



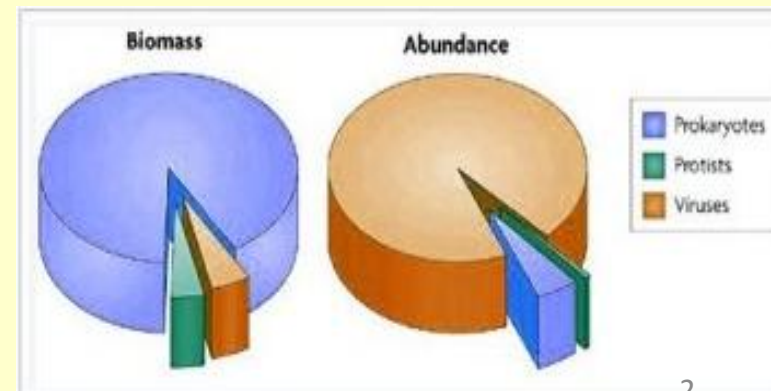
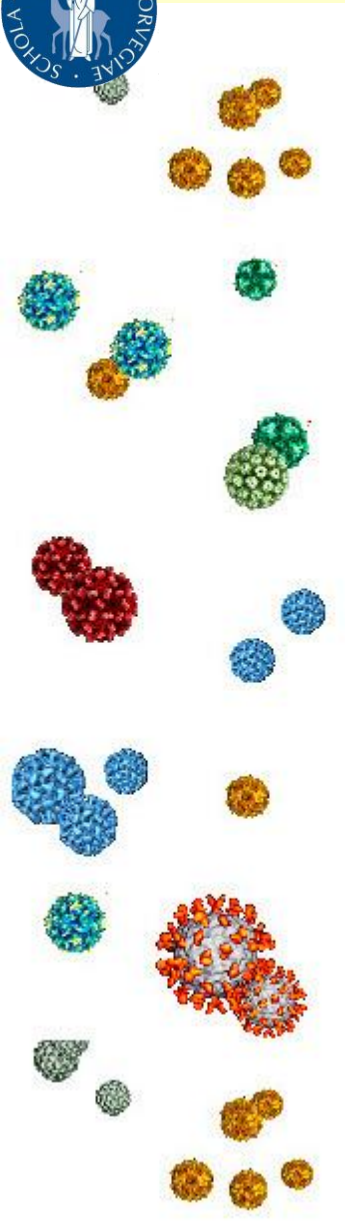
Vaksiner mot virussykdommer – muligheter og utfordringer

**Espen Rimstad,
Professor i virologi,
Norges veterinærhøgskole
Oslo**



Virus i verdens hav

- I havet er det $\approx 3 \times 10^9$ virus/liter
- Volumet av verdenshavet er $\approx 1,3 \times 10^{21}$ liter
- $\approx 4 \times 10^{30}$ virus I havet (Suttle 2005)
- Hvis vi antar at et gjennomsnittsvirus er omtrent 100 nm i diameter –og hvis alle virus i havet ble lagt etter hverandre ville de strekke seg ≈ 10 mill lysår eller 100 ganger diameteren i vår egen galakse!





Virus sykdommer hos oppdrettsfisk i Norge

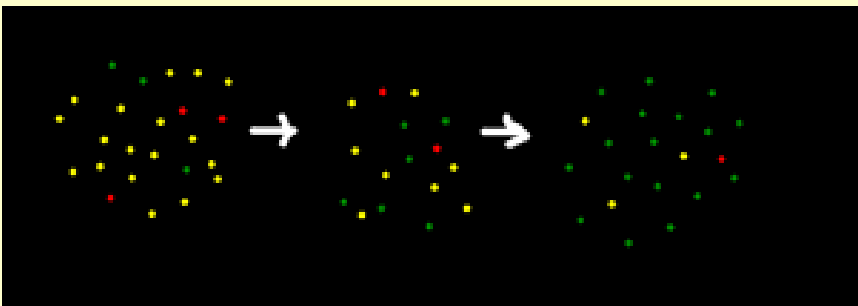
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
ILA	13	14	23	21	12	8	16	11	4	7	17	10
PD	7	10	11	15	14	22	43	45	58	98	108	75
HSMB							54	83	94	162	144	135
CMS										85	75	76
IPN					174	178	172	208	207	165	158	223
VHS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Sum												519

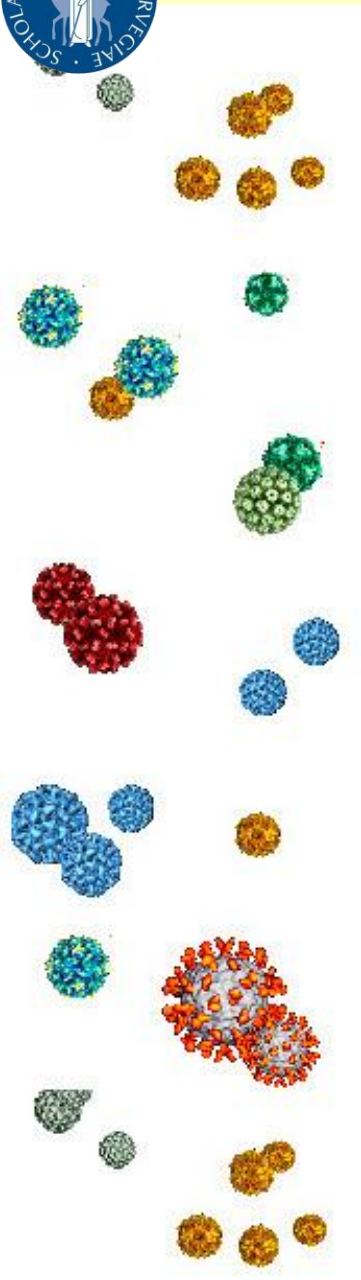
Source: National Veterinary Institute

Antall IPN utbrudd 2008	Laks	Regnbueørret
Ferskvann	58	12
Sjøvann	86	2
Totalt	144	14

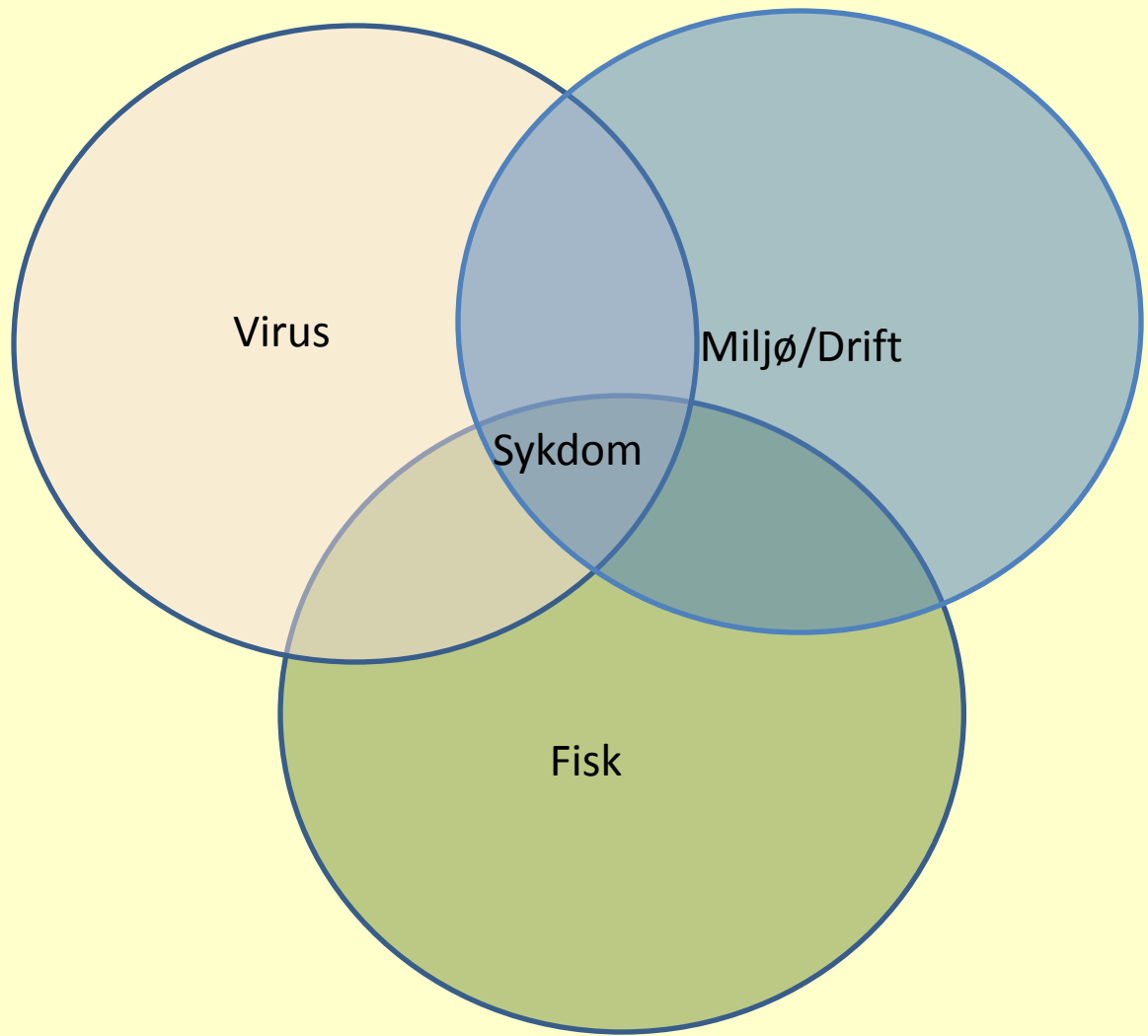
Seleksjonspress for virus i akvakultur

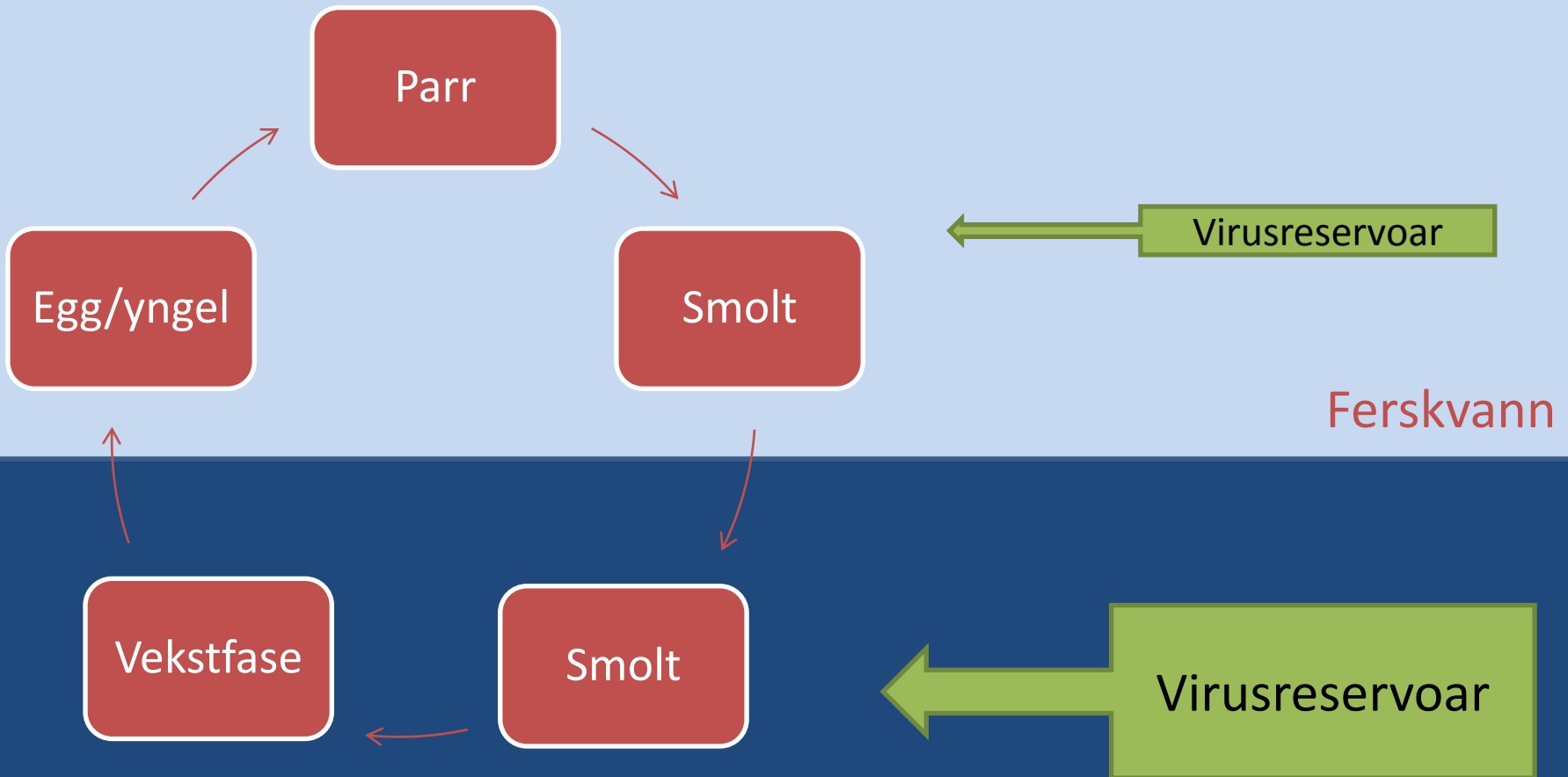
- Akvakultur er en kunstig prosess
- Seleksjonspress for virus hos vill fisk er annerledes enn i akvakultur
- Villaks: Lav tetthet av fisk, med unntak av gyteperioden -> seleksjon for virus med lav virulens slik at virus får muligheten til å infisere en ny vert
- Oppdrettslaks: Høy tetthet av fisk -> seleksjon for virus med høy formeringsrate (ubegrenset tilgang på nye verter)
- Altså: Virus som er relativt harmløse i villfisk populasjoner kan bli mer virulente i oppdrettsbetingelser.

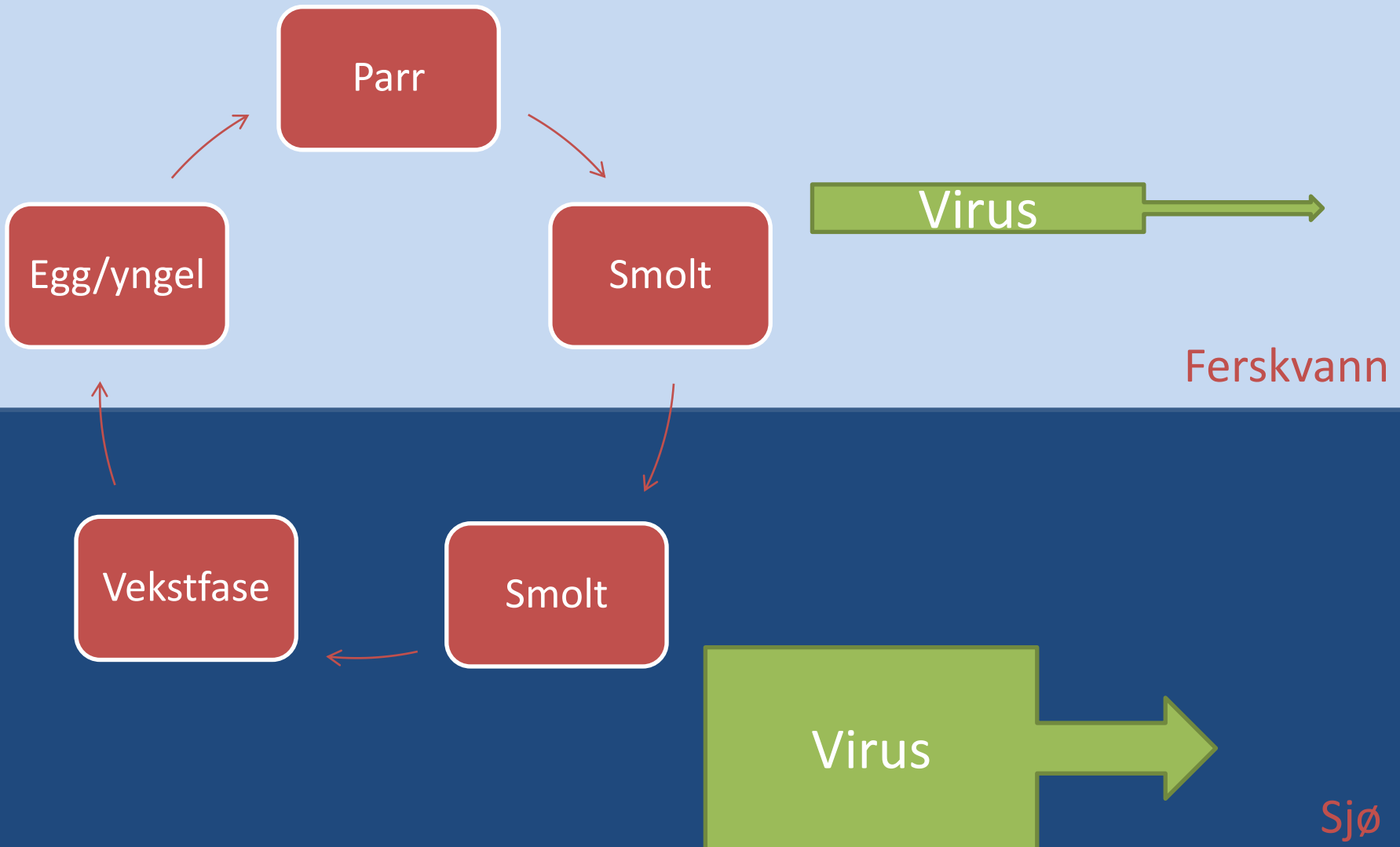


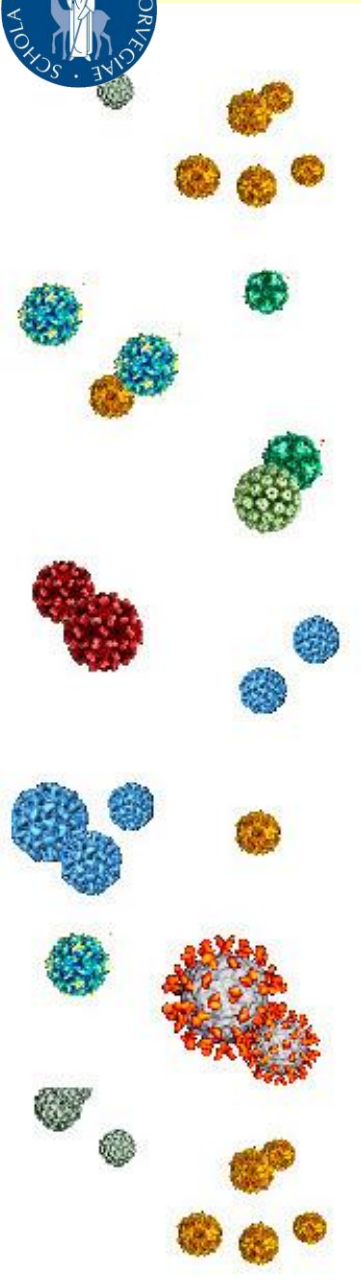


Virussykdommer

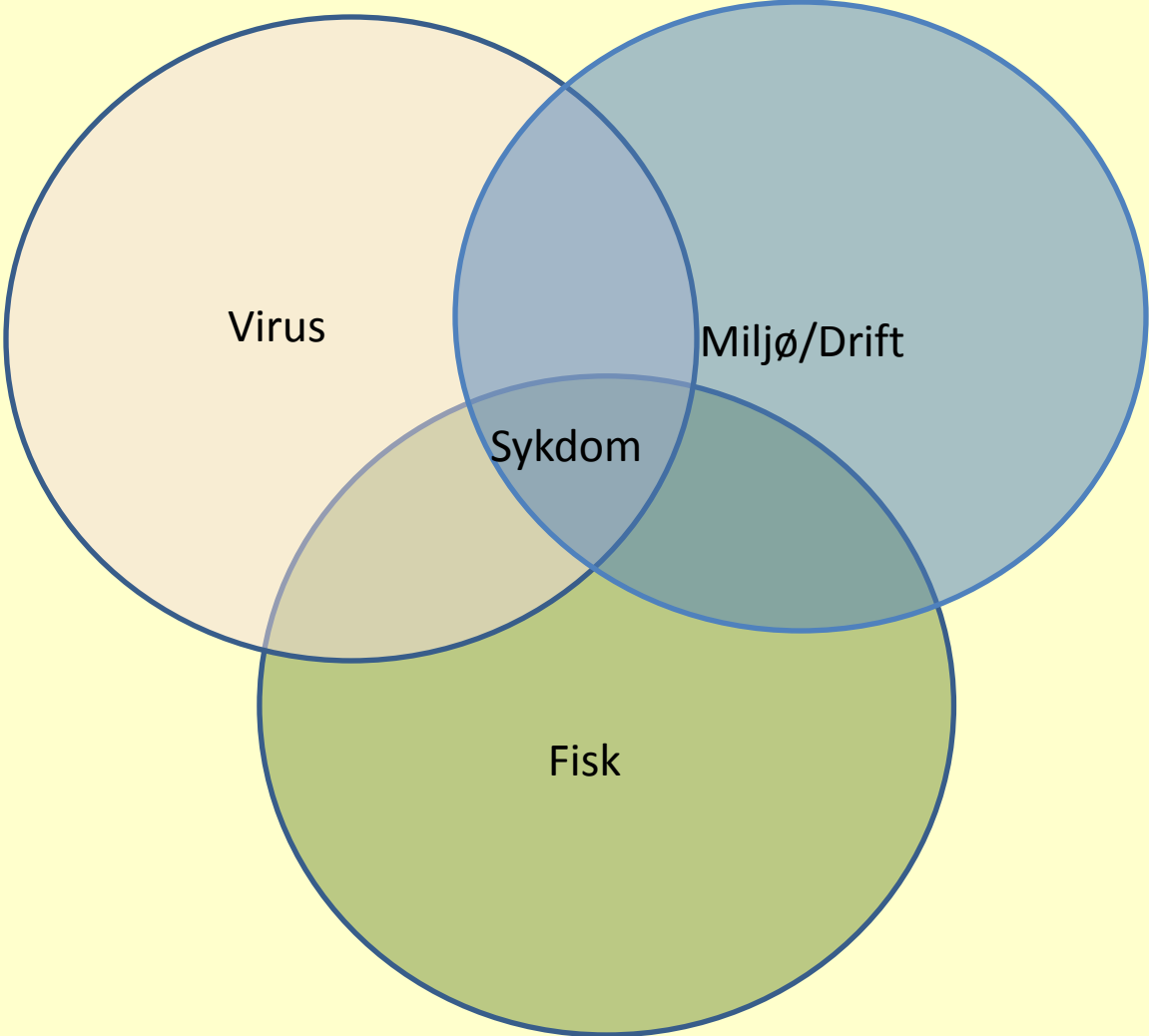


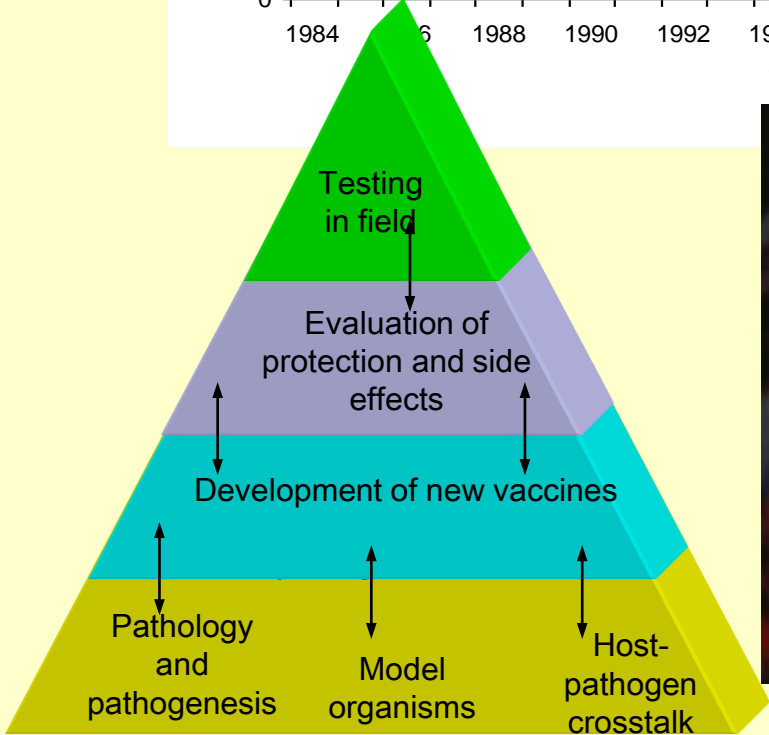
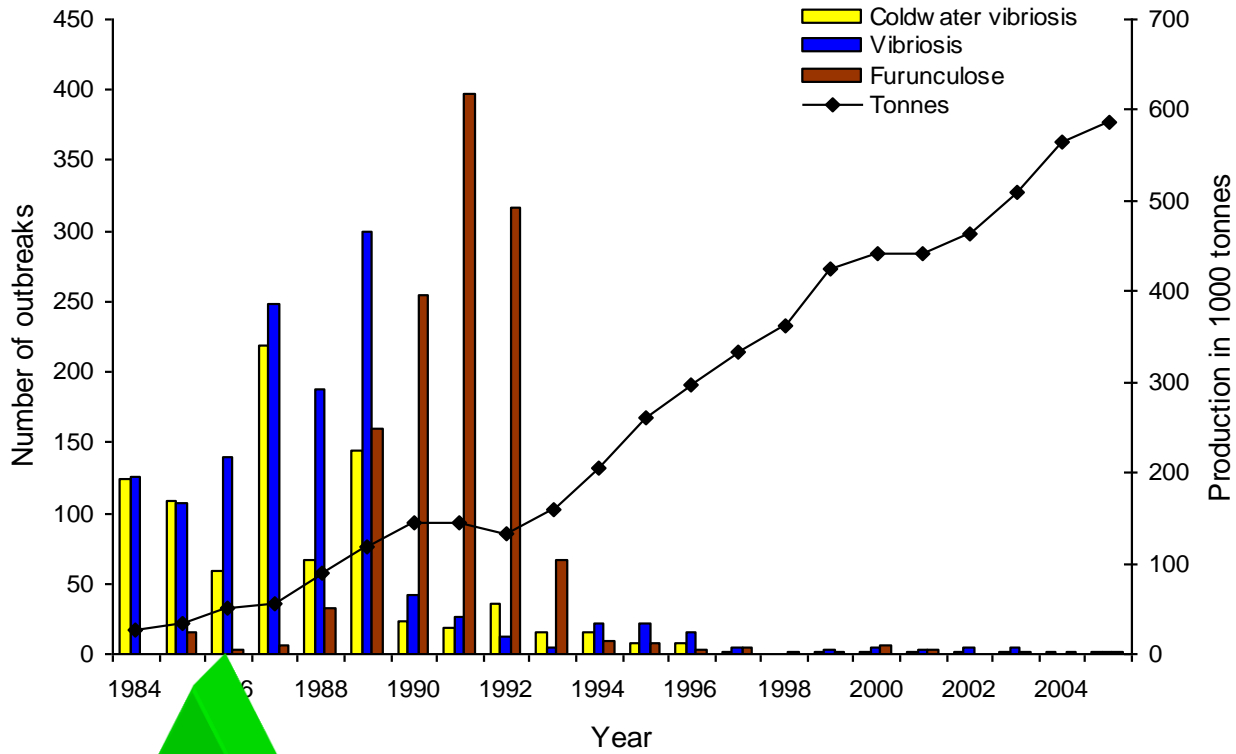






Virussykdommer

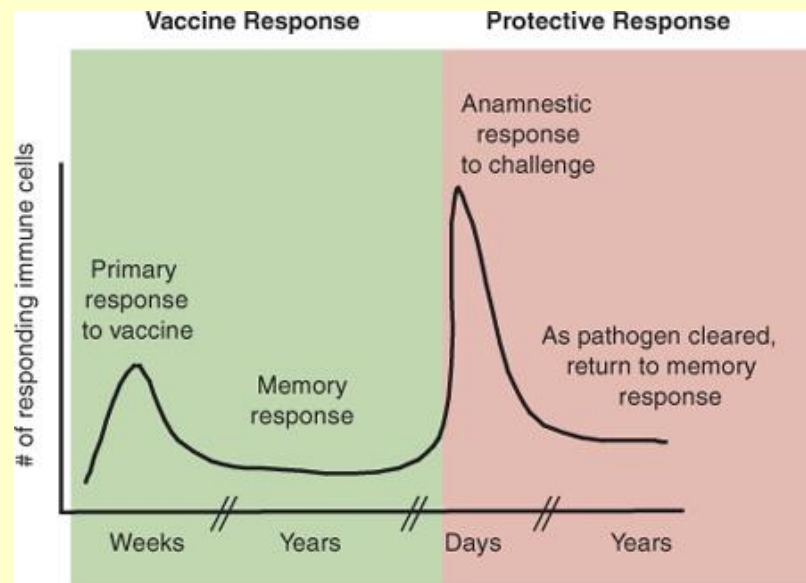




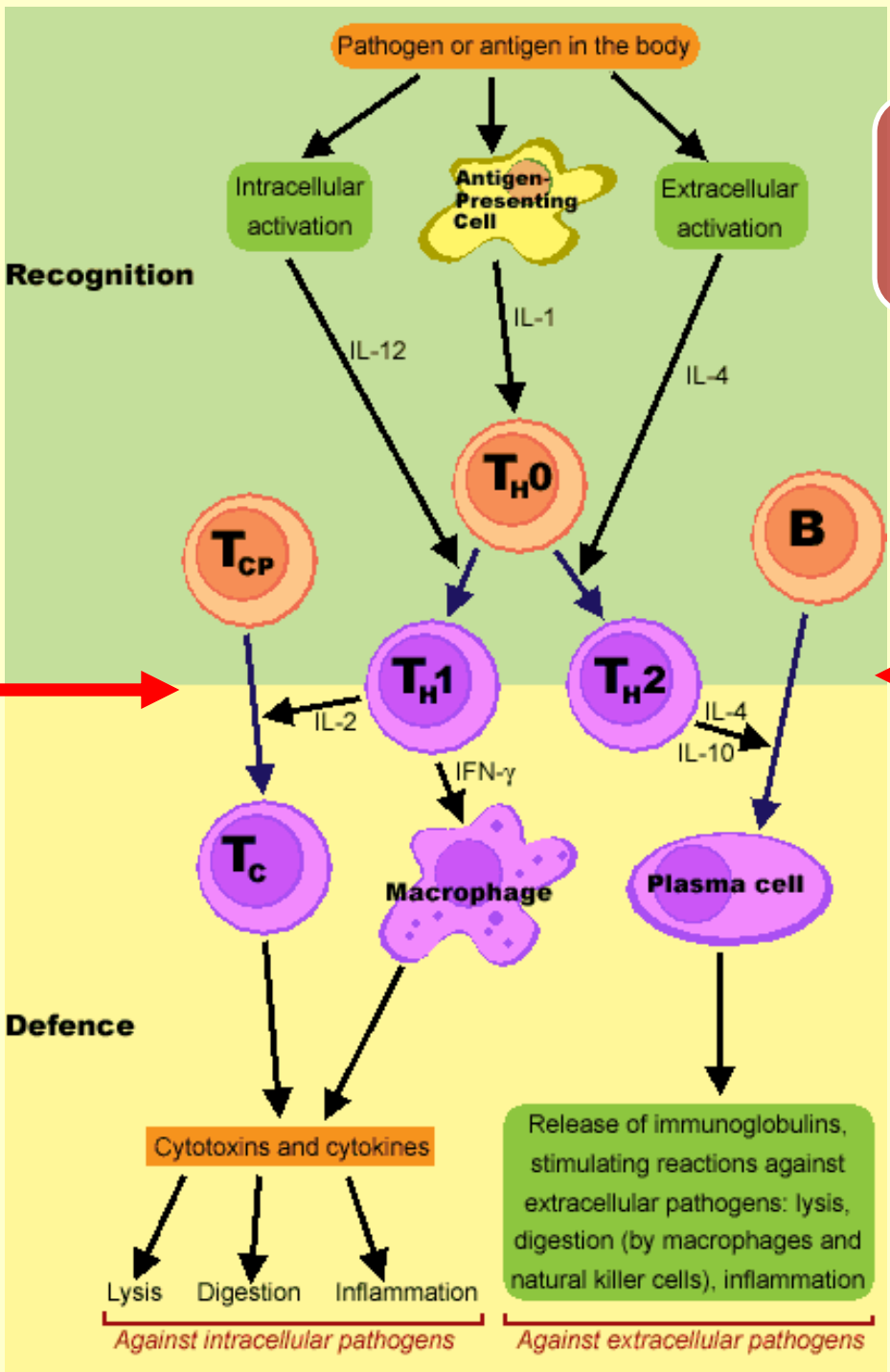
Javier Sotomayor, 1993, 2.45m

Trenger næringen flere og bedre virusvaksiner?

- Det er ca 20 % dødelighet i perioden utsett i sjø til slakt
- Større konsentrasjon av biomasse i oppdrett øker behovet for forebygging
- Skal oppdrettsnæringen fortsette å vokse må infeksjøs sykdommer kontrolleres
- Vaksinerings skal inducere en immunrepons hos fisken slik at den er immun hvis den senere kommer i kontakt med viruset det er vaksinert i mot.



Ervervet immunrespons

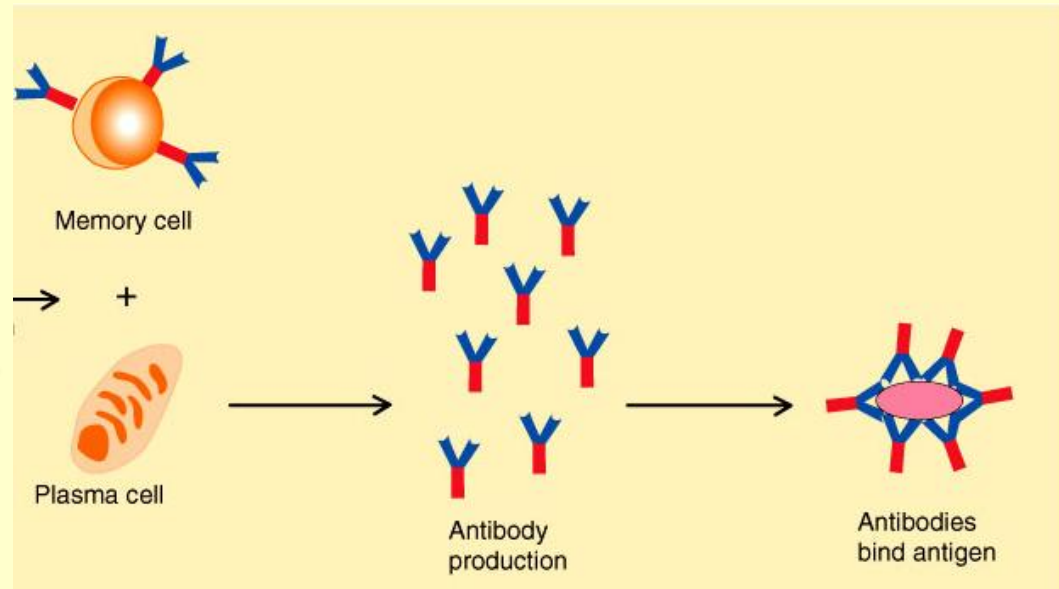
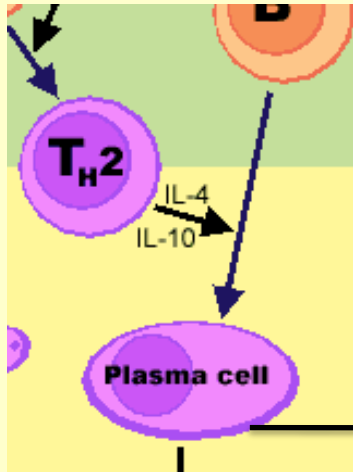


Ervervet immunrespons består grovt av to deler. Den ene lager antistoffer (humoral respons), den andre effektorceller (cellulær respons)

Cellulær respons
 Intracellulære patogener. Opprydding etter infeksjon

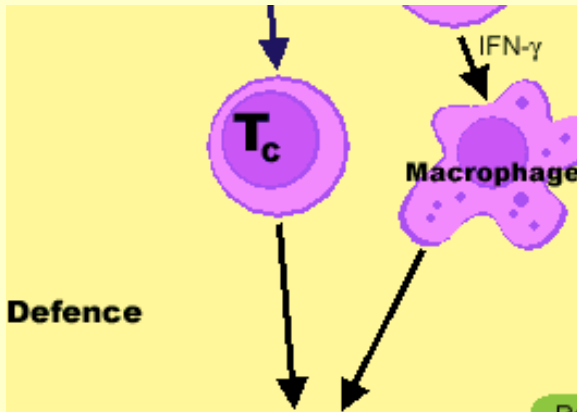
Antistoff (humoral) respons
 Ekstracellulære patogener. Beskyttelse mot etablering av infeksjon

Antistoffrespons

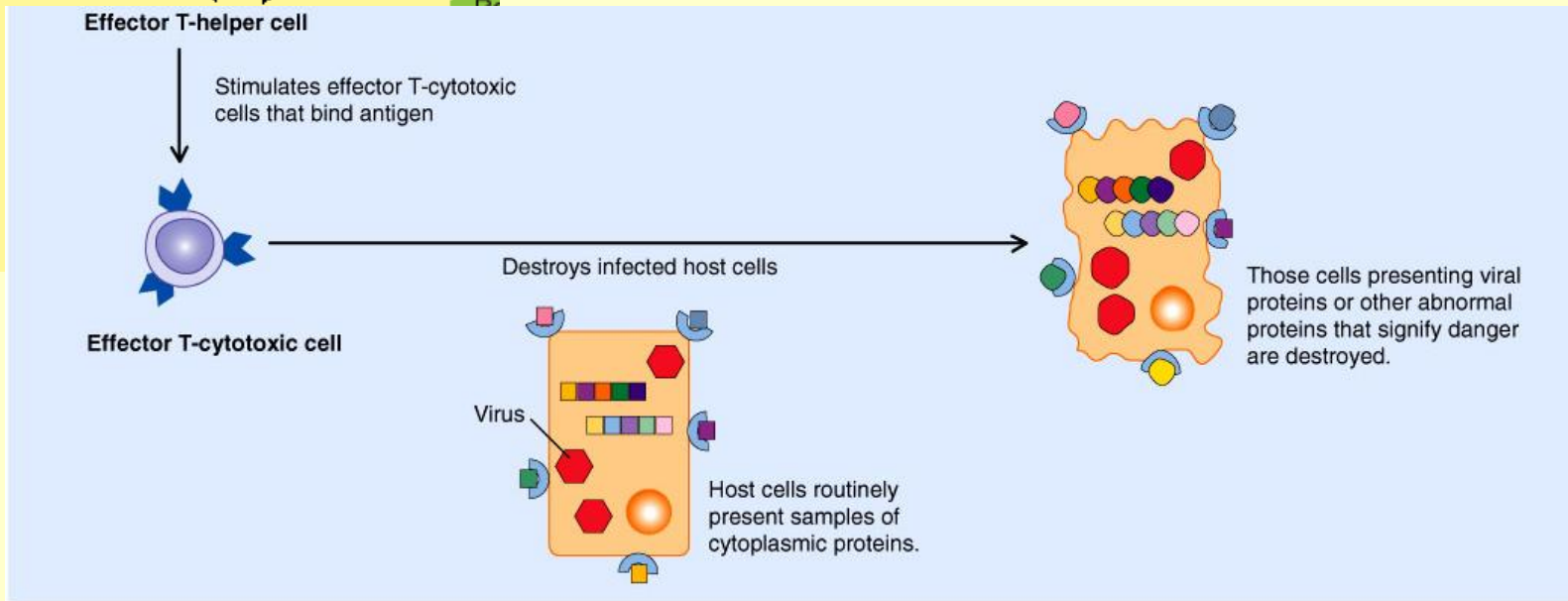


1. Ekstracellulære patogener.
2. Beskyttelse mot etablering av infeksjon

Cellulærrespons



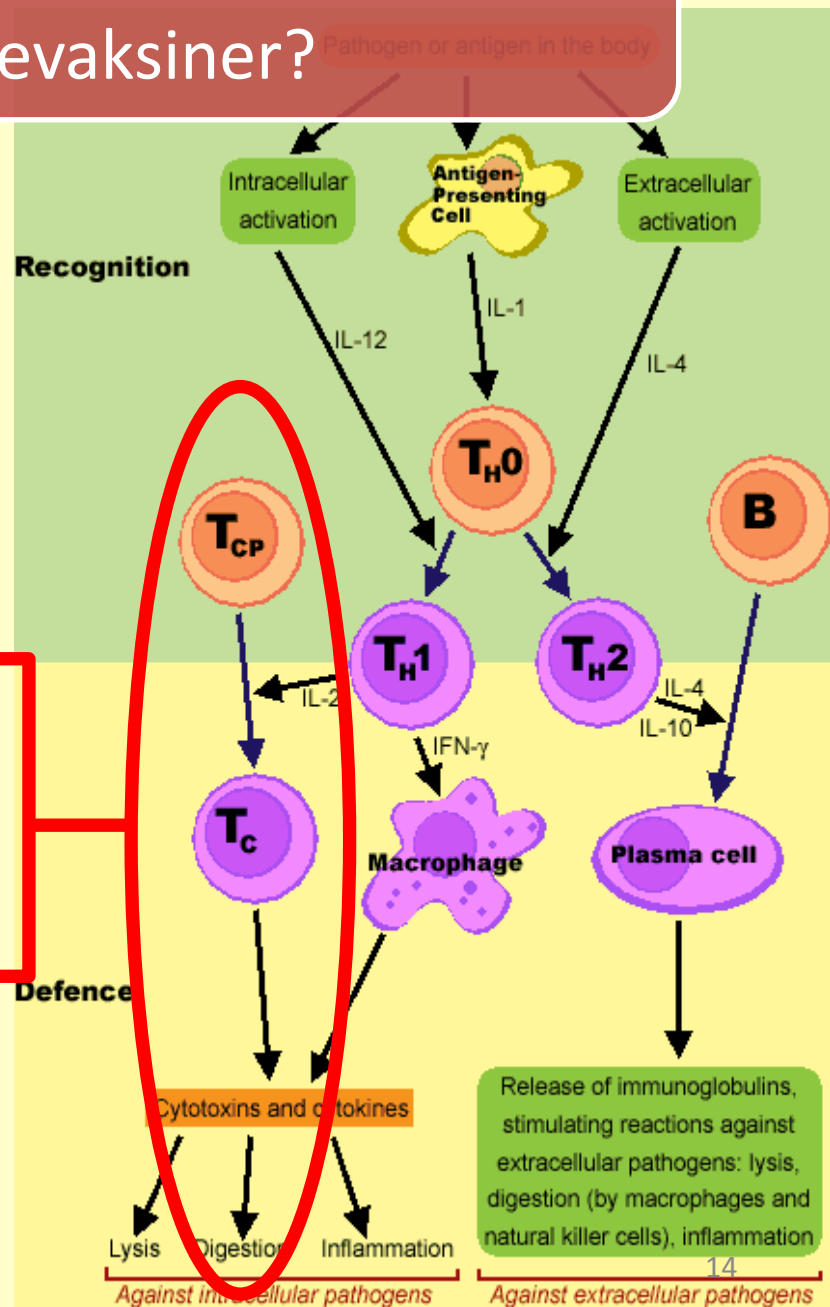
1. Intracellulære patogener.
2. Opprydding etter infeksjon



Hvorfor er ikke dagens virusvaksiner til laks like effektive som bakterievaksiner?

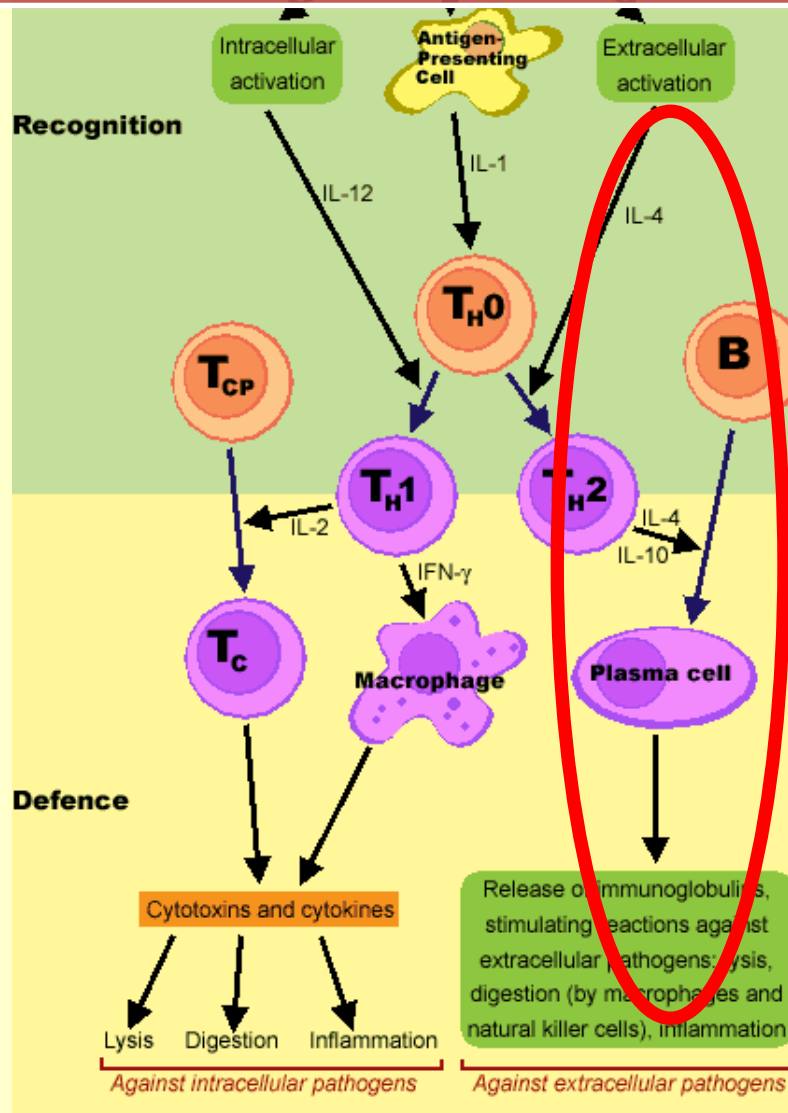
- Dagens virusvaksiner er basert på inaktiverte virus eller rekombinante subenheter. Slike vaksiner er dårlige til å indusere cellulær respons.

- Viktig for beskyttelse mot mange ulike virus
- "Ikke så viktig" for god beskyttelse mot bakterier



Hvorfor er ikke dgens virusvaksiner til laks like effektive som bakterievaksiner?

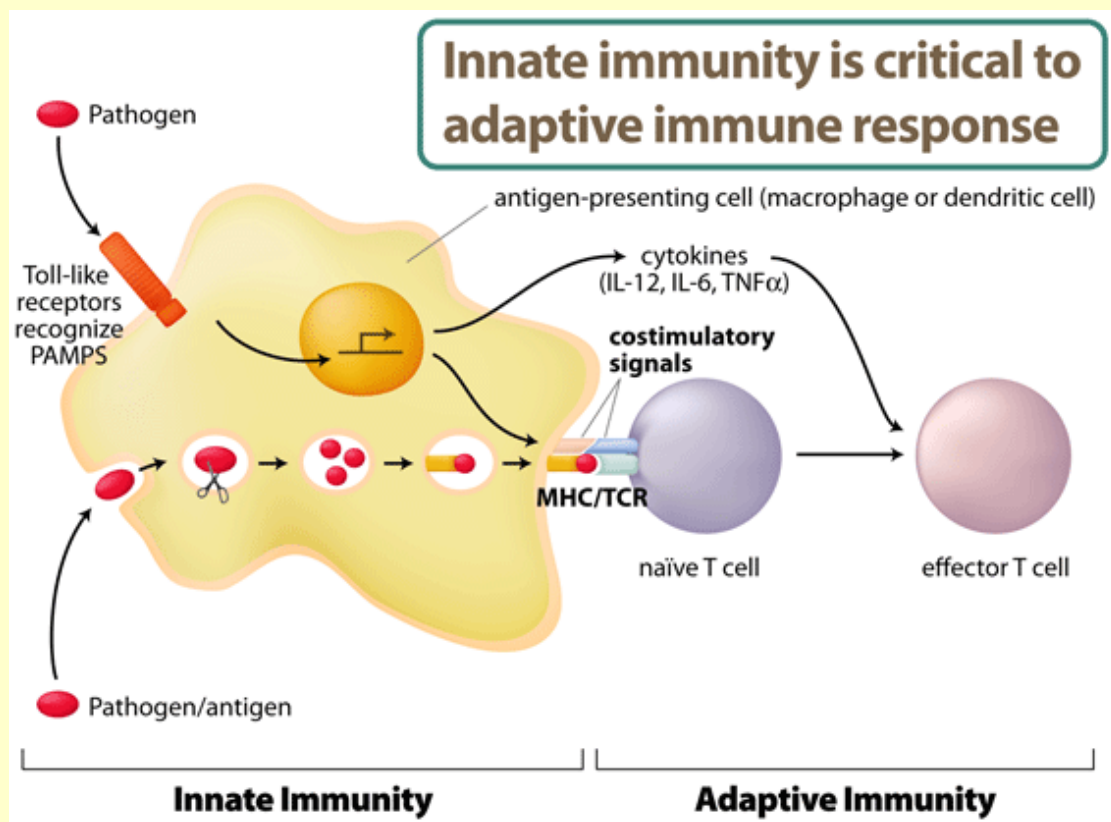
- Dagens virusvaksiner er basert på inaktiverte virus eller rekombinante subenheter. Slike vaksiner induserer i første rekke humoral respons.



For å få en sterk antistoff respons må man ha mye antigen (inaktivert virus eller lignende) i vaksinen. Dette er kostbart.

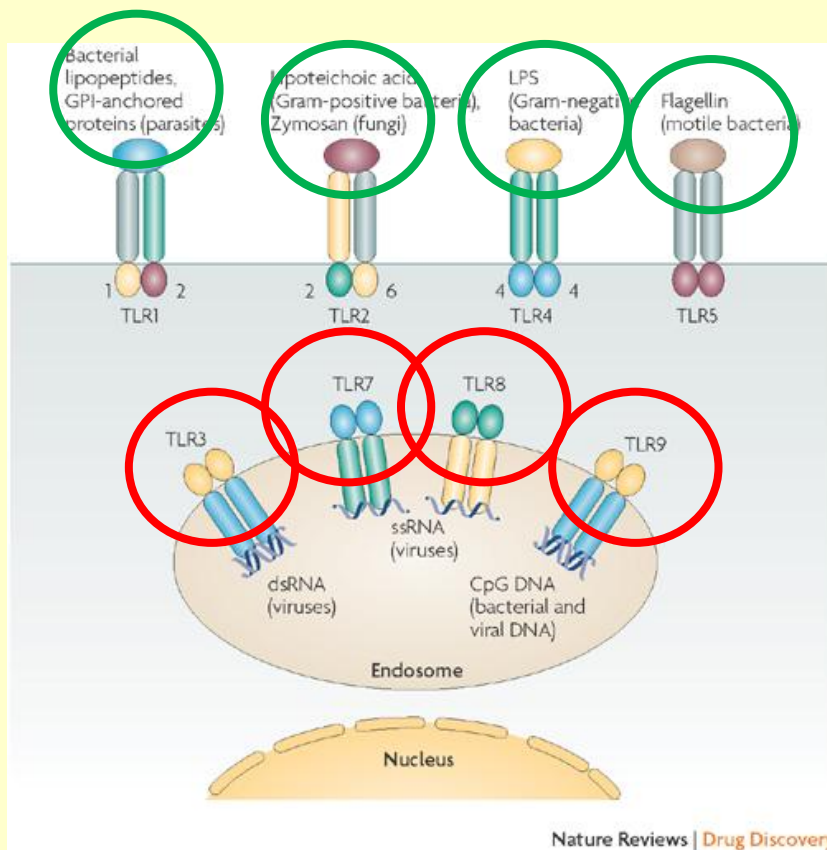
Hvorfor er ikke dagens virusvaksiner til laks like effektive som bakterievaksiner?

1. Stimulering av medfødt respons er kritisk for å få en god ervertet respons.



Hvorfor er ikke dagens virusvaksiner til laks like effektive som bakterievaksiner?

1. Molekyler som induserer medfødt immunrespons mot **virus** og/eller **bakterie** infeksjoner ved å binde seg til spesielle reseptorer (TLR) hos vertceller er fortsatt aktive hos inaktiverede bakterier, men mindre grad hos inaktiverede virus.



← Utsiden av cellen

← Cellemembran

← Inni cellen



Hvordan optimalisere virusvaksiner til laks?

- Levende vaksiner, svekkede virus
- DNA vaksiner
- Replikon vaksiner /Optimaliserte DNA vaksiner
- Vektorvaksiner
- M.fl.



Levende vaksiner, svekkede virus

- Klassiske levende virus vaksiner er ikke-sykdomsframkallende stammer av virus som replikerer i verten og beskytter denne mot sykdomsfremkallende stammer av samme virus.
 - De fleste virusvaksiner som inngår i barnevaksinering er levende, svekkede virus
- Klassiske levende virus vaksiner lages ved å svekke virus ved for eksempel multiple passasjer i cellekultur.
- Hvorfor er ikke da alle virusvaksiner levende?

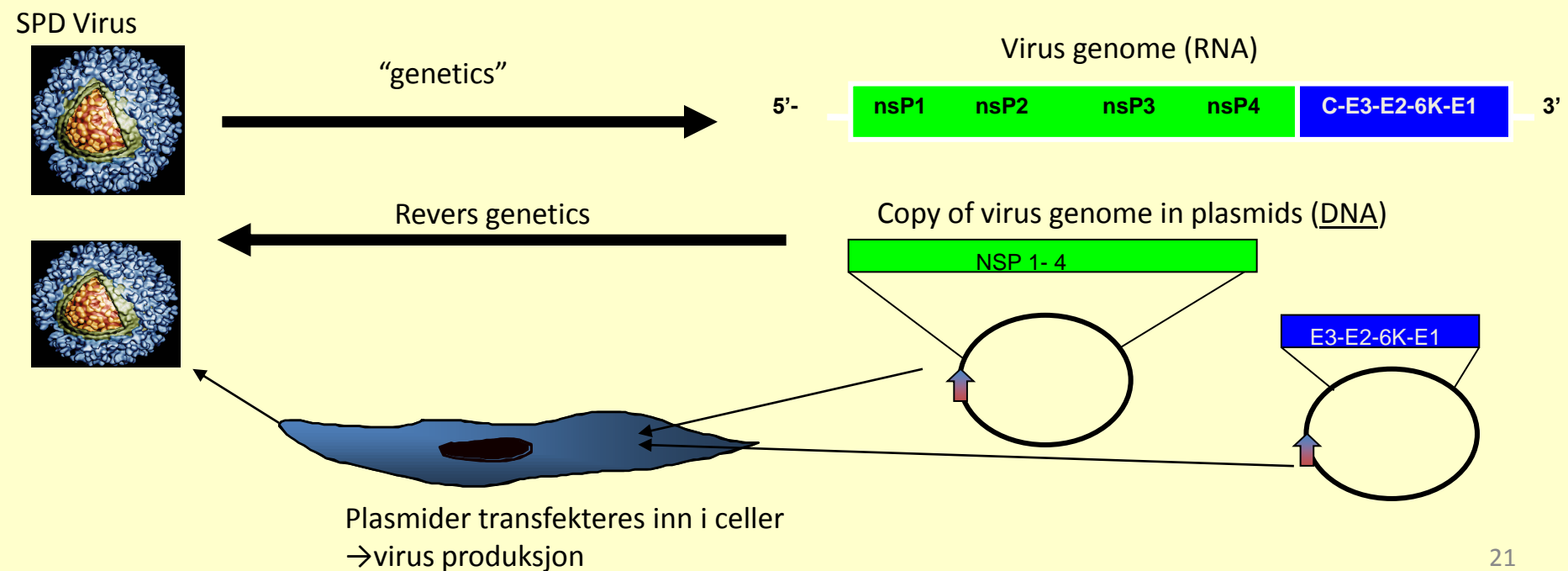


Levende vaksiner, svekkede virus

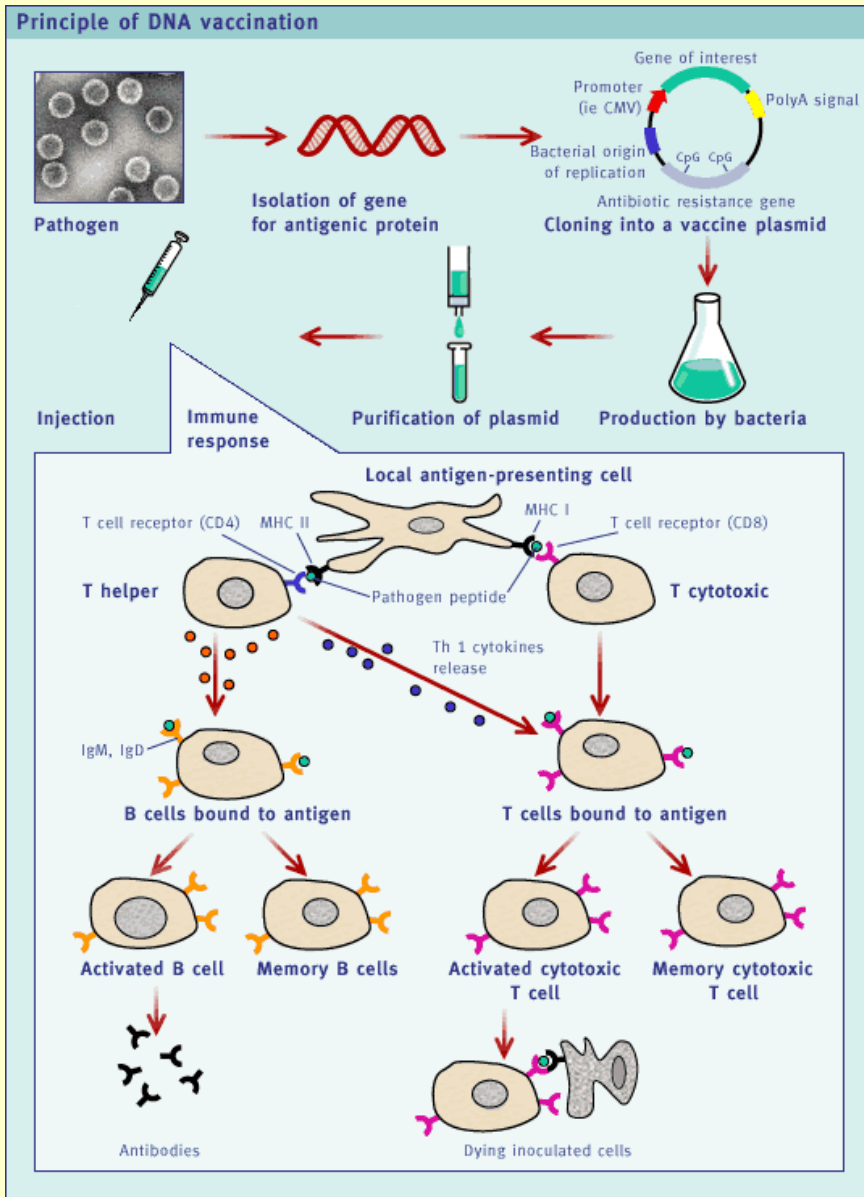
- Virus blir svekket på grunn av tilfeldige mutasjoner i virus genomet. En enkelt mutasjon kan være tilstrekkelig for at viruset svekkes. Dette er mulig reversibelt.
- Klassiske levende virus vaksiner er derfor ikke ansett å være helt trygge
- Risikovurdering av dette er vanskeligere i et akvatisk en et terrestrisk miljø.
- Kan vi lage tryggere, levende vaksiner?

Kan vi lage tryggere, levende vaksiner?

- Ja, men da vil de bli regnet som genmodifisert (GMO).
- For eksempel ved å fjerne ikke-essensielle deler av virus genom (ved hjelp av metoder som revers genetikk).
- Det er ingen kjente biologiske mekanismer som virus kan bruke for å "fikse" slike delesjoner.



DNA vaksiner

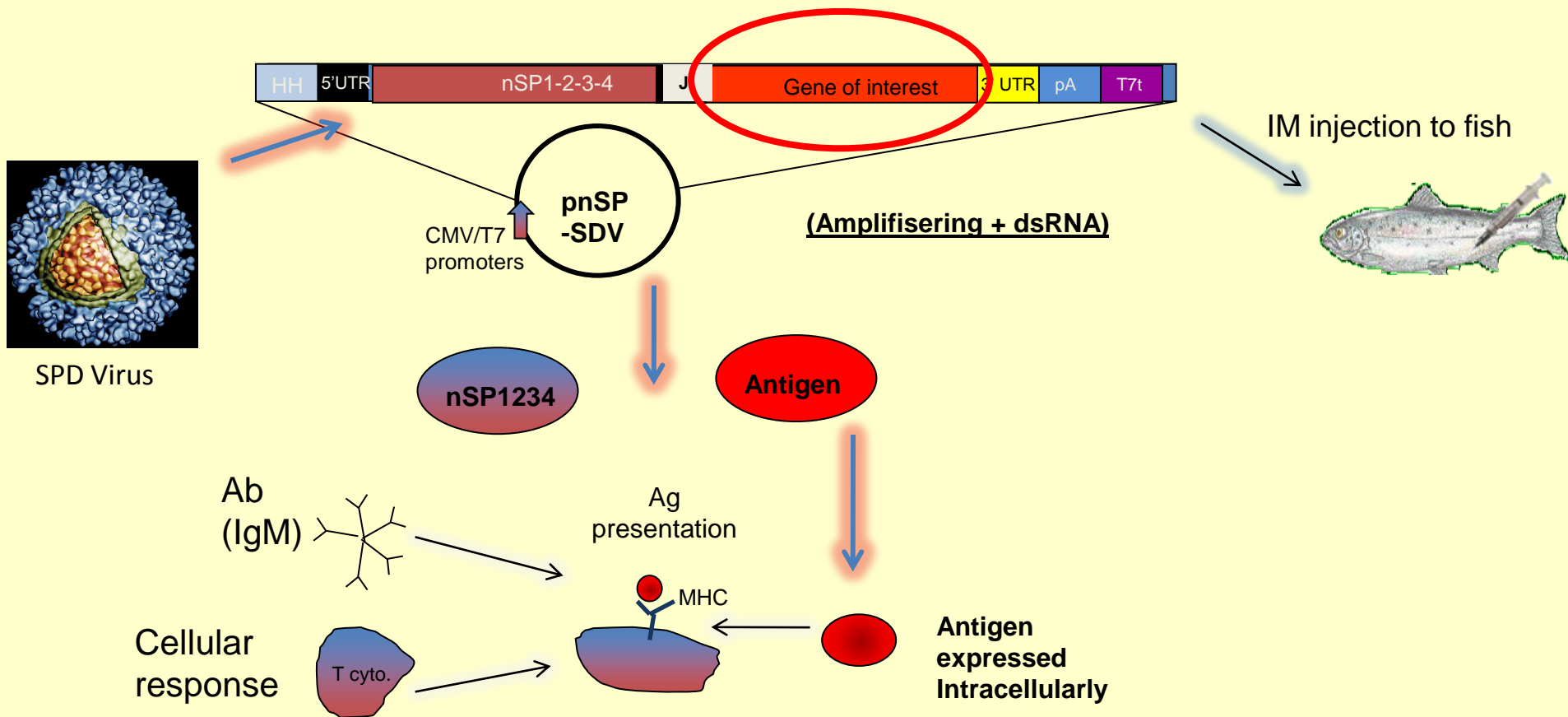


- Relativt enkel å lage
- Effektive mot noen virus sykdommer (IHN, VHS)
- Tillatt brukt i Atlantisk laks i Canada (British Columbia) mot sykdommen IHN
- Fisk som får slik vaksine i Norge har vært regnet som GMO

Replikon vaksiner / Optimaliserte DNA vaksiner

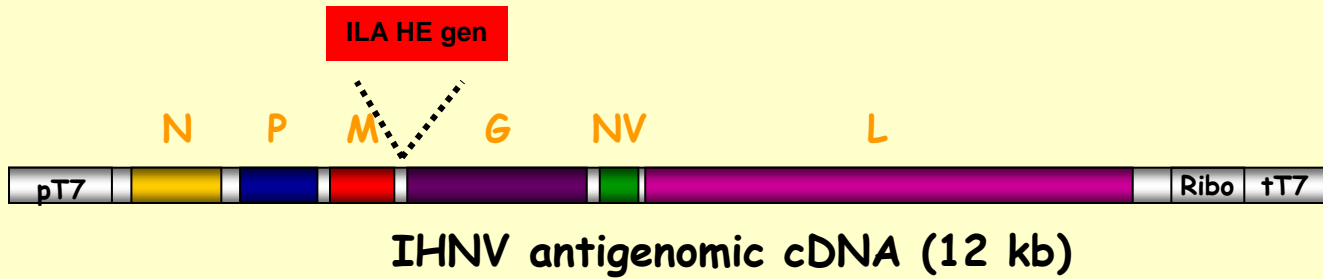
Bruker PD virus istedet for plasmider som vektor

Deler av PD virus genomet byttes ut med et eller flere gen (fra et annet virus) som man vil ha uttrykt



Vektorvaksiner

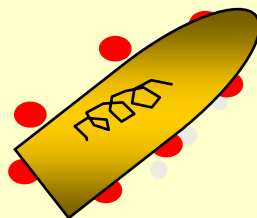
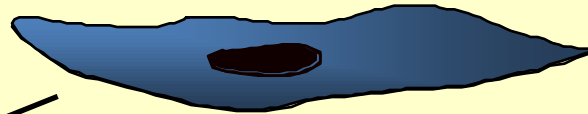
Konstruksjon av kimære virus (her IHNV-ILA)



2

Transfection

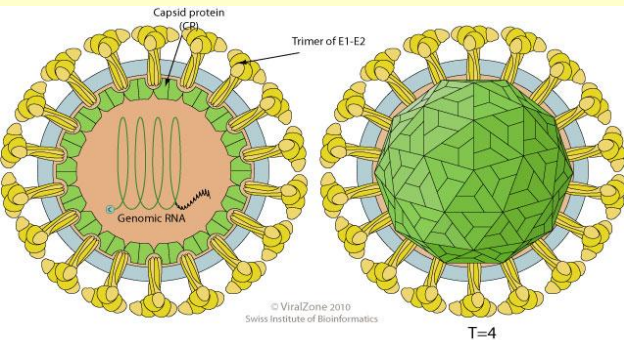
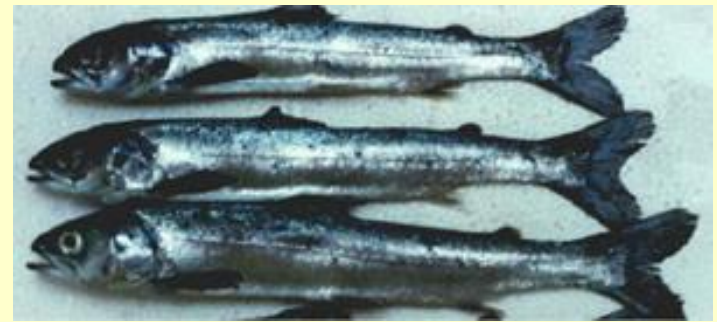
Replicative complex



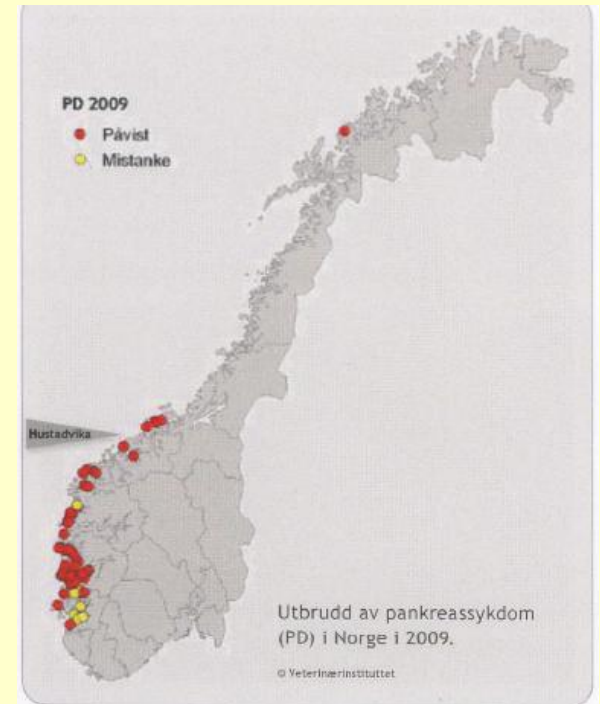
Virus med HE – ILA virus inkorporert i viruspartikkelen → to vaksiner i en.

Modified from
Biacchesi S. et al.,
J.Virol., 2000

Pancreas Disease



1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
7	10	11	15	14	22	43	45	58	98	108	75



- Relativt stort sykdomsproblem
- Flere eksperimentelle vaksiner, blant annet DNA vaksiner gir god beskyttelse (eksperimentelt)
- Tilstrekkelige mengder inaktivert antigen gir også god beskyttelse

Hjerte- og skjelettmuskel betennelse

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

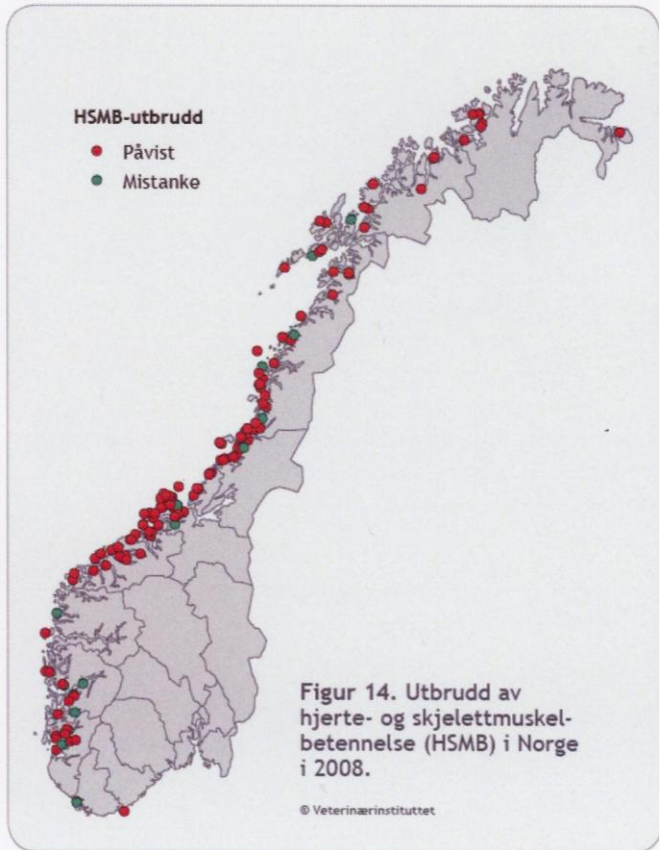
Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus

Gustavo Palacios¹*, Marie Lovoll^{2,3}, Torstein Tengs², Mady Hornig¹, Stephen Hutchison³, Jeffrey Hui¹, Ruth-Torill Kongtorp⁴, Nazir Savji¹, Ana V. Bussetti¹, Alexander Solovyov¹, Anja B. Kristoffersen², Christopher Celone³, Craig Street¹, Vladimir Trifonov³, David L. Hirschberg¹, Raul Rabadan⁵, Michael Egholm³, Espen Rimstad⁶*, W. Ian Lipkin¹*

1 Center for Infection and Immunity, Columbia University, New York, New York, United States of America, **2** National Veterinary Institute, Oslo, Norway, **3** 454 Life Sciences, Branford, Connecticut, United States of America, **4** Ministry of Fisheries and Coastal Affairs, Oslo, Norway, **5** Department of Biomedical Informatics and Center for Computational Biology and Bioinformatics, Columbia University, New York, New York, United States of America, **6** Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norway

Abstract

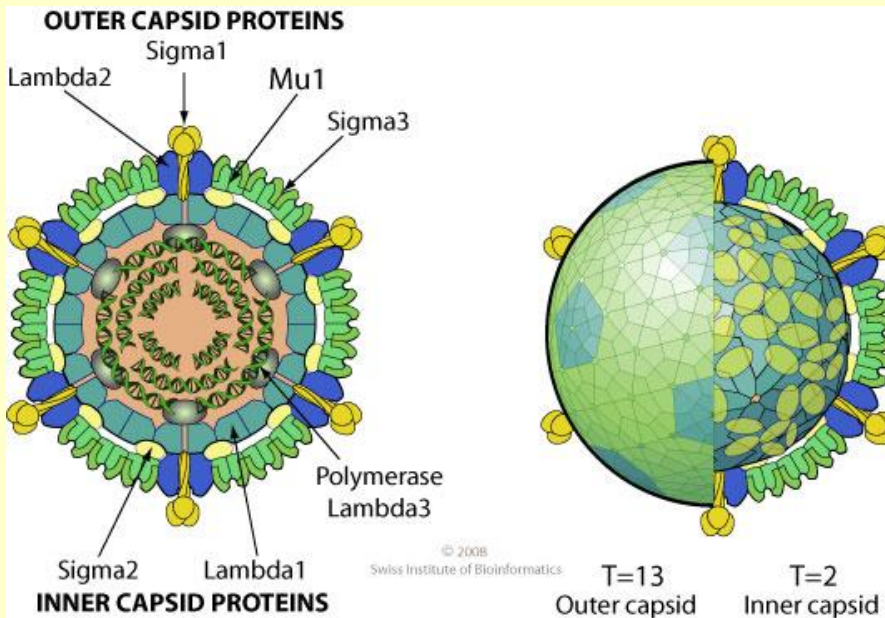
Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) mariculture has been associated with epidemics of infectious diseases that threaten not only local production, but also wild fish coming into close proximity to marine pens and fish escaping from them. Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) is a frequently fatal disease of farmed Atlantic salmon. First recognized in one farm in Norway in 1999[1], HSMI was subsequently implicated in outbreaks in other farms in Norway and the United Kingdom[2]. Although pathology and disease transmission studies indicated an infectious basis, efforts to identify an agent were unsuccessful. Here we provide evidence that HSMI is associated with infection with piscine reovirus (PRV). PRV is a novel reovirus identified by unbiased high throughput DNA sequencing and a bioinformatics program focused on nucleotide frequency as well as sequence alignment and motif analyses. Formal implication of PRV in HSMI will require isolation in cell culture and fulfillment of Koch's postulates, or prevention or modification of disease through use of specific drugs or vaccines. Nonetheless, as our data indicate that a causal relationship is plausible, measures must be taken to control PRV not only because it threatens domestic salmon production but also due to the potential for transmission to wild salmon populations.



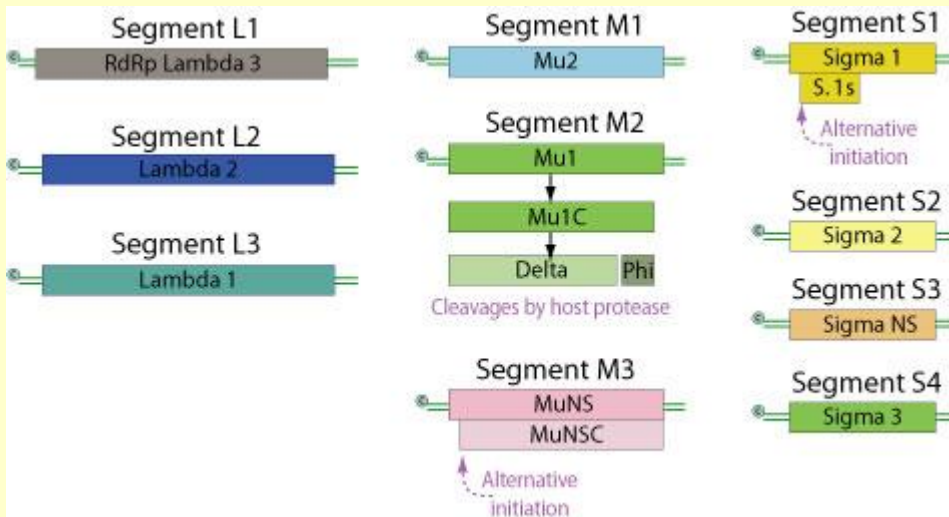
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
HSMB	54	83	94	162	144	135

Hjerte- og skjelettmuskel betennelse

ORTHOREO

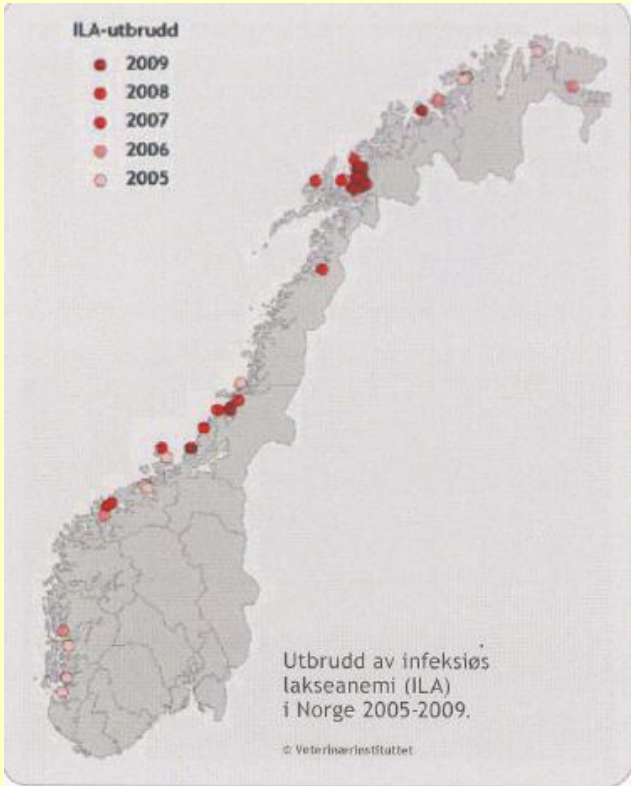
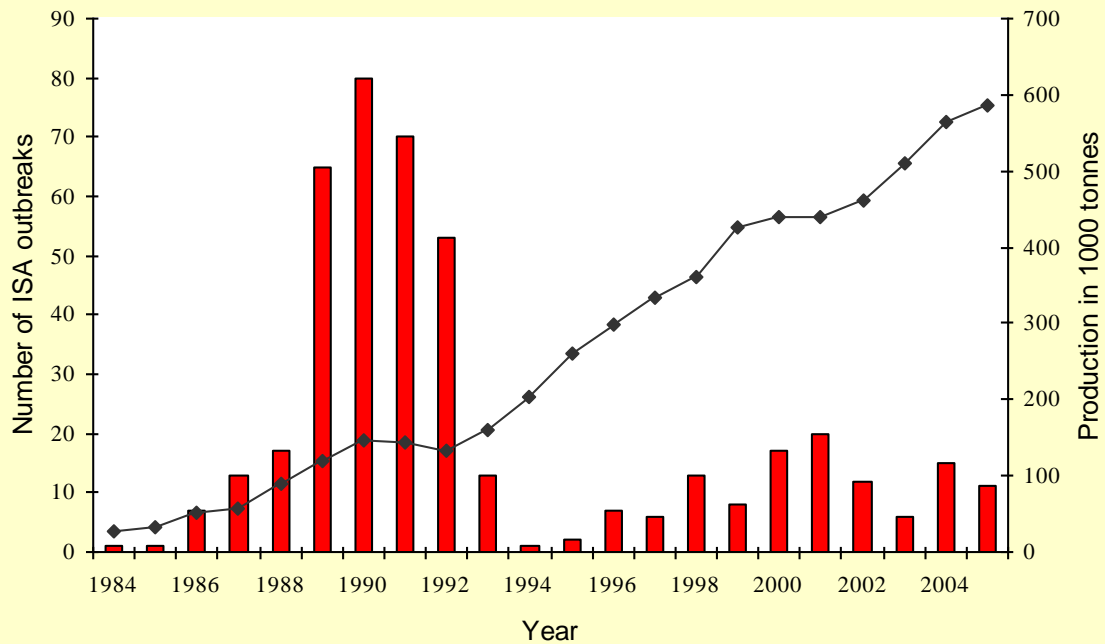


GENOME



1. Virus (vi kaller det Piscint reovirus, PRV) er vidt utbredt hos oppdrettslaks.
2. Virus finnes hos fisk med og uten HSMB (det er mye mer virus i fisk med HSMB)
3. Andre faktorer enn bare tilstedeværelse av virus er viktige.

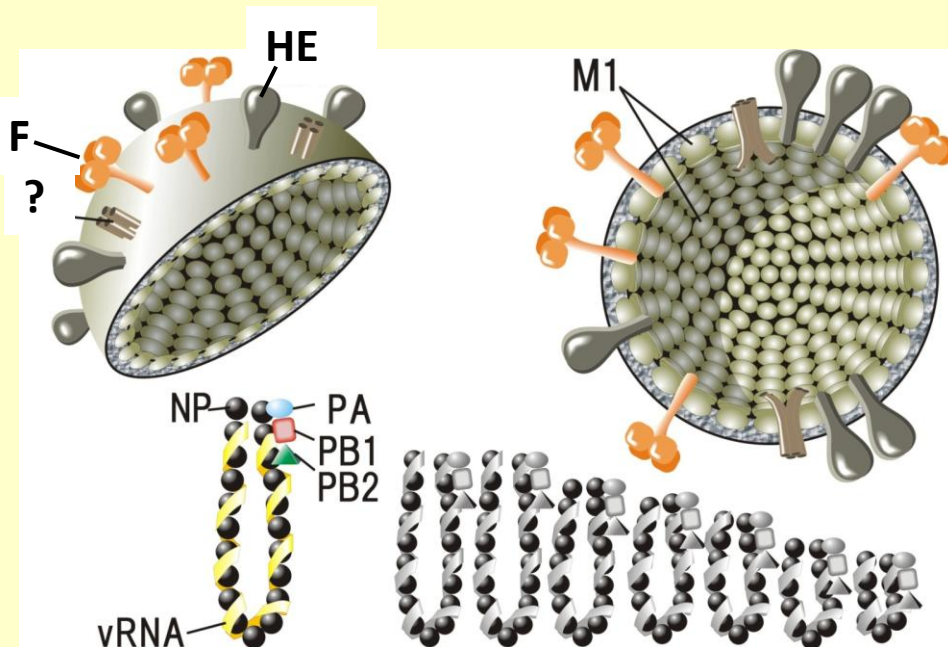
ILA i Norge



	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
ILA	13	14	23	21	12	8	16	11	4	7	17	10

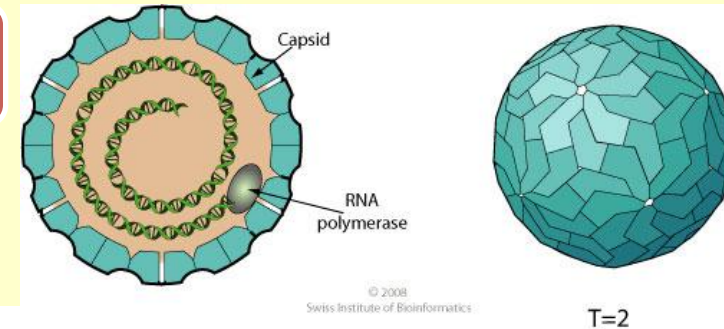


ILA virus



1. Ulik vaksinasjonspraksis i de enkelte land
2. Bruker man tilstrekkelig mengde med inaktivert antigen, dvs nok HE (og F) oppnår man beskyttelse.
3. Ikke-sykdomsfremkallende varianter (fullengde HE såkalt HPR0) er relativt vidt utbredt

Cardiomyopati syndrom - CMS



Løvoll et al. *Virology Journal* 2010, 7:309
<http://www.virologyj.com/content/7/1/309>



VIROLOGY JOURNAL

RESEARCH

Open Access

A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS)

Marie Løvoll¹, Jannicke Wiik-Nielsen², Søren Grove¹, Christer R Wiik-Nielsen¹, Anja B Kristoffersen³, Randi Faller¹, Trygve Poppe⁴, Joonil Jung⁵, Chandra S Pedomallu⁵, Alexander J Nederbragt⁶, Matthew Meyerson⁷, Espen Rimstad⁸, Torstein Tengs^{9*}

Abstract

Background: Cardiomyopathy syndrome (CMS) is a severe disease affecting large farmed Atlantic salmon. Mortality often appears without prior clinical signs, typically shortly prior to slaughter. We recently reported the finding and the complete genomic sequence of a novel piscine reovirus (PRV), which is associated with another cardiac disease in Atlantic salmon; heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). In the present work we have studied whether PRV or other infectious agents may be involved in the etiology of CMS.

Results: Using high throughput sequencing on heart samples from natural outbreaks of CMS and from fish experimentally challenged with material from fish diagnosed with CMS a high number of sequence reads identical to the PRV genome were identified. In addition, a sequence contig from a novel totivirus could also be constructed. Using RT-qPCR, levels of PRV in tissue samples were quantified and the totivirus was detected in all samples tested from CMS fish but not in controls. *In situ* hybridization supported this pattern indicating a possible association between CMS and the novel piscine totivirus.

Conclusions: Although causality for CMS in Atlantic salmon could not be proven for either of the two viruses, our results are compatible with a hypothesis where, in the experimental challenge studied, PRV behaves as an opportunist whereas the totivirus might be more directly linked with the development of CMS.

1. Et nylig beskrevet virus i familien *Totiviridae* er assosiert med CMS
2. Dette viruset (Piscint myocariditt virus, PMCV) er tilstede i fisk med CMS, (sjelden i annen fisk).

Takk for oppmerksomheten

Espen Rimstad,
Professor i virologi,
Norges veterinærhøgskole
Oslo

