



Smittemodell for ILAV HPR0



Smittemodell for ILAV HPRO

Forfattere

Hilde Sindre
Torfinn Moldal
Simon Chioma Weli
Søren Grove (Havforskningsinstituttet)

Forslag til sitering

Sindre, H., Moldal, T., Weli, SC., Grove, S. Smittemodell med ILAV HPRO. VI rapport 50. Veterinærinstituttet 2021. © Veterinærinstituttet, kopiering tillatt når kilde gjengis

Kvalitetssikret av

Trude Vrålstad, seksjonsleder Forskningsgruppe Fiskehelse og
Edgar Brun, avdelingsdirektør, Fiskehelse og fiskevelferd, Veterinærinstituttet

Publisert

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

Samarbeidspartner



Oppdragsgiver

Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) prosjektnummer 901624

Kolofon

Design omslag: Reine Linjer
Foto forside: Søren Grove, Havforskningsinstituttet
www.vetinst.no

Innhold

1	Innledning	5
2	Målsetning	7
3	Gjennomføringsplan	7
	3.1 Smittemateriale:	7
	3.2 Detaljert planlegging av smitteforsøket og utarbeiding av FOTS.....	7
	3.3 Gjennomføring av smitteforsøk	7
	3.4 Rapportering	7
4	Resultater	8
	4.1 Smitteforsøk 1 - ILAV HPR0 badesmitte/ip-smitte etterfulgt av kohabitering	8
	4.2 Smitteforsøk 2: ILAV HPR0 badesmitte.....	10
5	Oppsummering og kommentarer	13
6	Referanser.....	14

Summary

Infectious salmon anemia (ISA) is a notifiable disease caused by the orthomyxovirus, ISAV. The virus exists in an avirulent virus variant (ISAV HPR0) and more virulent virus variants with deletions in the highly polymorphic region (HPR) of the HE-gene (ISAV HPRΔ). Although horizontal transmission of the virus has been the cause of multiple epidemics of ISA, an increasing number of outbreaks has an unknown source of infection. A hypothesis of a transition of ISAV HPR0 to ISAV HPRΔ has been put forward. Field data has indicated a link between ISAV HPR0 detections in hatcheries and field outbreaks of ISA, but the hypothesis has not been supported through experimental testing. This project aimed at establishing an experimental challenge model for ISAV HPR0, where transition from ISAV HPR0 to ISAV HPRΔ could be tested. Low quality and high dilution of the challenge material was considered a main obstacle in previous unsuccessful challenge trials, and the focus was on securing fresh material with a high content of ISAV HPR0, and to down-scale the trial to prevent unnecessary dilution of the material. In addition, fry was chosen as target fish and a stress factor was introduced to maximize the susceptibility to virus infections, and hopefully allow for successful infection. Although this low-scale bath challenge model was shown to yield effective infection with ISAV HPRΔ, a successful experimental model for ISAV HPR0 was not established. Several factors may have contributed to this. The amount of infectious virus particles in the challenge material may have been lower than expected, bath challenge with homogenized tissue material may not be an effective way to introduce the virus, and there may be additional unknown co-factors crucial for a successful infection with ISAV HPR0. The experiments demonstrate that additional data from natural field infections with ISAV HPR0 should be collected before designing further challenge trials with ISAV HPR0.

Sammendrag

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en smittsom, meldepliktig laksesykdom forårsaket av orthomyxoviruset ILAV. Viruset er funnet i en avirulent variant (ILAV HPR0) og mer sykdomsframkallende varianter (ILAV HPRΔ) hvor det er delesjoner i den hyperpolymorfe regionen (HPR) i HE-genet. Selv om horisontal smitte mellom anlegg er vist i tilknytning til en rekke epidemier av ILA, er det et økende antall tilfeller som ikke kan forklares med smitte fra naboanlegg. En hypotese er lansert hvor naturlig forekommende ILAV HPR0 kan endre seg til ILAV HPRΔ. Feltobservasjoner har koblet påvisning av ILAV HPR0 i settefiskfasen med utbrudd av ILA i sjøfasen, men overgangen er ikke vist gjennom eksperimentelle smittemodeller. Målet med dette prosjektet var å etablere en fungerende smittemodell for ILAV HPR0 i laks. Utfordringer i tidligere forsøk var antatt knyttet til mangel på godt ILAV HPR0-positivt smittemateriale og til høy fortynningsfaktor under forsøkene. Hovedfokus var derfor å løse disse utfordringene. Fersk smittemateriale med lave Ct-verdier for ILAV HPR0 ble sikret fra felt, og forsøkene ble utført i små tanksystemer med kun 5 liter vann per tank under smitte for å hindre unødig fortynning av materialet. I tillegg ble yngel benyttet som målfisk, og et element av stress introdusert for å maksimere fiskens mottakelighet for viruset. Smittemodellen fungerte godt for badsmitte med virulent ILAV, men det lyktes ikke å etablere smitte med ILAV HPR0. Det kan være flere grunner til dette. Tross lave Ct-verdier for ILAV HPR0 er det usikkert hvor mye infeksiøst virus som var i smittematerialet, og bruk av homogenat som utgangspunkt for badsmitte med ILAV HPR0 kan være lite effektivt. I tillegg kan det være andre, til nå ukjente faktorer som er nødvendige for å introdusere smitte til fisken. Utfra erfaringene i prosjektet, er det nødvendig med innsamling av mer data fra naturlige infeksjoner med ILAV HPR0 fra felt, før design av nye eksperimentelle forsøk gjøres.

1 Innledning

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en alvorlig smittsom sykdom for laksefisk. Sykdommen ble første gang beskrevet i Norge i 1984 (Thorud and Djupvik, 1988), men er senere påvist i en rekke andre lakseproduserende land, som Færøyene, Island, Skottland, Canada, USA og Chile (Anonymous, 2000, Lovely et al., 1999, Rodger et al., 1998, Mullins et al, 1998, Bouchard et al., 2001, Godoy et al 2008). I 1995 ble viruset som forårsaker ILA, infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), isolert og oppformert i cellekultur (Dannevig et al, 1995). Etter genetisk karakterisering ble det fastslått at viruset er et enkeltrådet RNA virus med åtte segmenter, og tilhører familien orthomyxovirus (Mjaaland et al, 1997, [Chapter 2.3.5 Aquatic manual, OIE](#)).

Allerede i 2001 ble det identifisert et område innen hemagglutinin esterase-genet på segment 6 med stor sekvensvariasjon mellom ulike ILAV-isolater, kalt highly polymorphic region (HPR) (Devold et al 2001). Variasjon i dette genområdet ble knyttet til mulig virulens, og det ble også observert at virusvarianter som ellers var nært beslektet kunne ha store forskjeller i delesjonsmønster i det polymorfe området. En differensiell delesjonsmodell ble foreslått for å forklare utvikling av polymorfisme (Mjaaland et al, 2002). I 2003 ble en hypotese om et reservoar av mindre virulent ILAV med en lengre HPR (HPR0) i ville laksepopulasjoner lansert, samtidig med en teori om vertikal overføring som dominerende smittevei for ILAV hos oppdrettslaks (Nylund et al, 2003). Benevnningen ILAV HPR0 benyttes nå rutinemessig til å beskrive disse lite virulente/avirulente variantene, mens ILAV HPR Δ eller ILAV HPR Δ benyttes som benevnelse for mer virulente sykdomsgivende virusvarianter med delesjoner av varierende lengde i HPR. Tabellen under viser aminosyrevariasjon i ulike ILAV-varianter påvist i sammenheng med utbrudd av ILA i Norge i perioden 2003-2005 (Lyngstad et al, 2008), med fullengde ILAV-HPR0 sekvens øverst.

Tabell 1: Oversikt over aminosyresammensetning, ILAV HPR

Amino acid configuration in the HPR from selected ISAV isolates (A and B represent different fish) from outbreaks in 2003-2005

HPR0	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q	L	N	Q	T	F	N	T	N	Q	V	E	Q	P	A	T	S	V	L	S	N	I	F	I	S	M	G	V	A	Genogroup		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35									
200404 A	T	D	V	K	I	R	V	D	A													N	Q	V	E	Q	P	A	T	S	V	L	S	N	I	F	I	S	M	G	V	A	G3	
200404 B	T	D	V																																									G3
200405 A, B	T	D	V	K	I	R	V	D	A													N	Q	V	E	Q	P	A	T	S	V	L	S	N	I	F	I	S	M	G	V	A	G3	
200412 A, B	T	D	V	K																																								G3
200509 A, B	T	D	V	K	I	R	V																																					G3
200413 A, B	T	D	V	K																																								G3
200505 A, B	T	D	V	K	I	R	V	D	A														N	Q	V	E	Q	P	A	T	S	V	L	S	N	I	F	I	S	M	G	V	A	G3
200508 A, B	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q										N	Q	V	E	Q	P	A	T	S	V	L	S	N	I	F	I	S	M	G	V	A	G3
200510 A	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q	L	N	Q	T																											G2
200510 B	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q	L	N	Q	T																											G3
200511 A, B	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q	L	N	Q	T																											G2
200411 A, B	T	D	V	K	I	R	V	D	A	I	P	P	Q																															G2

En studie av alle ILA-utbrudd fra 2003-2005 viste at de fleste utbruddene disse årene kunne knyttes til horisontal smitte mellom nabolokaliteter i lokale epidemier (Lyngstad et al, 2008). En senere studie av ILA-utbrudd fra 2004-2009 viste at noe under halvparten av utbruddene kunne forklares med horisontal smitte fra nabolokaliteter, mens de resterende utbruddene hadde ukjent smitekilde (Aldrin et al, 2011). Studier fra Færøyene viste at ILAV HPR0 var et svært hyppig funn hos oppdrettslaks, og infeksjonen framsto som forbigående uten påvist patologi eller dødelighet i det enkelte anlegg (Christiansen et al, 2011). I løpet av de 53 månedene screeningen pågikk ble det ikke påvist sykdomsframkallende ILAV HPR Δ , noe som antydte at risiko for overgang til deletert virulent variant var lav, iallfall under de gitte

betingelsene. Men i 2017 ble det påvist mulig overgang fra ILAV HPRO til ILAV HPRΔ i et matfiskanlegg på Færøyene. ILAV HPRO varianten kunne knyttes til settefiskanlegget som leverte fisk til matfiskanlegget (Christiansen et al., 2017). Også i Norge er det gjort funn av ILAV HPRO både i settefisk og matfisk (Lyngstad et al, 2012), og tilsvarende indikasjoner på overgang fra avirulent til virulent variant er påvist ved flere tilfeller gjennom diagnostikk på Veterinærinstituttet (pers.komm., T. Moldal).

I motsetning til ILAV HPRΔ-infeksjon, som gir en systemisk infeksjon hvor hjertet vanligvis er det mest viruspositive organet, finner man typisk ILAV HPRO-varianten i gjellelev ved tilsvarende analyser. Studier har vist at de to virusvariantene har ulik vevstropisme, hvor ILAV HPRO gir en lokalisert infeksjon av gjelleepitel, mens endotelceller er hovedmål for ILAV HPRΔ (Aamelfot et al, 2016).

Hyppige funn av ILAV HPRO både i sjø- og settefiskfase de senere årene, koblet med mange ILA-utbrudd hvor primærintroduksjon enten er ukjent eller med en mulig kobling til settefisk, har ytterligere aktualisert viktigheten av å utrede mekanismer og risikofaktorer for mulig overgang fra ILAV HPRO til sykdomsframkallende varianter. Dessverre har muligheten til å undersøke dette i kontrollerte eksperimentelle studier ikke vært mulig. Hovedgrunnen til dette er at ILAV HPRO-varianten til nå ikke har vært mulig å isolere og oppformere *in vitro* i cellekultur tross gjentatte forsøk på dette. Ingen av de kjente ILAV-mottakelige cellelinjene som ASK-2, SHK-1 og TO har vært mottakelige for ILAV HPRO ved bruk av qRT-PCR positivt vevshomogenat som inokulat. Dette gjelder også andre tilgjengelige cellelinjer fra en rekke organer og fiskearter og nyetablerte epitelcellelinjer fra gjelle eller hud fra laks (Gjessing et al, 2018, pers.komm H. Sindre).

Siden det så langt ikke har vært mulig å isolere og/eller kvantifisere levende virus fra ILAV HPRO-positiv fisk, har viruspositivt vevshomogenat vært utgangspunkt for de begrensede smitteforsøk som er gjennomført på denne virusvarianten. Siden infeksjonen er kortvarig, har det imidlertid vist seg å være vanskelig å sikre prøvemateriale fra infeksjonstoppen. Dermed har utgangsmaterialet for smitteforsøk gjerne har hatt høyere Ct-verdi enn ønskelig og også da sannsynlig lavere mengde infeksiose viruspartikler. Siden viruset har lokalisert affinitet for gjelleepitel, antas intraperitoneal (ip)-smitte ikke å introdusere viruset til målcellene på en effektiv måte. Ved badesmitte blir fortynningsfaktoren stor når smitte skal gjennomføres i kar med typisk 100-150 liter vann under smitte og utgangspunktet er vevshomogenat med antatt moderat virusmengde (basert på Ct-verdi). Siden de få forsøkene som er gjennomført ikke har lyktes, er det ingen publiserte data. Gjennom uformell kontakt med vaksineindustrien er det klart at heller ikke de sitter med data knyttet til gjennomførte smitteforsøk med ILAV HPRO.

På grunnlag av hypotesen om at ILAV HPRO muterer til ILAV HPRΔ, gjorde OIE ILAV HPRO rapporteringspliktig fra og med 2014. Dette kan gi handelsmessige utfordringer for norsk eksport fordi HPRO-varianten er hyppig forekommende i norsk oppdrettslaks. Gjennom Mattilsynets arbeid med utarbeidelse av en ny nasjonal bekjempelsesplan for ILA ble det identifisert et behov for å øke kunnskapene om ILAV HPRO og betydningen av denne virusvarianten for utvikling av ILA sykdom. Veterinærinstituttet ble spurt om de kunne gjennomføre et prosjekt med formål å etablere en smittemodell for ILAV HPRO i 2020.

2 Målsetning

Å utvikle en fungerende smittemodell for ILAV HPR0.

3 Gjennomføringsplan

Gjennomføringsplanen består av fire deler, hvor 3.1 og 3.2 startet umiddelbart ved tilsagn.

3.1 Smittemateriale:

I prosjektplanen var det skissert tre strategier for innhenting av egnet smittemateriale til forsøkene.

- a. Benytte rester av ILAV HPR0 positivt prøvemateriale fra FHF prosjekt 901051
- b. Innhente ILAV HPR0-materiale fra samarbeidspartnere
- c. Innhente ferskt ILAV HPR0 materiale fra næringen (gjellemateriale/vann)

Alternativ a. innebar bruk av smittemateriale fra prosjekt 901051, men dette materialet var flere år gammelt, og ikke ansett som ideelt utgangspunkt da overlevelse av ILAV HPR0 over tid ikke er karakterisert. For alternativ b, ble det opprettet kontakt med samarbeidspartnere både på Færøyene og Chile angående tilgang på positivt materiale fra disse landene. I møte med referansegruppen i mars 2020 ble risiko for introduksjon av ukjente agens, spesielt fra Chile, påpekt. Dette alternativet ble derfor valgt bort. Alternativ c ble derfor ansett som det beste, og det ble besluttet å ta kontakt med lokaliteter som fikk påvist ILAV HPR0 gjennom OK-programmet og vanlig diagnostikk. Denne strategien sikret positivt materiale egnet for smitteforsøk fra et anlegg med nylig sjøsatt laks mai 2020. På samme måte ble positivt materiale sikret fra et settefiskanlegg med nært beslektet ILAV HPR0 (ut ifra tilgjengelige sekvenser for segment 5 og segment 6) i januar 2021 forut for det andre smitteforsøket.

3.2 Detaljert planlegging av smitteforsøket og utarbeiding av FOTS

Det ble avholdt møte med prosjekt- og referansegruppe i mars 2020 hvor planlagt forsøksoppsett ble diskutert. Søknad via Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem (FOTS) ble innsendt kort tid etter fra Havforskningsinstituttet.

3.3 Gjennomføring av smitteforsøk

Første smitteforsøk ble gjennomført i august/september 2020 på Havforskningsinstituttet i Bergen, og andre smitteforsøk ble gjennomført samme sted i januar/februar 2021.

3.4 Rapportering

Resultater ble presentert for FHF og referansegruppe i sluttmøte i april 2021, og faglige resultater er presentert i denne sluttrapporten.

4 Resultater

4.1 Smitteforsøk 1 - ILAV HPR0 badesmitte/ip-smitte etterfulgt av kohabitering

Tabell 2: Betingelser smitteforsøk 1

Vanntemperatur	14°C
Forsøkslengde	36 dager
Art	Laks
Antall fisk	5 grupper med 105 fisk
Utviklingsstadium og vekt	Yngel (0.58 g og 36.7 mm ved forsøksstart)
Annen info	Gjennomstrømning med betydelig flow (antatt god vannkvalitet)
Smittemateriale	Homogenat gjellevev, nylig smoltifisert laks, frosset/tint 2X, fortynnet 10X sterilfiltrert (0,45 µm),

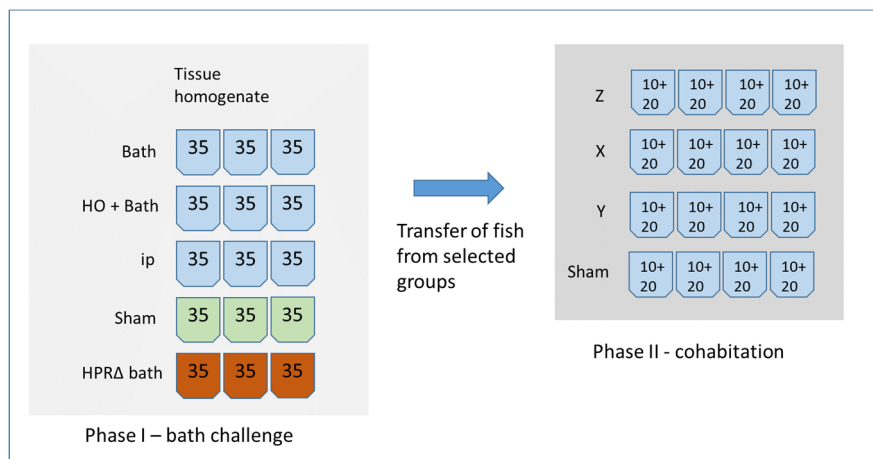
Smitteforsøket ble gjennomført i Havforskningsinstituttets yngellaboratorium i Bergen i august/september 2020. De har tilgjengelig et racksystem med småtanker, og systemet har vært brukt med suksess i sammenheng med studier av annen virus sykdom på laks. Systemet tillater at ulike smitteveier kan sammenlignes i liten skala og dermed uten bruk av store virusmengder. Dette var spesielt viktig i dette forsøket da tilgangen på større mengder ILAV HPR0- materiale ville være en utfordring. Oppsettet kunne derfor skaleres i forhold til virusmengde tilgjengelig på oppstartstidspunktet. Bildet under viser slike tanker i racksystem med lakseyngel på HI.



Foto: Søren Grove, Havforskningsinstituttet

Figur 1: Oppsett racksystem, våtlab, Havforskningsinstituttet

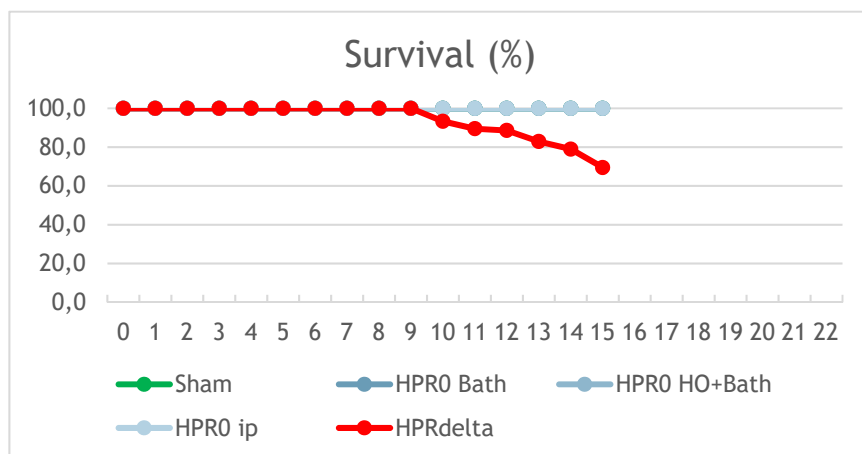
Sterilfiltrerte (0,45 µm) ILAV HPR0 inokulater fra vevshomogenater (bruksfortynning for badsmitte Ct ca 27, 25 for ip-smitte) ble brukt til smitte av lakseyngel med tre eksperimentelle grupper som mottok ILAV HPR0 ved bad eller ip-injeksjon, en negative kontrollgruppe og en positiv kontrollgruppe som mottok virulent ILAV HPRΔ (Glesvær) ved badesmitte i 2 timer som vist i Figur 2.



Figur 2: Oppsett smitteforsøk 1. X, Y og Z i Fase II representerer fisk valgt fra ulike positive kar fra Fase I. Sham: vevshomogenat uten ILAV HPR0/HPRΔ. HO+Bath: forbehandling med mildt hyperosmotisk sjokk, umiddelbart fulgt av ILAV HPR0 badesmitte. Fase I, hver tank - 35 fisk. Fase II, hver tank 10 sheddere og 20 kohabitanter.

I tillegg til prøvetaking av fisk ved 0-punkt før smitte, ble ni fisk fra hver gruppe (tre per parallell tank) prøvetatt 2, 9, 15 og 21 dager etter smitte. Vannprøver ble tatt ut 6, 7, 8, 9, 10, 15 og 21 dager etter smitte. Forut for ekstraksjon av RNA fra vannprøvene ble de filtrert og konsentrert som beskrevet tidligere for SAV (Weli et al, 2021), men med annet filter.

Vann-, vevs- og svaberprøver ble deretter analysert for forekomst av ILAV ved qRT-PCR. Allerede etter 2 dager kunne virus påvises i gjellevev fra 4 av 9 fisk fra ILAV HPRΔ-gruppen, og antallet hadde økt til 7 av 9 etter 9 dager. Også hudsvabrene var positive etter 9 dager for de fleste fiskene. For vannprøvene kunne virus påvises 7 dager etter oppstart, og positiv påvisning i vannet vedvarte fram mot 15 dager. Etter 15 dager i Fase I ble de tre tankene med ILAV HPRΔ terminert på grunn av ILA-sykdom og begynnende høy dødelighet i disse tankene som vist i figur 3.



Figur 3: Mortalitetsskurve smitteforsøk 1

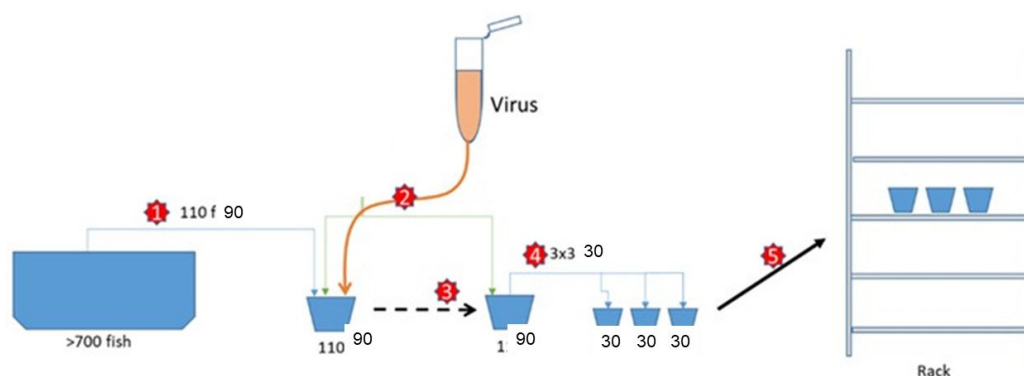
Ingen dødelighet ble observert i de andre tankene, og qRT-PCR-analyser av prøver fra disse tankene var alle negative for de tidspunkter som ble analysert. Etter 21 dager ble fisk fra ILAV HPR0-gruppene overført til nye tanker med usmittet fisk (Fase II), men utfra de negative qRT-PCR -resultatene fra Fase I, ble denne delen av forsøket terminert.

4.2 Smitteforsøk 2: ILAV HPR0 badsmitte

Tabell 3: Betingelser smitteforsøk 2

Vanntemperatur	11 °C
Forsøkslengde	38 dager
Art	Laks
Antall fisk	2 grupper med 90 fisk
Utviklingsstadium (og vekt?)	Yngel (1.52 g og 54.7 mm ved forsøksstart)
Annen info	Gjennomstrømning med betydelig flow (antatt god vannkvalitet)
Smittemateriale	Homogenat gjellevev, yngel laks, frosset 1x

På bakgrunn av de negative resultatene fra forsøk 1 ble det besluttet å starte smitte på nytt. Smittematerialet brukt i forsøk 1 hadde gjennomgått flere fryse-/tineomganger og annen behandling av materialet forut for smittestart (sterilfiltrering/fortynning). Det var derfor en mulighet for at dette kunne ha påvirket overlevelse av virus negativt. Følgelig ble det besluttet å gjennomføre et forenklet smitteoppsett kun med badesmitte og kontroll (sham) hvor smittematerialet var helt ferskt og så ubehandlet som mulig utover å være homogenisert i virus-transportmedium og én nedfrysing. Innsamlet prøvemateriale stammet denne gang fra et settefiskanlegg med påvist ILAV HPR0 fra prøveuttak i januar 2021, kun kort tid før oppstart av smitteforsøket for å sikre så ferskt materiale som mulig. Bruksfortynning homogenat ga estimert Ct 27 under badsmitten som for Smitteforsøk 1.



Figur 4: Forsøksoppsett smitteforsøk 2

For begge grupper ble 90 yngel først overført til en tank med 5 liter vann med kontinuerlig tilførsel av luft. Homogenat med ILAV HPR0 ble tilført til badsmittegruppen, og etter 2 timer ble fisken fordelt med 30 yngel per tank i hver av tre tanker (størrelse 8l) med 4 liter vann. Tankene ble så plassert i racksystemet og tilknyttet kontinuerlig vanntilførsel/flow. Figur 4 og tabell 4 viser henholdsvis oppsett og tidslinje for forsøk 2.

Tabell 4: Tidslinje smitteforsøk 2

Dato	Sted	Beskrivelse	Utført av
19.01.21	HI	Fisk mottatt	SG
03.02.21	VI	ILAV HPR0 homogenat sendt HI	TM
04.02.21	HI	ILAV HPR0 homogenat mottatt HI	SG
04.02.21	HI	O-punkt prøveuttak	HR, DK, SG
04.02.21	HI	Smitte	HR, DK, SG
18.02.21	HI	14 dg prøveuttak	HR, DK, SG
18.02.21	HI	14 dg vannprøver	HR, DK, SG
11.03.21	HI	38 dg prøveuttak	SG
11.03.21	HI	38 dg vannprøver	SG
11.03.21	HI	Terminering av forsøk 38 dg	SG

For forsøk 2 ble det gjennomført prøvetaking etter 2 og 5 uker av vannprøver i tillegg til hudsvaber og gjellelev. Dessverre kunne ikke ILAV HPR0 påvises ved qRT-PCR i noen av de analyserte prøvene.



Figur 5: Smittekar forsøk 2

5 Oppsummering og kommentarer

- Det lyktes ikke å utvikle og etablere en fungerende smittemodell for ILAV HPR0.
- Ved bruk av nyetablert filtreringsmetode kunne frigjøring av ILAV HPRΔ i vann overvåkes underveis i forsøket.
- Som fra feltprøver, kunne ILAV HPRΔ påvises i slim fra hud med lignende sensitivitet som for gjelleprøver.
- Våre resultater støtter andre studier i at vann- og slimprøver kan fungere som ikke-letale prøvetakingalternativer for ILAV overvåkning i felt.

Prosjektet fokuserte på å løse kjente utfordringer ved tidligere smitteforsøk med ILAV-HPR0, som dårlig egnet smitte materiale og for stor fortynningsgrad av dette. I tillegg ble yngel benyttet, som forventes å ha dårligere beskyttelse mot virussykdommer enn eldre fisk (f.eks. IPNV, VNNV mm) og en stressfaktor (mildt hyperosmotisk sjokk) ble i tillegg introdusert. Likevel lykkes det ikke å få etablert en fungerende smitte modell for ILAV HPR0 i løpet av prosjektperioden. Grunnene til dette kan være flere, men kan være knyttet til for lav mengde intakt infeksjøs virus i smitte materialet, kofaktorer som må være til stede for å muliggjøre smitte som for eksempel nedsatt immunstatus eller andre ytre faktorer som hud/gjellelesjoner eller lignende. Siden prosjektet hadde tilgang på smitte materiale av god kvalitet med lav fortykning, er det lite sannsynlig at kvaliteten på smitte materiale i seg har vært for dårlig. Det er heller ingen grunn til å forvente at ILAV HPR0 skiller seg radikalt fra ILAV HPRΔ når det gjelder robusthet ved frysing/tinging. Knyttet til at en ILAV HPR0 infeksjon normalt er kortvarig, kan det derimot være en utfordring å sikre materiale fra perioden hvor fisken er mest smitteførende, siden det er vanskelig å knytte påviste Ct-verdier til en tilstrekkelig mengde infeksjøs virus i gjellematerialet.

En strategi for å sikre at infektive virus er til stede under smitteforsøket kan være å bruke metoder for å isolere/konsentrere intakte viruspartikler i materialet via ultrasentrifugering og verifisering med EM. Men dette forutsetter tilgang på store mengder viruspositivt materiale og var ikke mulig å få til innen rammen for dette prosjektet. En annen mulighet kan være å benytte naturlig ILAV HPR0-infisert yngel. Denne strategien forutsetter at FOTS alt er innvilget og at smittefasiliteter og usmittet yngel er tilgjengelige på kort varsel, slik at forsøk kan igangsettes så fort egnet ILAV HPR0-positiv fisk er sikret. I tillegg må usikkerhet rundt andre faktorer som kan være nødvendig for effektiv smitte med ILAV HPR0 kartlegges. Observasjoner av overgang fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ i felt kan gi viktig informasjon knyttet til hvilke faktorer som kan være viktige for å etablere effektiv ILAV HPR0 infeksjon i laks under eksperimentelle forhold. Opparbeiding av kunnskap vil fortsette i FHF prosjekt 901674.

6 Referanser

Aldrin M, Lyngstad TM, Kristoffersen AB, Storvik B, Borgan Ø, Jansen PA (2011)

Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J R Soc Interface* 8(62):1346-56

Aamelfot M, Christiansen DH, Dale OB, McBeath A, Benestad SL, Falk K (2000) Localised Infection of Atlantic Salmon Epithelial Cells by HPR0 Infectious Salmon Anaemia Virus.

PLoS One. 2016 11(3):e0151723

Anonymous. ISA hits the Faroes. *Fish Farming Int* 27:47

Bouchard D, Brockway K, Giray C, Keleher W, Merrill PL (2001). First report of infectious salmon anemia (ISA) in the United States. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 21: 86-88

Christensen D, Østergård P, Snow M, Dale OB. and 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

J Gen Virol 92:909-918.

Christiansen DH, McBeath AJA, Aamelfot M, Matejusova I, Fourrier M, White P, Petersen PE, Falk K (2017) First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *J Gen Virol* 98(4):595-606

Dannevig BH, Falk K, Namork E (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J Gen Virol* 76:1353-1359

Devold M, Falk K, Dale OB, Krossøy B, Biering E, Aspehaug V, Nilsen F, Nylund A (2001) Strain variation, based on the hemagglutinin gene, in Norwegian ISA virus isolates collected from 1987 to 2001: indications of recombination. *Dis Aquat Organ* 47(2):119-28

Gjessing MC, Aamelfot M, Batts WN, Benestad SL, Dale OB, Thoen E, Weli SC, Winton JR (2018) Development and characterization of two cell lines from gills of Atlantic salmon. *PLoS One*. 2018 Feb 13(2):e0191792

Godoy MG, Aedo A, Kibenge MJ, Groman DB, Yason CV, Grothusen H, Lisperguer A, Calbucura M, Avendaño F, Imilán M, Jarpa M, Kibenge FS (2008) First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *BMC Vet Res* 4:28

Lovely JE, Dannevig BH, Falk K. (1999). First identification of infectious salmon anaemia virus in North America with haemorrhagic kidney syndrome. *Dis Aquat Org* 35:145-148

Lyngstad TM, Jansen PA, Sindre H, Jonassen CM, Hjortaas MJ, Johnsen S, Brun E (2008) Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003-2005. *Prev Vet Med* 84(3-4):213-27

Lyngstad TM, Kristoffersen AB, Hjortaas MJ, Devold M, Aspehaug V, Larssen RB, Jansen PA (2012) Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Dis Aquat Organ* 101(3):197-206

Mjaaland S, Rimstad E, Falk K, Dannevig BH (1997). Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J Virol* 71:7681-7686

Mjaaland S, Hungnes O, Teig A., Dannevig BH, Thorud K, Rimstad E (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene: importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology* 304(2):379-91

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Chapter 2.3.5, OIE

Mullins JE, Groman DB, Wadowska D. (1998) Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 18:110-114

Nylund A, Devold M, Plarre H, Isdal E, Aarseth M (2003). Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. *Dis Aquat Organ* 56(1):11-24

Rodger, HD, Turnbull, T, Muir, F, Millar, S, and Richards, RH (1998). Infectious salmon anaemia (ISA) in the United Kingdom. *Bull Eur Ass Fish Pathol*.18:115-116

Thorud, KE, and Djupvik, HO (1988). Infectious anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*L.). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 8: 109-111

Weli SC, Bernhardt LV, Qviller L, Myrmel M, Lillehaug L (2021) Development and evaluation of a method for concentration and detection of salmonid alphavirus from seawater. *J Virol Methods* 287:113990

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Oslo

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no