

FAGLIG SLUTTRAPPORT

FHF901305 PRV karakterisering (inaktivering og virulens) FHF901529 PRV sekvensering

September 2020

Prosjektleder

Øystein Wessel NMBU Veterinærhøgskolen

Prosjektdeltagere

Espen Rimstad	NMBU Veterinærhøgskolen
Elisabeth F Hansen	NMBU Veterinærhøgskolen
Dhamotharan Kannimuthu	NMBU Veterinærhøgskolen
Turhan Markussen	NMBU Veterinærhøgskolen
Maria K Dahle	Veterinærinstituttet
Gerrit Timmerhaus	Nofima
Marie Løvoll	VESO Vikan
Makoto Inami	VESO Vikan
Magnus Devold	PatoGen
Morten Lund	PatoGen
Håvard Aanes	PatoGen



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet



Veterinærinstituttet
National Veterinary Institute

Research facility
VESO Vikan

Nofima PATOGEN

INNHALDSFORTEGNELSE

1. Sammendrag (Summary)	3
Sammendrag	3
Summary	4
2. Innledning	5
Bakgrunn	5
Prosjektomfang og organisering	6
3. Problemstilling og formål	7
4. Gjennomføring, resultater, diskusjon, konklusjon.....	7
Arbeidspakke 1 – PRV inaktivering	7
Utvikling av modell for inaktiveringsforsøk (AP1.1).....	7
PRV inaktiveringsforsøk (AP1.2).....	9
Arbeidspakke 2 – PRV virulens.....	13
Oppformering av virus (AP2.1 AP2.3)	13
Virulensforsøk (AP2.2 AP2.4)	14
Arbeidspakke 3 – PRV sekvensering	23
5. Hovedfunn.....	25
6. Leveranser	25
Referanser	27

1. SAMMENDRAG (SUMMARY)

Sammendrag

Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) kan gi hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) som er en viktig og utbredt sykdom hos oppdrettslaks. Det er fortsatt mange ubesvarte spørsmål om hvorfor noen PRV-infeksjoner gir utbrudd av HSMB og andre ikke, og hvordan vi kan få bedre kontroll på infeksjonen og sykdommen. I dette prosjektet ønsket vi å besvare to spørsmål: 1) Hva skal til for å inaktivere PRV? 2) Er det virulensforskjeller mellom ulike PRV-1 isolater?

I inaktiveringsstudien utarbeidet vi først en ny modell hvor fisken selv brukes til å undersøke om viruset er infeksjøs. Dette ble benyttet ved måling av effekt av ulike desinfeksjonsmetoder. Studien viste at standard jod-behandling som benyttes til rogn (100 ppm, 10 min) inaktiverer PRV. Viruset ble også inaktivert ved svært høye og svært lave pH-verdier, samt ved behandling med Virocid, et kommersielt tilgjengelig desinfeksjonsmiddel. Det kreves en UV-dose på minst 50 mJ/cm² for å inaktivere PRV, og viruset ble funnet å være relativt varmestabilt. Resultatene fra dette studiet er publisert i Journal of Fish Diseases (<http://doi:10.1111/jfd.13214>).

I virulensstudien sammenliknet vi seks forskjellige PRV-1 isolater i et smittetest der fisken ble smittet med en standardisert dose renset PRV-1. Forsøket inkluderte to norske feltisolater fra 2018, tre historiske norske isolater fra før HSMB ble oppdaget, og ett isolat fra vestkysten av Canada. De to norske 2018 isolatene gav kraftige hjerteforandringer, i overensstemmelse med det man finner ved HSMB, mens de tre historiske norske og det canadiske isolatet gav vesentlig mildere hjerteforandringer. Infeksjonen med de to norske 2018 isolatene var assosiert med mye virus i plasma rett før de utviklet hjertelesjoner. Forsøket viste at det er virulensforskjeller mellom PRV-1 stammer. Sekvensanalyse av viruset viste at forskjellen er knyttet til proteinkodende del av PRV-segmentene S1, S4, M2, L1 og L2.

Prosjektet har bidratt med ny viktig informasjon som vil være av betydning for å kunne begrense mengden og effekten av PRV infeksjon hos norsk oppdrettslaks. Dokumentasjon av effekt av ulike inaktiveringsmetoder er et viktig bidrag i en målrettet kamp for å redusere mengden PRV-1 og spesielt med tanke på ferskvannsfasen. Bekreftelsen av virulensforskjeller mellom PRV-1 isolater åpner for målrettet sporing av og tiltak mot de høy-virulente variantene som har størst konsekvenser for fiskehelsen.

Summary

Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) is the causative agent of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI), an important disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). There are still unknown factors important for disease development and a need to control infection and associated disease. This project addressed two important questions: 1) What inactivates PRV? 2) Are there virulence differences between PRV-1 isolates?

In the inactivation study we developed an *in vivo* model to study inactivation of PRV, using fish to test if the virus was still infectious after inactivation procedures on purified PRV particles. The results showed that standard iodine treatment is efficient for inactivation of the virus, as are high and low pH extremes and treatment with Virocid, a commercial disinfectant. A UV dose of at least 50 mJ / cm² is required to inactivate PRV, and the virus has high resistance against heat treatment. This study has been published in Journal of Fish Diseases (<https://doi:10.1111/jfd.13214>).

In the virulence study we performed a challenge trial comparing standardized doses of six PRV-1 isolates, including two Norwegian field isolates from 2018, three historical Norwegian isolates predating the emergence of HSMI and one Canadian west-coast isolate. The Norwegian 2018 isolates induced histopathological lesions in the heart consistent with HSMI, whereas all three historical Norwegian and the Canadian isolates induced only mild cardiac lesions. Infection with the high virulent Norwegian 2018 isolates was associated with high plasma viremia prior to formation of cardiac lesions. The study demonstrated virulence differences between PRV-1 isolates, and sequence analysis showed that the phenotype was linked to protein coding parts of PRV-1 segment S1, S4, M2, L1 and L2.

The project has provided novel information important to reduce the impact of PRV-1 infections on the health of farmed Atlantic salmon. The documented effect of different inactivation methods will aid in an optimized strategy to reduce the amount of PRV-1 and contribute to the possible eradication of PRV-1 in freshwater facilities. The confirmation of virulence differences between PRV-1 isolates will enable a more targeted effort against the high virulent variants that is of most significance for the fish health.

2. INNLEDNING

Bakgrunn

Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) er vidt utbredt i oppdrettslaks og kan gi hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) [1-3]. Det meste av norsk oppdrettslaks blir infisert med PRV-1 i løpet av produksjonssyklus. Viruset er svært utbredt i sjøvannsfasen, men kan også gi infeksjon og sykdom i ferskvannsfasen der enkelte smoltanlegg opplever PRV-infeksjon som særlig problematisk [4]. Per i dag finnes det ingen effektiv vaksine eller andre målrettede tiltak som effektivt kan redusere mengden PRV og HSMB. Det finnes heller ingen spesifikk informasjon om hva som skal til for å inaktivere PRV. Dette skyldes i hovedsak at vi ikke kan dyrke viruset, noe som ville gjort det enklere å studere hva det tåler av ulike desinfeksjonsmetoder.

Selv om en stor andel oppdrettslaks blir infisert med PRV-1, så utvikler på langt nær alle HSMB. Det er fortsatt mye vi ikke vet om sykdomsutviklingen og hvorfor noen fisk blir syke mens andre ikke. HSMB ble første gang beskrevet i Norge i 1999 og har siden spredt seg langs hele norskekysten [3]. Sykdommen er karakterisert ved kraftig inflammasjon i hjerte og skjelettmuskel, og under et utbrudd finner man hjerteforandringer hos en stor andel av fiskene, og mortaliteten kan bli opptil 20 % [5]. PRV er vist å være årsaken til HSMB [1], men viruset var til stede i Norge minst 10 år før HSMB dukket opp [6]. I Canada er også PRV-1 vidt utbredt, men de har kun ett rapportert utbrudd av HSMB [7]. Tilstedeværelse av virus, men fravær av sykdom er også tilfelle på Færøyene. Smitteforsøk i Canada har ikke lyktes i å reprodusere HSMB [8,9]. Disse funnene indikerer at det kan finnes ulike varianter av PRV-1 som har ulik virulens, dvs evne til å fremkalle sykdom. For å kunne bekrefte denne hypotesen må man utføre standardiserte smitteforsøk der man smitter fisk med ulike varianter av viruset, men med samme dose.

PRV er et reovirus. De er nakne virus, det vil si at de ikke er omgitt av en membran, bygd opp av to proteinlag (kapsider) som pakker inn arvematerialet (genomet) som er dobbelttrådig RNA [2]. Genomet består av ti segmenter (L1-3, M1-3, S1-4) som koder for til sammen 12 virusproteiner [10]. Alle virus vil til enhver tid kunne endre seg for å tilpasse seg omgivelsene, og PRV gjør dette enten gjennom mutasjoner innen ett segment eller ved bytte ett eller flere segmenter med en annen stamme av PRV (reassortering). En virusegenskap vil kunne være knyttet til et bestemt segment eller en kombinasjon av mange segmenter. Tidligere studier har funnet sekvensforskjeller som kan være viktig for virulens [6], men hvilke segmenter som styrer dette er ikke bekreftet.

Et essensielt verktøy i all virusforskning er virus som er rensset, det vil si fritt fra annet cellulært materiale. Slikt materiale er et svært nyttig verktøy for å besvare basale virologiske spørsmål. Den vanligste kilden til rensing av virus er materiale fra dyrkning i cellekultur. Per i dag har dessverre ingen funnet en cellelinje som kan produsere de mengdene PRV som kreves for opprensing. Vi har nylig utarbeidet en metode for å rense PRV direkte fra infisert laks [1]. Dette er et svært nyttig forskningsverktøy og åpner for nye muligheter til å forstå og bekjempe PRV.

I dette prosjektet brukte vi rensset virus til å karakterisere viktige egenskaper ved PRV. Vi har undersøkt hva som skal til for å inaktivere PRV, bl.a. UV, jod, varme og pH. Vi har også undersøkt om det finnes virulensforskjeller mellom PRV-1 stammer og deres evne til å fremkalle HSMB, inkludert norske varianter fra både før og etter at HSMB ble et problem, samt en canadisk variant.

Prosjektomfang og organisering

FHF901305: PRV karakterisering – Inaktivering og virulens
FHF901529: PRV sekvensering

Prosjektstart 01.01.2017
Prosjektslutt 30.06.2020

Arbeidet omfattet to prosjekter. Det første prosjektet, PRV karakterisering – Inaktivering og virulens (FHF901305) studerte inaktivering av PRV og virulensforskjeller mellom PRV-1 stammer. Prosjektet ble ledet av NMBU ved prosjektleder Øystein Wessel og inkluderte Veterinærinstituttet, Nofima og VESO Vikan. Etter hvert ble det behov for å sekvensere og analysere genomet til PRV-1 isolatene brukt i forsøket. Dette arbeidet ble utført gjennom prosjektet «PRV sekvensering» (FHF901529) av NMBU og PatoGen. De to prosjektene var koordinerte og ble styrt som ett prosjekt med felles oppfølging, møter og referansegruppe, og de blir derfor presentert enhetlig i denne rapporten.

Prosjektleder

Øystein Wessel Veterinærhøgskolen, NMBU

Prosjektdeltagere

Espen Rimstad	NMBU Veterinærhøgskolen
Elisabeth F Hansen	NMBU Veterinærhøgskolen
Dhamotharan Kannimuthu	NMBU Veterinærhøgskolen
Turhan Markussen	NMBU Veterinærhøgskolen
Maria K Dahle	Veterinærinstituttet
Gerrit Timmerhaus	Nofima
Marie Løvoll	VESO Vikan
Makoto Inami	VESO Vikan
Magnus Devold	PatoGen
Morten Lund	PatoGen
Håvard Aanes	PatoGen

Ansvar/roller

NMBU Veterinærhøgskolen	Prosjektledelse, forsøksdesign, virusanalyser, sekvensanalyser
Veterinærinstituttet	Histopatologi, immunrespons analyser
Nofima	Microarray analyser
VESO Vikan	Smitteforsøk
PatoGen	Sekvensering

Observatør fra FHF

Sven Martin Jørgensen

3. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Målsetningen i prosjektet var å frembringe kunnskap som kan brukes for å redusere mengden PRV og sykdom relatert til virusinfeksjonen i oppdrettsnæringen. For å oppnå dette ønsket vi å undersøke hva som skal til for å inaktivere PRV. I tillegg ville vi studere om det finnes virulensforskjeller mellom PRV-1 isolater samt finne sekvensmarkører som skiller høy og lav-virulente isolater.

NYTTEVERDI

Prosjektet vil gi spesifikk kunnskap om effekt av bl.a. UV, jod og varme på inaktivering av PRV. Dette vil gi næringen informasjon som kan brukes som målrettede biosikkerhetstiltak mot viruset, spesielt med tanke på å holde ferskvannsfasen fri for PRV-1. Dette vil være spesielt viktig i forsvar mot et virus som PRV, der man verken har effektive vaksiner eller genetisk vertsresistens.

Prosjektet vil avklare om det er virulensforskjeller mellom PRV-1 isolater. Det vil avdekke om man kan differensiere mellom høy- og lav-virulente varianter, noe som kan være til stor nytte for næringen og muliggjøre målrettede tiltak mot de variantene som gir mest sykdom.

Samlet vil prosjektet kunne bidra til bedre fiskehelse gjennom kunnskap om hvordan man kan begrense mengden og effekten av PRV infeksjon hos norsk oppdrettslaks.

4. GJENNOMFØRING, RESULTATER, DISKUSJON, KONKLUSJON

Prosjektet var inndelt i tre arbeidspakker. Arbeidspakke 1 (PRV inaktivering) og 2 (PRV virulens) tilhørte prosjektet PRV karakterisering (FHF901350), mens den siste arbeidspakken er i denne rapporten referert til som arbeidspakke 3 (PRV sekvensering) og tilhørte prosjektet PRV sekvensering (FHF901529).

Arbeidspakke 1 – PRV inaktivering

FORMÅL

AP1.1 Utvikle en smittemodell i fisk for å studere inaktivering av PRV

AP1.2 Studere effekten av ulike inaktiveringsmetoder inkludert UV, jod, varme, pH og Virocid

UTVIKLING AV MODELL FOR INAKTIVERINGSFORSØK (AP1.1)

GJENNOMFØRING

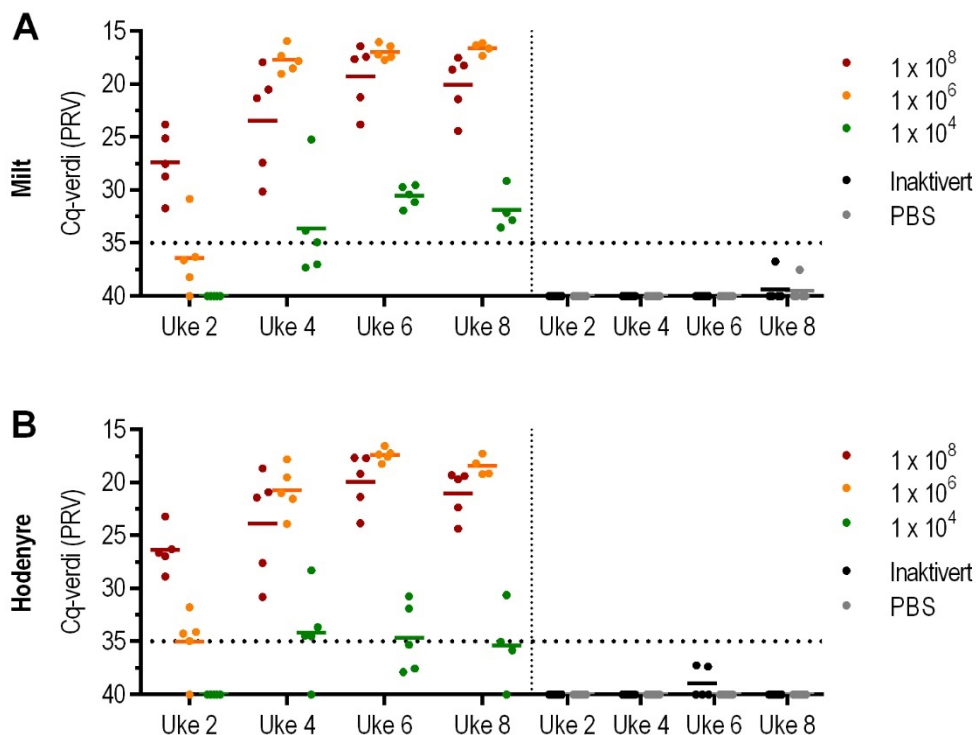
Det ble gjennomført ett smitteforsøk (105 fisk) der tre grupper fisk ble smittet intramuskulært med henholdsvis høy (10^8 kopier/fisk) (kopier = antallet virus genom), medium (10^6 kopier/fisk) eller lav dose PRV (10^4 kopier/fisk) for å optimalisere dose, tidspunkt for prøvetaking og målorgan for virusanalyse. I tillegg inkluderte forsøket to grupper som ble smitte med henholdsvis PBS (saltvannsoppløsning) eller høy dose PRV som var inaktivert (85°C , 25 min) for å studere muligheten for falske positive resultater. Fisken som ble brukt var parr av Atlantisk laks (startvekt 5 g). Forsøket ble utført i ferskvann ved 12°C over 8 uker, med prøvetaking av milt og hodenyre 2, 4, 6 og 8 uker etter smitte. Total RNA ble isolert fra vevsprøvene, og det ble undersøkt for PRV RNA ved hjelp av RT-qPCR [11].

Smitteforsøket ble gjennomført på VESO Vikan. Preparering og inaktivering av virus, samt virusanalyser ble utført av NMBU.

RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

Ved høy- og medium dose PRV ble det funnet store mengder virus RNA i milt ved 4, 6 og 8 uker etter smitte (Figur 1A). Selv om det var noe mindre virus i medium-dose gruppen ved 2 wpc var det minst like mye virus fra 4-8 uker etter smitte sammenliknet med høy-dose gruppen. I gruppen lav-dose gruppen var det ikke mulig å detektere virus RNA i milt ved 2 uker, og fra 4-8 uker ble det kun detektert lave mengder (Figur 1A). Resultatene fra hodenyre var relativt like milt, men med en tendens til generelt lavere mengder detektert (Figur 1B). I gruppene gitt PBS og inaktivert virus ble det kun registrert ett par positive prøver i milt og hodenyre gjennom forsøket med Cq-verdier mellom 35-40 (Figur 1). Dette representerte trolig uspesifikk amplifikasjon eller rester av inaktivert virus.

Basert på funnene ble det bestemt ble det bestemt at standard dose i modellen skulle være 10^7 kopier/fisk med prøvetaking av milt 4, 6 og 8 uker etter smitte. Det ble satt en Cq-grense på 35 for å minimere risikoen for falske positive i modellen.



Figur 1. Utvikling av smittemodell for inaktiveringsstudier. Tre grupper smittet med ulik mengde PRV inkludert høy (10^8 koper/fisk - rød), medium (10^6 koper/fisk - gul) og lav dose PRV (10^4 koper/fisk - grønn), i tillegg til en gruppe gitt inaktivert PRV tilsvarende høy dose (svart) og en gitt PBS (saltvann - grå). Mengden PRV RNA målt med RT-qPCR i milt (A) og hodenyre (B) vist som individuelle og gjennomsnitt Cq-verdi (n=5) fra 2 til 8 uker etter smitte. Prikkete linje markerer Cq-verdi på 35.

PRV INAKTIVERINGSFORSØK (AP1.2)

GJENNOMFØRING

PRV ble eksponert for ulike fysiske og kjemiske behandlinger for å undersøke hva som skal til for å inaktivere viruset. Det ble benyttet en standardisert mengde rensset virus, men ved temperaturbehandling ble også PRV i blodceller brukt for å undersøke en mulig beskyttende effekt av organisk materiale.

Følgende behandlinger ble testet

- Temperatur 85°C 25 min, 76°C 20 min, 56°C 30 min
- pH pH3 30min, pH12 30min
- UV 25, 50, 100, 200, 300 mJ/cm²
- Jod 50ppm 10min, 100ppm 5min, 100ppm 10min, 100ppm 20min, 200ppm 10min
- Virocid 0.5%, 1%, 1.5%, 2% (30min 4°C)

For å undersøke tilstedeværelse av infektivt virus etter behandlingene ble smitte modellen utviklet i AP1.1 benyttet. Forsøkene inkluderte totalt tre smitteforsøk med totalt 810 Atlantisk laks (parr, startvekt 5 g) og ble utført i ferskvann ved 12°C. Hvert forsøk inkluderte en positiv kontroll gruppe injisert med ubehandlet virus, og negativ kontroll gruppe injisert med inaktivert virus (85°C 25 min). For hver virusinaktivering ble 30 fisker injisert intramuskulært med den behandlede virusprøven tilsvarende 10⁷ kopier/fisk (0.1mL). Fiskene ble holdt i separate tanker i 8 uker og det ble tatt prøver av milt fra 10 fisk ved 4, 6 og 8 uker etter smitte. Total RNA ble isolert fra vevsprøvene og det ble undersøkt for PRV RNA ved hjelp av RT-qPCR [11].

RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

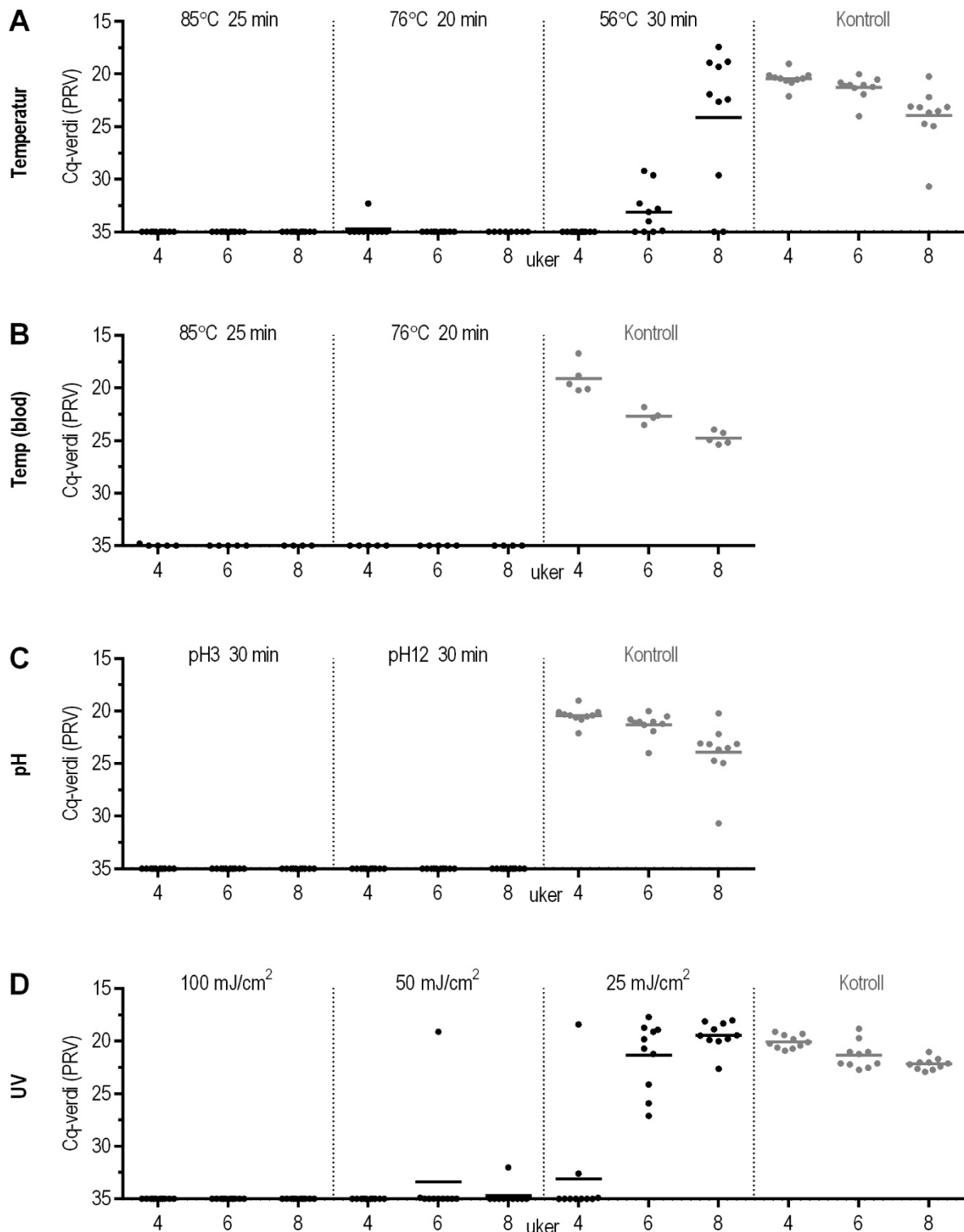
Temperatur

PRV ble inaktivert etter 85°C i 25 min, ettersom virus RNA ikke ble detektert på noe tidspunkt etter injeksjon (Figur 2A). Etter varmebehandling ved 76°C i 20min var en av ti fisk positive 4 uker etter smitte, men PRV ble ikke detektert ved de påfølgende tidspunktene 6 og 8 uker etter smitte (Figur 2A). Fravær av økende virusmengde tolkes som at PRV ble inaktivert. Inaktivering ble også observert ved behandling av PRV i blod under de samme betingelsene (Figur 2B). Dette viser blodceller ikke har noen beskyttende effekt under de gitte betingelsene. Til slutt ble varmebehandling ved 56°C i 30 min undersøkt. Alle prøvene var negative etter 4 uker, men ved 6 uker var sju av ti fisk positive med økende mengder observert 8 uker etter smitte (Figur 1A). Den økende mengden PRV bekrefter replikasjon og at behandlingen ikke var nok til å inaktivere PRV.

Varmebehandling ved 85°C i 25 min og 76°C i 20 min er parametere som er brukt til prosessering av biprodukter fra oppdrettsnæringen [12]. Forsøkene i dette prosjektet viser at PRV inaktiveres under disse betingelsene. Resultatene viser likevel at PRV er relativt varmeresistent, da 56°C i 30 min ikke var nok til å inaktivere viruset.

pH

PRV ble inaktivert ved både pH3 og pH12 i 30 min (Figur 1C). Til sammenlikning er mammalsk reovirus kjent for å tåle relativt ekstreme forhold inkludert pH2 til pH9 [13]. En oppfølgingsstudie vil kunne gi mer detaljert informasjon om stabiliteten til PRV i området pH3 til pH12.



Figur 2. Inaktivering ved temperatur, pH og UV. Effekt av inaktiveringsbehandling målt i smittemodell. (A) Temperaturinaktivering ved 85°C 25 min, 76°C 20 min og 56°C 30 min. (B) Temperaturinaktivering av PRV i blod ved 85°C 25 min og 76°C 20 min. (C) pH inaktivering ved pH3 og pH12 i 30 min. (D) UV-inaktivering ved vist ved 100, 50 og 25 mJ/cm². Behandlede prøver vist i svart, ikke-behandlet kontroll vist i grå (høyre side). Mengden PRV RNA målt med RT-qPCR i milt vist som individuelle og gjennomsnitts Cq-verdi ved 4, 6 og 8 uker etter smitte. (A, C, D: n=10, B: n=5).

UV

PRV ble inaktivert etter eksponering for en UV dose på 300, 200 og 100 mJ/cm², da PRV RNA ikke ble detektert på noen av tidspunktene i forsøket (Figur 2D, kun 100 mJ/cm² presentert). Etter UV dose på 50 mJ/cm² ble PRV ikke detektert etter 4 uker, men funnet i to av ti fisk etter 6 uker, inkludert en fisk med relativt høye mengder virus, og videre i en fisk 8 uker etter smitte (Figur 2D). Dette indikerer at ikke alt virus ble inaktivert ved UV behandlingen. Etter UV-dose på 25 mJ/cm² ble PRV funnet i to av ti fisk 4 uker etter smitte og i alle fiskene etter 6 og 8 uker (Figur 2D). Resultatene viste at 25 mJ/cm² UV ikke er nok til å inaktivere PRV.

Forsøkene viste at det kreves minst en UV-dose på 50 mJ/cm² for å inaktivere PRV. Til sammenlikning er det rapportert at det kreves mellom 118 til 246 mJ/cm² for inaktivering av IPNV [14-16]. Selv om modellen brukt for PRV i denne studien ikke er direkte sammenliknbar med testing i cellekultur som for IPNV, tyder resultatene på at IPNV er mer resistent mot UV enn hva PRV er. De fleste UV systemene som benyttes i Norge i dag er dimensjonert etter krav i forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet. Et vanlig brukt dimensjoneringskrav er da en teoretisk beregnet UV-dose på 25 mJ/cm², som ikke vil være nok for å inaktivere PRV. Dersom man har en målsetning å holde laksen fri for PRV i ferskvannsfasen, bør UV dosen vurderes.

Jod

Ulike konsentrasjoner og eksponeringstid ved jod-behandling ble undersøkt. Ved alle konsentrasjoner som ble testet, inkludert 200 ppm, 100 ppm og 50 ppm i 10 min, ble PRV inaktivert (Figur 3A, øverst). PRV ble også inaktivert ved 100 ppm behandling i 20 min, 10 min og 5 min (Figur 3A, nederst). Resultatene viser at PRV er sensitivt for jod og at dagens standard behandling (100 ppm, 10 min) er nok til å inaktivere PRV.

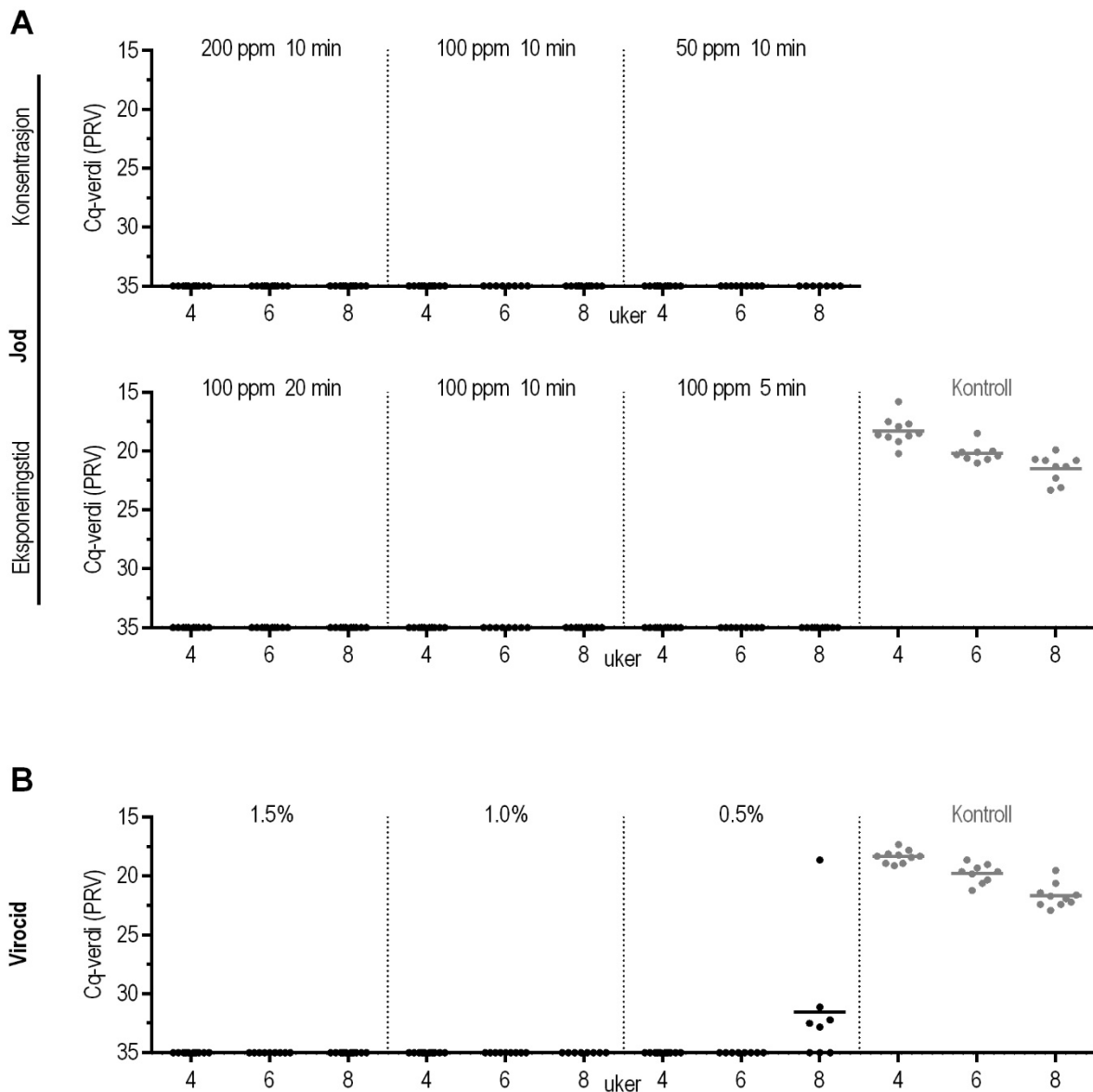
Det er viktig å bemerke at under praktiske forhold vil effektiv desinfeksjon av egg kreve inaktivering av frie viruspartikler og virus som er til stede inne i røde blodceller. Røde blodceller er en viktig målcelle for PRV og blodkontaminering under befruktning ved bruk av PRV infisert stamfisk vil trolig inkludere PRV-infiserte erythrocytter. Effekten av jod på PRV i røde blodceller ble ikke undersøkt i denne studien.

Virocid

Virocid, et kommersielt tilgjengelig desinfeksjonsmiddel, ble testet for effekten på PRV inaktivering. Resultatene viste at ved behandling på 2 %, 1.5 % og 1 % i 30 min ved 4 °C ble PRV inaktivert (Figur 3B). Behandling ved 0.5 % i 30 min ved 4 °C var derimot ikke nok til å inaktivere PRV. PRV ble ikke detektert ved 4 eller 6 uker, men ved 8 uker etter smitte var alle fiskene positive for PRV (Figur 3B). Resultatene viser at 1 % Virocid kreves for inaktivering av PRV.

Inaktiveringsmodell: Ett nytt verktøy for PRV

Modellen som ble utviklet og brukt i prosjektet bidro til å frembringe ny viktig kunnskap om hva som kreves for å inaktivere PRV. Smittemodellen var reproducerbar og muliggjorde en ikke-kvantifiserbar deteksjon av infektivt PRV. Modellen vil kunne brukes i fremtidige inaktiveringsstudier av PRV, både som oppfølging av denne studien og for å teste effekten av andre desinfeksjonsmetoder.



Figur 3. Inaktivering ved jod og Virocid. Effekt av inaktiveringsbehandling målt i smittemodell. (A) Jod-behandling ved følgende konsentrasjoner: 200ppm, 100ppm og 50ppm i 10min (oppe) og følgende eksponeringstid: 100ppm ved 20min, 10min, 5min (nede). (B) Virocid-behandling ved 1.5%, 1.0% og 0.5% i 30 min. Behandlede prøver vist i svart, ikke-behandlet kontroll vist i grå (høyre side). Mengden PRV RNA målt med RT-qPCR i milt vist som individuelle og gjennomsnitt Cq-verdi (n=7-10) ved 4, 6 og 8 uker etter smitte.

Arbeidspakke 2 – PRV virulens

FORMÅL

AP2.1 AP2.3 Oppformering og rensing av ulike PRV-1 isolater

AP2.2 AP2.4 Sammenlikne ulike PRV-1 isolaters evne til å fremkalle HSMB

I arbeidspakken var det planlagt to smitteforsøk for å sammenlikne virulensen til ulike PRV-1 isolater. I hvert forsøk skulle tre utvalgte PRV-1 isolater oppformerer og renses (AP2.1, AP2.3) og brukes som smitte materiale i hvert sitt virulensforsøk (AP2.2, AP2.4). En teknisk svikt under gjennomføring av første virulensforsøk (AP2.2) satte begrensninger på informasjonen man kunne hente ut av forsøket. Det ble derfor bestemt å utvide påfølgende virulensforsøk (AP2.4) til å inkludere seks PRV-1 isolater slik at alle kunne kjøres parallelt i samme forsøk. Dette forsøket ble gjennomført etter planen og er grunnlaget for resultatene i rapporten.

OPPFORMERING AV VIRUS (AP2.1 AP2.3)

GJENNOMFØRING, RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

Isolater

Seks PRV-1 isolater ble valgt ut til studien: to norske feltisolater (NOR-2018/NL, NOR-2018/SF), tre historiske norske isolater (NOR-1988, NOR-1996, NOR-1997) og ett canadisk isolat (CAN 16-005ND). De to norske feltisolatene ble innhentet i 2018 fra to sjøanlegg i henholdsvis Sogn og Fjordane (NOR-2018/SF) og Nordland (NOR-2018/NL). De tre historiske norske isolatene NOR-1988, NOR-1996 og NOR-1997 stammet alle fra sjøanlegg i Norge henholdsvis to, tre og sju år før HSMB ble beskrevet, og ble funnet etter screening av arkivmateriale ved NMBU Veterinærhøgskolen og Veterinærinstituttet. Det canadiske isolatet (CAN 16-005ND) ble gitt av Kyle Garver (Fisheries and Oceans Canada) og har vært brukt i smitteforsøk i Canada uten å reprodusere hjerteforandringene ved HSMB [8,9].

Oppformering

For å kunne lage et standardisert smitte materiale med rensed virus kreves blodprøver med store mengder virus. I ett oppformeringsforsøk ble materiale av hvert enkelt isolat injisert i Atlantisk laks (StofnFiskur Optimal), og blodprøver ble samlet inn ukentlig frem til 4 eller 5 uker etter smitte. Mengden virus RNA og virus protein i blod ble målt ved henholdsvis RT-qPCR og flowcytometri. En blodprøve fra hvert isolat med høye mengder virus ble brukt som utgangspunkt for rensing av virus. De utvalgte blodprøvene hadde følgende Cq-verdier: NOR-2018/SF Cq 15.3, NOR-2018/NL Cq 15.7, NOR-1988 Cq 17.9, NOR-1996 Cq 15.7, NOR-1997 Cq 15.4, CAN 16-005ND Cq 19.6.

Rensing

Virus ble reset fra cellulært materiale, separert ut ved hjelp av ultrasentrifugering på en tetthetsgradient av cesiumklorid (CsCl-gradient) og lagret i saltvannsløsning (PBS). Detaljert protokoll for rensing av PRV er publisert tidligere [1]. Prøvene med rensed virus ble inspisert med elektronmikroskopi for å verifisere tilstedeværelse av viruspartikler. Virusmengden ble kvantifisert ved hjelp av absolutt kvantitativ qPCR som gav hver prøve et viruskopitaltall per mL. Virusbatchene hadde følgende kopitaltall: NOR-2018/SF 7.3×10^9 kopier/mL, NOR-2018/NL 2.4×10^{10} kopier/mL, NOR-1988 4.0×10^9 kopier/mL, NOR-1996 1.6×10^{10} kopier/mL, NOR-1997 8.1×10^{10} kopier/mL, CAN 16-005ND 2.8×10^9 kopier/mL. Prøvene ble lagret i 15 % glycerol ved -80 °C til de ble brukt. Rett før smitte ble prøvene tint og fortynt i saltvannsløsning til standard dose på 5×10^7 kopier per fisk (0.1 mL).

Oppformeringsforsøket ble utført av VESO Vikan. Virusanalyser og rensing av virus ble utført av NMBU Veterinærhøgskolen.

VIRULENSFORSØK (AP2.2 AP2.4)

GJENNOMFØRING

Det ble gjennomført ett smitteforsøk for å sammenlikne de seks PRV-1 isolatene beskrevet over. Forsøket inkluderte totalt 500 smolt av atlantisk laks (StofnFiskur Optimal) med en startvekt på 95 g. I forkant av forsøket ble populasjonen bekreftet fri for kjente fiskepatogener, inkludert PRV-1. Smitteforsøket ble utført på sjøvann med 32 ‰ salinitet ved 12 °C og kontinuerlig lys. Forsøket hadde blitt godkjent av Mattilsynet (#11251).

Smitteforsøket inkluderte seks grupper med PRV-1 isolatene NOR-2018/NL, NOR-2018/SF, NOR-1988, NOR-1996, NOR-1997, CAN 16-005ND og en negativ kontrollgruppe. I hver gruppe ble 70 fisk smittet intramuskulært med en standardisert dose rensert virus på 5×10^7 kopier per fisk (0.1 mL). Kontrollgruppen ble injisert med saltvann.

Etter 1, 2, 3, 4, 6, 8 og 10 uker etter smitte ble det tatt ut 10 fisk fra hver gruppe. Det ble tatt blodprøver for å måle hemoglobinkonsentrasjonen (HemoCue) samt undersøke blodceller og plasma for virus RNA (RT-qPCR) og virus protein (flowcytometri og western blotting). I tillegg ble den medfødte immunresponsen i blodceller undersøkt ved hjelp av RT-qPCR, samt at det ble utført en transkriptom-analyse av blodceller ved hjelp av microarray. Vevsprøver ble tatt fra hjerte, milt, hodenyre og lever. Hjerteprøvene ble undersøkt for histopatologiske forandringer og scoret blindt på en skala 0-3 som tidligere publisert [1]. Hjertene ble også undersøkt for virus RNA ved hjelp av RT-qPCR og *in-situ* hybridisering.

Smitteforsøket ble utført av VESO Vikan. Virusanalyser i blod og organer ble utført av NMBU. Veterinærinstituttet hadde ansvar for histopatologi og analyser av medfødt immunrespons, mens microarray-analyse av blod ble utført av Nofima.

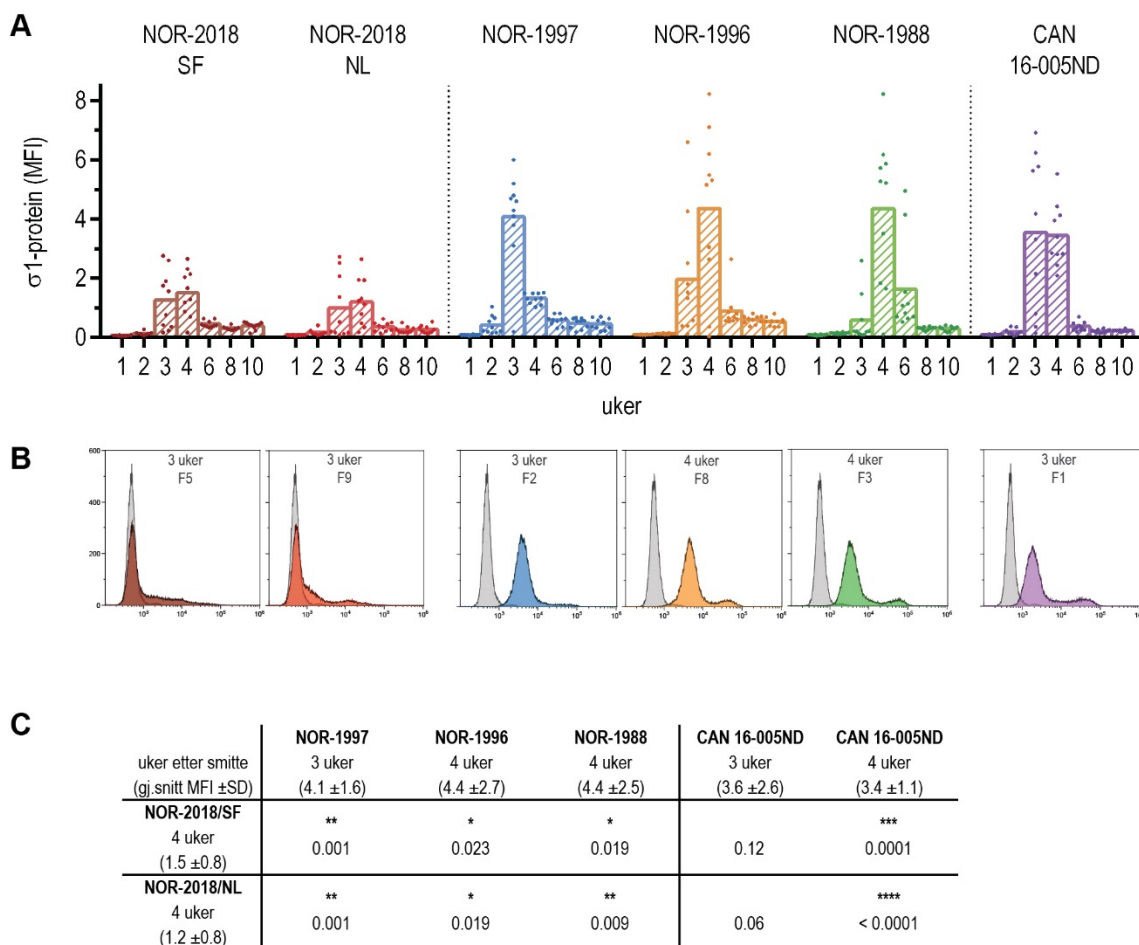
RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

Seks PRV-1 isolater ble sammenliknet i studien med fokus på virusreplikasjon i blod og hjerte, samt utvikling av hjerteslesjoner og vertsrespons. Isolatene inkludert to norske feltisolater fra 2018 (NOR-2018/NL, NOR-2018/SF), tre historiske norske isolater innhentet før HSMB ble beskrevet (NOR-1988, NOR-1996, NOR-1997) og ett canadisk isolat (CAN 16-005ND).

Virus i blodceller

I første fase av infeksjonen infiserer PRV-1 røde blodceller. Forsøket viste at mengden PRV-protein i blodcellene varierte mellom gruppene, målt som deteksjon av $\sigma 1$ -protein ved flowcytometri (Figur 4). Alle gruppene nådde en virustopp i blodceller 3-4 uker etter smitte, men det var signifikant lavere mengder i NOR-2018 isolatene (NOR-2018/NL, NOR-2018/SF), enn i de tre historiske norske (NOR-1988, NOR-1996, NOR-1997) og isolatet fra Canada (Figur 4A, C). Ved toppunktet ble virusprotein kun detektert i en mindre andel av blodcellene i NOR-2018 isolatene, mens alle blodcellene var positive i de norske historiske og canadiske isolatene (Figur 4B).

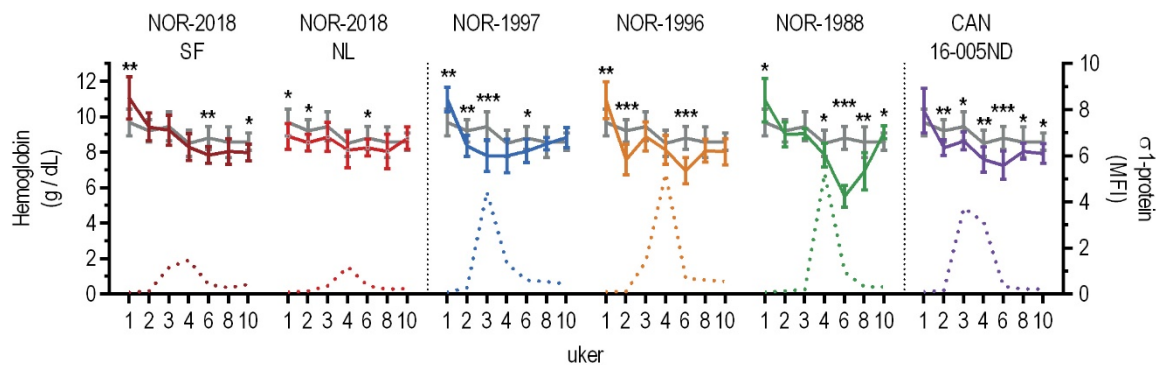
Mengden PRV RNA ble også målt i blodcellene ved hjelp RT-qPCR. Toppunktet av virus RNA sammenfalt i tid med virusprotein, men forskjellen observert i protein kom ikke frem ved deteksjon av RNA (data ikke vist).



Figur 4. PRV protein i blodceller. (A) Mengde PRV σ 1-protein i blodceller målt med flowcytometri, vist som gjennomsnittlig fluorescens intensitet (MFI) av enkeltfisk og gruppegjennomsnitt for NOR-2018/SF (mørke rød), NOR-2018/NL (rød), NOR-1997 (blå), NOR-1996 (oransje), NOR-1988 (grønn) og CAN 16-005ND (lilla). (B) Histogram av en enkeltfisk ved virustopp fra hver gruppe, MFI for σ 1-protein på X-aksen og antall celler på Y-aksen (30 000 celler per prøve). Fargekodet som over med negativ kontroll fisk (grå) lagt bak. (C) Statistisk sammenlikning av gjennomsnitt MFI ved virustopp (Mann-Whitney test) for NOR-2018/SF og NOR-2018/NL mot NOR-1997, NOR-1996, NOR-1988 og CAN 16-005ND. Resultater vis som p-verdi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

Hemoglobin

Hemoglobinkonsentrasjonen i blod ble undersøkt for å se om de ulike isolatene forårsaket anemi som en følge av replikasjon i de røde blodcellene. I alle gruppene ble det observert en reduksjon i hemoglobin ved eller rett etter virustoppen i blod (Figur 5). Reduksjonen var mest uttalt i de historiske norske isolatene ved 3 uker for NOR-1997 og 6 uker for NOR-1996, NOR-1988 og det canadiske isolatet. Reduksjonen var mer moderat i de to norske NOR-2018 isolatene. Ved slutten av studien økte hemoglobinkonsentrasjonen i alle grupper til nivået i kontrollgruppen.



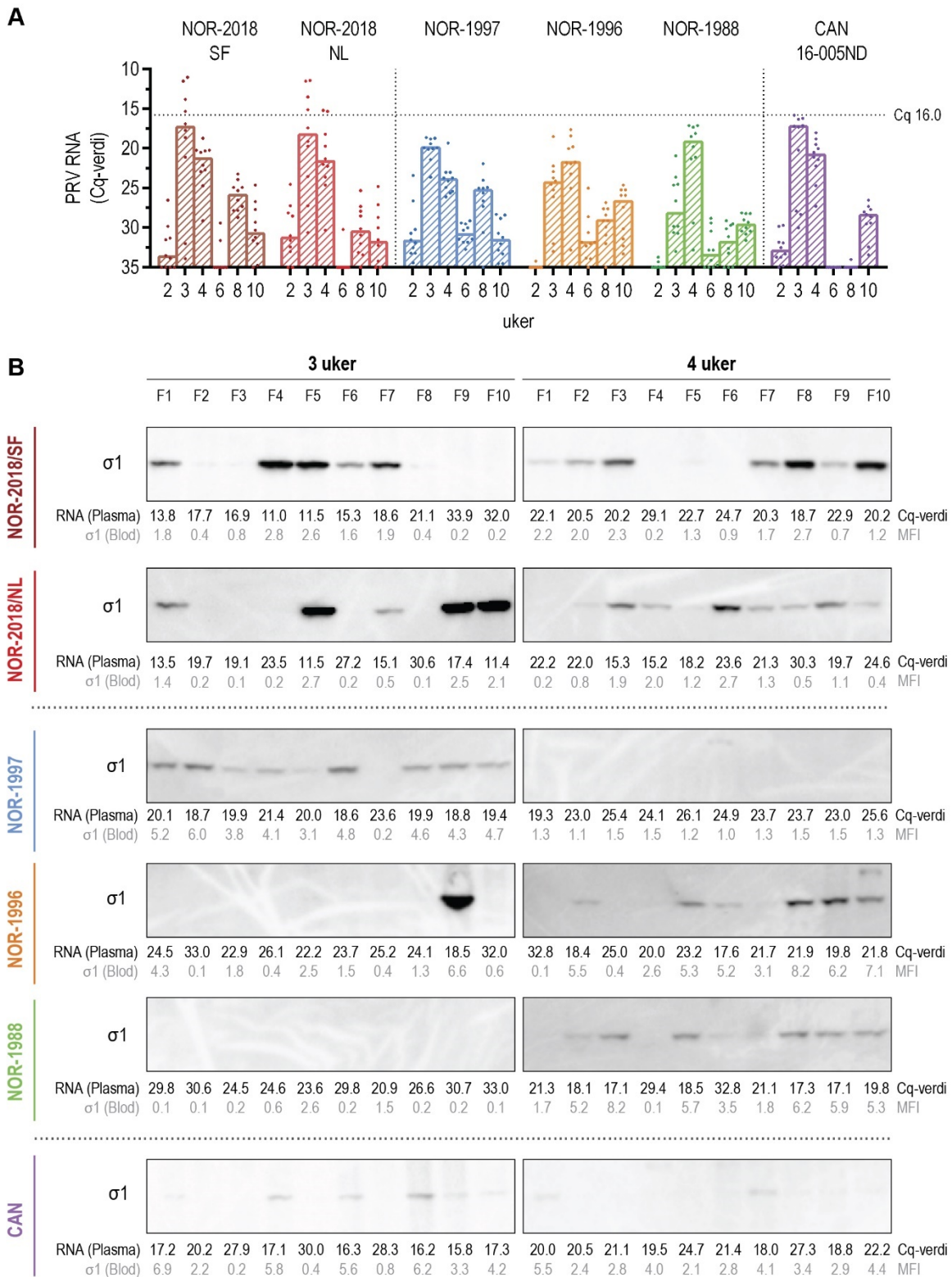
Figur 5. Hemoglobin. Hemoglobinkonsentrasjon (venstre Y-akse) presentert som gjennomsnitt og standardavvik for alle grupper (fargede linjer), med kontrollgruppe i bakgrunnen (grå linje). Statistisk sammenlikning av gjennomsnitt opp mot kontroll ved hvert tidspunkt (Mann-Whitney test), signifikante forskjeller markert med * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Mengde PRV σ 1-protein i blodceller vist under som prikkete linje for å indikere tidspunkt av virustopp i blod (høyre akse).

Virus i plasma

For å sammenlikne mengden utskilt virus etter replikasjon i de røde blodcellene ble mengden virus i plasma målt ved RT-qPCR (virus RNA) og western blotting (virus protein). Store mengder virus RNA ble detektert i plasma 3 uker etter smitte for begge de norske isolatene fra 2018: NOR-2018/SF median Cq 17.3, NOR-2018/NL median Cq 18.3 (Figur 6A). Ved dette tidspunktet hadde fire av ti fisk Cq-verdi under 16.0, inkludert individer med Cq ned til 11.0. Etter 4 uker var mengden virus RNA fortsatt høy, men noe redusert og uten de ekstreme mengdene observert ved 3 uker. Tilsvarende ble det også funnet store mengder virusprotein i plasma, spesielt 3 uker etter smitte da man så tydelige bånd ved western blotting deteksjon av σ 1-protein i halvparten av fiskene (Figur 6B).

Til sammenlikning ble det i de historiske norske og det canadiske isolatet også funnet relativt store mengder virus RNA i plasma 3-4 uker etter smitte, men verdiene var lavere og med fravær av de ekstreme verdiene observert i NOR-2018 isolatene (Figur 6A). Mengden virusprotein var også lavere, da kun svake bånd ble observert etter western blotting (Figur 6B). Funnene ble også verifisert ved deteksjon av andre virusproteiner ved hjelp av western blotting (data ikke vist).

Resultatene tyder på at infeksjon med NOR-2018 isolatene er assosiert med en kraftigere plasmaviremi, mens mindre mengder virus blir frigitt til plasma etter infeksjon med de historiske norske og det canadiske isolatet. Tidligere studier har antydnet forskjeller i mengden virus i plasma etter infeksjon med norske og canadiske isolater [1,9]. Våre resultater viser at selv om det tilsynelatende er mindre virusprotein i blodceller under infeksjon med NOR-2018 isolatene, så er det mer virus i plasma noe som kan skyldes for eksempel en mer effektiv frigjøring av virus til plasma, eller mindre binding til erythrocytters overflate. NOR-2018 isolatene er ikke assosiert med lavere hemoglobinkonsentrasjoner, noe som indikerer at virusutskillelse trolig involverer en ikke-lytisk frigjøringsmekanisme [17], eller, dersom færre erythrocytter har bundet NOR-2018 isolatene på overflaten, mindre fjerning av slike erythrocytter i milt. Forskjellen i plasmaviremi mellom isolatene kan ha direkte effekt på patogenesen og kan være en avgjørende virulensfaktor.



Figur 6. Plasmaviremi. (A) PRV RNA i plasma målt med RT-qPCR, vist som individuelle og median Cq-verdi 2-8 uker etter smitte. Vertikal prikkete linje marker Cq 16.0 (B) PRV σ 1-protein detektert i plasma ved hjelp av western blotting 3 og 4 uker etter smitte fra fisk F1-10 for hver gruppe. Listet under blottene er individuell RNA mengde i plasma (Cq-verdi) and σ 1-protein mengde i blodceller (MFI).

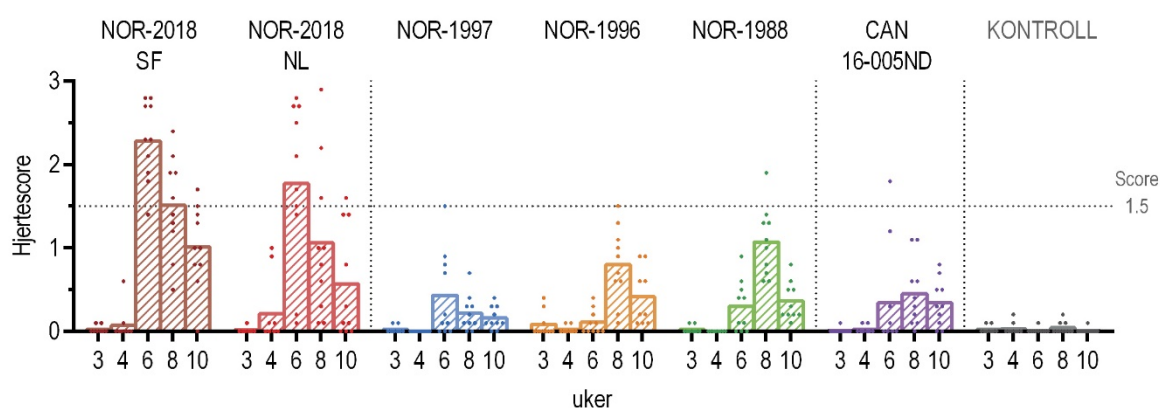
Hjerteforandringer

Hjertene ble score for histopatologiske forandringer for å sammenlikne isolatene sin evne til å fremkalle typiske HSMB-forandringer. Etter infeksjon med begge de norske 2018 isolatene ble det observert kraftige hjerteforandringer 6 uker etter smitte: NOR-2018/SF snitt score 2.3 ± 0.5 , NOR-2018/NL snittscore 1.8 ± 1.0 . Lesjonene var forenelig med de man finner ved HSMB med kraftig epikarditt og inflammasjon i kompaktum og spongiosum (Figur 8). Mot slutten av studien avtok hjerteforandringene.

I de historisk norske isolatene og det canadiske isolatet hadde hjerteforandringene signifikant lavere patologisk score (Figur 7). Lesjonene var mest uttalt ved uke 6 for NOR-1997 (0.4 ± 0.5) mens de kom først etter 8 uker for NOR-1996 (0.8 ± 0.6) og NOR-1988 (1.1 ± 0.4). Hjerteforandringer ble observert etter 6 uker for det canadiske isolatet, som nådde en topp 8 uker etter smitte (0.5 ± 0.4). Generelt var hjertelesjonene observert for de historiske norske og canadiske isolatet morfologisk like de som ble observert for de norske 2018 isolatene, men mindre alvorlige (Figur 8).

Forsøket viste at ulike PRV-1 isolater har ulik evne til å fremkalle HSMB. Det bør bemerkes at forandringene funnet i de lav-virulente isolatene var signifikant høyere enn kontrollgruppen og enkelt fisk ble funnet med hjertescore på 1.5 eller høyere. På gruppenivå skilte isolatene seg derimot tydelig med signifikante forskjeller mellom isolatene. Dette bekrefter at det er virulensforskjeller mellom PRV-1 isolater som åpner for målrettede tiltak mot de PRV-1 variantene som gir mest sykdom.

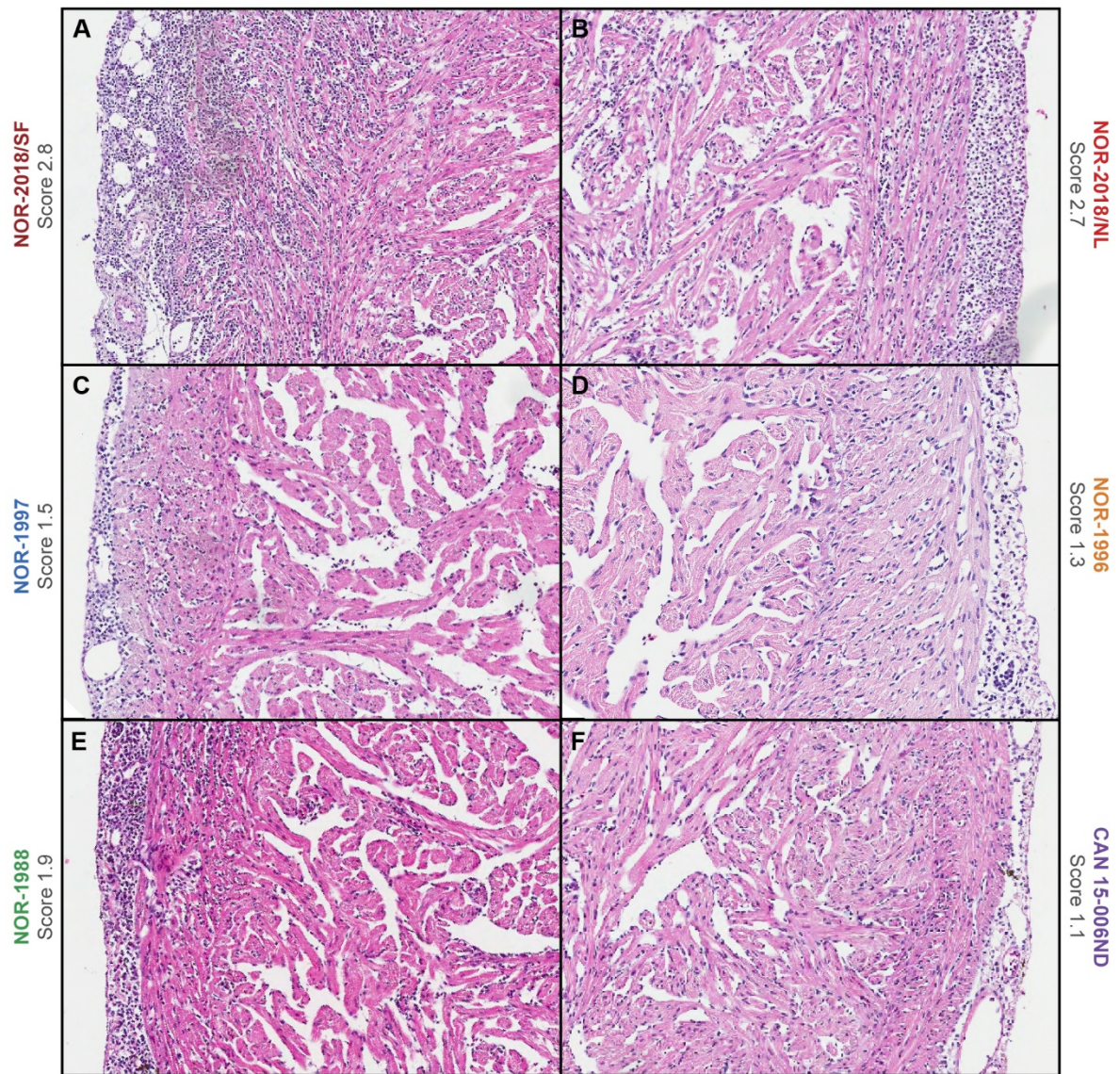
A



B

uker (gj.snitt score \pm SD)	NOR-1997 6 uker (0.4 ± 0.5)	NOR-1996 8 uker (0.80 ± 0.6)	NOR-1988 8 uker (1.1 ± 0.4)	CAN 16-005ND 8 uker (0.5 ± 0.4)
NOR-2018/SF 6 uker (2.3 ± 0.5)	*** < 0.001	*** < 0.001	*** < 0.001	*** < 0.001
NOR-2018/NL 6 uker (1.8 ± 1.0)	** 0.003	* 0.019	* 0.045	** 0.005

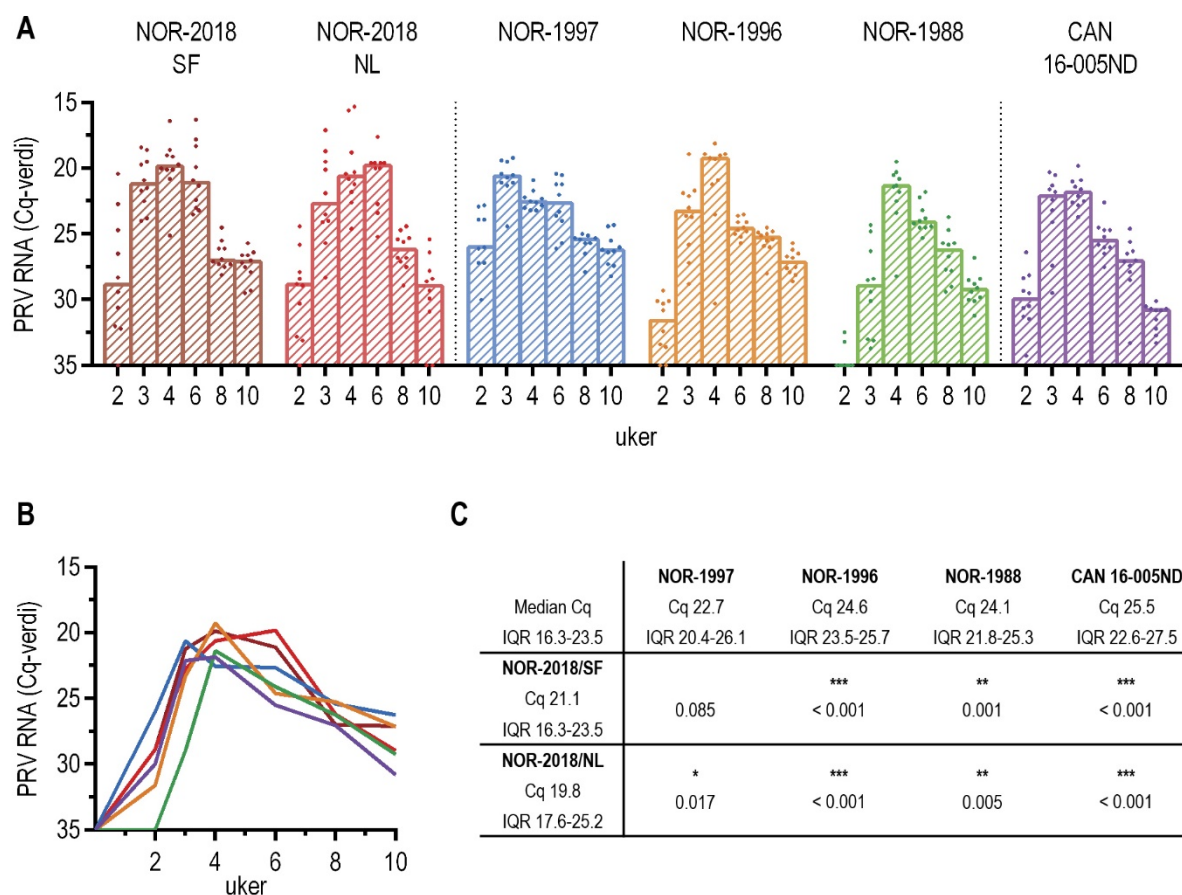
Figur 7. Hjertescore. (A) Totalt hjertescore vist som individuelle verdier og gjennomsnitt fra 3-10 uker etter smitte for alle seks PRV-1 isolatene (fargekodet) og kontroll gruppen (grå) (n = 10). (B) Statistisk sammenlikning av hjertescore i gruppe NOR-2018/SF og NOR-2018/NL opp mot NOR-1997 NOR-1996, NOR-1988 og canadisk isolat, CAN 16-005ND (Mann-Whitney test). Resultat vist som p-verdier (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).



Figur 8. Hjerteforandringer. Histopatologiske bilder som representerer de mest uttalte hjerteforandringene observert i hver gruppe. (A) NOR-2018/SF, 6 uker, score 2.8. (B) NOR-2018/NL, 6 uker, score 2.7. (C) NOR-1997, 6 uker, score 1.5. (D) NOR-1996, 8 uker, score 1.3. (E) NOR-1988, 8 uker, score 1.9. (F) CAN 15-006ND, 8 uker, score 1.1.

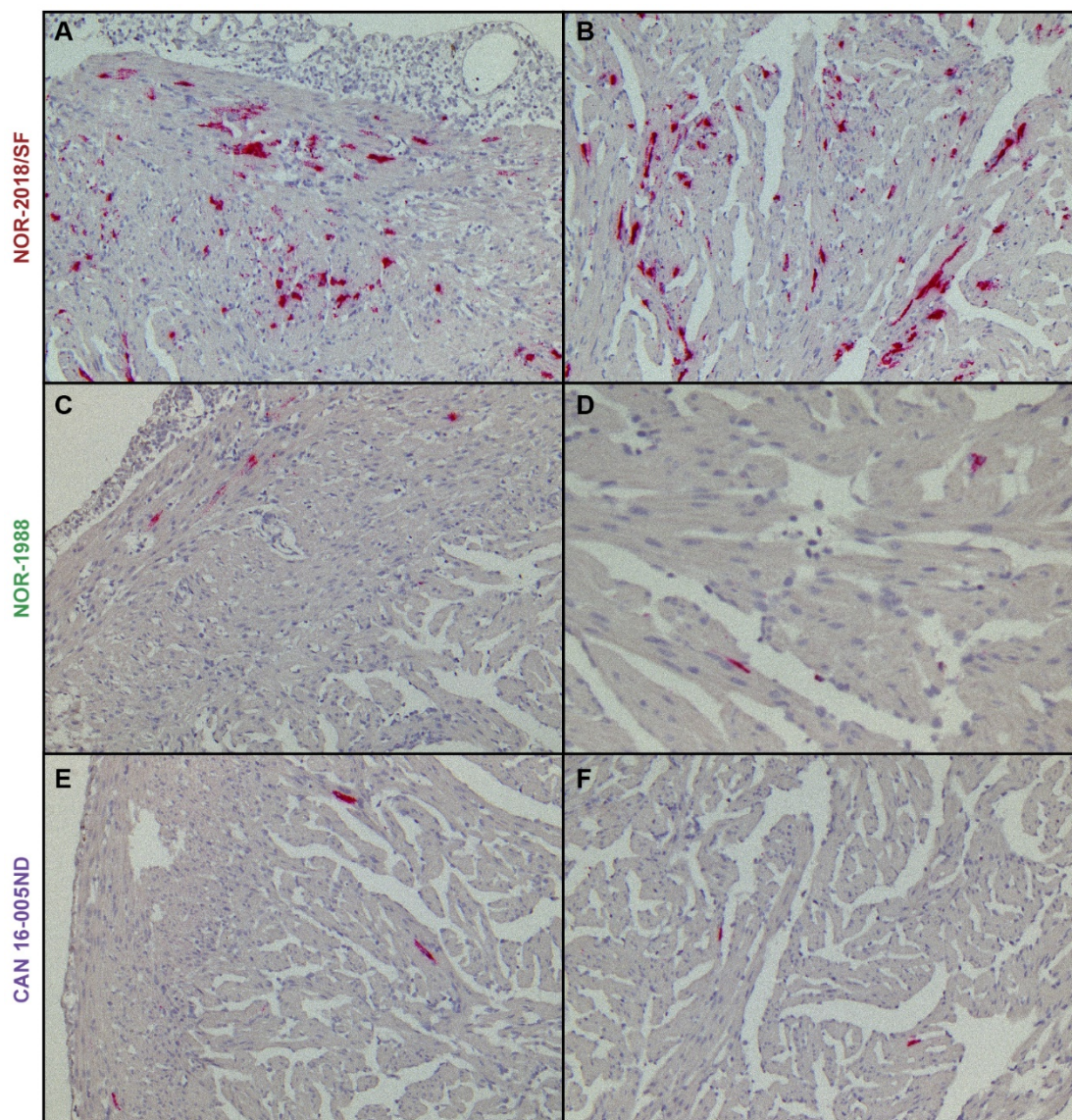
Virus i hjerte

Mengden virus RNA i hjerte ble målt ved RT-qPCR. I starten av infeksjonen var mengden virus RNA i hjerte relativt lik i alle grupper, med en tydelig økning opp til 3-4 uker etter smitte (Figur 6A, B). Etter 6 uker var det derimot en tendens til at mer virus ble detektert i hjertene fra gruppene med de norske 2018 isolatene (Figur 9 A, B). Dette skjer samtidig med at man fant kraftige hjerteforandringer (Figur 7). Mengden virus RNA ved 6 uker var signifikant høyere enn i de historiske norske og canadiske isolatet, bortsett fra når man sammenliknet NOR-2018/SF og NOR-1997 (Figur 6C). Det må tas i betraktning at virusdeteksjon i hjerte ved RT-qPCR ikke vil differensiere mellom virus fra kardiomyocytter og blodceller sirkulerende i hjerte ved prøvetaking.



Figur 9. Virus RNA i hjerte. (A) PRV RNA i hjerte målt med RT-qPCR, vist som individuelle og median Cq-verdi 2-8 uker etter smitte. (B) Median Cq-verdi for alle grupper. (C) Statistisk sammenlikning av median Cq-verdi ved 6 uker i gruppe NOR-2018/SF og NOR-2018/NL opp mot NOR-1997 NOR-1996, NOR-1988 og canadisk isolat, CAN 16-005ND (Mann-Whitney test). Resultat vist som p-verdier (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

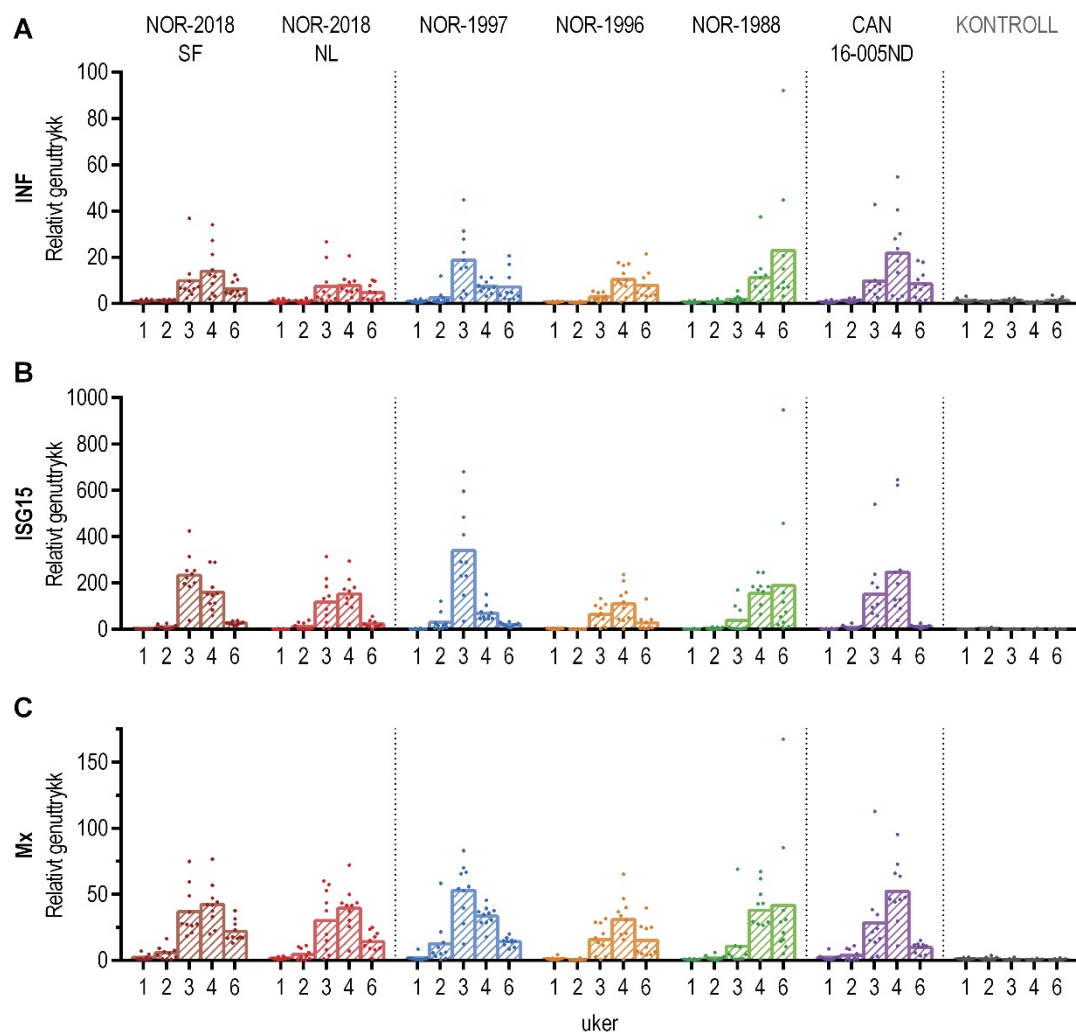
For å kunne sammenlikne virusmengden i kardiomyocytene bedre utførte vi *in-situ* hybridisering for PRV RNA deteksjon i hjertene 4-8 uker etter smitte for utvalgte isolater. Store mengder virus RNA ble detektert i kardiomyocytter 6 uker etter infeksjon med NOR-2018/SF isolatet, både i kompaktum (Figur 8A) og spongiosum (Figur 8B). Enkelte positive hjerteceller ble også funnet i kompaktum og spongiosum etter infeksjon med NOR-1988 (Figur 8C, D) og CAN16-005ND (Figur 8E,F). Resultatene tyder på at alle isolatene kan infisere kardiomyocytter, men de skilte seg derimot på mengde virus detektert. Denne forskjellen kan være relatert til mengden frigitt virus til plasma i forkant av utviklingen av hjertelejonene, hvor det var mer av 2018-isolatene enn av de andre isolatene.



Figur 10. *In-situ* deteksjon av PRV i hjertet. Deteksjon av PRV-1 i hjertet ved hjelp av *in-situ* hybridisering (rød farging) etter infeksjon med ulike PRV-1 isolater. (A, B) NOR-2018/SF: store mengder PRV detektert i kompaktum og spongiosum 6 uker etter smitte vist ved kraftig rød farging. (C, D) NOR-1988 og (E, F) CAN16-005ND: enkeltceller positive for PRV (rød farge) i kompaktum og spongiosum 6 uker etter smitte.

Immunrespons

For å sammenlikne den medfødte antivirale responsen i blod etter infeksjon med de ulike PRV-1 isolatene, ble uttrykket av utvalgte immungener undersøkt. I alle gruppene ble det observert en oppregulering av de antivirale genene: type I interferon (INF), interferonstimulert gen 15 (ISG 15) og myxovirus resistance GTPase (Mx). Genreguleringen fulgte samme mønster i alle de infiserte gruppene, med oppregulering 3-4 uker etter smitte, samtidig med virustopp i blod, etterfulgt av en reduksjon ved 6 uker. Det ble ikke funnet store forskjeller mellom isolatene, som ikke tyder på at induert medfødt immunrespons er knyttet til virulensforskjellene mellom isolatene.



Figur 11. Medfødt immunrespons i blod. Relativt genuttrykk av (A) type I interferon (INF), (B) interferonstimulert gen 15 (ISG 15) og (C) myxovirus resistance GTPas (Mx) etter infeksjon med seks ulike PRV-1 isolater (fargede) og ikke-infisert kontroll (grå) 1-6 uker etter smitte (n=10). Cq-verdi normalisert mot uttrykk av elongeringsfaktor (EF) 1 α i kontroll gruppe. Relativt genuttrykk vist som gjennomsnitt og individuelle verdier.

Transkriptomanalyse av blod

Det ble utført en transkriptomanalyse av mRNA i blodceller etter infeksjon med ulike PRV-1 isolater ved hjelp av microarray. Studien satte søkelys på vertsresponsen i blodceller ved virustoppen 3-4 uker etter infeksjon med NOR-2018/SF, NOR-1988 og CAN16-005ND. Generelt viste resultatene at infeksjon med de tre isolatene induserte en kraftig immunrespons, som var relativt lik i alle isolatene. Det ble derimot funnet en rekke andre gener som var uttrykt forskjellig etter infeksjon med ulike PRV-1 isolater. Datamengden i studien var betydelig, og det ble besluttet å utvide analysene ut over det rapporterte prosjektet. Arbeidet pågår og vil bli presentert i publikasjonsform senere.

Arbeidspakke 3 – PRV sekvensering

GJENNOMFØRING

PRV-1 isolatene i studien ble sekvensert, og fylogenetisk analyse av både nukleotid- og aminosyresekvens ble utført for å identifisere proteinkodende virusgen(er) som kan være knyttet til forskjellene mellom høy-virulente (NOR-2018/SF, NOR-2018/NL) og lav-virulente (NOR-1997, NOR-1996, NOR-1988, CAN16.005ND) isolater. Sekvensering ble utført av PatoGen, mens NMBU var ansvarlig for sekvensanalysene.

RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

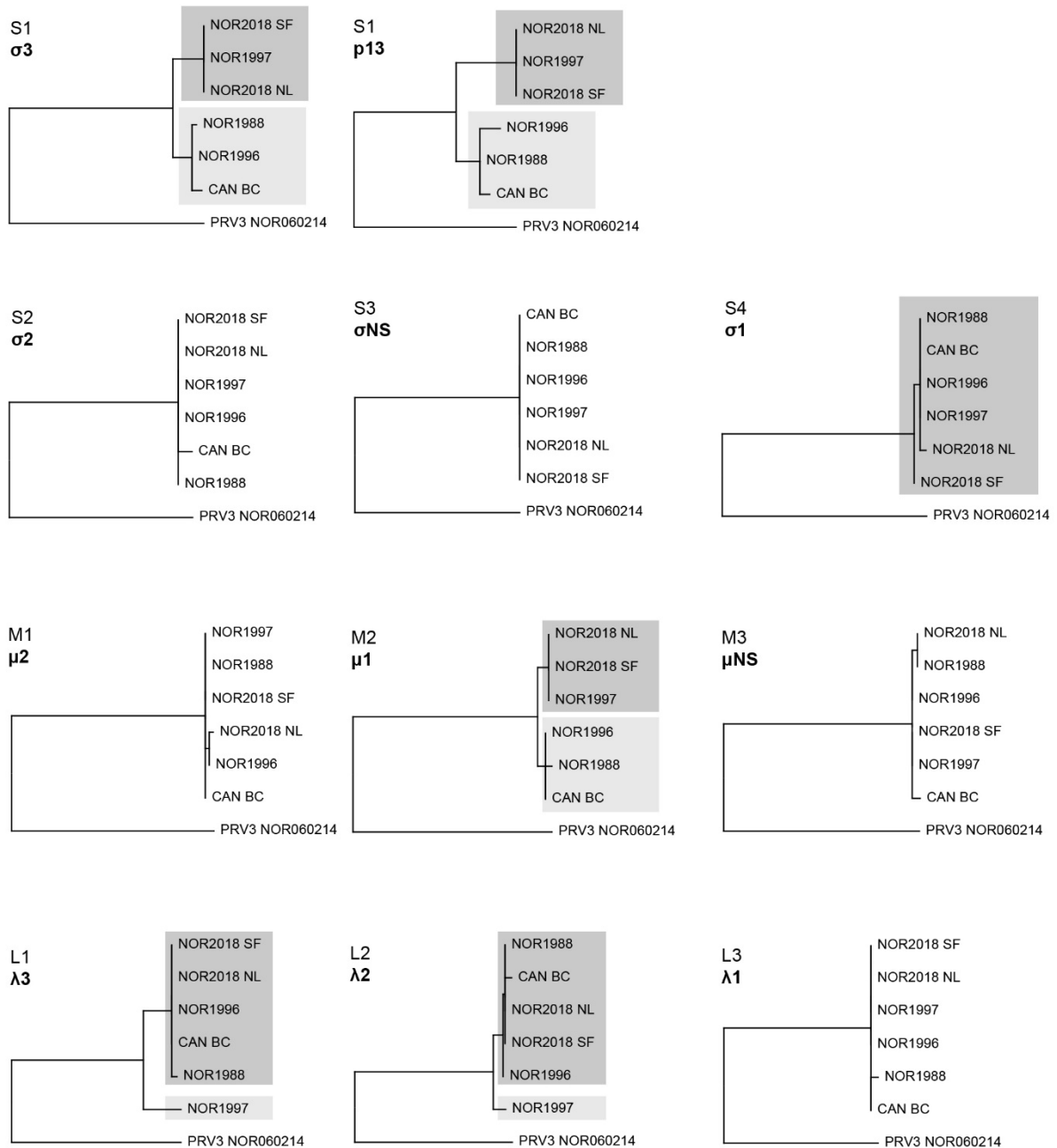
Sekvensforskjeller knyttet til forskjellen mellom høy- og lavvirulente isolater ble funnet i segment S1, S4, M2, L1 og L2

Segment S1 koder for to virusproteiner, σ_3 and p13 protein. Fylogenetisk analyse av aminosyresekvensen til disse to proteinene skilte isolatene i to tydelige grupper: den ene inkluderte NOR-1988, NOR-1996 og CAN16-005ND, mens de to norske isolatene NOR-2018/SF og NOR-2018/NL grupperte sammen med NOR-1997 med identisk aminosyresekvens (Figur 12). Den samme grupperingen ble observert for virusprotein μ_1 kodet på segment M2 (Figur 12). Segmentene S1 og M2 har tidligere vært foreslått knyttet til økt virulens [6]. Resultatene i denne studien viser en tydelig gruppering av disse to segmentene, men at de ikke alene kan forklare virulensforskjellene i og med at det lavvirulente isolatet NOR1997 her er identisk med de høy-virulente isolatene NOR-2018/SF og NOR-2018/NL. Ser man derimot samtidig på segment L1 og L2, som koder for henholdsvis λ_3 og λ_2 , så grupperer NOR-1997 separat, mens alle andre isolater har nesten identisk aminosyresekvens.

Resultatene tyder på at virulensforskjellene ikke er knyttet til et bestemt segment, men trolig er et resultat av en kombinasjon av flere segmenter. PRV kan endre seg gjennom mutasjoner innen et segment eller ved bytte av segmenter (reassortering). De tre historiske norske stammene inkludert i studien, NOR-1988, NOR-1996 og NOR-1997, var alle til stede i norsk laks før HSMB ble beskrevet i 1999. En hypotetisk rekombinasjon av disse isolatene, der man kombinerer S1 og M2 fra NOR-1997 med L1 og L2 fra enten NOR-1988 eller NOR-1996, vil kunne være opphav til ett virus som er nesten identisk med de norske 2018 isolatene.

Det ble også funnet sekvensforskjeller på segment S4 som koder for σ_1 (Figur 12). Den predikerte aminosyresekvensen til σ_1 var identisk hos de norske historiske og det canadiske isolatet. Det ble imidlertid funnet en enkelt aminosyreforskjell hos begge de norske 2018 isolatene, lokalisert på forskjellig sted i genet for σ_1 . Dette virusproteinet er av spesiell interesse, da σ_1 er antatt reseptorbindende protein for PRV, en funksjon som naturlig er knyttet til virulens. Hvis de to observerte aminosyreforskjellene hos de to NOR-2018 isolatene er knyttet til virulens vil de måtte ha samme funksjonelle effekt på tross av at de er lokalisert til forskjellige steder på virusproteinet.

Studien har identifisert variasjon i fem segmenter som skiller høy og lavvirulente PRV-1 isolater. Videre studier vil kunne avdekke prevalensen av de ulike variantene i norsk oppdrett, og prøve å beskrive den underliggende mekanismen bak virulensforskjellene. Resultatene bekrefter virulensforskjeller hos PRV-1. Dette åpner for målrettet sporing av og tiltak mot de høy-virulente variantene som har størst konsekvenser for fiskehelsen.



Figur 12. Sekvensanalyse. Fylogenetisk analyse av aminosyresekvensen av PRV proteinene fra alle isolatene i studien: NOR-2018/SF, NOR-2018/NL, NOR-1997, NOR-1996, NOR-1988, CAN 16-005ND. Proteiner med sekvensvariasjon som kan knyttes til virulens er markert i grått, der mørk grå indikerer økt virulens og lyse grå indikerer lavere virulens.

5. HOVEDFUNN

PRV INAKTIVERING

- Ny modell for å studere effekt av inaktivering
- UV dose på minst 50 mJ/cm³ må brukes for fullstendig inaktivering av PRV
- Jod-behandling (standard 100ppm, 10min) inaktiverer PRV
- Virocid (1%) inaktiverer PRV

PRV-1 VIRULENS

- Bekreftet virulensforskjeller mellom PRV-1 isolater
- Høyvirulente varianter viser høyere plasmaviremi og gir kraftigere hjerteforandringer
- Sekvensforskjeller funnet i L1, L2, M2, S1, S4

6. LEVERANSER

Leveranser i prosjektet er listet opp under inkludert presentasjoner og publikasjoner relatert til prosjektet samt møter med referansegruppe og statusrapporter underveis i prosjektet.

Presentasjoner

- | | |
|------------|---|
| 18.04.2018 | Havbruk, Oslo, Norge
Virulensforskjeller hos PRV-stammer (Wessel, muntlig presentasjon) |
| 04.09.2018 | 8 th International Symposium on Aquatic Animal Health, Charlottetown, Canada
PRV1; Virulence differences in Atlantic Salmon (Wessel, oral presentation) |
| 07.02.2019 | Frisk Fisk, Tromsø, Norge
Inaktivering av Piscine orthoreovirus (Wessel, muntlig presentasjon) |
| 23.05.2019 | Pathos Forum, Ålesund, Norge
Når får PRV-infisert fisk HSMB? Og hvorfor ikke alltid? (Wessel, muntlig presentasjon) |
| 11.09.2019 | 19 th EAFP, Porto, Portugal
Difference in virulence of PRV-1 strains infecting Atlantic salmon (Wessel, oral presentation) |
| 10.06.2020 | Havbruk, Digital konferanse
Virulensforskjeller hos PRV-1 stammer: Ulike virus har ulik evne til å fremkalle HSMB (Wessel, muntlig presentasjon) |

Publikasjoner

- | | |
|---------------------------|--|
| Vitenskapelig publikasjon | Wessel Ø, Hansen E F, Løvoll M, Inami M, Husby A, Kruse G, Dahle M K, Rimstad E.
Inactivation of Piscine orthoreovirus. Journal of Fish Diseases, 2020.
doi:10.1111/jfd.13214 |
| Vitenskapelig manuskript | Wessel Ø, Hansen E F, Dahle M K, Markussen T, Alarcon M, Vatne NA, Berg IN, Dhamotharan K, Timmerhaus G, Lund M, Aanes H, Devold M, Inami M, Løvoll M, Rimstad E. (Manuscript prepared, submission planned October 2020).
Piscine orthoreovirus-1 isolates differ in their ability to induce heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon. |

Populær-
vitenskapelig
formidling

Publisert på kyst.no sine sider
<https://www.kyst.no/article/dette-maa-til-for-aa-inaktivere-prv-hos-laks/>

Populær-
vitenskapelig
formidling

Planlagt pressemelding fra virulensarbeidet etter aksept av artikkel.
Følger opp dekning av arbeidet ut i digitale kanaler til næringen,
som kyst.no etc

Møter

20.02.2017 Møte styrings- og referansegruppe, Veterinærinstituttet, Oslo
13.09.2017 Møte styrings- og referansegruppe, FHF hovedkontor, Oslo
04.05.2018 Møte styrings- og referansegruppe, FHF hovedkontor, Oslo
09.10.2018 Møte styrings- og referansegruppe, Veterinærinstituttet, Oslo
03.05.2019 Møte styrings- og referansegruppe, Veterinærinstituttet, Oslo
18.12.2019 Møte styrings- og referansegruppe, FHF hovedkontor, Oslo
05.06.2020 Møte styrings- og referansegruppe, Digitalt møte

Statusrapport og perioderegnskap FHF

30.06.2017 Statusrapport og perioderegnskap FHF
19.01.2018 Statusrapport og perioderegnskap FHF
31.08.2018 Statusrapport og perioderegnskap FHF
11.01.2019 Statusrapport og perioderegnskap FHF
04.07.2019 Statusrapport og perioderegnskap FHF
08.11.2019 Perioderegnskap FHF
17.01.2020 Perioderegnskap FHF
05.02.2020 Statusrapport FHF

REFERANSER

1. Wessel, Ø.; Braaen, S.; Alarcon, M.; Haatveit, H.; Roos, N.; Markussen, T.; Tengs, T.; Dahle, M.K.; Rimstad, E. Infection with purified *Piscine orthoreovirus* demonstrates a causal relationship with heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon. *PLoS One* **2017**, *12*, e0183781, doi:10.1371/journal.pone.0183781.
2. Palacios, G.; Løvoll, M.; Tengs, T.; Hornig, M.; Hutchison, S.; Hui, J.; Kongtorp, R.T.; Savji, N.; Bussetti, A.V.; Solovyov, A., et al. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One* **2010**, *5*, e11487, doi:10.1371/journal.pone.0011487.
3. Kongtorp, R.T.; Kjerstad, A.; Taksdal, T.; Guttvik, A.; Falk, K. Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a new infectious disease. *J. Fish Dis.* **2004**, *27*, 351-358, doi:10.1371/journal.pone.0171471.
4. Løvoll, M.; Alarcon, M.; Bang, J.B.; Taksdal, T.; Kristoffersen, A.B.; Tengs, T. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Diseases of aquatic organisms* **2012**, *99*, 7-12, doi:10.3354/dao02451.
5. Kongtorp, R.T.; Taksdal, T.; Lyngøy, A. Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms* **2004**, *59*, 217-224, doi:<http://dx.doi.org/10.3354/dao059217>
6. Dhamotharan, K.; Tengs, T.; Wessel, O.; Braaen, S.; Nyman, I.B.; Hansen, E.F.; Christiansen, D.H.; Dahle, M.K.; Rimstad, E.; Markussen, T. Evolution of the Piscine orthoreovirus Genome Linked to Emergence of Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11050465.
7. Di Cicco, E.; Ferguson, H.W.; Schulze, A.D.; Kaukinen, K.H.; Li, S.; Vanderstichel, R.; Wessel, Ø.; Rimstad, E.; Gardner, I.A.; Hammell, K.L., et al. Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) disease diagnosed on a British Columbia salmon farm through a longitudinal farm study. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171471, doi:10.1371/journal.pone.0171471.
8. Garver, K.A.; Johnson, S.C.; Polinski, M.P.; Bradshaw, J.C.; Marty, G.D.; Snyman, H.N.; Morrison, D.B.; Richard, J. Piscine orthoreovirus from western North America is transmissible to Atlantic salmon and Sockeye salmon but fails to cause heart and skeletal muscle inflammation. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146229, doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146229>.
9. Polinski, M.P.; Marty, G.D.; Snyman, H.N.; Garver, K.A. Piscine orthoreovirus demonstrates high infectivity but low virulence in Atlantic salmon of Pacific Canada. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3297, doi:10.1038/s41598-019-40025-7.
10. Markussen, T.; Dahle, M.K.; Tengs, T.; Løvoll, M.; Finstad, Ø.W.; Wiik-Nielsen, C.R.; Grove, S.; Lauksund, S.; Robertsen, B.; Rimstad, E. Sequence analysis of the genome of Piscine orthoreovirus (PRV) associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One* **2013**, *8*, e70075, doi:10.1371/journal.pone.0070075.
11. Wessel, Ø.; Hansen, E.F.; Løvoll, M.; Inami, M.; Husby, A.; Kruse, G.; Dahle, M.K.; Rimstad, E. Inactivation of Piscine orthoreovirus. *J. Fish Dis.* **2020**, *10.1111/jfd.13214*, doi:10.1111/jfd.13214.
12. Nesse, L.L.R., E.; Ringø, E.; Rosnes, J.T. . *Risk assessment regarding processing requirements of by-products from aquaculture for use in fish feed*; Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 2012.
13. Attoui, H.; Mertens, P.P.C.; Becnel, J.; Belaganahalli, S.; Bergoin, M.; Brussaard, C.P.; Chappell, J.D.; Ciarlet, M.; del Vas, M.; Dermody, T.S., et al. Reoviridae. In *Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*, King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., Eds. Academic Press: Amsterdam, 2012; pp. 546-560.

14. Liltved, H.; Vogelsang, C.; Modahl, I.; Dannevig, B.H. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquacult. Eng.* **2006**, *34*, 72-82, doi:10.1016/j.aquaeng.2005.05.002.
15. Liltved, H.; Hektoen, H.; Efraimsen, H. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.* **1995**, *14*, 107-122, doi:10.1016/0144-8609(94)P4430-J.
16. Oye, A.K.; Rimstad, E. Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Diseases of aquatic organisms* **2001**, *48*, 1-5, doi:10.3354/dao048001.
17. Fernández de Castro, I.; Tenorio, R.; Ortega-González, P.; Knowlton, J.J.; Zamora, P.F.; Lee, C.H.; Fernández, J.J.; Dermody, T.S.; Risco, C. A modified lysosomal organelle mediates nonlytic egress of reovirus. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, doi:10.1083/jcb.201910131.