

Risiko for vertikal overføring av ikke- virulent variant av infeksiøs lakseanemi (ILAV-HPR0)

Faglig sluttrapport for prosjekt 901673

Gyri T. Haugland¹, Øyvind Vågnes², Torkjel Bruheim³

¹Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen, ²Blue Analytics, ³AquaGen

Januar 2022

Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag	2
1.1. Sammendrag på norsk	2
1.2. Summary	3
2. Innledning	4
2.1.Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	4
2.2 Prosjektets omfang	4
2.3. Prosjektorganisering	4
3. Problemstilling og formål	5
4. Prosjektgjennomføring	7
4.1 Metodikk	7
4.2 Gjennomføring av prosjektet	7
5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	8
5.1 Resultat.....	8
5.2 Diskusjon.....	9
5.3 Konklusjon	10
6. Hovedfunn	10
7. Referanser	11
8. Leveranser	11

1. Sammendrag

1.1. Sammendrag på norsk

Infeksiøs lakseanemi (ILA) forårsaket av ILA-viruset (ILAV) er en alvorlig, smittsom sykdom hos laksefisk. Sykdommen har store økonomiske konsekvenser for oppdrettsnæringen og fører til redusert fiskevelferd. Det er to varianter av ILAV, hvorav en er virulent (ILAV HPR-del) og en ikke-virulent (ILAV HPR0). Begge variantene er listeført av Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE), så selv om HPR0 ikke fører til sykdom, vil påvisning av viruset kunne få konsekvenser for internasjonal handel. Om HPR0 kan smitte fra stamfisk til settefisk gjennom rogn har vært et omdiskutert tema over mange år. Det forhold at HPR0 ikke har latt seg dyrke i lab har vært en begrensning på muligheten for å gjøre kontrollerte studier. I dette prosjektet hadde vi tilgang til et unikt materiale fra felt, der stamfisk som var klar for stryking ved AquaGen sitt anlegg i Steigen var blitt naturlig smittet med HPR0. Resultatet fra stryking viste funn av HPR0 i gjelleprøver i 60 av 60 tilfeldig utvalgte fisk. Rognvæske av 131 stamfisk som ble strøket viste en prevalens på 30.5%. Rogn ble produsert etter normal prosedyre som inkluderer skylling og desinfeksjon. Det overordnede målet med prosjektet var å få økt kunnskap om vertikal smitte av HPR0. Vi skulle undersøke om HPR0 smittes fra positiv stamfisk til settefisk gjennom rogn produsert etter standard strykeprosedyre ved bruk av RT-PCR. Rognkorn ble transportert til ILAB i Bergen og det ble tatt ut 94 egg til PCR-analyse. Eggeskall og embryo ble analysert hver for seg. Eggene klekket få dager etter ankomst til Bergen, og det ble deretter tatt ut prøver (ca. 30 fisk per uttak) hver 14.dag. De to første månedene ble det tatt ut trekant-prøver (fornyre, gjelle og hjerte), deretter prøver fra nyre, gjelle og hjerte. Fiskene ble fulgt i ca. 10,5 måneder. ATPase-assay viste at smoltifiseringen var igang. I dette prosjektet påviste vi ikke HPR0 i noen av de 742 prøvene som ble analysert.

1.2. Summary

Infectious salmon anemia virus (ISAV) is the causative agent for ISA, a viral disease of salmonid fish. The disease causes severe losses to infected farms and thus have great economic impact, as well as causing reduced fish welfare. There are two variants of ISAV, one highly virulent (ISAV HPR-del) variant and one non-virulent (ISAV HPR0). Since both variants are reportable to the world organization for animal health (OIE), HPR0 can have impact for fish export even though it does not cause disease. Whether the disease is spread vertically, from broodstock to juvenile fish through roe has been a topic of debate for years. Since ISAV HPR0 can't be grown in cell lines, the possibility of controlled studies has been limited. We had a unique material from the field, where the brood fish that where ready to spawn at Aquagen's facility in Steigen had been naturally infected with HPR0. qPCR analyses showed that HPR0 was detected in 60 of 60 randomly selected brood stock fish. Ovarian fluid of 131 fish showed a prevalence of 30.5%. Roe was produced according to normal procedures which include rinsing and disinfection. The overall goal of the project was to gain increased knowledge about vertical transmission of HPR0. We were to investigate by RT-PCR whether HPR0 is transmitted from positive broodstock to juvenile fish through roe produced according to standard procedures. Eggs were transported to ILAB in Bergen, and 94 eggs were collected for PCR analyses. Eggshell and embryo were analyzed separately. The eggs hatched only a few days after arrival in Bergen. Thereafter, samples were taken every 14th days (about 30 samples each time) over a period of 10 months. During the first two months, triangular samples (kidney, gill and heart) were taken. For the rest of the project period, samples were taken from kidney, gill and heart. The fish were followed to beginning of smoltification, as verified by ATPase assay. In this project, we did not detect HPR0 in any of the 742 samples that were analyzed.

2. Innledning

2.1. Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

ILAV-HPR0 er vidt utbredt i norsk lakseoppdrett, samt på Færøyene, Canada og Chile (<https://www.vetinst.no/dyr/oppdrettsfisk/infeksis-lakseanemi-ila>, Lyngstad et al. 2012, Gagne & LeBlanc 2018, Godoy et al. 2013). Det antas at nærmest all fisk som settes i sjø vil eksponeres for smitte (Falk et al. 2020). Og det rapporteres også om enkelte funn i settefiskanlegg, men i lavere forekomst enn i sjø. HPR0 gir en overflatisk infeksjon av epitelceller i hud og gjeller (Aamelfot et al. 2016). Virus kan påvises i små mengder i indre organer som nyre og hjerte, men forurensing ved prøveuttak kan ikke utelukkes som årsak i disse tilfeller. Ved samtidig prøvetaking i hud/gjelle og indre organer vil langt flere fisk være positive i hud/gjelle og med høyere mengder av virus, indikert gjennom lavere Ct-verdier (Bruheim, upubliserte resultat). Stamfisk av laks vil som hovedregel ha en tilvekstfase i sjø og er dermed også eksponert for HPR0. Funn av virus ved stryking er således et ikke helt uvanlig funn. I slike tilfeller vil virus frigjort fra hud og gjeller kunne forurense rogn, enten ved rognuttak eller i perioden før stryking når kjønnsapillen er ferdig utviklet og gir åpning inn til bukhule med mulighet for inntrenging av mikroorganismer som finnes i hud og vann. En slik kontaminasjon av rogn vil håndteres gjennom fjerning av rognvæske, skylling av rogn i fysiologisk saltvann og desinfeksjon med iodofor etter befruktning. **Det er uvisst om virus kan overleve denne desinfeksjonsprosedyren og dermed utgjøre en trussel for settefiskanlegg som mottar slik rogn.**

2.2 Prosjektets omfang

Prevalens i rognvæskeprøver fra 131 fisker var 30.5%. Prøver av egg, nyklekte larver, parr og smolt skulle undersøkes for tilstedeværelse av HPR0.

2.3. Prosjektorganisering

Ansvarlig organisasjon: Universitetet i Bergen, Institutt for biovitenskap

Prosjektleder: Gyri Teien Haugland, førsteamanuensis, UiB

Prosjektdeltakere: Torkjel Bruheim, AquaGen

Øyvind Vågnes, Blue Analytics

- Prosjektleder hadde det overordnede ansvar for koordinering av prosjektet, administrering, rapportering, publisering fra prosjektet og oversikt over budsjettet.
- Blue Analytics var ansvarlig for prøvetaking, PCR analyser og ATPase-testing ifbm smoltifisering, samt å holde kontakt med Vaxxinova som utleier av forsøksfasiliteter og ILAB som ansvarlig for daglig oppfølging.
- AquaGen leverte biologisk materiale med nødvendig dokumentasjon
- Vaxxinova hadde ansvar og kontroll med smittefasilitetene og nødvendig kontakt med forsøksdyrforvaltningen.
- ILAB sto som ansvarlig for forsøket ihht forsøksdyrregelverket. ILAB la til rette med nødvendig utstyr for klekking og fôring, samt daglig røkting ihht standard rutiner for slik oppfølging.

Referansegruppe: Ragnhild Aukan, Salmar
 Solveig Nygaard, Grieg seafood
 Lisbeth Martinsen, Salmon
 Henrik Duesund, Cermaq

Representant fra FHF: Sven Martin Jørgensen

3. Problemstilling og formål

Problemstilling: HPR0 er vanskelig å dyrke (Brun et al. 2018), og det er derfor ikke mulig å gjennomføre kontrollerte smitteforsøk. Da stamfisk som var klar for stryking ved AquaGen sitt anlegg i Steigen ble naturlig smittet med HPR0, var dette derfor en god mulighet for å få mer kunnskap om vertikal smitte av denne virus-varianten. Stamfisken var overført med brønnbåt fra AquaGen Profunda i Ørsta i januar 2020. Fisken har gått i landbasert produksjon i hele syklusen, men hadde et kort opphold i merd ett døgn tid i forbindelse med lossing og landsetting. Smitten har med overveiende sannsynlighet kommet inn under transport eller ved merdopphold før landsetting. Resultater fra stryking 15.05.20 viste funn av HPR0 i gjelleprøver i 60 av 60 tilfeldig utvalgte fisk, Ct-verdier 14-29. Rognvæskeprøver av samtlige 131 fisk som ble strøket denne dagen viste en prevalens på 30,5%, Ct-verdier 20-37. Rogn fra denne strykedato ble produsert etter normal prosedyre som inkluderer skylling og desinfeksjon. Rogna ble tatt vare på for videre forsøk med formål å studere hvorvidt det er mulig å finne igjen HPR0-virus i etterkommere etter infiserte stamfisk.

Hovedmålet for prosjektet var å øke kunnskap om vertikal smitte av HPR0. Delmål var å undersøke om HPR0 smitter fra HPR0 positiv stamfisk (30,5% prevalens) til settefisk gjennom rogn produsert etter standard strykeprosedyre.

Prosjektets betydning for næringen og nytteverdi: Det er per i dag uavklart om HPR0 smitter vertikalt og om virus i rogn overlever standard desinfeksjonsprosedyrer. Dersom virus kan overleve denne prosedyren vil rogn fra smittet stamfisk utgjøre en stor trussel for settefiskanlegg som mottar rogn og det er høy sannsynlighet for spredning til miljø og andre anlegg. Resultatene vil ha stor betydning for næringen. Dersom HPR0 smitter vertikalt, betyr det at all stamfisk bør individscreenes og rogn fra positive stamfisk destrueres.

Planlagte leveranser i prosjektet:

Planlagte leveranser var rapport fra oppstartsmøtet, referat fra referansegruppemøter, statusrapport midtveis i prosjektet, administrativ og faglig sluttrapport, samt populærvitenskapelig artikkel og manus til vitenskapelig artikkel (Tabell 1).

Tabell 1. Planlagt leveranser i prosjektet

FRIST	LEVERANSER
15.02.2021	Rapport fra oppstartsmøte
30.06.2021	Statusrapport til FHF
30.06.2021	Referat fra referansegruppemøte
15.12.2021	Referat fra avsluttende møte med referansegruppen
31.12.2021	Administrativ sluttrapport ihht FHF's retningslinjer
31.12.2021	Faglig sluttrapport ihht FHF's retningslinjer
31.12.2021	Populærvitenskapelig artikkel
31.12.2021	Manus til vitenskapelig artikkel

4. Prosjektgjennomføring

4.1 Metodikk

Prøvene ble undersøket med RT-PCR etter standard prosedyre ved Blue Analytics. RNA ble renset med kommersielle kit. I RT-PCR ble det benytte assay mot segment 8, matriksprotein 1, i tråd med offisielle protokoller fra OIE og EU. Eventuelle positive funn skulle videretypes gjennom sekvensering av HE proteinet kodet av segment 6. Resultatene fra RT-PCR ville i første omgang scores som positive eller negative. Dersom noen av prøvene er positive, skulle vi gå videre med disse prøvene og gjøre Sanger sekvensering. Eventuelle sekvenseringsresultat vil bli sammenlignet med tidligere påvisinger for å kunne fastslå om det var samme virusisolat som ble påvist i foreldregenerasjonen.

4.2 Gjennomføring av prosjektet

Ca 5000 rognkorn fra strykedato 15.05.20 ble overført fra AquaGen Steigen til ILAB. Rogna ble inkubert videre, klekket og startfôret etter prosedyrer som var sammenlignbare med det som gjennomføres i kommersielle anlegg. Startfôring ble gjennomført i ett 0.6m kar, fisken ble så videre fordelt til ytterligere ett kar (1.0m) etter behov grunnet størrelse/biomasse. Det ble gjennomført prøveuttak som følger:

- 95 rognkorn etter mottak (skall og embryo hver for seg)
- 30 fisk ble tatt ut hver 14. dag. Det ble tatt trekantprøver i starten, deretter prøver av gjeller og hud. Trekantprøvene sikret materiale av både gjelle og hud i tillegg til hjerte og nyre og er en vanlig metode for prøveuttak på liten fisk der enkeltorganer vanskelig lar seg fridissekere.
- Prøvene ble lagret i RNA-later og analysert ved RT-PCR etter standard prosedyre. Forsøket ble planlagt for 10 måneder, frem til sjøvannsklar smolt. Biomasse ble justert slik at en hele tiden lå under en grense på 40 kg/m³.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Resultat

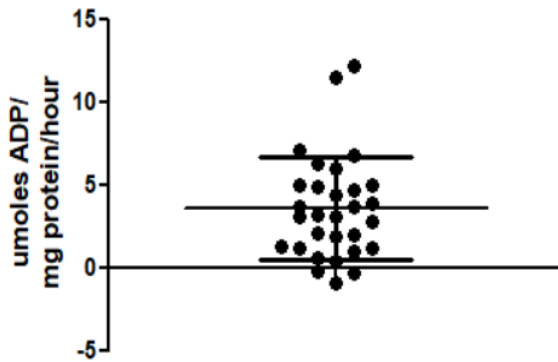
Prøvene ble analysert med RT-PCR (Tabell 2). EF1a ble benyttet som referanseggen, positiv kontroll og negative kontroller var inkludert.

Tabell 2. Oversikt over prøver som ble analysert med RT-PCR.

Dato	Prøve	EF1a (Ct)	ISAV (Ct)	Pos./Neg. kontroll	Antall (n=)
03.09.20	Skall	17,29 ± 0,47	n.d.	OK	95
03.09.20	Embryo	21,79 ± 2,11	n.d.	OK	95
08.09.20	Trekant	14,19 ± 0,42	n.d.	OK	32
22.09.20	Trekant	13,60 ± 0,61	n.d.	OK	30
07.10.20	Trekant	13,95 ± 0,35	n.d.	OK	32
23.10.20	Trekant	14,20 ± 0,63	n.d.	OK	32
03.11.20	Trekant	13,58 ± 0,93	n.d.	OK	32
17.11.20	Gjelle	12,98 ± 0,46	n.d.	OK	32
04.12.20	Gjelle	13,51 ± 0,43	n.d.	OK	31
18.12.20	Gjelle	15,60 ± 0,77	n.d.	OK	32
14.01.21	Gjelle	15,48 ± 1,23	n.d.	OK	32
27.01.21	Gjelle	15,72 ± 2,58	n.d.	OK	32
08.02.21	Gjelle	17,07 ± 0,73	n.d.	OK	32
22.02.21	Gjelle	16,80 ± 0,59	n.d.	OK	32
09.03.21	Gjelle	16,85 ± 0,67	n.d.	OK	32
22.03.21	Gjelle	15,65 ± 1,32	n.d.	OK	32
08.04.21	Gjelle	14,99 ± 1,37	n.d.	OK	32
20.04.21	Gjelle	16,90 ± 3,29	n.d.	OK	32
06.05.21	Gjelle	16,15 ± 0,61	n.d.	OK	31
20.05.21	Gjelle	16,27 ± 0,84	n.d.	OK	31
03.06.21	Gjelle	15,68 ± 0,57	n.d.	OK	31
17.06.21	Gjelle	15,64 ± 0,51	n.d.	OK	31
27.06.21	Gjelle	16,64 ± 0,60	n.d.	OK	31
17.07.21	Gjelle	15,83 ± 0,74	n.d.	OK	78

n.d. = ikke detektert

For å undersøke om fisken var påbegynt smoltifisering, ble en ATPase test gjort. For ATPase test ble gjelleprøver fra 30 fisk tatt ut på SEI (sodium-EDTA-imidazole)-buffer og deretter raskt frosset ned. Prøvene ble deretter analysert for ATPase aktivitet (Sigrud Stefanson, Universitetet i Bergen). Resultatene viser at smoltifiseringen var i gang for flere av fiskene, men ikke alle (Fig. 1).



Figur 1. ATPase test av gjellelev prøvetatt 27.06.2021. Figuren viser gjennomsnitt \pm SD.

5.2 Diskusjon

Utgangspunktet for forsøket med en stamfiskgruppe gjennominfisert med HPR0 må kunne sies å utgjøre et worst-case scenario med tanke på risiko for smitteoverføring. Slike stamfiskgrupper forekommer sjelden. Hvis vertikal overføring av HPR0 er en reell mekanisme, burde dette materialet dermed være av det best egnete til å demonstrere dette.

ILAV-HPR0 gir en kortvarig og forbigående infeksjon av hud og gjeller noe som innebærer at det kan være krevende å fange opp en slik smitte. Samtidig er det en erfaring at når HPR0 først påvises, vil det gjerne være med høy prevalens i fiskegruppen. I dette forsøket ble det gjort prøveuttak hver 14 dag noe som gir god sikkerhet for at en eventuell tilstedeværelse av HPR0 ville blitt detektert. Når forsøket også gikk over så lang tid som 10 måneder og inkluderte begynnende smoltifisering av fiskegruppen gir dette et godt grunnlag for å konkludere med at HPR0 ikke ble overført med rogn av denne stamfiskgruppen.

Ideelt sett kunne en ønsket å ha gjennomført forsøket uten å ha gjennomført skylling og desinfeksjon av rogn. Dette kunne ha gitt enda bedre svar med tanke på potensialet for vertikal

overføring av HPR0. Men slikt materiale var ikke tilgjengelig for forsøket. Skylling og desinfeksjon av rogn har imidlertid vært en forskriftspålagt og veletablert rutine i flere tiår, så med tanke på praktisk relevans skulle desinfisert rogn være et adekvat forsøksmateriale.

Resultatene fra denne studien støtter opp under konklusjonen i FHF-prosjekt 901181; Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk (Jansen et. Al. 2021, Christiansen et al. 2021). I arbeidspakke 3 ble mulighet for vertikal overføring studert gjennom systematisk sekvensering av HPR0-isolater fra både stamfisk, settefisk og matfisk. Resultatene viste ingen genetisk sammenheng mellom HPR0 funnet i stamfisk og HPR0 funnet i avkom. Funnene støtter dermed at horisontal smitte er smitteveien av betydning for ILAV HPR0.

5.3 Konklusjon

Det ble ikke detektert ILAV i noen av prøvene vi analyserte. Vi kan ikke avkrefte at viruset kan smitte vertikalt fra positiv stamfisk, men ved standard prosedyre for rogn produksjon slik som inngikk i prosjektet, har vi vist at det ikke ble overført virus til rogn selv med svært høy prevalens i rognvæske fra stamfisk (30.5%).

6. Hovedfunn

- Strykeklar stamfisk som var blitt naturlig smittet med HPR0 hadde en prevalens på 30,5% i rognvæske (40/131 fisk) og 100% i gjelle (60/60 fisker).
- HPR0 ble ikke detektert i eggeskall eller embryo
- HPR0 ble ikke detektert i prøver fra noen av uttakene av avkom, totalt 742 prøver analysert.
- ATPase assay viste at smoltifisering var i gang.

7. Referanser

- Aamelfot M, Christiansen DH, Dale OB, McBeath A, Benestad SL, Falk K** (2016). Localised infection of Atlantic salmon Epithelial cells by HPR0 infectious salmon anaemia virus. PLoS ONE 11(3): e0151723. [doi:10.1371/journal.pone.0151723](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151723)
- Christiansen DH, Petersen PE, Dahl MM, Vest N, Aamelfot M, Kristoffersen AB, Jansen MD, Gallagher MD, Matejusova I, Jónsson G et al.** (2021). No Evidence of the Vertical Transmission of Non-Virulent Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV-HPR0) in Farmed Atlantic Salmon. Viruses 13, 2428. <https://doi.org/10.3390/v13122428>
- Falk K** (2018). ILA kunnskapsstatus: Forekomst, smittespredning, diagnostikk. Foredrag
- Gagne N & LeBlanc F** (2018). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPR0 subtype. J Fish Dis 41, 421-430
- Godoy M, Kibenge MJ, Suarez R, Lazo E, Heisinger A, Aguinaga J, Bravo D, Mendoza J, Llegues KO, Avendano-Herrera R, Vera C, Mardones F, Kibenge FSB** (2013). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Chilean Atlantic salmon (Salmon salar) aquaculture: emergence of low pathogenic ISAV-HPR0 and re-emergence of virulent ISAV-HPRΔ: HPR3 and HPR14. Vir J 10:344
- Jansen MD, Christiansen DH, Moldal T, Falk K** (2021) Sluttrapport: Utbredelse og betydning av ILA-virus i den norske oppdrettspopulasjonen av laksefisk (FHF-901181). VI 43-2021 rapport. Veterinærinstituttet 2021.
- Lyngstad T, Kristofferen 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 101:197-206. doi.org/10.3354/dao02520

8. Leveranser

Prosjektet har levert leveranser i forhold til planen (Tabell 1). Arbeidet med å skrive en populærvitenskapelig artikkel er påbegynt. Manuskriptet er påbegynt, men ikke ferdig.

Prosjektet skal presenteres ved muntlig foredrag på «NCEA settefisk forum: Biosikkerhet, ILAV og HPR0» som skal arrangeres i Bodø 2.-3. februar.