
IPN-virus hos stamfisk av regnbueørret

SLUTTRAPPORT

- i. Prosjektansvarlig: Norges veterinærhøgskole, Pb 8146 Dep., 0033 Oslo
Tlf: 22964500
- ii. Prosjektleder/utøvende institusjon: Øystein Evensen, epost:
oystein.evensen@veths.no
- iii. Deltagere: SalmoBreed ved Håvard Bakke
haavard@salmobreed.no

Arbeidsoppgaver i prosjektet

Innsamling av organmateriale fra stamfisk – prescreening og virus-analyse ved gyting.

- 1) Det samles inn organmateriale (nyre) fra inntil 60 individer fra de ulike familiepopulasjoner av stamfisk. Vevet overføres til RNAlater og transportmedium/glyserol for oppbevaring ved -20C. Analysene omfatter real-time PCR og dyrkning på cellekultur. Prevalensen bestemmes.
- 2) Det samles inn nyreprøver, rognvæske og melke fra gytende stamfisk for dyrking på nyre og RT-PCR analyse av IPNV i nyre og rognvæske. Analysen utføres raskt, slik at det skal være mulig å innkubere kun rogn som i følge analysen er virus-fri. Hensikten er å finne ut om innlegging av kun "virus-fri" rogn kan redusere faren for IPN utbrudd i tidlig yngel fase.

Det ble mottatt prøver fra 2 ulike stamfiskanlegg i SalmoBreed, Sjøtroll (Jakta) og fra Osland Havbruk. Hos Osland Havbruk ble det bygget opp ny rogn-avdeling med 100 enkelt inkubatorer for å kunne legge inn rogn, og selekere bort grupper med tidlig IPN utbrudd.

De metodene som ble benyttet ved laboratorieundersøkelsene var som beskrevet i søknaden og i korthet som følger:

- 1) RNAlater prøver av nyre og rognvæske ble analysert ved real-time PCR. Analysene ble satt opp slik at alle varianter av norske IPNV isolater vil påvises og alle individer undersøkes separat (ikke samleprøver). Prøvene ble undersøkt fortløpende etter mottak ved laboratoriet. Resultatene ble meddelt til innsender pr mail.
- 2) Parallell organprøver (fra nyre/rognvæske) av real-time PCR positive prøver ble undersøkt ved virusdyrking på cellekultur (fra Osland Havbruk). Påvist CPE i cellekulturene ble verifisert ved RT-PCR (diagnostisk PCR).
- 3) Virus fra ELISA positive supernatanter opparbeides for sekvensering som sendes til MWG i Tyskland for sekvensering.
- 4) Grunnlaget for vraking av rognbatcher ble basert på resultatene fra real-time analyser av rognvæskeprøvene.

Sjøtroll - Jakta

Det ble tatt ut prøver fra hunnfisk fra Jakta for PCR undersøkelser fra rognvæske og fra nyre. Prøvene var fordelt som følger:

Rognvæskeprøver (real-time PCR)

Det ble mottatt 262 rognvæskeprøver. Alle ble analysert ved real-time PCR og av disse var 8 positive.

Nyreprøver (real-time PCR)

Antall nyreprøver som ble mottatt på RNA-later mottatt var 266 stk, dvs. at disse prøvene også inkluderte alle de fiskene hvor det ble mottatt rognvæskeprøver. Alle nyreprøvene ble analysert ved real time PCR og det ble påvist 7 positive prøver. Ingen av de som var positive i rognvæske var samtidig positive i nyre.

Hannfisk

Totalt ble det mottatt 23 prøver fra melke som alle ble undersøkt ved real-time PCR. Ingen var positive.

Oppsummert ble det funnet 8 positive prøver fra rognvæske og 7 positive fra nyre av totalt 266 undersøkte individer ved bruk av real-time PCR metode. Dette gir en prevalens på henholdsvis 3.1 og 2.6 % for rognvæske og nyre. Hvis vi ser resultatene fra rognvæske og nyre under ett og gjør beregningen på basis av 266 individer har vi en prevalens viruspositive på 5.7% i denne populasjonen.

Osland Havbruk

Fra hunnfisk ble det tatt ut prøver for real-time PCR av rognvæske og nyre. Samtidig ble det tatt ut nyrevev for dyrkning.

Rognvæske (real-time PCR)

Det ble tatt ut 470 rognvæskeprøver totalt. Prøvene ble ikke preservert før innsendelse. Alle prøvene ble analysert ved real-time PCR. Av disse var 30 prøver positive som gir en prevalens på 6.4%.

Nyreprøver (til real-time PCR undersøkelse)

Av de 470 hunnfiskene som det ble tatt rognvæskeprøver fra ble det gjort et tilfeldig utvalg for uttak av nyreprøver fra 88 individer som ble overført til RNA-later før innsendelse til laboratoriet. Dette uttaket ble gjort uten kjennskap til hvilke av de 470 fiskene som var positive for IPNV i rognvæske. Alle nyreprøvene ble analysert ved real-time PCR og av disse ble det kun funnet 1 positiv prøve. Dette gir en prevalens på 1.14%.

Nyreprøver (for virusdyrkning)

Fra de samme 88 fiskene som beskrevet ovenfor ble det mottatt nyreprøver på transportmedium (tilsatt antibiotika) for virusdyrkning. Alle prøvene ble undersøkt ved virusdyrkning på cellekultur (CHSE celler/2 passasjer ihht gjeldende OIE prosedyrer). Av disse

var 26 prøver positive for IPNV hvor positive diagnose ble verifisert ved diagnostisk RT-PCR. Dette gir en prevalens på 29.5%.

Hannfisk

Det ble undersøkt til sammen 93 prøver fra melke fra hannfisk (fra Osland). Alle prøvene ble undersøkt ved real-time PCR og ingen prøver er undersøkt ved celledyrkning da erfaringen er at melke gir uspesifikk skade på cellene (cytotoksisitet) som umuliggjør en sikker avlesning. PCR er derfor den beste og kanskje eneste metoden.

Av de 93 prøvene som ble undersøkt var det 1 positiv prøve. Dette gir en prevalens på 1.1%.

Oppsummering - viruspåvisning

- Undersøkelse av rognvæskeprøver ved real-time PCR fra 470 hannfisk viste en prevalens på 6.4% (30/470 positive) og virusdyrkning fra nyre fra 88 hannfisk (fra samme populasjon som de 470 fiskene) gav en prevalens på 29.5%.
- Av de 30 hann-fiskene (av 470) som var positive for IPNV ved real-time PCR fra rognvæske var 1 fisk positiv **både** ved PCR undersøkelse og ved dyrkning fra nyre.
- Av de 30 hann-fiskene (av 470) som var positive for IPNV ved real-time PCR fra rognvæske var ytterligere 3 fisk positive ved dyrkning fra nyrevev
- Samlet sett ble kun 4 fisk funnet positive i **både** nyre og rognvæske for IPNV og det således dårlig samsvar mellom virus positivitet i rognvæske og nyre

Konklusjonen blir at det er dårlig sammenheng mellom de ulike metoder og de ulike organer.

- Av de 470 hannfiskene ble det tatt nyreprøver fra 88 individer for PCR og virusdyrkning
 - Ved real-time PCR ble 1 fisk funnet positiv for IPNV
 - Ved dyrkning ble 26 fisk funnet positive for IPNV

Dette understreker ytterligere den dårlige sammenheng mellom dyrkning og real-time PCR.

Samlet sett har vi funnet at virusdyrkning fra nyre er en mer sensitiv metode enn real-time PCR på nyrevev.

På rognvæske ble det kun kjørt RT-PCR. Ut fra resultatene på nyrevev er det viktig å videreføre prosjektet med dyrkning av prøver fra rognvæske.

Diskusjon/kommentarer

Det er ikke samsvar mellom resultatene som oppnås for real-time PCR og dyrkning mhp. antall positive individer i populasjonen som vi har undersøkt. Disse resultatene er basert på undersøkelse av nyrevev fra samme fisk. På basis av at vi finner så få virus positive ved real-time PCR har vi også sett på muligheten for at det kan være forskjeller i virusets genom i de

områdene som er benyttet for primer og probe-design uten at vi har kunnet påvise det som en forklaringsmodell for de påviste forskjeller. Som det vil framgå av resultatene nedenfor (sekvensering) er det motiv-forskjeller på lakse- og ørretisolater av IPNV, men dette gir ikke forklaringsgrunnlag for de påviste forskjeller mellom de metodene som er benyttet.

I tillegg er det forskjeller for ulike organer fra samme individ og vi finner ikke samsvar mellom de to undersøkelsesmetodene, real-time PCR og virusdyrkning. Høyest prevalens i nyre ble funnet for virusdyrkning (29.5%) mens ved real-time PCR ble prevalensen funnet å være så lav som 1.14%. Dette er i stor kontrast til tidligere undersøkelser som vi har vært med på og hvor det ble funnet god sammenheng mellom de to metodene fra samme vev. Dette gir grunnlag for ytterligere undersøkelser og setter også et spørsmålstegn ved den prevalensen som ble funnet for rognvæskeprøver ved bruk av real-time PCR (6.4%).

Betydning av IPN virus påvisning i nyrevev i forhold til vertikal overføring er usikker. Antagelsen vil være at påvisning av IPN virus i rognvæske har størst betydning for vertikal overføring (relativt til påvisning i nyrevev), men her kan det være forskjeller mellom ulike fiskearter. En prevalens på over 25% i nyre (eller rognvæske) for laks ville vært et unormalt høyt tall. Tidligere undersøkelser har vist en prevalens ned mot eller under 1% ved undersøkelser av nyre fra laks, selv fra populasjoner som har gjennomgått en IPN virus-infeksjon i løpet av produksjonssyklus. Hvorvidt et så høyt bærertall i ørretpopulasjonen kan være med på å forklare de IPN problemer som har vært observert de seneste årene må framholdes som en mulighet. Melke synes ikke å være smittekilde for IPN virus i en stamfisk populasjon av ørret, noe som sammenfaller med det som er funnet for laks.

Ettersom det var stor forskjell i resultatene i analyser med real-time-PCR og dyrkning, fikk en ingen pålitelig informasjon om forholdet mellom prevalens i nyre og gonadevæske. Det er viktig å klarlegge dette forholdet.

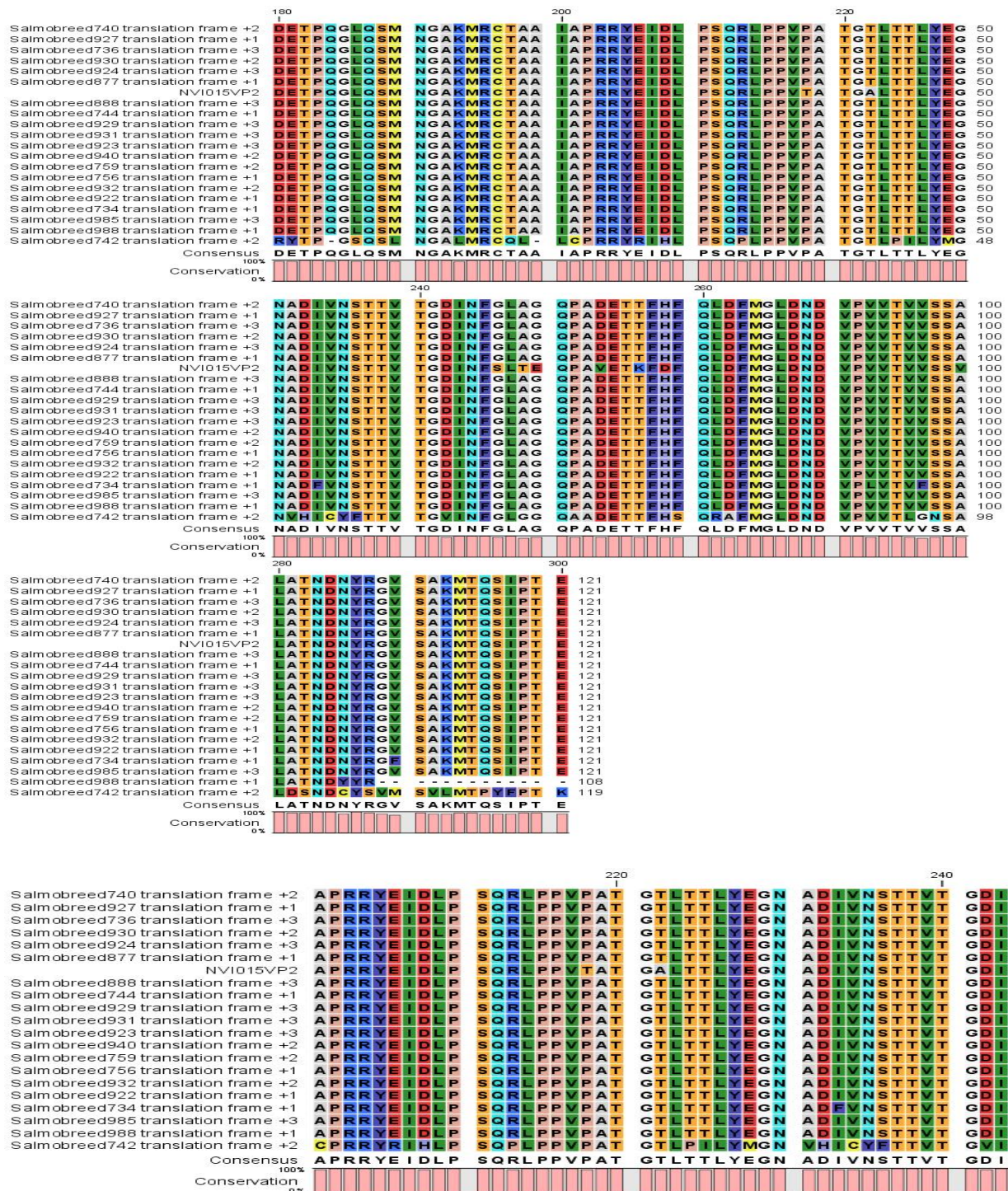
Sekvensering

For å sammenligne sekvenser innen et anlegg og for å kunne sammenligne virusvarianter og sekvenser fra stamfisk hos ørret med det som er funnet for laks, ble det mottatt 90 nyreprøver på transportmedium (for virusdyrkning) fra Osland. Dette var de samme prøvene som beskrevet ovenfor hvor det ble tatt ut parallelle prøver for real-time PCR analyser på rognvæske og nyrevev. Prøvene ble homogenisert direkte i transportmediet og homogenatet ble inokulert på levende fiskeceller som er sensitive for IPN-viruset.

26 av 88 prøver (29.5 %) var positive etter 2 passasjer på RTG-2 celler. Kun 4 av disse prøvene var også positiv på rognvæske som nevnt ovenfor og 1 prøve var positiv ved real-time PCR. Virussupernanten ble høstet og det ble isolert viralt RNA etterfulgt av en diagnostisk RT-PCR.

3 av 26 positive lot seg ikke amplifisere ved RT-PCR og de øvrige 23 prøvene ble innsendt for sekvensering. 20 prøver ble vellykket sekvensert (3 PCR-produkter hadde for dårlig kvalitet for å oppnå en fullgod sekvens som lot seg analysere). Etter at sekvensene blir mottatt fra et eksternt laboratorium ble de analysert ved bruk av et standard algoritme-verktøy. Nedenfor

vises et alignment (sammenligning) som viser alle de 20 sekvensene sammenlignet med hverandre. I tillegg er disse sammenlignet med en kjent referansesekvens (NVI015VP2).



På basis av denne analysen ser vi at opptil 20 aminosyreposisjoner avviker mellom IPN virus isolatet fra laks når dette sammenlignes med de ulike isolatene fra regnbueørret. I tidligere studier har vi vist at de virulente stammene fra laks har et gjennomgående motiv som er definert gjennom hvilke aminosyrer som finnes i posisjonene 217, 221 og 247 i VP2

proteinet. Når vi sammenligner lakse- og ørretisolatene finner vi at mens laks kjennetegnes ved en kombinasjon av aminosyrene treonin, alanin og treonin i de tre posisjonene (TAT) har ørretisolatene byttet ut disse med prolin, treonin og alanin (i de samme posisjonene). Fingeravtrykket til ørretisolatene blir dermed PTA. Dette avtrykket sammenfaller med de avirulente lakseisolatene som ikke gir dødelighet ved eksperimentell smitte av laks.

I tillegg til å analysere de ulike isolatene fra stamfisk (fra Osland) har vi også mottatt ulike isolater (dels yngel) fra ørretanlegg som har hatt klinisk utbrudd av IPN i ferskvann like etter startfôring. Alle disse isolatene har også hatt et PTA motiv og i tillegg er disse isolatene "nært beslektet" med det som finnes hos stamfisk av ørret. Hvilken betydning dette har under feltforhold er ikke kjent, men det synes som distinkt forskjellige varianter av IPN virus forekommer i forbindelse med kliniske utbrudd av IPN hos laks og ørret, men begge virusvariantene forefinnes hos de to artene.

Samlet oppsummering

Denne studien har vist at det ikke er samsvar mellom ulike organer når det gjelder påvisning av IPN virus ved bruk av real-time PCR metode. Det er heller ikke samsvar mellom ulike organer fra samme individ når ulike undersøkelsesmetoder benyttes. Framtidige undersøkelser bør inkludere en sammenlignende studie av real-time PCR og virusdyrkning av rognvæske da dette "produktet" framstår som en potensiell viktig bærer av og smittekilde for IPN virus.

Det er også nødvendig å finne ut hvorvidt påvisning i nyre kan settes i sammenheng med risiko for overføring av IPN virus til avkom. I denne undersøkelsen ble det påvist mange viruspositive individer i nyre, men grunnlaget for vraking av virus-positive rognbatcher var basert på resultatene fra rognvæskeprøvene. Ved startfôring ble det påvist IPN hos et stort antall av batchene og med høy dødelighet. Vi står derfor igjen med et spørsmål om hvorvidt rognvæske er velegnet for å skille mellom virus-negative og -positive hunner samt at real-time PCR metoden må forbedres både når den baseres på rognvæske og nyrevev. Virusdyrkning står fram som det sikreste alternativet for påvisning av IPNV i ørret ut fra de undersøkelser som er gjennomført i denne studien, men det må avklares om denne metoden skal baseres på rognvæske- eller nyreprøver.

Dersom vertikal overføring er en viktig smitteveg for IPN hos ørret, må det utvikles og brukes en sikker virusanalyse på rognvæske, slik at positiv rogn kan elimineres.