etablere prosedyrer for mest effektiv deteksjon av virusmitte i settefiskanlegg	10
AP3: Epidemiologisk kartlegging av smitteveier til og smittedynamikk innad i settefiskanlegg og overføring til sjøfase ved en longitudinell observasjonsstudie.....	11
AP4: Undersøke effekt på virusforekomst av brakklegging og desinfeksjonstiltak i anlegg med påvist smitte.	12
AP5: Undersøke om infisert stamfisk har potensial til å overføre virus til neste generasjon.	12
7. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	13
AP1: Etablere nye metoder for sporing av smitte og kunne skille virus fra ulike steder og tider vha genetiske markører	13
AP 2: Etablere prosedyrer for mest effektiv deteksjon av virusmitte i settefiskanlegg.	17
AP 3: Epidemiologisk kartlegging av smitteveier til og smittedynamikk innad i settefiskanlegg og overføring til sjøfase ved en longitudinell observasjonsstudie.....	26
AP4 Undersøke effekt på virusforekomst av brakklegging og desinfeksjonstiltak i anlegg med påvist smitte	27
AP5: Undersøke om infisert stamfisk har potensial til å overføre virus til neste generasjon	30
8. Hovedfunn	30
9. Major findings	31
10. Leveranser	31
11. Referanser	32
12. Vedlegg	33

Prosjektgruppe/Forfattere
 Brit Tørud (prosjektleder), Karoline Sveinsson,
 Snorre Gulla, Maria K Dahle, Mona Gjessing, Ole
 Bendik Dale og Even Thoen (Veterinærinstituttet)

Oppdragsgiver
 Fiskeri- og havbruksnæringens
 forskningsfinansiering

Prosjektpartner
 Renate Johansen og Stian Nylund (Pharmaq
 Analytiq)

Design omslag: Reine Linjer
 Foto forside: Snorre Gulla

ISSN 1880-3290

© Veterinærinstituttet 2020

1. Sammendrag

Laksepox har de siste årene blitt kjent som en potensielt katastrofal sykdom med høy dødelighet i noen anlegg, mens andre registrerer kun smitte uten synlig sykdom. Prosjektets formål var å kartlegge smitte og se på noen potensielle smitteveier. Det største gjennombruddet er utvikling av et sporingsverktøy for å vurdere slektskap mellom virus. Resultatene viser generelt en høy grad av slektskap mellom laksepoxvirus fra ulike geografiske opphav i Nord-Europa, samtidig som prøver fra samme land viser noe større likhet. Oppløsningen i metoden er høy nok til å kunne skille ulike epidemiologiske tilfeller, og kan identifisere tilstedeværelse av mer enn ett isolat i tilfeller med koinfeksjon. Selv om noen fjordssystemer og settefiskanlegg ser ut til å ha en «husstamme» som vedvarer over tid, så er det ukjent om disse kommer fra reinfeksjon fra samme kilde, eller om det samme isolatet overlever internt i anlegget.

Genotyping av virus fra fiskegrupper fra Norge med ulik klinisk sykdomshistorie gir så langt ingen indikasjoner på at det finnes varianter av viruset som er hhv lav- eller høy-virulente. Både erfaringer fra dette prosjektet og resultater fra NFR-prosjektet SALPOX tyder på at laksepoxutbrudd i de aller fleste tilfeller er avhengige av flere faktorer enn kun smitte, som for eksempel stress.

Fiskegrupper i de fem deltakende settefiskanleggene ble prøvetatt i perioder av produksjonssyklusen med økt stressnivå, for å øke sjansen for påvisning av virus. Testingen viser veldig forskjellige trender i smitteprevalens. Det mest overraskende funnet var den jevnt over høye prevalensen allerede i startfôringsfasen, og at denne kan øke og minke i løpet av produksjonen. To av fiskegruppene opplevde laksepox-relatert dødelighet i løpet av forsøket, hvorav det ene var et mildt tilfelle. Histologisk vurdering av utvalgte gjeller viste generelt veldig lite laksepox-relaterte forandringer, i tråd med klinikken, mens samsvar med Ct-verdier var avhengig av PCR-design. En PCR som påviser viralt RNA samsvarte dårlig ifht en PCR for viralt DNA. Påvisning av viralt RNA er meget følsom mht å påvise en infeksjon, men ikke nødvendigvis utfallet av infeksjonen: produksjon av DNA-virus som laksepoxviruset. Når vi så finner mye viralt RNA, lite viralt DNA, ingen klinisk sykdom og lite histopatologiske forandringer kan det tyde på en effektiv antiviral-respons som stopper infeksjonen. Dette er kanskje normalsituasjonen når fisken er sunn og robust, det ikke har bygd seg opp et for stort smittepress eller er andre ting som utfordrer fisken.

Prøver ble også tatt regelmessig fra punkter i miljøet som representerte innløp og utløp. Selv med optimalisering av preparering av miljøprøver før analyse er det ikke mulig å bruke nåværende tilgjengelige metoder for tidlig påvisning av smitte. Påvisning av viralt RNA som det kan være mye av i infiserte celler, kan raskt bli nedbrutt i miljøet, mens intakte DNAvirus vil persistere lenger. Ut fra dette kan det se ut til at laksepoxviruset har en viss tilstedeværelse i biofilm over tid. Villfisk i vannkilder ble undersøkt som en potensiell smittekilde, uten at det ble noen sikre påvisninger av laksepoxvirus. Da prøvene kom fra kun laksefisk-arter, kan vi ikke si noe om andre fiskearter kan være bærere av viruset.

Den planlagte epidemiologiske undersøkelsen med bruk av data fra anleggets fagsystem ga dessverre ikke ny kunnskap. Det ble derimot stadfestet at disse dataene ikke er særlig egnet til retrospektive analyser, da det er umulig å følge fiskegrupper detaljert over tid. Videre ble det klart at hendelser i anlegget som f.eks byggeaktiviteter, rutinemessig bøl registreres da observasjoner tyder på at slikt kan påvirke fisken sterkere enn antatt.

Ett settefiskanlegg med RAS-avdeling utførte en begrenset sanering av biofilter. Ved dette anlegget har laksepox vært et gjentakende problem, og det ble forsøkt med desinfisering med kun høy pH. De første påfølgende miljøprøvene var negative, men viruset ble relativt raskt påvist igjen i fiskeprøver. Isolater fra fiskeprøver før og etter prosedyren kunne sammenlignes ved hjelp av sporingsverktøyet nevnt tidligere, og her ble det påvist andre subvarianter etter sanering. Generelt ble det imidlertid påvist en del variasjon mellom virusisolater i prøvesettene, både før og etter desinfeksjon. I fremtiden kan det bli aktuelt å prøve igjen dersom et anlegg med laksepoxutbrudd er villig til å gjennomføre en saneringsprotokoll og sende prøver til Veterinærinstituttet.

For å få mer kunnskap om effekt av vask og desinfeksjon ble ett av settefiskanleggene, et gjennomstrømningsanlegg, fulgt opp i etterkant av et svært alvorlig laksepoxutbrudd. Det ble gjort endringer i vaskerutiner og det ble byttet fra nøytralt til surt desinfeksjonsmiddel. Etter dette er det tatt prøver i fem omganger av den nyeste fiskegruppen, fra plommesekkstadiet, startfôring og før og etter sortering (25 - 40 g) og etter vaksinerings. Alle prøvene før vaksinerings var negative. Etter vaksinerings ble det påvist laksepoxvirus i nesten alle fisk som ble prøvetatt. MLVA genotyping viste at det var samme genotype av laksepoxviruset som ble påvist etter vaksinerings og som har vært påvist i anlegget tidligere.

I forsøket med vertikalsmitte ble det laget foreldregrupper som skulle ha størst mulig risiko for å overføre viruset til avkom. Det ble ikke påvist laksepoxvirus i avkom fra disse gruppene. I tillegg ble sporingsverktøyet som nevnt ovenfor også brukt til å sammenligne isolater av laksepoxvirus fra stamfisk og parallelle søskengrupper herfra som fikk utbrudd av laksepox senere, i henholdsvis to separate settefiskanlegg. Det ble ikke påvist smittemessig kobling mellom stamfisk og avkom, men isolatene fra yngelen var identiske med de som ble påvist ved hvert settefiskanlegg samme året. Sammenstilt med resultater fra det vertikale smitteforsøket, tyder dette på at det ikke er en vertikal rute som utgjør den store risikoen for smittespredning.

2. Summary

Salmon gill poxvirus disease has emerged as a potentially catastrophic disease with high mortality rates in some hatcheries, while others experience infection with no observable clinical signs. The purpose of the project was to uncover the prevalence in a few selected hatcheries and look into potential routes of infection. Most importantly, a tracing tool was developed in order to assess the genetic relationship between viral isolates. The results indicate an overall high degree of genetic similarities between strains of salmon gill poxvirus isolated in Northern Europe. In addition, samples from within the same country show a slightly higher degree of similarity. The level of resolution provides an opportunity to distinguish between epidemiologically separate cases. The method can also identify the presence of more than one strain in the case of co-infections. Even though some fjord systems and some hatcheries appear to house persistent viral strains, it is unknown whether these originate from the same source of infection or if the strains survive within the hatcheries.

Genotyping of viral isolates from Norwegian fish groups with different clinical histories has so far not indicated that some strains are more virulent than others. Observations from this project, as well as the NFR-project SALPOX, indicate that the severity of the outbreak depends on several factors such as stress, not only infection.

To increase the chances of viral detection, we sampled the fish groups of the five participating hatcheries during periods of the production cycle associated with increased stress levels. The test results show very different trends in prevalence. The most surprising finding was the early and generally high prevalence in first feed fry, at that it may increase and decrease throughout the production cycle. Mortality occurred in two of the fish groups during the project, one of which was a mild case. A histopathological evaluation of selected gill samples revealed very few lesions associated with salmon gill poxvirus disease, in accordance with the clinical history. A considerable discrepancy between Ct-values from PCR analyses and histopathological scoring was evident, but the reason was unclear until differences in PCR designs were discovered. A PCR detecting viral RNA showed low correlation with a DNA-based PCR. Detection of viral RNA is a very sensitive method when the aim is to detect infection, but not necessarily to evaluate the outcome of that infection: the production of DNA-virus particles like salmon gill poxvirus. When analyses show a high level of viral RNA, little viral DNA, no clinical signs and few histopathological changes it may indicate that an antiviral response stops the infection. This may be the normal situation when the fish are healthy and robust, the infection pressure is low and there are no other stressors.

Samples from the environment were also taken routinely, representing water inlets and outlets. Even after the pre-analysis method was optimized, it was not possible to utilize currently available methods for early detection of infection. Viral RNA, which may be found in large quantities in infected cells, can

degrade quickly in the environment while intact DNA-viruses will have longer survival time. Based on this, it may appear that salmon gill poxvirus has a certain long-term presence in the biofilm. Wild fish in water sources were examined as a potential source of infection, with no clear positive results. As only salmonid species were sampled, it is impossible to say whether other fish species may act as carriers.

Unfortunately, the epidemiological survey based on data from the hatcheries did not provide any new knowledge. It was however established that these data are not suited for retrospective analyses, as it is impossible to track the detailed movements within fish groups over long periods. Furthermore, it was made clear that incidents or events such as construction work should be routinely registered as observations indicate that it may have a stronger impact on the fish than previously believed.

One RAS-hatchery with a history of recurring problems with salmon gill poxvirus disease completed a limited disinfection of the biofilter using only disinfectants with high pH. The first environmental samples following the disinfection were negative but the virus was soon detected again in fish samples. Viral isolates from fish samples before and after the disinfection were compared, using the tracing tool mentioned earlier, identifying the presence of different subvariants of the virus after disinfection. In general, there was some variation between isolates in both sets of samples, both before and after disinfection. In the future it may be relevant to try again if a hatchery with a confirmed case of salmon gill poxvirus is willing to complete a disinfection protocol and send samples to the Veterinary Institute.

In order to gain more knowledge about the effect of cleaning and disinfection, one of the hatcheries using flow through technology was observed closely following a very severe outbreak. Cleaning routines were altered and an acidic disinfection solution was used instead of a neutral one. The next fish group was then sampled five times, starting with the yolk sac fry, then first feed fry, before and after grading (25-40g) and after vaccination. All samples taken pre-vaccination were negative. After vaccination salmon gill poxvirus was found in almost all samples. MLVA genotyping proved this to be the same genotype as previously detected in the hatchery.

For the vertical challenge experiment parent groups were established with the intent of maximizing the risk of transferring the virus to the offspring. Salmon gill poxvirus was not found in offspring from these groups. In addition, the tracing tool mentioned earlier was used to compare isolates of salmon gill poxvirus from parallel sibling groups, stocked in two different hatcheries, both of which experienced an outbreak, with samples from the original broodstock. There was no epidemiological link between the isolates from broodstock and offspring, but the strains found in the fry were identical to the ones detected at the respective hatcheries earlier that year. When compiling these results with the results from the vertical challenge, it seems likely that the main route of infection is not vertical.

3. Innledning

Prosjektets formål var å øke kunnskapen om virusets smittedynamikk og utbredelse, samt finne potensielle deteksjons- og desinfeksjonsmetoder. Fem settefiskanlegg ble valgt ut basert på deres ulike produksjonssystemer og varierende historikk med laksepox. Ett anlegg har tidligere opplevd utbrudd ved flytting av for mange fisk til for små kar. Et annet anlegg har hatt flere laksepoxutbrudd i forbindelse med gravearbeider ute og bygging i hall. To anlegg har i perioder slitt med dårlig vannkvalitet, enten på grunn av varierende vannføring eller tekniske problemer med RAS-enheter.

Det er anlegg med 100% gjennomstrømning til hovedsakelig RAS, med og uten sjøvannstilsetning, og med og uten oppgang av anadrom fisk i vannkilden. Hvert anlegg ble tildelt en kode på tre bokstaver for anonymisering (se tabell 2).

Tabell 1. Oversikt over deltagende settefiskanlegg, med anonymiserte koder. GS = gjennomstrømning.

Anlegg	Hovedtype	Anadrom fisk i vannkilde	Sjøvann	Gjenbruk av ferskvann
BAB	RAS	Nei	Nei	Nei
GOB	RAS	Ja	Nei	Nei
OUB	GS	Nei	Ja	Ja
SHB	GS	Ja	Ja	Nei
ANB	GS	Nei	Ja	Nei

Laksepoxx er en gjellesykdom sett hos norsk oppdrettslaks første gang i 1995. Et koppevirus assosiert med sykdommen ble beskrevet av Nylund og kollegaer ved Universitetet i Bergen i 2008 (1), og gitt navnet salmon gill poxxvirus (SGPV). Viruset ble videre karakterisert ved Veterinærinstituttet i 2015 (2), og en PCR-analyse ble utviklet. Slik en har sett sykdommen så langt har den ofte et dramatisk forløp med høy dødelighet i settefiskfasen, men laks i sjø kan også rammes av laksepoxx.

Laksepoxxviruset er et stort DNA-virus, og evolusjonsmessig det eldste kjente koppeviruset påvist i virveldyr. Viruset angriper gjellene og skader den respiratoriske overflaten (det tynne epitelcellelaget mellom vann og blodårer), og skadene som oppstår kan kompliseres med sekundære infeksjoner (2). I sykdomstilfeller som ikke er komplisert av andre agens er det sparsomme obduksjonsfunn, men tydelige histopatologiske forandringer. Siden laksepoxxviruset er et nylig beskrevet virus, har man foreløpig ikke nok kunnskap om hvordan man kan hindre smittespredning. Sykdommen er også rapportert fra Skottland og Færøyene der en har opplevd store problemer hos yngel. Også på Island er det påvist utbrudd av sykdommen. Så langt er det kjent at viruset infiserer gjellene hos atlantisk laks, men det utelukkes ikke at andre arter er mottagelige. Tabell 2 viser antall diagnostikksaker på Veterinærinstituttet med påvist smitte og klinisk sykdom i norske oppdrettsanlegg de siste fem årene.

Tabell 2. Oversikt over Veterinærinstituttets diagnostikksaker der det er påvist laksepoxxvirus og klinisk sykdom de siste fem årene.

År	Settefisk	Matfisk
2015	15	3
2016	11	9
2017	8	8
2018	8	8
2019 (tom november)	15	8

Laksepoxxvirus er spredt over hele landet, og viruset påvises i settefiskanlegg både med og uten bruk av sjøvann. Det avtegner seg et bilde der det er svært alvorlige dødelighetsepisoder pga laksepoxx spesielt i forbindelse med smoltifisering. Men, som på Færøyene, viser det seg at også fisk ned i bare to til fem gram kan angripes og sykdommen kan føre til massiv dødelighet. Med sin svært akutte opptreden og med en dødelighet opp imot 70 % må dette anses som en sykdom som kan få svært alvorlige konsekvenser. Etter at det ble utviklet en spesifikk PCR-analyse for laksepoxxvirus, har det ved generell utredning av gjellesykdom blitt klart at viruset kan være involvert i langt flere tilfeller med gjelleproblemer enn man

tidligere var klar over. Siden laksepoxviruset ofte opptrer sammen med andre agens, kan diagnosen være vanskelig å stille, og betydningen vanskelig å vurdere. Det er også en mulighet for at laksepoxviruset kommer først og åpner for andre agens som gir sterkere symptomer i neste omgang.

De aktuelle problemstillingene ble delt inn i fem delmål og arbeidspakker (APer), der AP1 tok for seg virusets genom i håp om å kunne utvikle et enkelt sporingsverktøy for å undersøke slektskap mellom virusstammer. I AP2 ble det forsøkt å finne metoder for tidlig påvisning av virus i fiskens miljø, med det formål å hindre eller begrense sykdomsutbrudd. Protokollen for AP2 inkluderer også prøvetaking av klinisk frisk fisk i hvert av de fem settefiskanleggene, og utvelgelse av positive prøver aktuelle for molekylær epidemiologi i AP1 dersom det lyktes å utvikle et pålitelig sporingsverktøy. For å kunne vurdere risikoen for reinfeksjon via inntaksvann, ble villfisk i aktuelle vannkilder også prøvetatt. Miljøprøver og fiskeprøver fra AP2 skulle brukes i den epidemiologiske studien under AP3, sammen med produksjons- og helsedata fra hvert anlegg. Målet var å kunne sammenfatte dataene med funn fra prøvetaking for å avdekke eventuelle mønstre i smittedynamikk og eventuelle risikofaktorer for sykdomsutbrudd. AP4 var rettet mot sanering og potensielle desinfeksjonsmetoder i anlegg med påvist smitte. AP5 skulle undersøke virusets evne til vertikal overføring fra positiv stamfisk, ettersom laksepoxviruset er påvist med relativt høy prevalens i stamfisk av både oppdrettet og vill laks.

4. Prosjektorganisering

Prosjektet ble ledet av Veterinærinstituttet, med styringsgruppe bestående av representanter fra oppdrettsnæringen ved Mowi, SalMar, Sisomar og Trøndersmolt, og med Pharmaq Analytiq som samarbeidspartner.

FHF-ansvarlig: Sven Martin Jørgensen

Styringsgruppe: Farah Manji (Mowi), Ingrid Moan (SalMar), Hans Petter Rønning (Sisomar) og Asgeir Østvik (Åkerblå, representerer Trøndersmolt).

Prosjektgruppe ved Veterinærinstituttet: Brit Tørud (prosjektleder), Ole Bendik Dale, Karoline Sveinsson, Snorre Gulla, Maria K Dahle, Even Thoen og Mona Gjessing. Simon Weli, Arthur Mårtensson, Chiek Er og Bjørn Spilsberg har også bidratt med sin ekspertise.

Pharmaq Analytiq: Renate Johansen og Stian Nylund.

5. Problemstilling og formål

På bakgrunn av laksepoxvirusets store genom, som er beskrevet tidligere, var det potensial for å kunne identifisere et tilstrekkelig antall genetiske markører for utvikling av en enkel, høyresolusjons MLVA (multi locus variable number tandem repeat analysis) genotyping protokoll. Sekvensering av ytterligere genomer ville lette dette arbeidet, og samtidig muliggjøre identifikasjon av eventuelle spesifikke gener av betydning for virusets virulens. MLVA genotyping av prøver fra ulike kliniske manifestasjoner av sykdommen ville også i seg selv potensielt kunne bidra til å utforske hvorvidt det forekommer mer og mindre virulente varianter av viruset.

Det forelå heller ikke kunnskap om laksepoxvirusets evne til å overleve i vann eller biofilm, eller om brakklegging og desinfeksjonsmåter kunne bryte smittekjeder og senke infeksjonspresset. Dette var viktig kunnskap for å lage fornuftige saneringsregimer der sykdommen har etablert seg, og for å finne ut hvordan en kan beskytte seg mot ny smitte. For å kunne oppdage smitteveier inn til og innad i settefiskanlegg, var det behov for å etablere effektive prosedyrer for å spore smitte med laksepoxvirus i fisk og miljø. Det vil også gi mulighet til å følge eventuell smitte over i sjøfasen, og overføring av smitte til neste generasjon via stamfisken.

Hovedmål

Etablere nødvendig kunnskap for å kunne bekjempe laksepox i produksjonssyklus til og med postsmoltfase i sjø.

Delmål 1

Å etablere nye metoder for sporing av smitte og kunne skille virus fra ulike steder og tider vha genetiske markører.

Delmål 2

Å etablere prosedyrer for mest effektiv deteksjon av virus-smitte i settefiskanlegg.

Delmål 3

Å foreta epidemiologisk kartlegging av smitteveier til, og smittedynamikk innad i settefiskanlegg og overføring til sjøfase ved en longitudinell observasjonsstudie.

Delmål 4

Å undersøke effekt på virusforekomst av brakklegging og desinfeksjonstiltak i anlegg med påvist smitte.

Delmål 5

Å undersøke om infisert stamfisk har potensial til å overføre virus til neste generasjon.

Vurdering av næringsnytte og hvordan resultater kan utnyttes

Det er ikke uvanlig med 10-30 % dødelighet i settefiskanlegg med laksepoxutbrudd. I enkelte anlegg har hele grupper gått tapt, og det er sett 90 % dødelighet ved ett tilfelle i sjø. Siden laksepox kan få såpass alvorlige konsekvenser for det enkelte anlegg, i verste fall med behov for fullstendig sanering av enkelte grupper, er det nødvendig å finne metoder for å avdekke smitteveier inn til og innad i anlegg. Med dagens enormt store settefiskanlegg som bruker RAS, er det av stor økonomisk betydning å kunne overvåke situasjonen i anlegget for å kunne gjøre forebyggende tiltak mot sykdomsutbrudd. Med tanke på sanering av biofilter er det viktig å få kjennskap til om virus kan etablere seg i biofilmen. Kunnskap om hvordan viruset kommer inn i og opptrer i anlegg vil gi nyttig grunnlag for beslutningsprosesser om oppgradering av anlegg og ikke minst for utforming av produksjonsstrategier.

6. Bakgrunn og metode

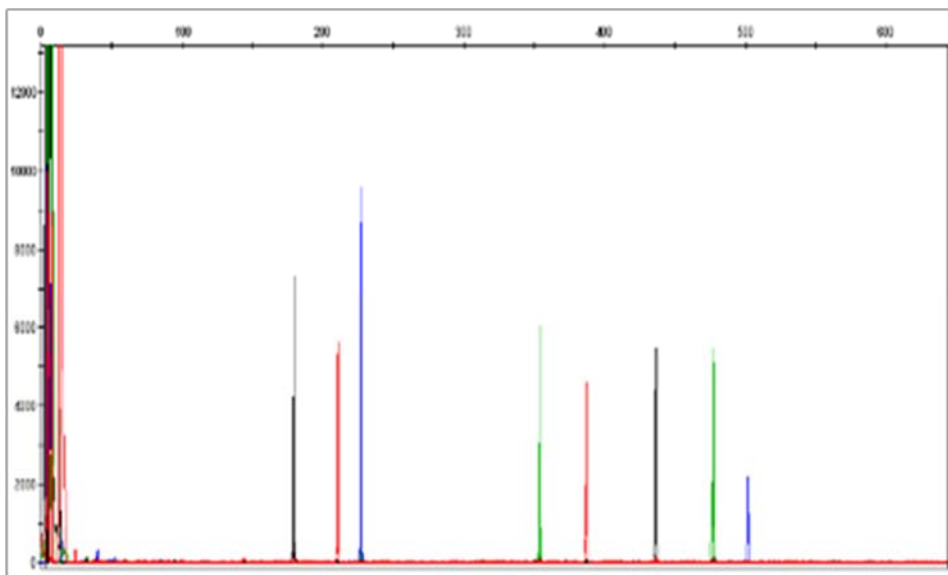
AP1: Etablere nye metoder for sporing av smitte og kunne skille virus fra ulike steder og tider vha genetiske markører

For å kunne si noe om epidemiologien til laksepoxviruset, ble det utviklet et sporingsverktøy for rask slektskapsanalyse av isolater. Dette var basert på utvalgte genetiske markører som endrer seg hyppig, og som gjør det mulig å skille mellom nært beslektede stammer av viruset.

Til dette arbeidet ble det innledningsvis valgt ut gjelleprøver positive for laksepoxvirus, med ulikt geografisk opphav, til Illumina helgenomsekvensering. Genomsekvensene ble videre benyttet til å utvikle et såkalt Multi-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) genotyping assay for laksepoxviruset. MLVA baserer seg på variasjoner i et utvalg genetiske områder kalt Variable-Number Tandem Repeat (VNTR). Disse karakteriseres av korte DNA-sekvenser som repeteres flere ganger etter hverandre, og hvor antallet slike repetisjoner kan endre seg over relativt få generasjoner. De resulterende MLVA-profilene kan derfor benyttes for å skille genetisk nært beslektede virusstammer fra hverandre. Siden endringene i VNTR-ene skjer nokså fort, egner metoden seg spesielt godt til å utforske hvorvidt virus fra ulike utbrudd er epidemiologisk forbundet.

Selv om MLVA nok er mest brukt til genotyping av bakterier, finnes det også assay beskrevet for noen virus. Hver protokoll er imidlertid som oftest artsspesifikk, og en ny protokoll ble dermed utviklet fra bunnen av for laksepoxvirus. MLVA-assayet som ble utviklet for laksepoxviruset i dette prosjektet baserer seg på 8 VNTR-områder spredt utover virusets genom. Disse ble valgt ut fra ca. 100 identifiserte

kandidatområder, hvorav totalt 19 ble utprøvd i laboratoriet. En lang rekke spesifikke primerpar ble så testet ut før vi til slutt fant en samling som lot seg kombinere i én og samme PCR-reaksjon (multiplex). Ved hjelp av fargemerking på den ene primeren i hvert av de 8 parene kunne vi da ved kappillærelektroforese enkelt bestemme størrelsen på hvert VNTR-område (Figur 1).



Figur 1. Eksempelskjerm bilde etter kappillærelektroforese av laksepoxprøve for MLVA-typing. Hver av de fargede toppene representerer én av de åtte genmarkørene, og den horisontale plasseringen av dem viser hvor lange de er. Det er disse lengdene som varierer på tvers av virusvarianter og bestemmer MLVA-profilen til viruset i prøven.

Etter ferdigstilling har MLVA-protokollen blitt brukt til å type totalt 182 laksepoxvirus-positive prøver fra fisk i Norge (29 oppdrettslokaliteter og 14 vassdrag) og utlandet, de eldste med opphav så langt tilbake som i 1995. For epidemiologiske undersøkelser har vi for flere anlegg studert prøver samlet over flere år. Prøvesamlingen dekker store deler av norskekysten, og en rekke prøver fra villfisk er også undersøkt (Figur 2). Der dette har latt seg fremskaffe har også kliniske data (utbruddets alvorlighet etc.) blitt samlet for vurdering opp imot resultatene fra MLVA. Et stort antall prøver (over 100) er i tillegg forsøkt typet uten hell, da hovedsakelig pga. for lave virusmengder i prøvene (Ct-verdier over 28).



Figur 2. Pox-positive prøver (norske) som ble MLVA-typet i prosjektet stammet fra oppdrettslaks på 29 lokaliteter (røde trekanter) og fra villaks i 14 vassdrag (blå sirkler).

AP2: Etablere prosedyrer for mest effektiv deteksjon av virusmitte i settefiskanlegg

Etter godkjenning fra FHF gjennomførte Veterinærinstituttet og Pharmaq Analytiq befaring på et RAS-anlegg med laksepoxutbrudd for innledende prøveuttak av gjeller og biofilm på RNA-later. Det ble også tatt ut vannprøver for virusundersøkelse før offisiell prosjektstart. Miljøprøvene ble tatt fra faste plasser i anlegget. Det ble også tatt prøver av syk og tilsynelatende frisk fisk. Det var ikke mulig å ta ut prøver av fisk fra «friske» kar fordi det var mer eller mindre forhøyet dødelighet i hele anlegget.

Pharmaq Analytiq foretok virusanalyser med PCR, mens Veterinærinstituttet gjorde undersøkelser med hensyn til sykdomsforandringer.

Miljøprøver

Under planlegging av prosjektets gjennomføring ble ulike metoder for påvisning av virus i vann og biofilm vurdert og sammenlignet. Metoden med filtrering av vann som var utviklet for forsøkskar på 1x1 meter, viste seg ikke å være egnet for bruk i et kommersielt settefiskanlegg for påvisning av laksepoxviruset. Svabring var heller ikke optimalt, men ble vurdert som det beste alternativet. Derfor ble svabring av biofilm og analysing ved PCR valgt som metode for prosjektets miljøprøver. Svabere med lysisbuffermedium ble levert og analysert for viralt RNA av Pharmaq Analytiq. I ettertid ble dette vurdert som ikke optimalt, da påvisning av viralt RNA forutsetter tilstedeværelse av fiskeceller. Disse går fort i oppløsning i biofilm, og forutsetter derfor store mengder virus og kontinuerlig utskilling fra fisk for å kunne påvises.

Hvert av de fem settefiskanleggene ble kartlagt med tanke på representative steder for prøveuttak. Siden anleggene er så forskjellige ble det laget individuelle prøveuttaksregimer som skulle gi oss en oversikt over eventuell virusforekomst i innløp og utløp. I noen anlegg er miljøprøvene tatt ut på karnivå, i andre på avdelingsnivå, avhengig av tilgjengelighet. I ett tilfelle var det også mulig å svabre biofilm i anleggets inntaksrør i vannkilden. Punktene ble prøvetatt en gang i måneden fram til sjøsetting, så langt det var mulig, av anleggenes ansatte. Første prøveuttak var samtidig som første besøk og uttak av fiskeprøver, og videre miljøprøver fulgte fiskegruppen ved flytting innad i anlegget.

Fiskeprøver

Vi fulgte seks fiskegrupper (to suksessive fiskegrupper ved ett anlegg) som ble prøvetatt ved tidspunkter i produksjonssyklusen som representerer perioder med økt stress, og dermed risiko for sykdom. Disse er startfôring, vaksinerings/sortering og smoltifisering. I løpet av prosjektperioden ble det lagt til enda et prøveuttak etter sjøsetting. Siden de alvorligste gjelleproblemene oftest kommer på sensommeren og høsten, var det en ønsket periode for prøveuttak. Tidspunktet for dette uttaket varierer på grunn av logistiske utfordringer, men representerer gjellehelsen til fisk som har stått i sjø en stund.

Hvert prøveuttak består av minst 60 gjelleprøver der andre gjellebue på venstre side er delt og lagt på RNAlater og formalin for henholdsvis PCR-analyse og histologisk undersøkelse. I noen få tilfeller er prøven tatt fra en annen gjellebue der dette var nødvendig for å sikre nok egnet prøvemateriale. Prøvene ble individuelt merket så histologiske funn kan knyttes til virusresultat. Prøver på RNAlater ble sendt til Pharmaq Analytiq for PCR-analyse for laksepoxvirus. Prøver på formalin ble preparert og vurdert histologisk ved VI.

Histologisk undersøkelse ble i utgangspunktet gjennomført på et utvalg av prøvene basert på PCR-resultater. Det ble fokusert på tilstedeværelse, og eventuell grad, av karakteristiske poxførandringer i tillegg til eventuelle andre patologiske funn.

Prøver fra sjøsatt fisk

I løpet av prosjektet ble det foreslått at det hadde vært interessant å se på prevalens av andre gjelleagens etter sjøsetting. Det eksisterte da en relativt ny multiplex-PCR ved Veterinærinstituttet som kunne analysere for *Paramoeba perurans*, '*Ca. Branchiomonas cysticola*', *Desmozoon lepeophtherii* (*Paranucleospora theridion*) og laksepoxvirus samtidig. For å optimalisere metoden ble det innført rutinemessig homogenisering av alle gjelleprøver, spesielt med tanke på agens som fordeler seg heterogent i vevet - som amøber. Det ble planlagt å ta ut 60 prøver ved hvert uttak, gjerne fordelt på flere merder hvis mulig.

Prøver fra villfisk i vannkilder

Det ble gjennomført prøveuttak av villfisk i alle ferskvannskilder, og ett i sjø nær vanninntaket. Metoder som er brukt varierer, avhengig av praktiske årsaker. I Straumvatnet, Fykan og Sunnskjørvatnet er det fisket med garn, med forskjellige maskevidder for å få flere arter og størrelser. I Ytre Standalselva ble det brukt el-fiske. I Dravlauselva er det fisket med stang. Uttaket i sjø ble gjort med kilenot. Der det var mulig ble det lagt opp til å ta ut ca. 60 fisk.

AP3: Epidemiologisk kartlegging av smitteveier til og smittedynamikk innad i settefiskanlegg og overføring til sjøfase ved en longitudinell observasjonsstudie.

Rapporter med produksjonsdata fra settefiskanleggene skulle hentes inn sammen med helse rapporter fra fiskehelsetjenesten. Planen var å bruke statistisk databehandling for å lage dødelighetskurver, og deretter se nærmere på aktuelle tidspunkter sammenfattet med helsedata og resultater fra fisk- og miljøprøver. Dette viste seg å være svært komplisert. Det er enorme mengder data som ikke er organisert på samme måte og i et format som ikke er egnet for retrospektive undersøkelser. Skal undersøkelser der f.eks. tetthet, vannkvalitet, lysstyring og håndtering sammenstilles, må dataene være registrert på samme måte. Vi valgte derfor å gå gjennom bare dataene fra det ene anlegget som ikke hadde andre avdekkede gjelleproblemer enn laksepox.

AP4: Undersøke effekt på virusforekomst av brakklegging og desinfeksjonstiltak i anlegg med påvist smitte.

Tidlig i prosjektets forløp ble det klart at et settefiskanlegg med laksepoxutbrudd ønsket å gjennomføre en delvis saneringsprotokoll av biofilteret i den ene RAS-avdelingen. Ved en full sanering blir biofilteret behandlet først med høy pH og deretter med lav pH. Høy pH slår ikke ut biofilmen i samme grad som behandling med høy pH etterfulgt av behandling med lav pH. Før tømning av hallen med tilhørende biofilter, ble det forsøksvis tatt parallelle miljøprøver på representative steder ved filtrering av vann og ved svabring av biofilm. Alle prøvene ble analysert med PCR av Pharmaq Analytiq. Deretter ble det gjennomført vask og desinfeksjon av kar og en behandling av biofilteret med høy pH. Miljøprøvene ble gjentatt og analysert med negativt resultat. Etter noen måneder ble laksepoxviruset igjen påvist i fisk i denne avdelingen.

Etter dette har det ikke vært tilgang på anlegg som ønsker å gjennomføre sanering av biofilter. Usikkerhet rundt smitte fra villfisk i vannkilde og metodikk for miljøprøver gjør det vanskelig å rettferdiggjøre en slik sanering.

Det er viktig å finne ut hvordan anlegg med laksepoxproblemer kan gjennomføre vaske- og desinfeksjonsprosesser. Siden de så langt ikke har lyktes med dyrking av viruset i SALPOX-prosjektet, kunne vi ikke bruke etablerte prosedyrer for undersøkelse av effekten av desinfeksjonsmidler.

I forbindelse med et perakutt laksepoxutbrudd i et av settefiskanleggene som deltok i prosjektet, og som i prosjektperioden hadde viruspåvisning på ca. 90 % av fisken allerede i startfôringa, fikk vi ideen om sammen med anlegget å gå gjennom driftsrutiner, foreslå endringer og deretter følge første fiskegruppe som ble lagt inn i klekkeriet med tanke på forekomst av laksepoxviruset.

AP5: Undersøke om infisert stamfisk har potensial til å overføre virus til neste generasjon.

Valg av stamfiskanlegg og prescreening av stamfisk

To stamfiskanlegg ble valgt ut, ett der det var påvist laksepoxvirus og ett der det ikke var gjort funn av viruset. En kontrollundersøkelse viste imidlertid at begge stamfiskanlegg hadde positiv stamfisk, derfor måtte vi ut på leting etter et nytt negativt stamfiskanlegg. Det lyktes vi med.

For å finne foreldrefisk som var positive med tanke på laksepoxvirus måtte vi finne en metode for prøveuttak der vi ikke tok livet av fisken. Først ble parallelle svaberprøver og biopsier fra gjellene testet for å validere svabring som metode. Biopsi viste en systematisk lavere Ct-verdi enn svabring, men svabring ga fortsatt et pålitelig resultat. Siden vi ønsket foreldrefisk med mest mulig virus, valgte vi de med de laveste Ct-verdiene som foreldre til våre testgrupper.

Metodebeskrivelse

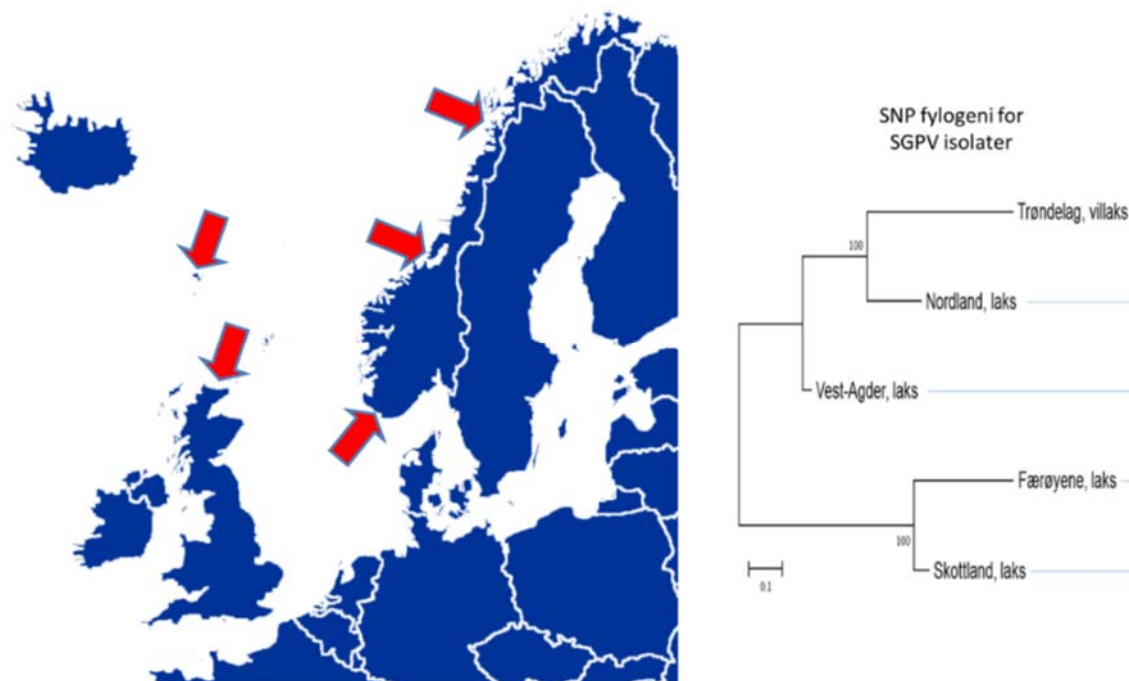
I stamfiskanlegget med viruspåvisning ble fire hannfisk og fire hunnfisk satt sammen i fire familier. I tre av disse ble befruktning gjennomført etter vanlige prosedyrer, mens i én gruppe ble rogn befruktet i rognvæske, og uten noen form for desinfisering. Melke og rogn fra en hann og en hunnfisk fra det negative anlegget ble negativ kontrollgruppe, men noe senere enn de andre gruppene. Foreldrefisken ble prøvetatt igjen ved stryking for å bekrefte smittestatus. All rogn ble inkubert på de respektive stamfiskanlegg, og ved sjokking ble alle grupper prøvetatt for første gang. Ved øyerognstadiet ble gruppene flyttet til fellesakvariet på Adamstua.

Videre prøvetaking ble utført ved gjellebiopsi fra andre gjellebue på venstre side, av 60 fisk fra hver gruppe ved klekking, startfôring og vaksinerings/smoltifisering. CO₂ og NH₄⁺-nivåer ble monitorert fra startfôring, og forsøksvis holdt over anbefalte grenseverdier for å indusere noe stress samtidig som det gjenspeiler reelle situasjoner i felt.

7. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

AP1: Etablere nye metoder for sporing av smitte og kunne skille virus fra ulike steder og tider vha genetiske markører

Sammen med prøven som ble sekvensert i 2015 ble det opparbeidet laksepoxvirus- helgenomsekvenser fra totalt fem ulike steder tilgjengelig for videre arbeid: oppdrettslaks fra Nord- og Sør-Norge, Færøyene og Skottland, samt fra villaks fra Trøndelag (Fig 3).



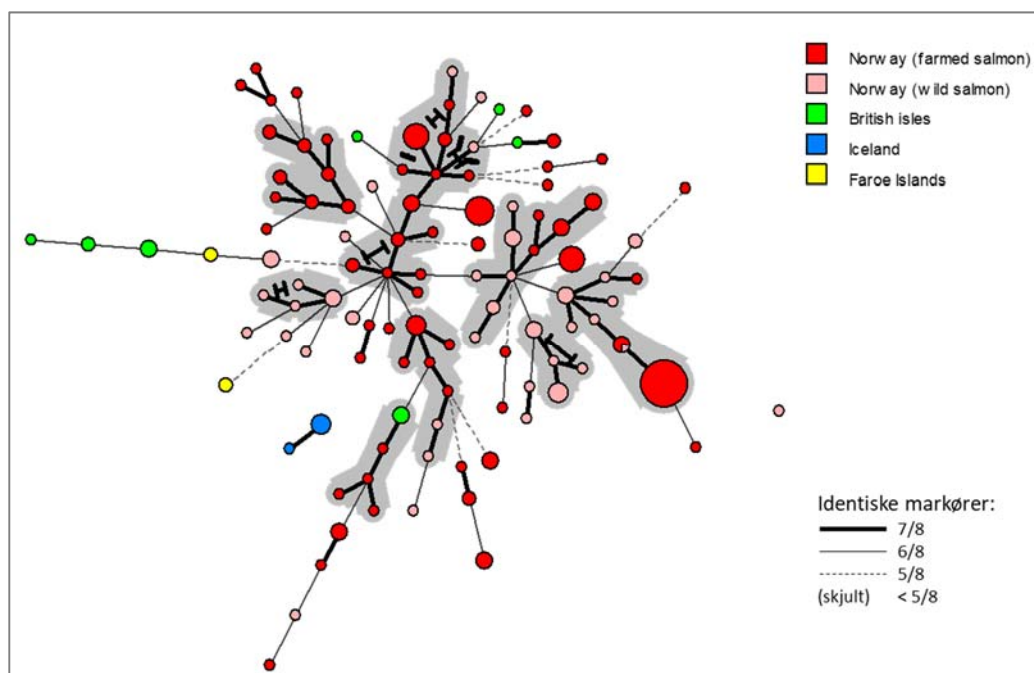
Figur 3. Slektskap mellom sekvenserte genomer fra Norge, Skottland og Færøyene

Sammenstilling av genomsekvensene fra disse nordeuropeiske prøvene viste at de er svært like, men det er likevel noen gener som skiller seg ut med større variasjon. Et par av genene som varierer kan bety noe for virusets evne til å gi sykdom, siden de har likheter med et virulensgen (B22R) kjent fra det mammalske poxviruset, Vaccinia virus. Genet uttrykker et protein som sitter i membranen til virusinfiserte celler. Proteinet har evnen til å «slå av» immunceller som skal bekjempe virusinfeksjoner, noe som så gjør det lettere for viruset å spre seg. Variasjonene i de potensielle virulensgenene i laksepoxviruset endrer aminosyresekvensen i en slik grad at de muligens kan endre proteinenes funksjon. Det er så langt ikke funnet områder som sikkert kan benyttes til sykdomssporing, og man vet ikke om variasjonene kan være en av forklaringene på at man både ser milde og alvorlige utbrudd med laksepox. Virulensgenene er nå klonet fra ulike varianter av laksepoxviruset for videre studier i cellekultur i NFR-prosjektet SALPOX.



Figur 4. Aminosyrevariasjon i et lite område av B22R fra laksepox-varianter fra Nordland, Agder og fra villaks fra Trøndelag. Figuren viser hvordan SGPV fra villaks har hele 7 aminosyrer med endret polaritet og/eller ladning i dette området. Fargekode: Sort-nøytral, grønn-polar, blå-positiv ladning/basisk, rød-negativ ladning/sur aminosyre.

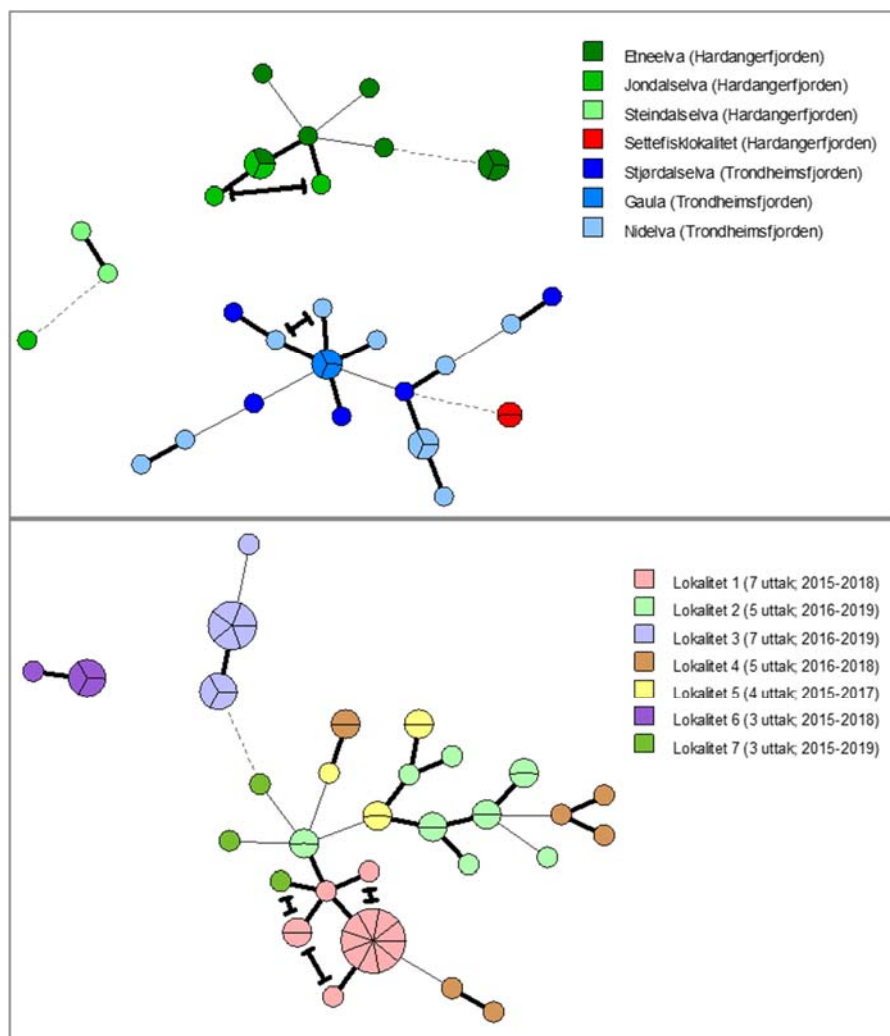
MLVA-metoden som ble utviklet på bakgrunn av genomene tar utgangspunkt i DNA fra laksepoxvirus-positive gjelleprøver, helst med Ct-verdi (DNA-basert PCR) i underkant av 28 (uforutsigbart hvorvidt metoden fungerer ved høyere Ct). Etter multiplex PCR og kapillærelektroforese kan så prøvenes MLVA-profiler sammenlignes i et såkalt Minimum-Spanning-Tree (MST). Her vil prøver med nært beslektede virus legge seg tett inntil hverandre, og et MST diagram fra MLVA av alle de analyserte prøvene vises i Figur 5. På et overordnet nivå støtter denne oppunder at det trolig foreligger én, genetisk nokså konservert, hoved-variant/stamme av viruset som dominerer i Nord-Europa som helhet, da nesten alle påvisningene (direkte eller indirekte) kan kobles sammen gjennom et nettverk med forgreininger tilsvarende $\geq 5/8$ identiske MLVA-markører. Likevel ser man jevnt over en nærmere tilknytning mellom prøver fra samme land, enn det som er tilfelle på tvers av land.



Figur 5. Et MST laget på bakgrunn av laksepoxvirus MLVA profiler opparbeidet i dette prosjektet. Prøvene er farget iht. opphavsland (og fisketype, for Norge). De ulike forgreiningene angir hvor mange MLVA-markører (av totalt åtte) som er identiske mellom prøvene. Større grupper av prøver som indirekte linkes sammen gjennom 7/8 identiske markører, er fremhevet med grå bakgrunn.

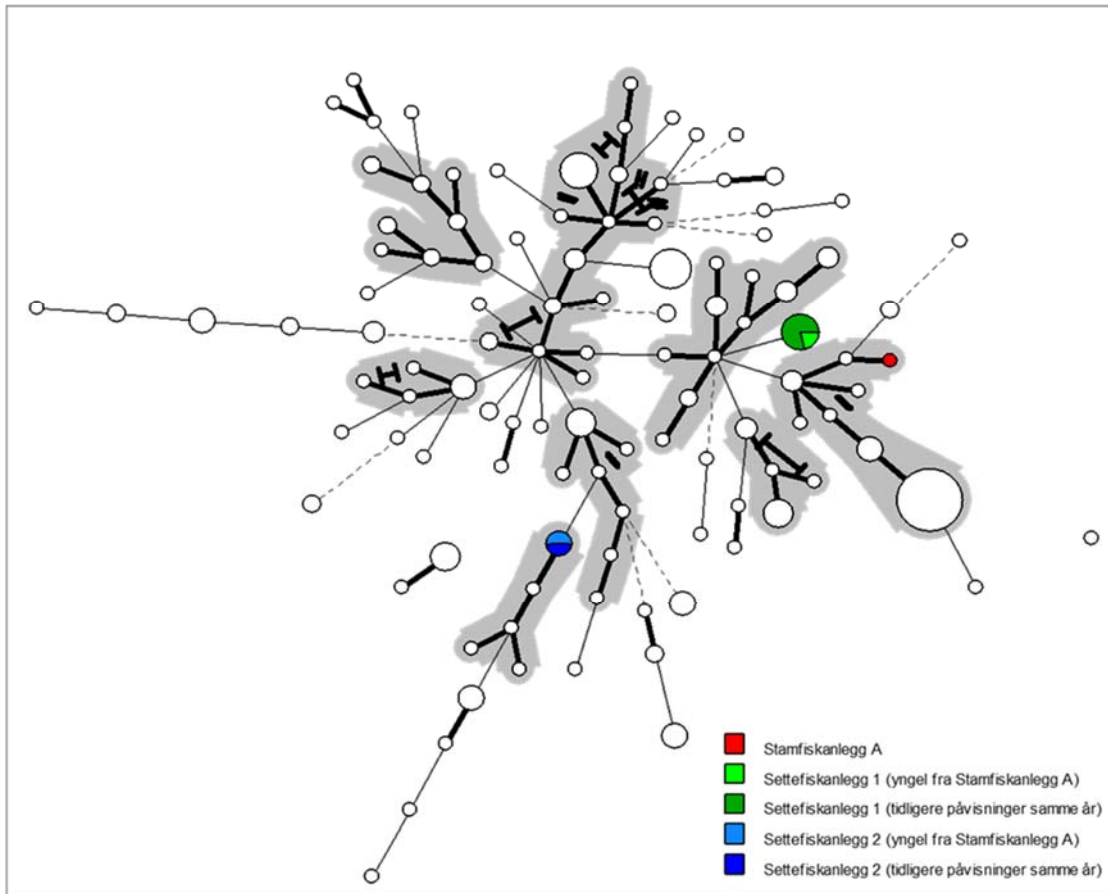
Laksepoxyvirus-positive prøver fra henholdsvis norsk oppdrettslaks og villaks legger seg i stor grad om hverandre i Figur 5, noe som tilsier én eller flere felles smittereservoarer på nasjonalt nivå. Ved nærmere ettersyn finner man imidlertid tydelige tegn på at lokale 'sub-varianter'/'hus-stammer' kan dominere over gjentatte år i individuelle fjordsystemer og/eller settefisklokaliteter, selv om dette ikke alltid ser ut til å være tilfelle (Figur 6). Spesielt er det verdt å merke seg at mens laksepoxvirus fra villfisk i tre elver tilknyttet Hardangerfjorden samler seg innunder to sub-varianter, så er det ingenting som tyder på at de analyserte prøvene fra settefisk i samme område er epidemiologisk knyttet til disse.

For settefiskanleggene som ble fulgt over flere år var bildet delt i den forstand at det i noen tilfeller kun ble påvist én svært avgrenset sub-variant av viruset, mens det i andre tilfeller var mer diversitet, iblant til og med innad i enkeltuttak. I de tilfellene der én og samme sub-variant vedvarer, er det fremdeles usikkert hvorvidt dette kommer av gjentatte re-introduksjoner fra samme kilde, eller pga. opprinnelig smitte som man ikke har klart å fjerne fra anlegget. Vi er videre kjent med at ett av anleggene gjennomførte rens av biofilter innimellom uttakene, og selv om laksepoxvirus ble påvist både før og etter dette, så kan det se ut som om nye sub-varianter av viruset overtok etter rensingen.



Figur 6. MST basert på MLVA av laksepoxvirus-positive prøver. Forgreiningene er som i Figur 5. Det øverste diagrammet inkluderer prøver samlet mellom 2009-2015 fra 3 elver (villfisk) og 1 settefiskanlegg tilknyttet Hardangerfjorden, samt fra villfiskprøvene i 3 elver tilknyttet Trondheimsfjorden. For villfiskprøvene sees en klar inndeling som reflekterer hvilken fjord elvene utløper i, samtidig som settefiskprøvene fra Hardangerfjorden faktisk legger seg tette innpå villfiskprøvene fra Trondheimsfjorden. Det nederste diagrammet inkluderer prøver fra sju norske settefiskanlegg (samlet over minst tre ulike år). Man ser her både tilfeller der en avgrenset sub-variant/husstamme kan dominere over tid i et anlegg (f.eks. lok. 1), mens epidemiologien i andre tilfeller fremstår som mer uklar (f.eks. lok. 4).

Ved ett tilfelle der laksepoxvirus var påvist i et stamfiskanlegg, og det senere inntraff pox-utbrudd i parallelle søskengrupper med yngel (hos to separate settefiskanlegg) fra den affiserte stamfisken, ble MLVA-typing utført på prøver fra alle de tre involverte lokalitetene. De resulterende MLVA-profilene fra stamfisken og de to yngelgruppene var alle ulike (ikke nært epidemiologisk linket), samtidig som yngelprøvene viste seg å være identiske med øvrige laksepoxvirus-påvisninger ved de aktuelle mottakeranleggene fra samme år (Figur 7). Dette tilsier at yngelen trolig, i begge tilfeller, ble smittet etter ankomst ved settefiskanleggene, og at smitteoverføring fra stamfisken i dette tilfellet kan anses som svært usannsynlig.



Figur 7. Samme MST-diagram som Figur 5 viser, men her er kun prøver fra tre anlegg (ett stamfisk og to settefisk) farget. Gitt fordelingen av disse anses det som usannsynlig at de parallelle yngelgruppene har båret smitte med seg fra stamfiskanlegget.

Generelt for MLVA-metoden så bør det avslutningsvis nevnes at enkeltprøver kan inneholde flere forskjellige sub-varianter av laksepoxvirus, noe som skaper utfordringer dersom disse er ulike på to eller flere markører. Selv om flere slike prøver måtte ekskluderes fra analysen, så lot det seg i noen tilfeller likevel gjøre å skille MLVA-profilene fra hverandre. Dette forutsatte imidlertid at det forelå langt mer av den ene sub-varianten i prøven, slik at signalet fra denne fremsto som sterkt dominerende. Slike samtidige infeksjoner med flere laksepoxvirus sub-varianter i enkeltfisk fremsto som langt vanligere i villfiskprøvene, selv om det også forekom hos noen oppdrettsfisk.

AP 2: Etablere prosedyrer for mest effektiv deteksjon av virusmitte i settefiskanlegg.

Miljøprøver

Innledende forsøk viste at vannprøver kun var pålitelige dersom de kom fra relativt små kar, og denne metoden ble derfor ikke brukt i prosjektet. Det ble isteden benyttet svaberprøver fra biofilm. Nedenfor er sammenfattede resultater fra mottatte miljøprøver per anlegg fordelt på måned og prøveuttak.

Fullstendige tabeller med detaljert oversikt over punkter for prøveuttak er lagt ved som vedlegg (vedlegg 1).

Anlegg ANB

Gjennomstrømningsanlegg med sjøvanntilsetning og UV-behandling av inntaksvann. Ferskvannskilden har ikke oppgang av anadrom fisk. Anlegget har mange utilgjengelige punkter for prøvetaking, men dette ble forsøkt løst ved å la tappekraner renne og danne biofilm i en kopp som deretter ble svabret månedlig. I startfôringsavdelingen ble det lagt ut et objekt i lufteren som ble svabret.

Til tross for ingen positive screeningprøver fra fisk tatt i forbindelse med prosjektet, registrerte anlegget i mai og juni 2017, og igjen i august, dødelighet knyttet til laksepox. Gjelleprøver fra første del av sykdomstilfellet ble innlemmet i SALPOX-prosjektet for å se på immunreaksjoner i fisken.

Tabell 3. En positiv prøve i august, direkte fra kar med bekreftet SGPV-smitte og dødelighet knyttet til laksepox. Det ble ikke påvist SGPV i vannkilder.

ND	ND	ND	ND	23,92
Mars	Mai	Juni	Juli	August
Startfôring, avdeling B og D og vannkilder				D og vannkilder
2017				

Anlegg SHB (2 fiskegrupper):

Gjennomstrømningsanlegg med sjøvanntilsetning på stor fisk, og UV-behandling av inntaksvann. Har oppgang av anadrom fisk i ferskvannkilden, men elva er ikke registrert som anadrom strekning.

Miljøprøver representerer hovedsakelig inntak og utløp på karnivå, der vannet tappes så inntaket kan svabres direkte og svabring av munk. Noen steder var det tilgjengelige punkter for felles inntak på hallnivå. I perioden før sjøsetting av fiskegruppe 1 delte den hall med fiskegruppe 2, derfor er det noen miljøprøver fra felles inntak som gjelder for begge gruppene. Til tross for høy prevalens i screeningprøver fra fisk og mange positive miljøprøver over tid, ble det ikke registrert økt dødelighet knyttet til laksepox i disse fiskegruppene, men anlegget opplevde i ettertid sitt hittil mest alvorlige utbrudd.

Tabell 4. Fiskegruppe 1, medianverdier, og kun én positiv prøve i mai 2018.

ND	32,44	ND	32,36	32,53	29,05	30,15	32,24	ND	ND	ND	31,44
Mars	Mai	Juni	Juli	August	Oktober	November	Januar	Februar	Mars	April	Mai
Avdeling C og D		B og D				F				A	
2017							2018				

Tabell 5. Fiskegruppe 2, medianverdier

31,47	31,45	29,76	30,81	ND	33,04	32,82	32,07
August	Oktober	November	Januar	Februar	Mars	April	Mai
Avdeling D		A, B, D og E		A og F			
2017				2018			

Anlegg OUB:

Gjennomstrømningsanlegg med RAS i klekkeriet, med mulighet for gjenbruk av ferskvann i perioder med lav vannstand i vannkilde. I perioder med flom har det tidligere vært problemer med svært dårlig vannkvalitet. Det brukes sjøvann de siste ukene før utsett. Rørsystemene var ikke tilgjengelige, så miljøprøver ble tatt fra hovedinntak i elv og/eller brønn, og utløp på karnivå fra munken i utvalgte kar. Det ble ikke registrert dødelighet knyttet til laksepox på denne fiskegruppen, men anlegget hadde et utbrudd med laksepox i en yngre fiskegruppe etter at den vi fulgte var sjøsatt.

Tabell 6. medianverdier, kun én positiv i juli 2017. * VK= vannkilde, SF = startfôring.

ND	ND	34,06	33,57	32,77	29,76	ND	ND	ND	ND	ND
Mai	Juni	Juli	August	September	Oktober	November	Desember	Januar	Februar	Mars
VK	Vannkilde og påvekst 1		Vannkilde og påvekst 2							
SF*										
2017								2018		

Anlegg BAB:

To resirkuleringsenheter som betjener hver sin del av anlegget. Spedevann er som regel fra elv, men kan også komme fra grunnvann avhengig av årstid og forhold. Grunnvannet er ubehandlet, mens elvevannet tilsettes silikat. I løpet av prosjektperioden ble det installert UV-anlegg. I nedbørsperioder kan det bli problemer med vannkvalitet. Miljøprøver ble tatt fra beslag i hydrotechfilter og nedsenket objekt i pumpesump som kan svabres. Det ble ikke registrert dødelighet knyttet til laksepox på denne fiskegruppen.

Tabell 7. Medianverdier

ND	33,93	ND	ND	31,83	31,08	ND	ND	ND
September	Oktober	November	Desember	Januar	Februar	Mars	April	Mai
RAS til startfôring og påvekst 1				RAS til påvekst 2				
2017				2018				

Anlegg GOB

Kun resirkulering, uten bruk av sjøvann, bestående av fire RAS-enheter (klekkeri, startfôring, presmolt- og smoltavdeling). Anlegget har UV-behandling på alt vann, men har utfordringer med vannets klarhetsgrad og dermed muligens suboptimal effekt av UV-stråling. Hovedvannkilde er en innsjø med oppgang av anadrom fisk.

Tabell 8. Medianverdier, og én positiv prøve i mai 2018.

ND	25,78	ND	33,79	ND
November	Januar	Mars	Mai	Juni
Startfôring	Presmolt		Presmolt (ND) og smolt	Smolt
2017	2018			

Observasjoner

Det lyktes ikke å benytte miljøprøver som tidlig varslings for verken smitte eller sykdom i fisk. I ett anlegg er det hovedsakelig negative miljøprøver både før, under og etter et aktivt utbrudd, med unntak av én prøve tatt i munk fra kar med dødelighet. Et annet anlegg har gjennomgående mange positive miljøprøver, men også negative enkeltprøver tatt direkte fra kar med høy prevalens av smittet fisk. Det kan også argumenteres for at det er vanskelig å vurdere om en metode kan brukes til å predikere smitte, når en stor andel av fisken allerede er smittet ved første prøveuttak. Før prosjektstart ble startfôring ansett som et passende nullpunkt for første prøveuttak, men dette viste seg å være for sent i de fleste anleggene.

Selv med optimalisering av preparering før analysering er det ikke mulig å bruke nåværende tilgjengelige metoder for tidlig påvisning av virus i miljø. Tabell 9 viser resultatene fra et optimaliseringsforsøk med et annet isoleringskit (U i tabell 9) før PCR-analyse. Dette ga noe lavere Ct-verdier, og i ett tilfelle påvisning i en tidligere negativ prøve tatt fra kar med høy prevalens av positiv fisk. Metoden anses derfor som lite sensitiv og uegnet til vårt formål. I ettertid har det derimot blitt utviklet bedre metoder for filtrering av vannprøver, som øker sensitiviteten, og som forhåpentligvis blir lett tilgjengelig i fremtiden.

Tabell 9. Oversikt over optimaliserte analyser av utvalgte miljøprøver (prøve-ID 4, 14, 15, 17A og B og 22), med et annet isoleringskit (U) sammenlignet med standardkit (Q). PA = Pharmaq Analytiq.

Well Name	Ct (dRn)	Ct (PA)
4 med Q	No Ct	No Ct
4 med U	No Ct	
PTK 17-04-2494/F11	19.66	
14 med Q	25.97	26,73
14 med U	21.25	
PRK	No Ct	
15 med Q	No Ct	No Ct
15 med U	No Ct	
17A med Q	32.37	No Ct
17A med U	31.04	
17B med Q	38.56	33,79
17B med U	32.76	
22 med Q	30.39	29,76
22 med U	27.78	

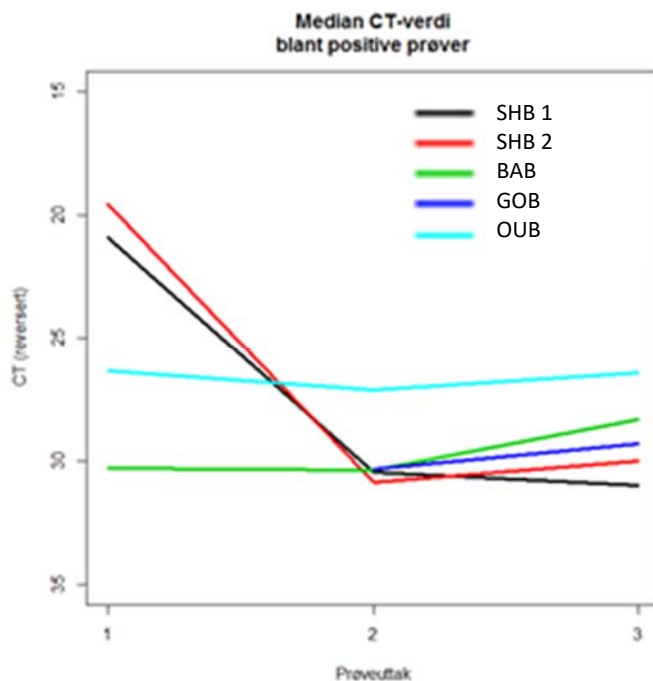
Fiskeprøver

Resultater fra screeningprøver i fiskegruppene viser svært variabel prevalens gjennom produksjonssyklusen (se tabell 10 og figur 8), men det mest overraskende funnet var den jevnt over høye prevalensen allerede i startfôringsfasen.

Tabell 10. Oversikt over prevalens av SGPV-positive prøver på gruppenivå. *ett prøveuttak mangler fra anlegg ANB. ND = not detected.

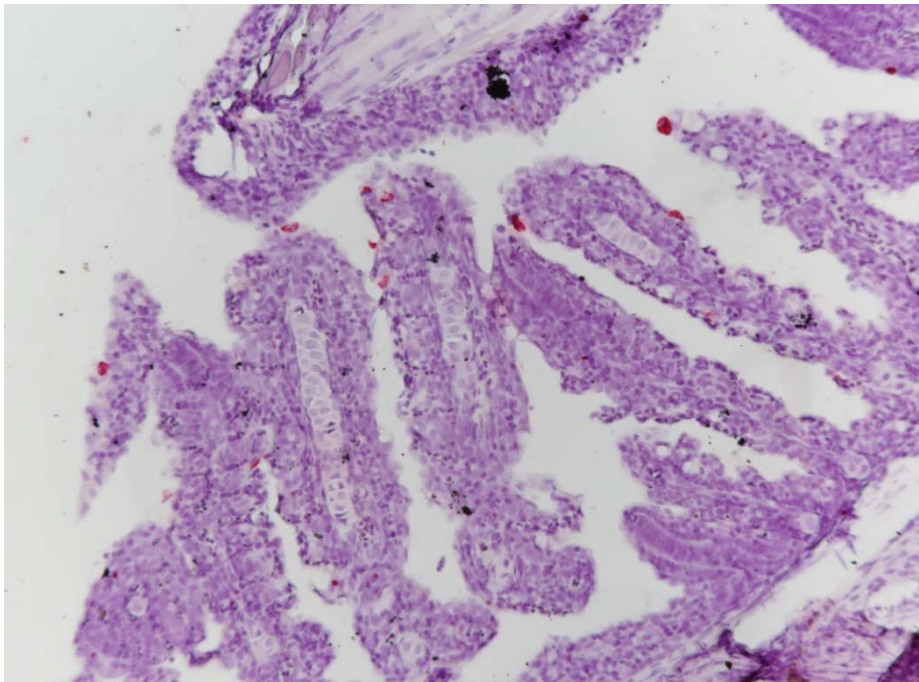
Anlegg	Startfôring	Vaksinering/sortering	Smoltifisering
ANB	ND	-*	ND
SHB 1	98 %	27 %	3 %
SHB 2	33 %	27 %	33 %
OUB	91 %	21 %	52 %
BAB	47 %	90 %	13 %
GOB	ND	7 %	17 %

Medianverdier av PCR-resultater fra prøveuttak viser også varierende utvikling med tiden (se figur 8), for eksempel synkende prevalens på gruppenivå, men økt virusmengde (lavere median Ct-verdi) på individnivå ved siste prøveuttak (SHB 1). En annen gruppe holdt ganske jevn prevalens gjennom store deler av settefiskfasen, men viser stor variasjon i virusmengde, som starter høyt før den reduseres kraftig og så stiger litt igjen (SHB 2). Fiskegruppen fra anlegg OUB viste stor variasjon fra veldig høy prevalens i startfôringsyngel, så en reduksjon ved vaksinering/sortering, før den øker til at rundt halvparten av prøvetatte individer er positive. Medianverdien derimot holder seg ganske stabil gjennom det hele. Det var tidlig tegn på at noe ikke stemte med tanke på lave Ct-verdier i noen prøver og fraværende klinikk på fiskegruppenivå, men på dette tidspunktet ble det antatt at histologisk scoring av gjelleprøver ville vise et mer nyansert bilde på individnivå.



Figur 8. Medianverdier for SGPV på gruppenivå for hvert anlegg. Fiskegruppe ANB er ikke med da alle prøver var negative.

I utgangspunktet var det planlagt å velge ut interessante prøver basert på Ct-verdi til histologisk undersøkelse og scoring av eventuelle laksepoxrelaterte skader. Etter scoring av rundt 170 gjeller ble det helt tydelig at noe ikke stemte. Prøver med Ct-verdi som erfaringsmessig skulle tilsi laksepoxrelatert dødelighet, viste ingen eller kun svært milde histopatologiske forandringer typiske for infeksjon med laksepoxvirus. Det ble forsøkt med RNA-scope in-situ hybridisering, en metode der fargede prober binder seg til RNA, i dette tilfellet hovedsakelig mRNA, og synliggjør eventuell transkripsjon direkte i vevssnitt. Med in-situ hybridisering var det mulig å visualisere en del positive celler (se figur 9), men svært få kunne knyttes til celleforandringer, noe som støtter oppunder mistanken om at påvisning av mye RNA ikke nødvendigvis henger sammen med patologi og sykdom.



Figur 9. In-situ hybridisering viser celler positive for RNA fra laksepoxvirus (rød farging).

Manglende overensstemmelse mellom resultater fra Pharmaq Analytiq PCR-undersøkelser og histologiske gjellescoringer ved Veterinærinstituttet førte til forvirring siden erfaringer hadde vist god korrelasjon mellom PCR resultater fra Veterinærinstituttet og gjellescore. Forklaringen på manglende sammenfall mellom Ct-verdier og histologi kom da det ble oppdaget at Pharmaq Analytiq PCR-metode analyserer for RNA, ikke DNA som Veterinærinstituttets PCR.

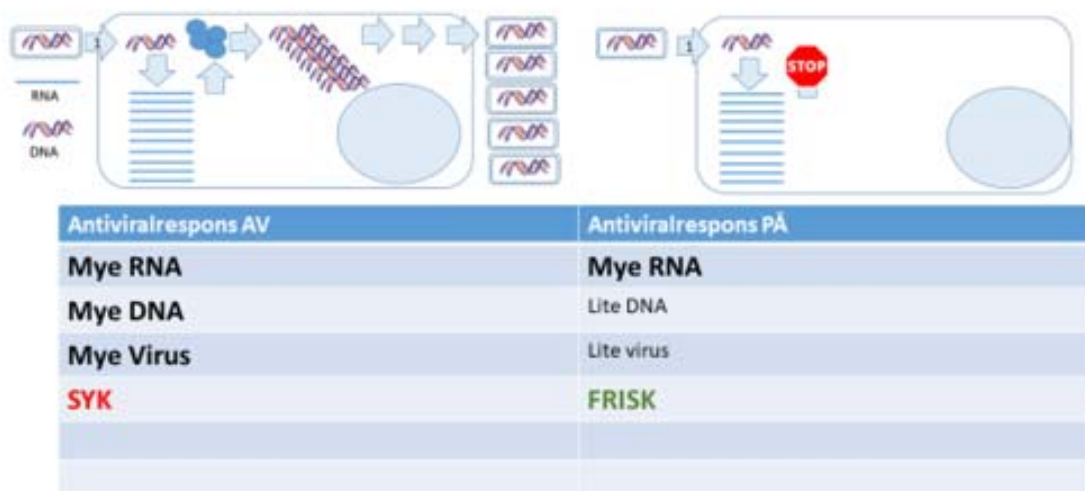
DNA vs. RNA-baserte PCR-analyser

Det benyttes i dag to forskjellige metoder for PCR-påvisning av laksepoxvirus. Den ene benyttes ved Veterinærinstituttet og påviser laksepox-DNA (selve genomet til laksepoxviruset), mens den andre benyttes av Pharmaq Analytiq og påviser RNA (som produseres i infiserte celler under infeksjonen, men ikke er en del av viruset). Disse analysene gir to forskjellige svar som ikke må forveksles.

Under forløpet av en poxvirusinfeksjon skjer følgende:

1. Viruset fester seg til gjellenes overflate: I denne korte fasen er bare viruspartiklene til stede, og man kan kun påvise små mengder DNA inne i viruspartiklene.
2. Viruset er i tidlig fase av infeksjonen: I denne fasen er viruset inne i cellene. Det produseres mye RNA, og en RNA-påvisning vil være sensitiv. Men i denne fasen er ikke gjellene skadet og påvisningen har ikke sammenheng med patologi. Cellene i en sunn og frisk fisk kan slå på en beskyttelsesrespons (antiviralrespons) som låser viruset i denne fasen (Se figur 10 - Antiviralrespons PÅ). Da produseres det ikke nye virus (og lite DNA), og man forventer ikke at gjellene skades og fisken blir syk. Et DNA assay vil gi ganske lite utslag her.
3. 'Viruset er i slutfase av infeksjonen: I denne fasen produseres en mengde viruspartikler som har kopier av DNA-genomet i hver viruspartikkel (se figur 10 - Antiviralrespons AV). Et DNA-assay slår nå ut med kraftig påvisning. I denne fasen, når viruset sendes ut av cellene, får man celledød, kan påvise sykdom ved histologi, og fisken får i mange tilfeller utbrudd og dør.

Det er derfor et assay mot laksepox-DNA korrelerer med sykdom, mens et assay mot RNA egner seg bedre til å påvise laksepoxvirusinfeksjon, er mer sensitivt i ellers frisk fisk. Det bør bemerkes at de andre virusene som analyseres i laksenæringen (PRV-HSMB, SAV-PD, ISAV-ILA, PMCV-CMS, IPNV-IPN) har RNA-genom og det kan kun benyttes RNA-baserte analyser.



Figur 10. Figuren viser to tilstander i en poxvirusinfisert celle. Aktiv virusproduksjon (venstre), der både RNA og DNA-påvisning blir god og fisken blir syk, og en celle der antiviralresponsen bremser virusproduksjonen (høyre), hvor kun et RNA-assay gir mye utslag og fisken forblir frisk.

Prøver med lav Ct-verdi når analysert for RNA, høy verdi når analysert for DNA og sparsom eller ingen patologi, vil kunne brukes videre i SALPOX-prosjektet for å se nærmere på forskjeller i fisk som tydeligvis har en effektiv antiviralrespons. Dette vil kanskje kunne gi verdifull innsikt i hvorfor det er så store forskjeller i alvorlighetsgrad ved utbrudd av laksepox.

Prøver fra sjøsatt fisk

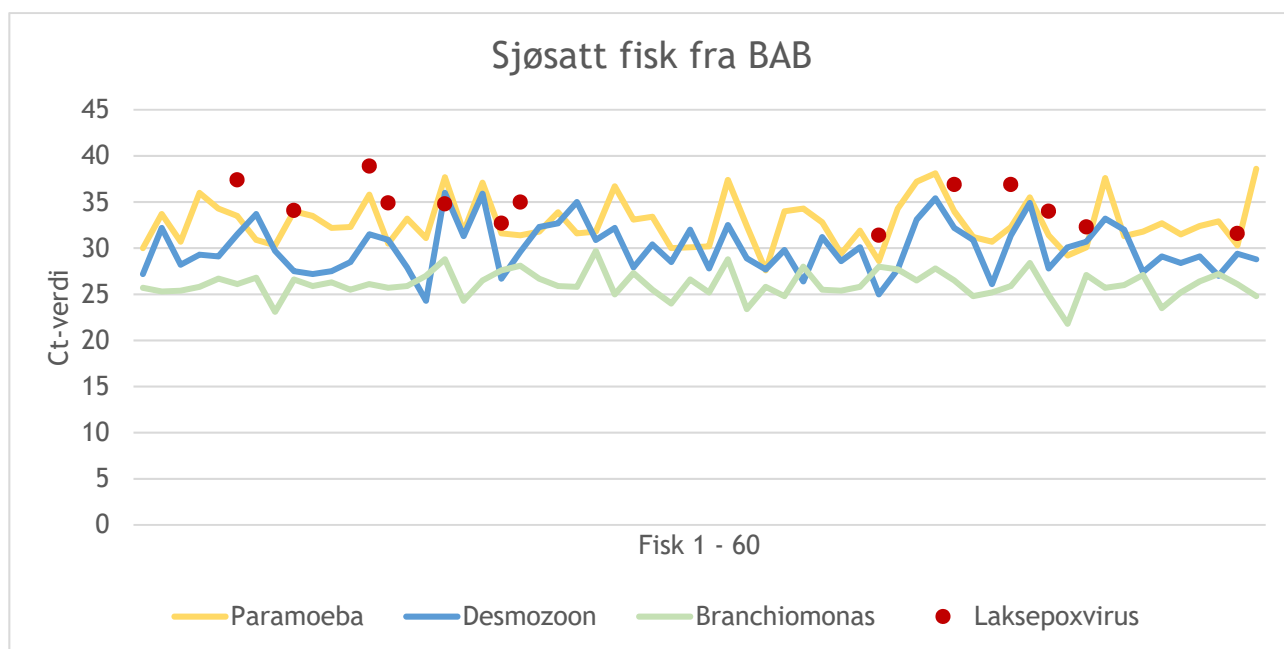
Det ble gjennomført anleggsbesøk og prøveuttak, der det var mulig, av sjøsatt fisk fra de samme fiskegruppene. Ett anlegg (SHB) leverte smolt til et eksternt selskap, og disse kunne ikke prøvetas. Fiskegruppen fra GOB ble delt på to sjølokaliteter, og her var det fiskehelsetjenesten som tok ut prøver for prosjektet i forbindelse med rutinebesøk. Ved den ene sjølokaliteten ble prøveuttaket fordelt på to

besøk, med ca. en måneds tid mellom de to. Fiskegruppen fra BAB ble også fordelt på to sjølokaliteter, og av logistikkmessige årsaker ble det tatt prøver fra kun den ene. Prøver fra fiskegruppen fra ANB ble tatt fra en av tre mulige sjølokaliteter og analysert før det ble bestemt at det skulle lages et oppsett for flere gjelleagens, og at alle negative prøver skulle lagres. Siden alle prøvene fra dette uttaket var negative for laksepoxvirus, ble prøvene destruert og det finnes dessverre ingen oversikt over prevalens av andre gjelleagens for denne gruppen.

I denne PCR-metoden er det analysert for laksepoxvirus-DNA, så Ct-verdier skal erfaringsmessig være pålitelige med tanke på klinisk betydning.

BAB

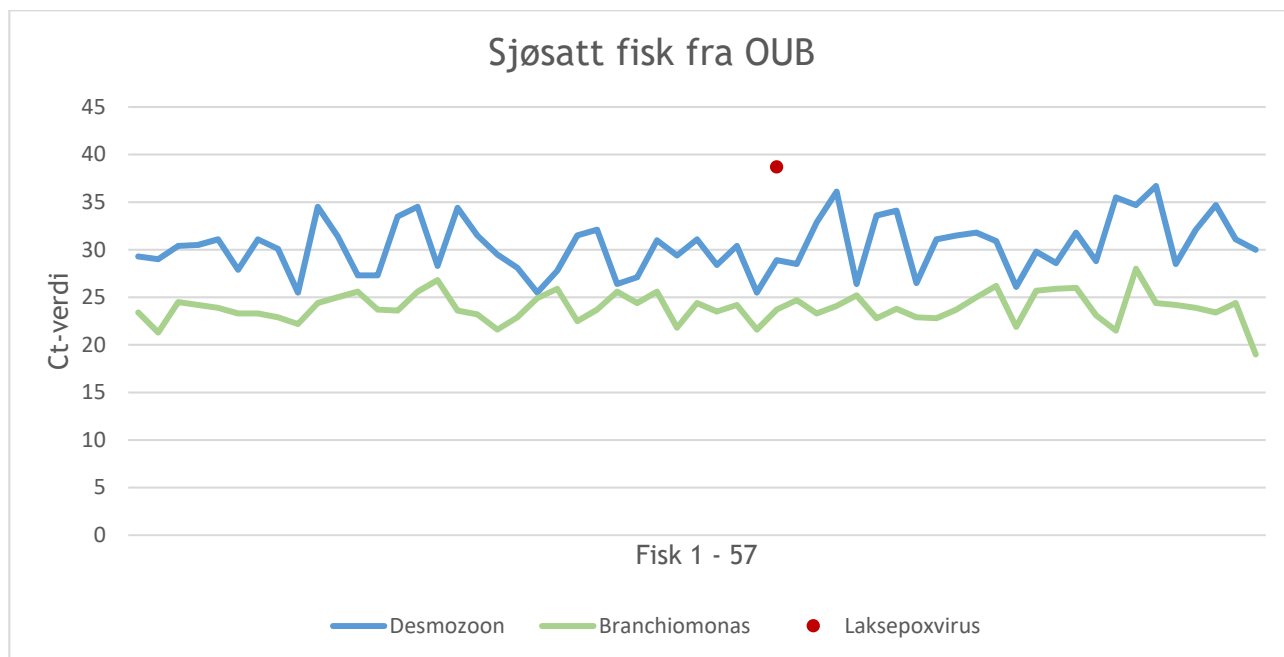
Sjøsatt i april/mai 2018, prøvetatt i oktober 2018. Resultatene viser 100 % prevalens av både *Paramoeba perurans*, *Desmozoon lepeophtherii* og *Ca. Branchiomonas cysticola* og disse vises som sammenhengende linjer for å illustrere at disse agensene sammen danner et tydelig bakgrunnsbilde av kompleks gjellesykdom i fiskegruppen. Prevalensen av laksepoxvirus var her på ca. 22 %, og er en moderat økning fra 13 % ved smoltifisering ca. syv måneder tidligere. Ct-verdiene for laksepoxvirus tyder ikke på klinisk sykdom da alle er over 30.



Figur 11. Resultater fra multiplex-PCR for gjelleagens i sjøsatt fisk fra BAB. N= 60.

OUB

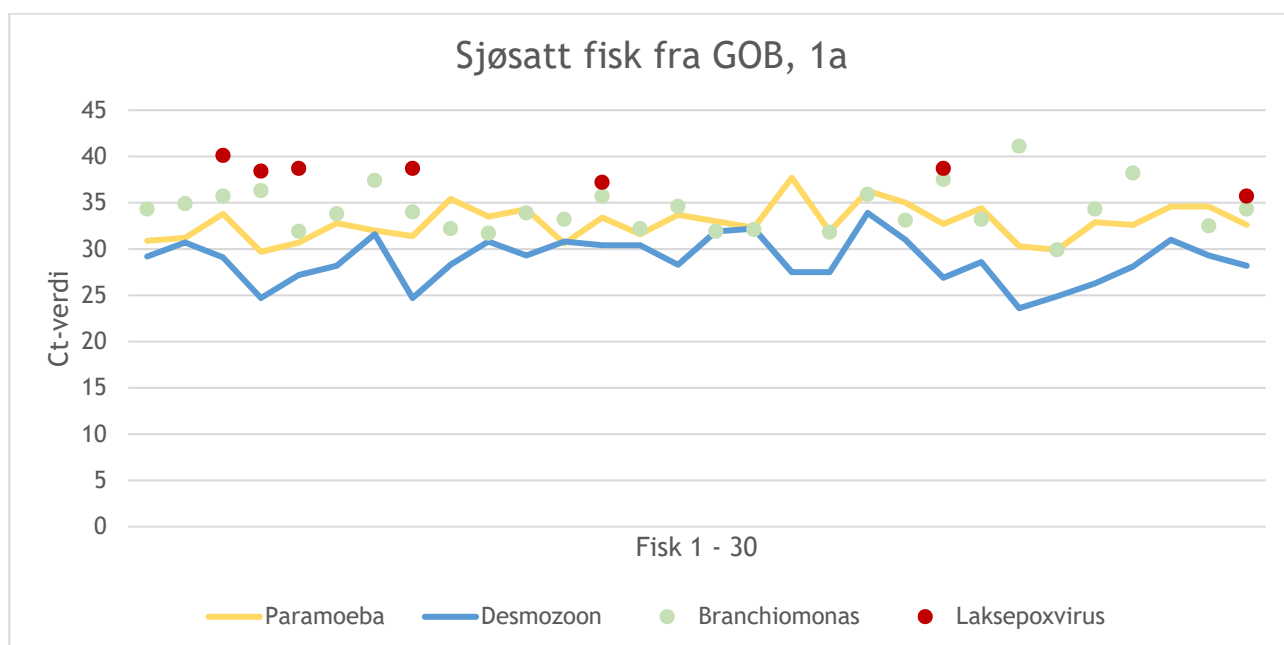
Sjøsatt mars/april 2018, prøvetatt november 2018. Også her er prevalensen av *Desmozoon lepeophtherii* og *Ca. Branchiomonas cysticola* 100 %, og med til dels ganske lave Ct-verdier, mens det var ingen positive for *Paramoeba perurans*. Ved smoltifisering i mars var prevalensen av laksepoxvirus på 52 %, og hadde steget siden uttaket ved sortering/vaksinering. I disse prøvene fra sjøsatt fisk var det kun én positiv for laksepoxvirus, og med veldig høy Ct-verdi. Det var tre prøver som viste seg å ikke inneholde tilstrekkelig prøvemateriale for pålitelig analyse.



Figur 12. Resultater fra multiplex-PCR for gjelleagens i sjøsatt fiskegruppe fra OUB. Det ble ikke påvist *Paramoeba perurans* i disse prøvene. N= 57.

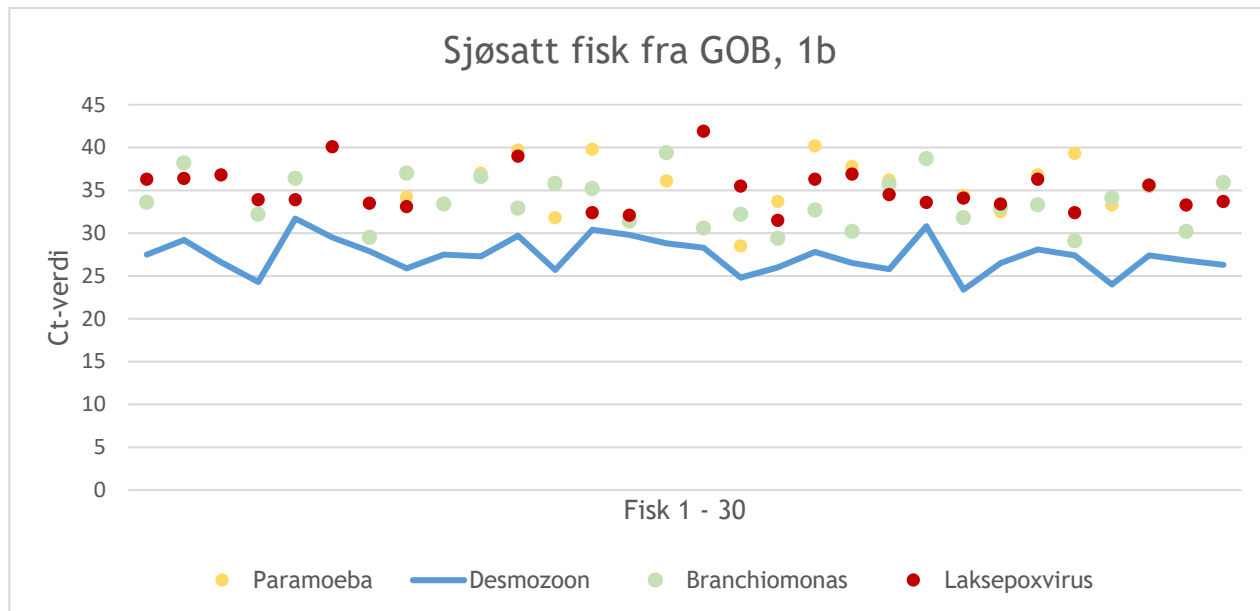
GOB

Sjøsatt i juni 2018, og fordelt på to sjølokaliteter. Ved den ene lokaliteten ble det tatt prøver i to omganger (1 a og b), henholdsvis november og desember 2018. I november (se figur 13) var alle prøvene positive for *Paramoeba perurans* og *Desmozoon lepeophtherii*, med tydelig innslag av *Ca. Branchiomonas cysticola* (93 %). 23 % er positive for laksepoxvirus, men med veldig høye Ct-verdier. Ved smoltifisering juni 2018 var prevalensen av fisk positive for laksepoxvirus 17 % med ingen eller få påvisninger i fiskegruppa før dette.



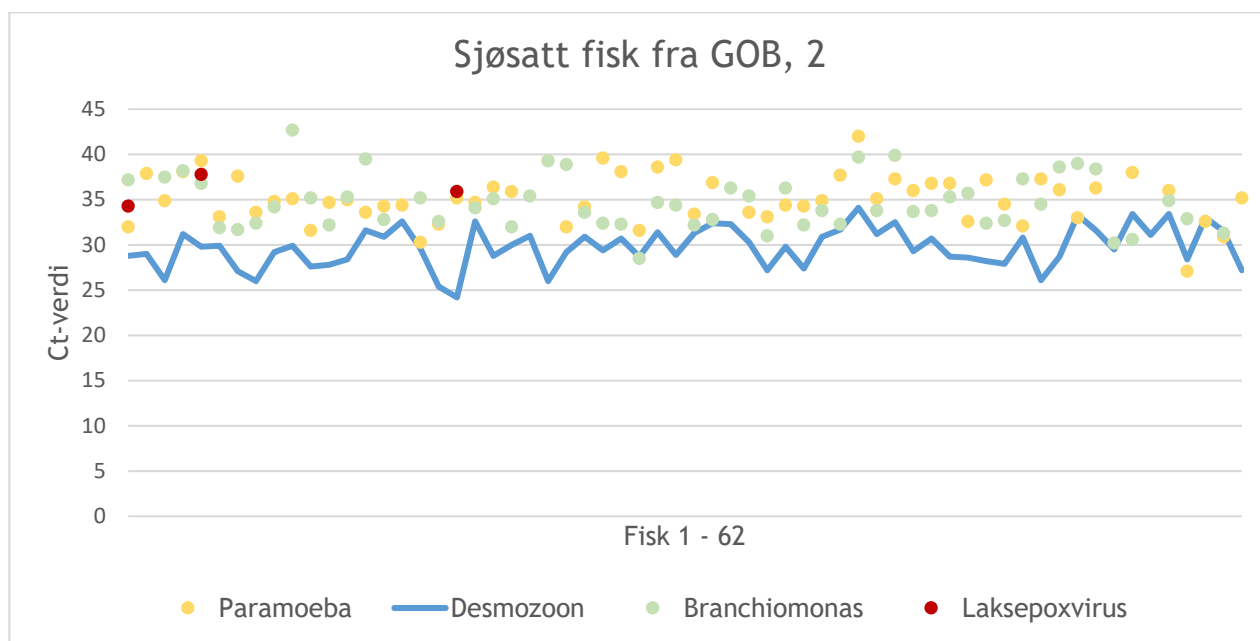
Figur 13. Resultater fra multiplex-PCR for gjelleagens i sjøsatt fiskegruppe fra GOB, ved en av de to sjølokalitetene, i november 2018. N=30

I desember 2018 (se figur 14) ble det tatt 30 nye prøver. Disse viser en økning i prevalens av fisk positive for laksepoxvirus, men fortsatt med såpass høye Ct-verdier at de erfaringsmessig ikke er assosiert med klinisk sykdom. Prevalensen for *Paramoeba perurans* har her sunket til 53 %. Det er fortsatt 100 % prevalens av *Desmozon lepeophtherii* med moderate Ct-verdier. Ca. *Branchiomonas cysticola* holder seg stabil med likt antall positive som i november. Det er en tydelig økning i antall fisk som er positive for laksepoxvirus, med 83 % prevalens i dette uttaket.



Figur 14. Resultater fra multiplex-PCR for gjelleagens i sjøsatt fiskegruppe fra GOB, ved en av sjølokalitetene, i desember 2018. N = 30.

Ved den andre av de to sjølokalitetene ble det også tatt prøver i november 2018, med to prøver ekstra enn de planlagte 60. Også her er det 100 % prevalens av *Desmozon lepeophtherii*, og i likhet med den andre lokaliteten er det høy prevalens av Ca. *Branchiomonas cysticola* (92 %). Det er også mange positive for *Paramoeba perurans* (92 %). Prevalensen av fisk positive for laksepoxvirus er derimot veldig lav med kun tre individer, og alle med høye Ct-verdier.



Figur 15. Resultater fra multiplex-PCR for gjelleagens i sjøsatt fisk fra GOB, ved den andre av de to sjølokalitetene, i november 2018. N = 62.

Felles for alle prøveuttakene av sjøsatt fisk er et tydelig bakgrunnsbilde av en kompleks smittetilstand i gjellene, selv om Ct-verdiene er hovedsakelig ganske høye. Det mest overraskende funnet er kanskje utbredelsen av smitte med *Desmozoon lepeophtherii*. Tilbakemeldinger fra fiskehelsetjenester beskriver alt fra tydelig gjelleproblematikk, hovedsakelig AGD, til ingen nevneverdige problemer med gjellehelse. Innslagene av laksepoxvirus er veldig varierende, også innad på en og samme lokalitet over ganske kort tid. Dessverre var det ikke mulig å sammenligne disse fiskegruppene med den fra settefiskanlegg ANB, noe som hadde vært interessant da alle screeningprøver fra ANB tatt i forbindelse med prosjektet var negative for laksepoxvirus.

Villfiskprøver

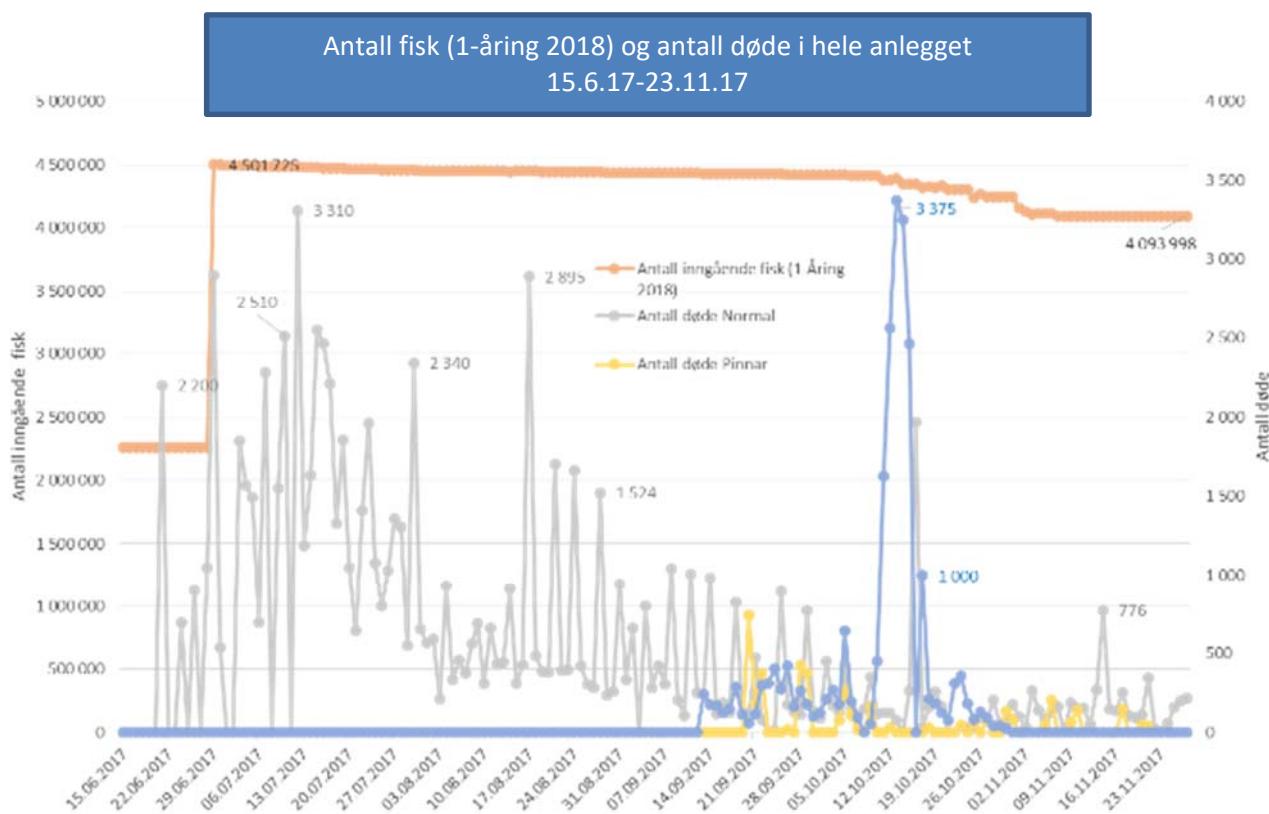
Tabell 11. Oversikt over villfiskprøver med resultater. I Fykanvatnet var det først en positiv prøve fra ørret, men da denne ble testet på nytt var den negativ.

Vannkilde	Art	Antall	Laksepoxvirus +/-
Straumvatnet	sjøørret	11	-
	laks	1	-
	ørret	44	-
	sjørøye	4	-
Ytre Standalselva	ørret	60	-
Dravlauselva	ørret	27	-
Sunnskjørvatnet	ørret		-
	sjøørret		-
	røye		-
Fykanvatnet	ørret	51	1?
Ytre Standal, i sjø	laks	5	1

AP 3: Epidemiologisk kartlegging av smitteveier til og smittedynamikk innad i settefiskanlegg og overføring til sjøfase ved en longitudinell observasjonsstudie.

Ved analysing av produksjonsdata fra ett av anleggene som omfattet et laksepoxutbrudd, var det enkelt å sette opp dødelighetskurver for fiskegruppen som helhet, og på mindre enhetsnivå (se figur 16). Dette var også det eneste dataene var egnet til, og det var ikke mulig å følge fisk fra kar til kar over tid. Dataene inneholdt heller ikke opplysninger om andre eller spesielle hendelser som vi kunne sette i forbindelse med dødeligheten. Det viste seg også at det var vanskelig å gå tilbake og finne sikre tidsspesifikke data rundt hendelser som kunne vært stressende for fisken. Samtidig hadde vi sett gjennom smitteforsøk i SALPOX-prosjektet at det var nødvendig å stressе fisken for å få sykdomsutbrudd. Forsøk

der man bare satte laksepoxsmittet fisk inn i kar med naiv fisk ga en oppformering av viruset i forsøksfisken, men altså ingen sykdom. Konklusjonen ble at skal en ha nytte av undersøkelser der en legger produksjonsdata til grunn for å finne årsak til laksepoxutbrudd, må de forberedes slik at nødvendige notater blir skrevet ned etter hvert. Noe av det samme gjaldt helseopplysninger som var tydelig avhengig av individuelle preferanser for oppsett blant fiskehelsepersonell, og det var svært vanskelig å trekke ut opplysninger som datasett. I tillegg var det i noen tilfeller utfordrende å i det hele tatt få tak i helseopplysningene. Det ble til slutt vurdert som ikke hensiktsmessig å videreføre denne arbeidspakken. Det kan ikke anbefales å bruke retrospektive data tatt ut fra faprogrammene eller fra fiskehelsetjenestenes rapporter for å finne ut hvordan spesielle produksjonsforhold påvirker infeksjoner med laksepoxvirus og sykdomsutbrudd.



Figur 16. Utdrag av produksjonsdata fra en fiskegruppe i et tidsrom på ca. fem måneder, med en tydelig dødelighetstopp rundt midten av oktober 2017. Blå linje viser dødelighet registrert som laksepoxrelatert av anlegget

AP4 Undersøke effekt på virusforekomst av brakklegging og desinfeksjonstiltak i anlegg med påvist smitte

Høsten 2016 ble det gjennomført et forsøk på en begrenset sanering av biofilter i den ene RAS-avdelingen ved anlegg BAB. Anbefalt protokoll består av to trinn - først høy og så lav pH, men for å bevare noe av biofilterets funksjon ble det kun brukt høy pH. Resultatene fra prøvetaking av biofilm med svaber før og etter sanering er vist i henholdsvis tabell 12 og 13. På våren året etter sanering ble det igjen påvist laksepox ved BAB.

Tabell 12. Oversikt over miljøprøver før sanering

Avd	Kar	vev	kommentar	Ct-verdi
P1	K910	Svaber	Biofilter, P1, K910, Avløp	ND
P1	K910	Biofilm	Skrap, P1, K910, Avløp	ND
P1	K910	Svaber	Biofilter, P1, K910, Innløp	ND
P1	K910	Biofilm	Skrap, P1, K910, Innløp	ND
P1	K910	Filter	P1, K910, 19.09, Innløp	33,7
P1	K910	Filter	P1, K910, 19.09, Avløp	ND
P1	K901	Svaber	Biofilter, P1, K901, Avløp	ND
P1	K901	Biofilm	Skrap, P1, K901, Avløp	ND
P1	K901	Filter	P1, K901, Inntak, 19.09	34,5
P2	K9	Svaber	Biofilter, P2, K9, Avløp	ND
P2	K9	Biofilm	Skrap, P2, K9, Avløp	ND
P2	K9	Svaber	Biofilter, P2, K9	ND
P2	K9	Biofilm	Biofilter, P2, K9	32,4
P2	K2	Svaber	Biofilter, P2, K2, Avløp	34,4
P2	K2	Biofilm	Skrap, P2, K2, Avløp	34,0
P2	K2	Filter	P2, K2, Inntak, 19/9	32,1
P2	K2	Filter	P2, K2, Avløp, 19/9	ND

Tabell 13. Oversikt over miljøprøver etter sanering

Avd	Kar	vev	kommentar	Ct-verdi
P2		Filter	Sediment, P2	ND
P2		Svaber	Biofilter, P2	ND
P2		Biofilm	Skrap, P2	ND
P2		Filter	P2	ND
P2		Filter	P2	ND
P2		Filter	P2, Råvann, 19/9	ND
P1		Svaber	Biofilm, Råvann P1	ND
P1		Biofilm	Skrap, Råvann P1	ND
P1		Filter	Sediment, P1	ND
P1		Filter	Biofilter, P1	ND
P1		Filter	Biofilter, P1	31,5
P1		Filter	P1, Råvann, 19/9	ND
P1		Filter	P1, Avløp, 19/9	ND

Ny saneringsprotokoll - gjennomstrømningsanlegg

Ett av settefiskanleggene som hadde høy prevalens av laksepoxvirus allerede i startfôringsperioden hos gruppene som ble undersøkt i laksepoxprosjektet, gjennomførte et nytt opplegg for vask og desinfeksjon. Det var et svært alvorlig laksepoxutbrudd der nesten 700 000 fisk med gjennomsnittsvikt på 80 g døde i løpet første måned i 2019 som var bakgrunnen for denne endringen av prosjektet. Ved gjennomgang av vannkvalitet og bruk av vann så vi ingen spesielle forhold som kunne være årsaken til sykdomsutbruddet. Videre gjennomgang av driftsforhold viste at byggarbeider kunne ha vært en utløsende faktor. Fra smitteforsøk i SALPOX-prosjektet er det langt på vei bekreftet at det er nødvendig å stresser fisken på

forhånd dersom det skal bli sykdomsutbrudd. Vi så også for oss at en oppbygging av virusmengde i miljøet over flere år også kunne være en viktig faktor i forbindelse med dette laksepoxutbruddet.

Ut fra disse vurderingene og etter gjennomgang av anlegget, rådet vi anlegget til å utarbeide nye vaske- og desinfeksjonsrutiner. Oversikt over vaskerutinene er vedlagt.

- Starte med klekkeri for så å ta hall etter hall etter hvert som de tømmes
- Lage vaskeplan som involverer alt fra bakker, kar, gangbaner, gulv, vegger, rør, løst utstyr osv.
- Gjelder alle rommene dvs hall, teknisk rom, fôrlager og sluse.
- Motivere ansatte til å gjøre jobben så godt som mulig, understreke betydningen av dette.
- Forlenge tørketiden så mye som mulig.
- Bruke surt desinfiseringsmiddel (Kick-start) der dette er mulig. Sjekk effekten av vask, desinfisering og tørke vha ATP-måler.

I stedet for å bruke et nøytralt desinfeksjonsmiddel som tidligere, ble det skiftet til et surt desinfeksjonsmiddel siden det har vært anbefalt til bruk ved smitte med andre koppevirus. Fra Veterinærinstituttet skulle vi så følge opp med uttak av prøver fra fisken. Første prøveuttak var på plommesekkstadiet. Deretter fortsatte vi med prøveuttak i forbindelse med flyttinger fra hall til hall. Fisken gjennomgikk sortering uten at vi greide å påvise viruset. Prøvene er også denne gangen undersøkt ved Pharmaq Analytiq.

Avlsselskapet som leverte rogn er trukket inn for å undersøke om det kunne være aktuelt å finne fram til genotyper med ekstra motstandskraft mot laksepox. I denne sammenhengen ble det tatt ut prøver av dødfisk, svimere og overlevende etter laksepoxutbruddet for videre genetiske undersøkelser. Dette arbeidet pågår fortsatt internt i avlsselskapet.

Anlegget har også innført andre nye biosikkerhetstiltak i tillegg til de nye vaske- og desinfeksjonsrutinene. Det er nå innarbeidet et hygienisk skille innad slik at anlegget nå drives som to separate settefiskanlegg. Erfaringer med for dårlig beredskap til å håndtere så mye dødfisk på en forsvarlig måte, har ført til ombygginger slik at det nå går an å håndtere et stort sykdomsutbrudd på en hygienisk, og for ansatte arbeidsmessig god måte.

På grunn av de interessante resultatene etter nye vaske- og desinfeksjonsrutiner, ville styringsgruppa fortsette undersøkelsene fram mot utsett. Etter vaksinerings ble det imidlertid påvist høy prevalens av laksepoxvirus. Viruset ble også påvist i noe av den fisken som gikk gjennom vaksineringsmaskina, men uten å bli vaksinert fordi de var for små. I ettertid er det også blitt noe forhøyet dødelighet på grunn av laksepox i vaksinert fisk. MLVA genotyping viste at det var samme genotype av laksepoxviruset som ble påvist etter vaksinerings og som har vært påvist i anlegget tidligere. Dette kan tolkes som at anlegget gjennom mange generasjoner har bygd opp et miljø der en husstamme av laksepoxviruset har fått mulighet til å etablere seg. Vaksineringsmaskina er svært komplisert og vanskelig å vaske og desinfisere og her ble ikke den nye vaskeplanen gjennomført. Sure desinfeksjonsmidler kan virke korrosive og er derfor ikke anbefalt til denne maskina. Leverandøren av vaksineringsmaskina ble involvert og har deltatt i reingjøring og desinfeksjon for å utvikle gode prosedyrer.

Anleggets konklusjoner

- Unngå all form for stress som kan utløse utbrudd, særlig høy lyd og vibrasjon.
- Sette inn tiltak med økt oksygen og redusert/stopp i fôring så raskt som mulig. Isoler karet og minimer stress.
- Vær grundig i forbindelse med vask og desinfisering. Bruk surt middel der det er mulig. Ingen snarveier må tas.
- Motiver de ansatte
- Det er store utfordringer i forbindelse med vask og desinfisering av Maskon vaksineringsmaskin, da denne er satt opp med utstyr som ikke tåler sur desinfisering. I tillegg er det vanskelig å komme til skikkelig i sorteringsmaskinen.

AP5: Undersøke om infisert stamfisk har potensial til å overføre virus til neste generasjon

Potensiell vertikal overføring ble forsøkt utredet ved å følge avkommet fra både positive og negative foreldre.

Gruppe 1: positive foreldre, befruktet i rognvæske, ikke desinfisert.

Gruppe 2 og 3: positive foreldre, befruktning og desinfisering etter standard prosedyre med skylling i fysiologiske saltvann før befruktning og desinfeksjon før svelling.

Gruppe 4: negative foreldre og desinfisering etter standard prosedyre.

Det er ikke påvist laksepoxvirus i avkom etter positive foreldre, men i siste prøvetaking etter vaksinerings/smoltifisering var 16 av 60 fisk i den negative kontrollen positive. Undersøkelser av fisk i anlegget der hvor vi får annen kontrollfisk fra, var negative med tanke på laksepoxvirus. Det er uvisst om smitten kommer inn via inntaksvannet i akvariet ved VI/NMBU, men ikke umulig da dette har skjedd ved andre forsøksakvarier.

Siden det ikke ble noen påvisning av laksepoxvirus på yngel etter smittede foreldre, så vi ingen grunn til å undersøke rogn som vi hadde tatt ut på RNAlater. MLVA-typingen som ble utført på parallelle yngelgrupper fra samme laksepoxvirus-positive foreldrefisk tilsa som nevnt under AP1 heller ikke at vertikal overføring kunne forklare disse tilfellene (Figur 7).

8. Hovedfunn

- MLVA-typing av laksepoxvirus muliggjør høyresolusjons genotyping som kan anvendes epidemiologisk f.eks. til smittesporing.
- Det er oppdaget et potensielt virulensgen i laksepoxvirus som er kjent fra andre poxvirus, men genets funksjon i forbindelse med laksepoxutbrudd er foreløpig ukjent.
- Tilgjengelige metoder for overvåking av laksepoxvirus i miljø er foreløpig ikke sensitive nok til å forutsi smitte i fisk.
- Resultater fra screening av fisk med PCR må vurderes sammen med klinikk og andre undersøkelser for å unngå feiltolkning.
- Prevalensen av laksepoxvirus i fisk er meget høy veldig tidlig i noen settefiskanlegg, og viser ulik utvikling mellom flere av anleggene.
- Det virker lite sannsynlig at vill laksefisk i ferskvannskilder er en viktig smittekilde.
- Registrerte driftsopplysninger er ikke egnet til detaljert analyse, og inneholder ikke nok informasjon til å kunne vurdere ytre påvirkninger på fisken opp mot dødelighet.
- Utvidet vask- og desinfeksjonsprotokoll ser ut til å være veldig effektivt.
- Data fra smitteforsøk og -sporing gir grunnlag for å anta at vertikal overføring av laksepoxvirus ikke representerer en vesentlig smittevei.

Erfaringer

- Anekdotiske opplysninger fra flere anlegg tilsier at stress i form av bråk og vibrasjoner kan være en utløsende årsak til laksepoxutbrudd, og fortjener mer oppmerksomhet.
- Intensiv drift, som for eksempel høy tetthet, og generell overskridelse av anleggets kapasitet kan være en viktig faktor i forbindelse med laksepox.

9. Major findings

- MLVA-typing of salmon gill poxvirus provides high resolution genotyping which may be used in epidemiological investigations, such as tracing infections.
- The salmon gill poxvirus genome comprises a potential virulence gene also found in other poxviruses. It is unknown whether this gene plays a part in salmon gill poxvirus disease outbreaks.
- The available methods for environmental sampling are not sensitive enough to predict infection in fish.
- When screening fish using PCR-analyses it is important to interpret the results in correlation with clinical signs and other methods.
- The prevalence of salmon gill poxvirus is very high early on in some hatcheries, and the different farm sites show different infection rates over time.
- Wild salmonids in freshwater sources appear to be a negligible source of infection.
- Production data are not suited for detailed analyses and contains too little information to evaluate the possible effects of external events in terms of mortality.
- An extensive cleaning and disinfection routine appears to be very effective.
- Data from the infection pilot and tracing method strongly indicates that vertical transmission is not a primary route of infection.

Observations

- Anecdotes from several hatcheries indicate that stress, such as noise and vibrations may trigger outbreaks and this deserves more attention.
- Intensive production with high densities and exceeding the capacity of the hatchery may be an important factor when it comes to salmon gill poxvirus disease.

10. Leveranser

Gjennomført formidling av opplegg for prosjektet, resultater, utveksling av erfaringer og smittemateriale

Foreløpige resultater om sporingsverktøyet under delmål 1 ble presentert med poster på Havbruk 2018, som populærvitenskapelig artikkel i 2018, som foredrag på Frisk Fisk i 2019:

Genetiske varianter av laksepox - en sammenlikning av nordeuropeiske isolater : Maria K Dahle*, Snorre Gulla*, Mona Gjessing, Åse Helen Garseth, Petra E Petersen, Ole Bendik Dale, Torstein Tengs.

Møter med ansatte i Marine Harvest/Mowi Norge, Skottland og Canada

Skypemøte med forskere fra Færøyene, Skottland og Shetland

Presentasjon av prosjektet under Gill Health Initiative i Galway april 2018.

Akvaveterinærenes høstturs 2018, innlegg

Populærvitenskapelig artikkel - Norsk fiskeoppdrett: Nytt sporingsverktøy for laksepox, des 2018

Poster om AP5 på havbruk 2018: «Overføres Salmon gill poxvirus (SGPV) vertikalt?»

Nytt sporingsverktøy for laksepox i Norsk Fiskeoppdrett og Norsk Veterinærtidsskrift, des. 2018

Laksepox hos lakseyngel i Norge, Skottland og på Færøyene i Norsk Fiskeoppdrett og Norsk Veterinærtidsskrift i juni 2018

Undervisning for veterinærstudenter der laksepox var inkludert, februar 2019

Poster på Frisk Fisk 2019: «Laksepox - snikende virus, skjult fare?»

Møte med fiskehelsepersonell og driftsledere i Mowi Møre og Romsdal 2019

11. Referanser

1. Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S. et al. Arch Virol (2008) 153: 1299. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0117-7>
2. Gjessing, M.C., Thoen, E., Tengs, T., Skotheim, S.A. and Dale, O.B. (2017), Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon. J Fish Dis, 40: 1253-1265. doi:[10.1111/jfd.12608](https://doi.org/10.1111/jfd.12608)

12. Vedlegg

Resultater fra miljøprøver:

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
BAB	14.09.2017	P1	Felles inntak	ND
	27.10.2017	P1	Felles inntak	33,93
	27.10.2017	P1	Felles avløp	ND
	21.11.2017	P1	Felles inntak	ND
	21.11.2017	P1	Felles avløp	ND
	13.12.2017	P1	Felles inntak	ND
	13.12.2017	P1	Felles avløp	ND
	18.01.2018	P2	Felles inntak	31,61
	18.01.2018	P2	Felles avløp	33,47
	29.01.2018	P2	Felles inntak	30,52
	29.01.2018	P2	Felles avløp	32,04
	14.02.2018	P2	Felles inntak	32,48
	14.02.2018	P2	Felles avløp	29,67
	14.03.2018	P2	Felles inntak	ND
	14.03.2018	P2	Felles avløp	ND
	18.04.2018	P2	Felles inntak	ND
	18.04.2018	P2	Felles avløp	ND
	16.05.2018	P2	Felles inntak	ND
	16.05.2018	P2	Felles avløp	ND

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
GOB	02.11.2017	Startfôring	Felles avløp	ND
	02.11.2017	Startfôring	Inntak 18	ND
	02.11.2017	Startfôring	Felles avløp	ND
	08.01.2018	Presmolt	Felles avløp	23,67
	08.01.2018	Presmolt	Felles inntak	27,89
	21.03.2018	Presmolt	Felles inntak	ND
	21.03.2018	Presmolt	Felles avløp	ND
	03.05.2018	Smolt	Inntak 4	ND
	03.05.2018	Smolt	Felles avløp	33,79
	03.05.2018	Presmolt	Inntak 4	ND
	03.05.2018	Presmolt	Felles avløp	ND
	27.06.2018	Smolt	Felles inntak	ND
	27.06.2018	Smolt	Felles avløp	ND

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
ANB	23.03.2017	B	Inntak 08	ND
	23.03.2017	B	Inntak 04	ND
	23.03.2017	B	Inntak 01	ND
	23.03.2017	Startfôring	Avløp 01	ND
	23.03.2017	Startfôring	Avløp 04	ND
	23.03.2017	Startfôring	Avløp 08	ND
	23.03.2017	Startfôring	Felles inntak	ND
	03.05.2017	D	Felles inntak	ND
	03.05.2017	B	Felles inntak	ND
	03.05.2017	D	Avløp 16	ND
	03.05.2017	B	Avløp 01	ND
	03.05.2017	B	Avløp 04	ND
	16.06.2017	D	Felles inntak	ND
	16.06.2017	D	Avløp 28	ND
	26.07.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	26.07.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	26.07.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	09.08.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	09.08.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	09.08.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	09.08.2017	D	Avløp 31	23,92
	22.08.2017	Ekstern	Vannkilde	ND

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
SHB (gruppe 1)	31.03.2017	C	Inntak 3	ND
	31.03.2017	C	Avløp 3	ND
	31.03.2017	C	Inntak 7	ND
	31.03.2017	C	Avløp 7	ND
	31.03.2017	C	Inntak 11	ND
	31.03.2017	C	Avløp 11	ND
	31.03.2017	C	Felles avløp	ND
	23.05.2017	C	Inntak 10	32,44
	23.05.2017	C	Avløp 10	32,18
	23.05.2017	D	Inntak 10	ND
	23.05.2017	D	Avløp 10	31,55
	23.05.2017	C	Inntak 3	34,52
	23.05.2017	C	Avløp 3	ND
	20.06.2017	B	Inntak 6	ND
	20.06.2017	B	Avløp 6	ND
	20.06.2017	B	Inntak 2	ND
	20.06.2017	B	Avløp 2	ND
	20.06.2017	D	Inntak 13	ND
	20.06.2017	D	Avløp 13	ND
	31.07.2017	D	Inntak 8	32,79

	31.07.2017	D	Avløp 8	29,03
	31.07.2017	D	Inntak 18	32,3
	31.07.2017	D	Avløp 18	28,06
	31.07.2017	B	Inntak 3	34,32
	31.07.2017	B	Avløp 3	32,41
	29.08.2017	B	Inntak 3	31,47
	29.08.2017	B	Avløp 3	32,53
	29.08.2017	B	Inntak 5	33,55
	29.08.2017	B	Avløp 5	ND
	31.08.2017	B	Inntak 6	30,48
	31.08.2017	B	Avløp 6	33,32
	02.10.2017	B	Inntak 4	28,87
	02.10.2017	B	Avløp 4	30,21
	02.10.2017	B	Inntak 9	29,24
	02.10.2017	B	Avløp 9	29,19
	02.10.2017	B	Inntak 10	27,93
	02.10.2017	B	Avløp 10	28,9
	03.11.2017	F	Inntak 3	30,15
	03.11.2017	F	Avløp 3	32,96
	03.11.2017	F	Inntak 9	29,95
	03.11.2017	F	Avløp 9	30,27
	03.11.2017	F	Inntak 10	28,98
	03.11.2017	F	Avløp 10	32,15
	30.11.2017	F	Felles inntak	ND
	30.11.2017	F	Avløp 3	ND
	30.11.2017	F	Avløp 10	32,81
	03.01.2018	F	Felles inntak	ND
	03.01.2018	F	Avløp 3	33,67
	03.01.2018	F	Avløp 10	30,81
	02.02.2018	F	Felles inntak	ND
	02.02.2018	F	Avløp 1	ND
	02.02.2018	F	Avløp 7	ND
Gruppe 1 og 2	02.03.2018	F	Felles inntak	ND
	12.03.2018	F	Avløp 1	ND
	12.03.2018	F	Avløp 7	ND
Gruppe 1 og 2	03.04.2018	F	Felles inntak	ND
	03.04.2018	F	Avløp 1	ND
	03.04.2018	F	Avløp 7	ND
	03.05.2018	A	Inntak 6	31,44
Gruppe 1 og 2	03.05.2018	F	Felles inntak	ND

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
SHB (gruppe 2)	29.08.2017	D	Inntak 1	26,83
	29.08.2017	D	Avløp 1	26,73
	31.08.2017	D	Inntak 2	ND
	31.08.2017	D	Avløp 2	ND
	31.08.2017	D	Inntak 11	ND
	31.08.2017	D	Avløp 11	ND
	02.10.2017	D	Inntak 1	30,48
	02.10.2017	D	Avløp 1	31,86
	02.10.2017	D	Inntak 2	30,78
	02.10.2017	D	Avløp 2	31,38
	02.10.2017	D	Inntak 11	31,52
	02.10.2017	D	Avløp 11	32,77
	03.11.2017	D	Inntak 5	32,33
	03.11.2017	D	Avløp 5	30,42
	03.11.2017	B	Inntak 4	29,19
	03.11.2017	B	Avløp 4	27,92
	03.11.2017	D	Inntak 14	30,58
	03.11.2017	D	Avløp 14	30,61
	30.11.2017	A	Inntak 6	29,75
	30.11.2017	A	Avløp 6	28,9
	30.11.2017	A	Inntak 4	31,28
	30.11.2017	A	Avløp 4	29,74
	30.11.2017	E	Inntak 2	27,31
	30.11.2017	E	Avløp 2	28,35
	03.01.2018	F	Avløp 12	ND
	03.01.2018	A	Inntak 6	33,37
	03.01.2018	A	Avløp 6	29,23
	03.01.2018	A	Inntak 4	30,81
	03.01.2018	A	Avløp 4	30,65
	02.02.2018	A	Inntak 4	ND
	02.02.2018	A	Avløp 4	ND
	02.02.2018	A	Inntak 6	ND
	02.02.2018	A	Avløp 6	ND
	02.02.2018	F	Avløp 12	ND
Gruppe 1 og 2	02.03.2018	F	Felles inntak	ND
	02.03.2018	A	Inntak 4	ND
	02.03.2018	A	Avløp 4	ND
	02.03.2018	A	Inntak 6	33,62
	02.03.2018	A	Avløp 6	32,45
	02.03.2018	F	Avløp 12	ND
Gruppe 1 og 2	03.04.2018	F	Felles inntak	ND
	03.04.2018	F	Avløp 11	ND
	03.04.2018	A	Inntak 6	ND
	03.04.2018	A	Avløp 6	32,82
	03.04.2018	A	Inntak 4	ND
	03.04.2018	A	Avløp 4	ND
	03.05.2018	A	Avløp 6	32,9

	03.05.2018	A	Inntak 4	ND
	03.05.2018	A	Avløp 4	ND
Gruppe 1 og 2	03.05.2018	F	Felles inntak	ND
	03.05.2018	F	Avløp 5	ND
	03.05.2018	F	Avløp 6	31,23

Anlegg	Dato	Avdeling	Punkt/kar	Resultat
OUB	12.05.2017	Startfôring	Felles inntak	ND
	12.05.2017	Ekstern	Vannkilde	ND
	12.05.2017	NA	Lufter	ND
	12.05.2017	Startfôring	Avløp 5	ND
	12.05.2017	Startfôring	Avløp 11	ND
	12.05.2017	Startfôring	Avløp 14	ND
	15.06.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	15.06.2017	Påvekst 1	Avløp 15	ND
	28.07.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	28.07.2017	Påvekst 1	Avløp 15	34,06
	28.07.2017	Påvekst 1	Avløp 9	ND
	28.07.2017	NA	Avløp 19	ND
	31.08.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	31.08.2017	Påvekst 2	31	33,21
	31.08.2017	NA	19	ND
	31.08.2017	Påvekst 2	32	33,93
	26.09.2017	Påvekst 2	40	33,43
	26.09.2017	Påvekst 2	36	32,77
	26.09.2017	Påvekst 2	34	31,28
	26.09.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	31.10.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	31.10.2017	Påvekst 2	41	ND
	31.10.2017	Påvekst 2	42	29,76
	31.10.2017	Påvekst 2	34	29,76
	24.11.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	24.11.2017	Påvekst 2	36	ND
	24.11.2017	Påvekst 2	40	ND
	24.11.2017	Påvekst 2	35	ND
	19.12.2017	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	19.12.2017	Påvekst 2	33	ND
	19.12.2017	Påvekst 2	35	ND
	19.12.2017	Påvekst 2	39	ND
	31.01.2018	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	31.01.2018	Påvekst 2	35	ND
	31.01.2018	Påvekst 2	37	ND
	31.01.2018	Påvekst 2	38	ND
	28.02.2018	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	28.02.2018	Påvekst 2	33	ND

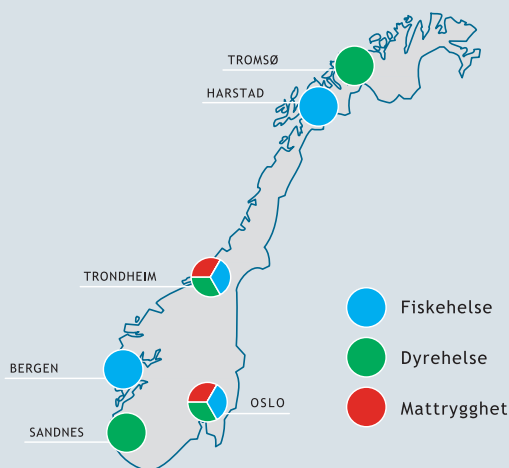
	28.02.2018	Påvekst 2	38	ND
	28.02.2018	Påvekst 2	52	ND
	31.03.2018	Påvekst 1	Tank 6	ND
	31.03.2018	Hele anlegget	Tank ekstra inntak	ND
	31.03.2018	Hele anlegget	Hovedinntak	ND
	31.03.2018	Påvekst 2	37	ND
	31.03.2018	Påvekst 2	51	ND
	31.03.2018	Påvekst 2	53	ND

Faglig ambisjøs, 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