

ILA-virus i villfisk og oppdrettsfisk i Troms

Øyvind Kileng, Lill-Heidi Johansen, Ingvill Jensen





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Forretningsområdet marin driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringen. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, effektiv og bærekraftig produksjon, prosess- og produktutvikling av sjømat samt marin bioprospektering.

Nofima Marin AS
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: marin@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

 ISBN: 978-82-7251-894-2 (trykt)
 ISBN: 978-82-7251-895-9 (pdf)

 Rapportnr:
 28/2011

 Tilgjengelighet:
Åpen

<i>Tittel:</i> ILA-virus i villfisk og oppdrettsfisk i Troms		<i>Dato:</i> 1.06.2011
		<i>Antall sider og bilag:</i> 10 + appendiks
<i>Forfatter(e):</i> Øyvind Kileng, Lill-Heidi Johansen, Ingvill Jensen		<i>Prosjektnr.:</i> 21151
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF: 900587
<i>Tre stikkord:</i> ILA-virus, villfisk, oppdrettsfisk		
<i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> <p> Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en sykdom forårsaket av ILA-virus (ILAV) som resulterer i store tap i lakseoppdrett. Sykdomsutbrudd er kun registrert på oppdrettslaks, men en avirulent variant av viruset er også påvist i vill laksefisk uten sykdomstegn. Man kan ikke utelukke at villfisk kan være bærer av virulente virus og det samles mye fisk rundt oppdrettsanlegg, noe som kan utgjøre en smitterisiko. Med bakgrunn i den manglende kunnskapen om gjensidig smitterisiko mellom oppdrettslaks og villaks, har vi studert forekomst av ILAV i Målselv-vassdraget som er i nær tilknytning til Astafjordbassenget i Sør-Troms. I dette området har det vært gjentatte ILA-utbrudd i oppdrettslaks over flere år. </p> <p> Laks fisket i Målselv-vassdraget sesongen 2010, samt laks fra to oppdrettslokalteter med påvist ILA ble analysert for tilstedeværelse av ILAV ved bruk av qPCR. Resultatene viste at alle oppdrettsfiskene i studien hadde høye nivå av ILAV i fornyre. Sekvensering av Hemagglutinin – esterase genet viste at de to virusisolatene er identiske, selv om det var ett år mellom utbruddene. ILAV ble ikke påvist i villaks, på tross av at de har oppholdt seg i et område der mange oppdrettsanlegg har hatt utbrudd av sykdommen. Resultatene antyder at virulent ILAV ikke har stor utbredelse i laks som vandrer opp Målselva. Vi kan imidlertid ikke konkludere med at ILAV ikke smitter mellom villfisk og oppdrettsfisk eller <i>vice versa</i>; til det er prøvematerialet som er analysert for lite. </p>		
<i>English summary: (maks 100 ord)</i>		

Innhold

1	Innledning	1
2	Material og metode	2
2.1	Prøvetaking fra oppdrettsfisk og villfisk	2
2.2	Høsting av RNA, cDNA syntese, qPCR, standard PCR og sekvensering.	2
3	Resultater	3
3.1	Prøvetaking fra villfisk og oppdrettsfisk	3
3.2	Analyse av prøver fra laks fisket i Målselva og oppdrettsfisk for tilstedeværelse av ILAV	4
4	Oppsummering og diskusjon	8
4.1	Prevalens av ILAV i villaks	8
4.2	Analyse av fisk fra anlegg med påvist utbrudd av ILAV	8
5	Forslag til videre arbeid	9
5.1	Mer omfattende screening av prøver fra villaks	9
5.2	Undersøke vill marin fisk fanget rundt anlegg med sykdomsutbrudd	9
6	Referanser	10

1 Innledning

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en sykdom som resulterer i store tap innen oppdrett av laks. Sykdommen skyldes et akvatisk orthomyxovirus, og både epidemiologisk og genetisk er det likhetstrekk mellom ILA-viruset (ILAV) og influensavirus funnet hos pattedyr og fugl (Cottet et al 2011). Utbrudd av ILA er kun registrert på Atlantisk laks i oppdrett, men en avirulent variant av viruset (Hpr0) er også påvist i vill laksefisk uten sykdomstegn. Genetiske studier har vist at viruset endrer seg raskt via genetisk drift og mutasjoner, og man antar at de høyvirulente isolatene som gir sykdom og høy dødelighet stammer fra det avirulente Hpr0 (Markussen et al 2008). Reservoaret til ILAV er ikke kjent, men man kan ikke utelukke at villfisk kan være bærer av virulente virus.

Det samles mye fisk rundt oppdrettsanlegg, noe som kan utgjøre en smitterisiko. Man kan heller ikke utelukke at høyvirulente virus kan smitte mellom oppdrettsfisk og villfisk, da syk villfisk mest sannsynlig vil dø uten at dette registreres. Epidemiologiske undersøkelser tyder på at horisontal smitte er å regne som den viktigste smitteveien for spredning av ILAV, noe som underbygger risikoen for spredning av smitte (Scheel et al 2007, Lyngstad et al 2008). I løpet av 2009 var det utbrudd av ILA på ti forskjellige lokaliteter med laks i Norge og seks av disse utbruddene var i Midt- og Sør-Troms (Astafjord-bassenget). I dette området har det vært vedvarende problemer med ILA over en treårsperiode, og i 2010 ble det registrert tre ILA-utbrudd her. Vaksinerings mot ILA har ikke vært tillatt i Norge, men for området i Sør-Troms ble det i 2008 gitt midlertidig tillatelse til vaksinerings. Mattilsynet har nå åpnet for vaksinerings mot ILA langs mesteparten av norskekysten.

I Astafjord-bassenget i Midt- og Sør-Troms er mange oppdrettsanlegg lokalisert. I det samme området har flere viktige lakseelver sitt utløp, bl.a. Målselva som er den største i Troms basert på årlig fangstvolum. Innslaget av vill laks (og andre anadrome laksefisker som sjørøye og sjørøret) er derfor periodevis høyt i dette området. Med bakgrunn i den manglende kunnskapen om gjensidig smitterisiko mellom oppdrettslaks og villaks, ønsket vi å studere forekomst av ILAV i et vassdrag i nær tilknytning til et område med gjentatte sykdomsutbrudd i oppdrettslaks.

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking fra oppdrettsfisk og villfisk

Laks ble hentet fra to ulike oppdrettslokaliteter i tilknytning til Astafjordbassenget med påvist utbrudd og økt dødelighet som følge av ILA. Det første anlegget var Vassvika (Lokalitet 17595) med utbrudd i mai og juni 2009. Det andre anlegget var Storvika III (Lokalitet 10552) med utbrudd i mai og juni 2010. I dette anlegget var laksen blitt vaksinert mot ILAV samme året. Svimerer av laks ble fanget med håv og deretter avlivet på stedet. Fisken ble åpnet og prøver av fornyre ble lagt på RNAlater. Organprøve ble deretter inkubert ved romtemperatur i 24 timer før langtidslagring ved -20°C.

Et samarbeid ble etablert med grunneierlaget i Målselva som sørget for prøvetaking fra laks fisket der fra juni til august 2010. Fornyre ble tatt ut og lagt på RNAlater. Organprøvene ble inkubert ved romtemperatur i 24 timer før langtidslagring ved -20°C.

2.2 Høsting av RNA, cDNA syntese, qPCR, standard PCR og sekvensering

RNA fra fornyre ble høstet med Total RNA I minikit (E.Z.N.A). Av fornyre ble 10 µg vev lagt i lysisbuffer, homogenisert med Magnalyser og RNA høstet fra homogenatet etter produsentens anbefaling. Konsentrasjon og kvalitet av RNA ble undersøkt med Nano drop ND-1000. Videre ble 200 ng RNA fra hver fisk revers transkribert til cDNA med High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, ABI). cDNA fra fornyre ble undersøkt for tilstedeværelse av ILAV med kvantitativ real time PCR (qPCR). SYBRGreen (Abi) og genspesifikke primere mot ILAV segment 8 ble benyttet. qPCR ble kjørt i 45 syklar for å fange opp eventuelle lave nivå av ILAV. De samme prøvene fra villfisk og oppdrettsfisk ble sendt til Patogen Analyse (<http://www.patogen.no/>) og analysert med primer og probe i deres standardiserte TaqMan-assay for ILAV. Prøvene ble også undersøkt med et eget qPCR-assay for å detektere den avirulente stammen av ILAV, Hpr0.

Utvalgte prøver av laks fra Målselv og oppdrettsfisk ble også forsøkt typebestemt ved sekvensering. Typebestemming av ILAV ble gjort ved å oppformere genet for hemagglutinin-esterase (ILAV segment 6) med tradisjonell PCR. De som var PCR-positive for ILAV segment 6 ble sekvensert. Sekvenser av ILAV segment 6 ble deretter sammenlignet med sekvenser av kjente stammer av ILAV i en fylogenetisk studie i Clustal W og MEGA4.

3 Resultater

3.1 Prøvetaking fra villfisk og oppdrettsfisk

I juni 2009 (ISAV2009) og juni 2010 (ISAV2010) ble det tatt organprøver av 5 svimere fra to separate oppdrettsanlegg med påvist ILA. Vekten til svimerne var fra 2-4 kg. Alle fiskene hadde de klassiske tegnene på ILA med bleke gjeller og hjerte samt ascites i bukhulen.

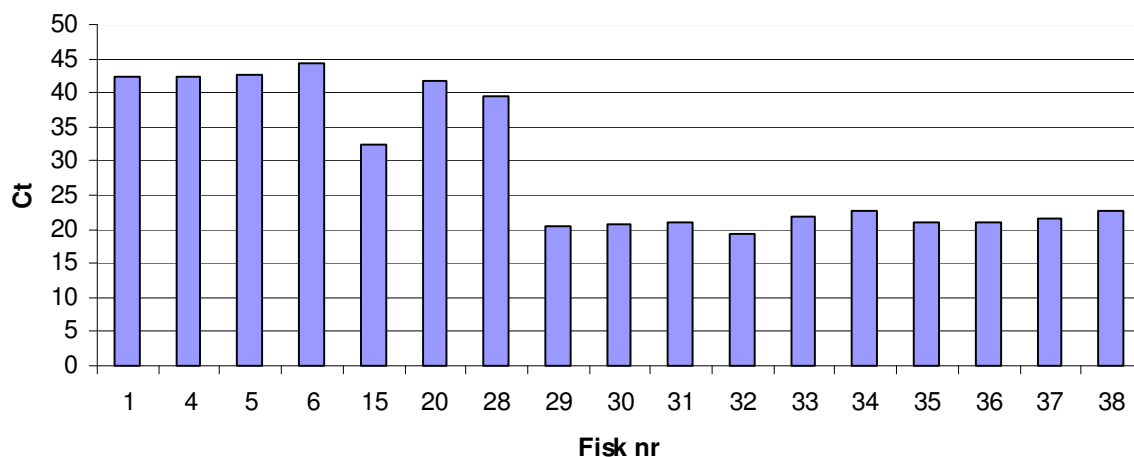
I perioden 15. juni til 15. august 2010 ble 28 laks med vekt fra 1,5 - 11,5 kg fanget i samarbeid med grunneierne i Målselvfossen (Tabell 1). Ingen av villfiskene hadde synlige sykdomstegn bortsett fra fisk nr 27 som hadde parasitter på lever samt at leveren var misfarget (sennepsgul med røde flekker).

Tabell 1. Oversikt laks fisket i Målselva sommeren 2010

Fisk nr	Dato	Vekt (Kg)	Kjønn	Anmerking
1	17.06.2010	6	Hunn	
2	18.06.2010	6	Hunn	
3	18.06.2010	11	Hunn	
4	18.06.2010	4	Hunn	
5	18.06.2010	8	Hann	
6	18.06.2010	9,6	Hann	
7	19.06.2010	11,5	Hann	
8	15.07.2010	7,6	Hann	
9	15.07.2010	1,9	Hunn	
10	15.07.2010	4,5	Hann	
11	15.07.2010	4,8	Hunn	
12	15.07.2010	5,5	Hunn	
13	15.07.2010	6,7	Hunn	
14	15.07.2010	8,7	Hann	
15	15.07.2010	6,7	Hann	
16	15.07.2010	8,8	Hunn	
17	15.07.2010	8,3	Hunn	
18	16.07.2010	7,1	Hunn	
19	16.07.2010	4,1	Hunn	
20	16.07.2010	4,5	Hunn	
21	16.07.2010	3	Hann	
22	16.07.2010	1,9	Hann	
23	16.07.2010	1,9	Hunn	
24	16.07.2010	8,8	Hunn	
25	16.07.2010	8,5	Hunn	
26	15.08.2010	1,5	Hann	
27	15.08.2010	2,5	Hann	Parasitter på lever. Lever misfarget, sennepsgul og røde flekker. 12-15 lakselus. Sykdomsstatus ukjent.
28	15.08.2010	1,3	Hann	

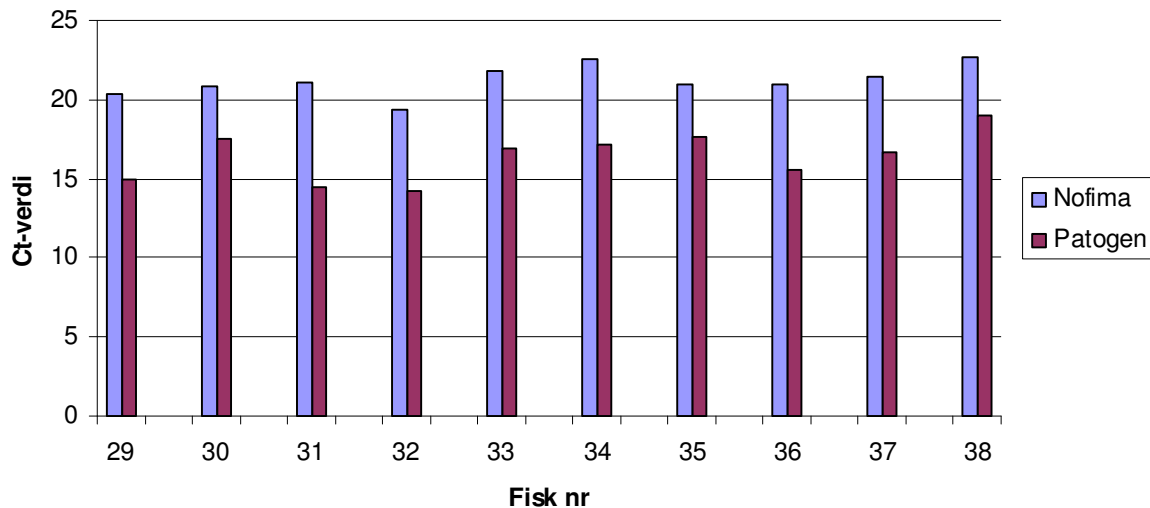
3.2 Analyse av prøver fra laks fisket i Måselva og oppdrettsfisk for tilstedeværelse av ILAV

Villfisk og oppdrettsfisk ble analysert med qPCR for ILAV. Første del ble gjort med SYBRGreen og primere, og resultatet av to separate kjøringer viste at en villfisk (fisk nr.15) kunne være positiv for viruset. qPCR for denne fisken ga et signal med Ct-verdi rundt 33, mens de resterende 27 fiskene enten var helt negative eller ga et svakt signal rundt Ct 40 (Fig.1). De samme prøvene ble også sendt til Patogen Analyse som brukte et standardisert TaqMan-assay med primer og probe for deteksjon av ILAV. Denne analysen konkluderte med at alle villfiskene var negative for ILAV. Et annet assay for deteksjon av ILAV Hpr0 var også negativt (resultat ikke vist).



Figur 1 Ct-verdier etter qPCR på villfisk og oppdrettsfisk for deteksjon av ILAV. Fisk 1-28 er villfisk, fisk 29-33 er oppdrettsfisk fra Vassvika og fisk 34-38 er oppdrettsfisk fra Storvika III. De individene som ikke er med i figuren ga ingen Ct-verdi.

Alle oppdrettsfiskene som ble analysert var positiv for ILAV. Våre data viser at alle fiskene hadde høye nivå av virale transkripter i fornyre med Ct - verdier rundt 20 (Fig 1). Den samme undersøkelsen gjort av Patogen Analyse ga enda lavere Ct-verdier (Ct fra 14,2 – 19) og bekreftet dermed at oppdrettsfisken var smittet av ILAV (Fig 2).



Figur 2 Sammenligning av Ct-verdier fra qPCR på prøver fra oppdrettslaks med påvist ILA analysert med to ulike assays ved henholdsvis Patogen Analyse og Nofima.

Siden enkelte av villfiskene ga et svakt positivt signal i vår studie, ble disse samt alle oppdrettsfiskene undersøkt nærmere med standard PCR for Hemagglutinin - esterase (HE) genet til ILAV. Prøvene fra oppdrettsfiskene var som tidligere påvist positive, og dette materialet ble deretter sekvensert for å typebestemme viruset. Prøvene fra laks i Målselv viste seg å være negative for ILAV og de ble dermed ikke inkludert i videre analyser.

Resultatet av sekvenseringen viste at virus-isolatene ISAV2009 og ISAV2010 var tilnærmet identiske. En basesubstitusjon ble observert, men denne var nøytral og ga samme aminosyre i nevnte posisjon. Denne posisjonen tilsvarer bp 881 i ILAV Hpr0.

En sammenligning av sekvensene av ISAV2009 og ISAV2010 med kjente referansestammer ble utført med ClustalW. Resultatet av dette viste at ISAV2009 og ISAV2010 hadde et trunkert HE som følge av en delesjon. Den deleterte regionen tilsvarer aminosyre (aa) 340-369 (Bp 1045-1107, Fig. 3) i ISAV Hpr0. For øvrig er sekvenslikheten (protein) størst med referansestammen ISAV10 (Fig. 4 og Fig. 5)

```

ISAV6      AAAATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGA----- 1045
ISAV7      AAAATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGA----- 1045
ISAV4      AAGATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGA----- 1045
ISAV2009   AAGATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTCA-----
ISAV2010   AAGATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTCA-----
ISAV11     AAGATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAGC----- 1047
ISAV10     AAGATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTG----- 1044
ISAV3      GGGATCGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGA----- 1045
Hpr0       AAAATCAGGGTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAACCAAACATTCAATACAAACCAAGTG 1071
          *** *****

ISAV6      -----ACCAAACATTGGGTGTAGCAGGTT 1069
ISAV7      -----ACCAAACATATGGGTGTAGCAGGTT 1069
ISAV4      -----ACCAAACATATGGGTGTAGCAGGTT 1069
ISAV2009   -----TTTCTATGGGTGTAGCAGGTT
ISAV2010   -----TTTCTATGGGTGTAGCAGGTT
ISAV11     -----AACATCTTCATTTCTATGGGTGTAGCAGGTT 1078
ISAV10     -----ATTTCTATGGGTGTAGCAGGTT 1066
ISAV3      -----ACATCTTCATTTCTATGGGTGTAGCAGGTT 1075
Hpr0       --GAGCAACCTGCAACATCTGTGTTGAGCAACATCTTCATTTCTATGGGTGTAGCAGGTT 1129
          * *****

```

Figur 3 Sammenligning av cDNA sekvenser for ILAV segment 6 (Hemagglutinin – esterase) fra ILA-utbrudd i Sør-Troms i 2009 (ISAV2009) og 2010 (ISAV2010) med ulike referansestammer av ILAV. Sammenligningen viser en region av HE der endringer i sekvens i forhold til Hpr0 er forbundet med høyvirulente virus.

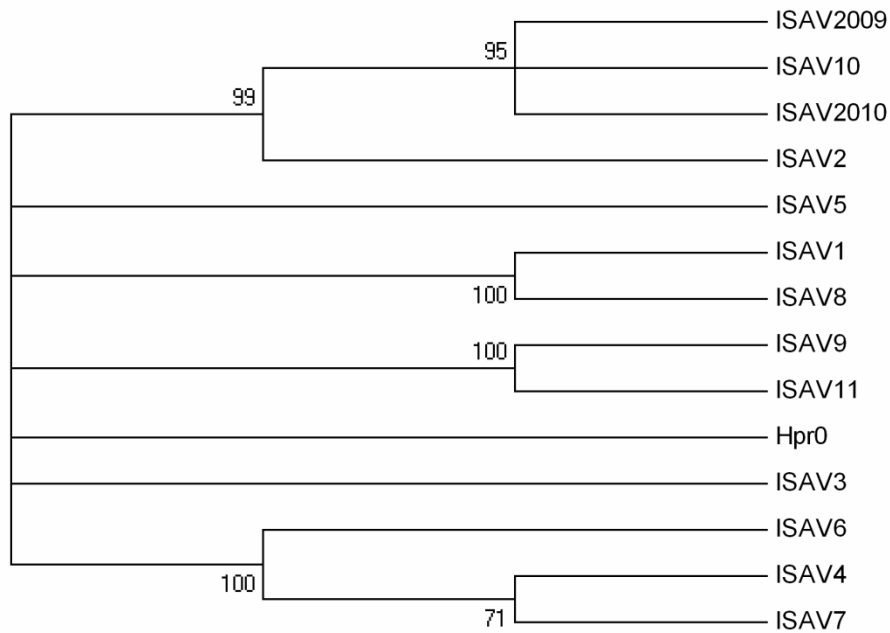
```

ISAV1      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIRVDANQVEQ-----P 349
ISAV2      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVK-----P 339
ISAV5      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVK----- 338
ISAV8      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIRVDATQVEQ-----P 349
Hpr0       VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIRVDATPPQLNQTFTNTNQVEQP 360
ISAV2009   VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA
ISAV2010   VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA
ISAV11     VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA 343
ISAV10     VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA 343
ISAV4      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA 343
ISAV7      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA 343
ISAV9      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VDA 343
ISAV3      VKDFDQTSLGNTDALVMGEVALHGEMISELRRNITDVGIG-----VD 342
ISAV6      VKDFDQTSLGNTDTLIMREVALHKEMISKLQRNITDVKIR-----VD 342
          *****:.* *****:.*:*****

ISAV1      ATSVLSNIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 400
ISAV2      ATSVLSNIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWI AACMYKSRGRIPPSSLSVA 390
ISAV5      -TSVLSNTFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 388
ISAV8      ATSVLSNIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 400
Hpr0       ATSVLSNIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 411
ISAV2009   IPPQL----ISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA
ISAV2010   IPPQL----ISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA
ISAV11     IPPQLSNIFISMGVAGFGIALFLVGVKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 394
ISAV10     IPPQL----ISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 390
ISAV4      IPPQLNQT---MGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 391
ISAV7      IPPQLNQT---MGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 391
ISAV9      IPPQLNQTIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 394
ISAV3      AIPPQLNIFISMGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 393
ISAV6      AIPPQLN---QTLGVAGFGIALFLAGWKACIWIAAFMYKSRGRIPPSSLSVA 391
          .:*****.*****:* *****.*

```

Figur 4 Sammenligning av aminosyresekvenser for ILAV segment 6 (HE) fra ILA-utbrudd i Sør-Troms i 2009 (ISAV2009) og 2010 (ISAV2010) og ulike referansestammer av ILAV. Sammenligningen viser en region av HE der endringer i sekvens i forhold til Hpr0 er forbundet med høyvirulente virus.



Figur 5 Fylogenetisk tre av ISAV2009, ISAV2010 og ulike referansestammer av ILAV. Fylogenetisk slektskap er beregnet med Neighbour-Joining metode og en boot-strap test med 2000 replikater i MEGA4.

4 Oppsummering og diskusjon

Våre analyser av laks fanget i Målselva 2010 og svimere av oppdrettslaks hentet fra to lokaliteter i Sør-Troms perioden 2009 -2010 gir grunnlag for følgende konklusjoner:

4.1 Prevalens av ILAV i villaks

ILAV ble ikke påvist i noen av villaksene analysert i denne studien. Data fra Patogen Analyse viste at alle villaksene i studien var negative, mens våre data fra qPCR kunne tyde på lave nivå av RNA fra ILAV i en villaks (Fisk nr. 15). Dette ble forsøkt verifisert med andre metoder, men resultatet var negativt. Vi kan derfor fastslå at ILAV ikke ble påvist i villaks i denne studien, på tross av at de har oppholdt seg i et område der mange oppdrettsanlegg har hatt utbrudd av sykdommen over en periode på 3 år.

Resultatene antyder at virulente ILAV ikke har stor utbredelse i laks som vandrer opp Målselva. Vi kan imidlertid ikke konkludere med at ILAV ikke smitter mellom villfisk og oppdrettsfisk eller *vice versa*; til det er prøvematerialet som er analysert for lite. Det må også tas i betraktning at det i etterkant av vår prøvetaking fra laks i Målselv ble publisert data som viser at gjeller har høyere prevalens av avirulent ILAV sammenlignet med fornyre (Christiansen et al 2011). I vår studie ble kun fornyre analysert og vi kan ikke utelukke at ILAV kunne vært påvist i gjelleprøver. Til tross for dette mener vi at våre analyser av fornyre ville påvist virulente varianter av ILAV i villfisken hvis de hadde vært tilstede .

4.2 Analyse av fisk fra anlegg med påvist utbrudd av ILA

Resultatene fra Patogen Analyse og oss viser at alle oppdrettsfiskene i studien hadde høye nivå av virale transkripter i fornyre og dermed var smittet med ILAV. Sekvensering av Hemagglutinin – esterase genet viser at ISAV2009 og ISAV2010 er identisk i alle fiskene som ble undersøkt, selv om det var 1 år mellom utbruddene. Basert på sekvenslikhet og fylogenetisk studie er dette viruset mest likt referansestammen ISAV10, som tidligere er blitt karakterisert som moderat virulent i smitteforsøk. Våre data viser at dette isolatet har fått fjernet en kort sekvens som tilsvarer bp 1045-1107 i ILAV Hpr0. Dette er helt identisk med resultatene fra en nylig publisert epidemiologisk studie om spredning av ILAV i Sør – Troms perioden 2007-2009 (Lyngstad et al 2011). Dette kan bety at viruset er etablert i fjordsystemet, enten i oppdrettsanlegg eller hos en naturlig vert i sjøen. Den samme epidemiologiske studien fant Hpr0 i 8 anlegg uten sykdomsutbrudd i dette området. De foreslår at slike anlegg kan utgjøre et reservoar for avirulente virus som kan endres til virulente stammer.

Spesielt med utbruddet i 2010 var at oppdrettsfisken var vaksinert mot ILAV, uten at dette forhindret ILA utbrudd. Dette anlegget ble tømt og all fisk slaktet i perioden juli og august.

Dette, sammen med rapporter om andre ILA utbrudd på vaksinert fisk i dette området, tyder på at vaksinene ikke gir fullgod beskyttelse.

5 Forslag til videre arbeid

5.1 Mer omfattende screening av prøver fra villaks

Det analyserte prøvematerialet fra villaks var begrenset. For å kunne trekke sikrere konklusjoner omkring smitterisiko mellom villfisk og oppdrettsfisk, ville undersøkelser av et større prøvemateriale samlet inn over en lengre tidsperiode være hensiktsmessig. Her bør en også inkludere flere vassdrag. Prøvematerialet bør inkludere både fornyrer og gjeller for å øke muligheten for å detektere lavvirulente ILAV.

5.2 Undersøke vill marin fisk fanget rundt anlegg med sykdomsutbrudd

Det er kjent at det står store mengder vill marin fisk rundt et oppdrettsanlegg og også at store stimer av villfisk forflytter seg mellom anlegg. Hvilken rolle denne fisken kan ha i smitteoverføring til oppdrettsfisk er ukjent. Det er heller ikke kjent om denne fisken blir smittet av syk oppdrettsfisk. I videre studier vil det være viktig å analysere prøver fra vill marin fisk, fanget rundt anlegg med pågående sykdomsutbrudd og helst sammenligne disse med prøver fra villfisk i områder uten oppdrettsaktivitet.

6 Referanser

- Aldrin M, Lyngstad TM, Kristoffersen AB, Storvik B, Borgan O, Jansen PA. 2011. Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J R Soc Interface*. Feb 16, Epub ahead of print.
- Christiansen DH, Østergaard PS, Snow M, Dale OB, Falk K. 2011. A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV-HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands. *J Gen Virol*. 92:909-18.
- Cottet L, Rivas-Aravena A, Cortez-San Martin M, Sandino AM, Spencer E. 2011. Infectious salmon anemia-genetics and pathogenesis. *Virus research* 155: 10-19.
- Lyngstad TM, Hjortaas MJ, Kristoffersen AB, Markussen T, Karlsen ET, Jonassen CM, Jansen PA. 2011. Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. *Epidemics*. 3:1-11.
- Lyngstad TM, Jansen PA, Sindre H, Jonassen CM, Hjortaas MJ, Johnsen S, Brun E. 2008. Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003-2005. *Prev Vet Med*. 84(3-4):213-27.
- Markussen T, Jonassen CM, Numanovic S, Braaen S, Hjortaas M, Nilsen H, Mjaaland S. 2008. Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*. 374(2):515-27.
- Scheel I, Aldrin M, Frigessi A, Jansen PA. 2007. A stochastic model for infectious salmon anemia (ISA) in Atlantic salmon farming. *J R Soc Interface*. 2007 4(15):699-706.

Appendix

Material og metode

1. qPCR

qPCR med SYBRGreen og genspesifikke primere mot ILAV segment 8 på cDNA av fornyre fra oppdrettsfisk og fisk fra Måselva ble kjørt ved standard betingelser som beskrevet av leverandør (Applied Biosystems (Abi)) med unntak av at PCR ble kjørt 45 syklers for lettere fange opp eventuelle bærere av ILAV Hpr0. Primerne er designet for å oppformere et amplicon på 101 bp i ILAV segment 8 og er laget i Primer Express 3.0 (Abi). For primersekvenser se tabell 2.

2. PCR og sekvensering

En Touch-down PCR ble utviklet for å oppformere og sekvensere Hpr0 regionen av genet for Hemagglutinin – esterase (HE) fra ILAV segment 6 (Tabell 2). Primerne gir et amplicon på 734 bp i 3`regionen i genet for HE. PCR-produktet ble deretter renset med Exo-Zap (UBS) og det samme primersettet ble brukt ved sekvensering. Sekvensering ble utført med BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit etter produsentens anbefaling (Abi).

Tabell 2. Primere brukt til qPCR, Touch-down PCR og sekvensering

Primer navn	Primer sekvens 5` - 3`	Applikasjon	ISAV segment	Amplicon lengde	Tm
ISAV S8 Fwd	GCTACACAGCAGGATGCAGATG	qPCR	8	101	58 °C
ISAV S8 rev	ATGCCGGAAGTCGATGAACT	qPCR	8	101	58 °C
ORFSeq6-Fwd3	CGGTGAAGGTGTTGACTTTCAGCAGCCCTA	Sekvensering	6	734	64,1 °C
ORFSeq6-Rev1	AAGCAACAGACAGGCTCGATGGTGAATTCTA	Sekvensering	6	734	63,1 °C

Tabell 3 Touch-down PCR ILAV segment 6 (HE)

Temperatur	Tid (sek)	Syklus nr	Antall syklers
94	20	Pre-PCR	
94	10		
67	30	1	5
72	40		
94	10		
65	30	2	5
72	40		
94	10		
63	30	3	27
72	40		
72	7 min	Post-elongering	
4	-		



ISBN 978-82-7251-894-2 (trykt)
ISBN 978-82-7251-895-9 (pdf)
ISSN 1890-579X