

Audny Hellebø, Anne Stene og Vidar Aspehaug

**Potensielle reservoarer for SAV og PMCV
på marine akvakulturanlegg**

Tittel	Potensielle reservoarer for SAV og PMCV på marine akvakulturanlegg
Forfatter(e)	Audny Hellebø, Anne Stene ¹ , Vidar Aspehaug ²
Antall sider	23
Prosjektnummer	54677
Prosjektets tittel	Undersøking av potensielle reservoarer for patogene virus – fokus på NSAV og PMCV i marine akvakulturanlegg for atlantisk laks
Oppdragsgiver	FHF, Tollbugata 32, Postboks 429 Sentrum, 0103 Oslo
Referanse oppdragsgiver	900721, Merete Bjørgan Schrøder
ISSN	0804-54380
Distribusjon	Åpen
Nøkkelord	Pankreassyke (PD), kardiomyopatisyndrom (CMS), salmonid alpha virus (SAV), piscine myocardit virus (PMCV), virus, reservoar, smittespredning, dødfisk, fettavsiv
Godkjent av	Agnes Gundersen, Forskningsjef
Godkjent dato	09.05.14

Sammendrag

I dette prosjektet finansiert av FHF (900721) ble fastsittende og frittlevende organismer ved merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton fra anlegg med pankreassyke (PD) eller kardiomyopatisyndrom (CMS) analysert for tilstedeværelse av virusene som forårsaker sykdommene. Det var materiale fra 3 anlegg med PD-utbrudd og 1 anlegg med CMS-utbrudd som ble analysert med Real-Time RT-PCR for å påvise henholdsvis salmonid alpha virus (SAV) eller piscine myocardit virus (PMCV).

Fra hvert anlegg ble det samlet inn hjerteprøver fra laks som referanse på sykdomssituasjonen i anleggene. Lakselus på laksen, slim og feces fra laks ble også undersøkt. Det ble også gjennomført forsøk med fettavsiv fra dødfisk fra ett PD-anlegg. Avsiv fra bukfettet og pylorusfettet fra dødfisken ble undersøkt for virus ved Real-Time RT-PCR og inkulert på fiskeceller for å undersøke infektivitet.

Resultatene indikerer at laksen selv er hovedreservoaret for SAV og PMCV. Fettavsiv fra SAV-infisert laks på lokaliteter med høyt smittepress kan ha en rolle i smittespredning. Fettavsivet kan transporteres med de øvre vannmasser så fokus på og bedring av dødfiskhåndtering vil derfor være viktig for å forhindre horisontal smittespredning.

I denne rapporten er noe datamateriale i resultatdelen utelatt. Dette fordi vitenskapelig publisering er under arbeid. Den fullstendige rapporten vil få rapportnummer: MA 14-07.

© Forfatter/Møreforskning Marin

Forskriftene i åndsverksloven gjelder for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller i fremstille eksemplar til privat bruk. Uten spesielle avtaler med forfatter/Møreforskning Marin er all annen eksemplarfremstilling og tilgjengelighetsgjøring bare tillatt så lenge det har hjemmel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettshavere til åndsverk.

¹ Høgskolen i Ålesund

² PatoGen Analyse AS

FORORD

Vi vil benytte anledningen til å takke for god hjelp på alle de fire anleggene. Det var positive driftsledere og røktere som gjorde dette prosjektet mulig. Tusen takk for dyktig tilrettelegging! Takk også til selskapene som lot oss få opprette kontakt med anleggene med sykdomsutbrudd og som ønsket å stille personell, utstyr og tid til rådighet!

Vi ønsker også å takke Vaxxinova som gav oss celleflasker ved behov, Hilde Sindre på Veterinærinstituttet som gav oss SAV for å få erfaring med å dyrke SAV i cellekultur og Emilie Merour ved Frankrike sitt nasjonale institutt for landbruksforskning (INRA) som gav oss antistoff mot SAV.

Tilslutt vil vi takke Møre og Romsdal fylkeskommune for finansiering av forprosjektet (108/2008) og FHF for finansiering av dette prosjektet (900721). En stor takk også til motiverte medlemmer i styringsgruppen og observatøren i FHF.

Styringsgruppen bestod av:

Nina Santi (AquaGen), Vidar Aspehaug (PatoGen Analyse), Kristian Straume-Lie (Lerøy). Sistnevnte sluttet i Lerøy og ble erstattet av Ragnhild Aukan 29.04.2013.

Observatøren for FHF:

Merete Bjørgan Schrøder

Prosjektgruppen bestod av:

Anne Stene, Vidar Aspehaug og Audny Hellebø (prosjektleder)

Foreløpig rapport:

I denne rapporten er noe datamateriale i resultatdelen utelatt. Dette fordi vitenskapelig publisering er under arbeid. Den fullstendige rapporten vil få rapportnummer: MA14-07.

Audny Hellebø

Ålesund 30.04.2014
Audny Hellebø
Forsker



INNHOOLD

OPPSUMMERING	9
SUMMARY	10
1 INNLEDNING.....	11
1.1 Bakgrunn for prosjektet	11
1.2 Prosjektets omfang	11
1.3 Prosjektorganisering	12
1.4 Prosjektets effektmål	12
1.5 Prosjektets resultatmål	12
2 MATERIALE OG METODE	13
2.1 Valg av forskningsmetode	13
2.2 Gjennomføring av prosjektet	13
2.2.1 Anleggene.....	13
2.2.2 Prøver fra anleggene	13
2.2.3 Dødfisk og fettavsiv	14
2.2.4 Inokulering av fettavsiv på cellekultur	14
2.2.5 IFAT.....	14
2.2.6 Real-Time RT-PCR	15
2.3 AVVIK.....	15
3 RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON	16
3.1 Oppnådde resultater.....	16
3.1.1 Undersøkelse for SAV-reservoar på tre PD-anlegg	16
3.1.2 Undersøkelse for PMCV-reservoar på ett CMS-anlegg	16
3.1.3 Fettavsiv fra PD-dødfisk og infektivitet	16
3.2 Diskusjon	17
3.3 Konklusjon.....	18
4 LEVERANSER.....	19
5 KVALITETSSIKRING	19
6 REFERANSER.....	20

OPPSUMMERING

Pankreassyke (PD) og kardiomyopatisyndrom (CMS) gir betydelige økonomiske tap i sjøbasert oppdrett. PD er forårsaket av salmonid alfavirus (SAV) og CMS av piscine myocarditisviruset (PMCV). PD er et stort problem fra Rogaland til Sør-Trøndelag og CMS et problem langs hele Norskekysten [1]. For å forsøke å redusere spredning av PD er det innført: "Forskrift om sone for å hindre smitte og bekjempe pankreassjukdom hos akvakulturdyr". I forskriftens §13: "Tiltak overfor akvakulturanlegg med klinisk utbrudd av PD", ligger et pålegg om at oppdrettsbåter, fôrflåter, flyteringer og annet utstyr fra akvakulturanlegg med klinisk utbrudd av PD skal rengjøres og desinfiseres før utstyret tas i bruk igjen.

Formålet med dette prosjektet var å identifisere mulige virusreservoar og nye smitteveier for SAV og PMCV. I prosjektet er det samlet inn prøvemateriale fra anlegg under utbrudd, for å være sikker på at virus var tilstede på lokaliteten. Det ble samlet inn fastsittende og frittlevende organismer ved merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton. Det ble også samlet inn hjerter fra laks som referanseprøver. I tillegg ble slim, feces og lakselus fra laks undersøkt. Fettavsiv fra utskjært pylorus- og buk fett fra dødlaks med PD har også blitt undersøkt for virus.

Av det innsamlede materialet var alle organismene fra merd og bunn, sediment, biofilm og plankton negative for SAV og PMCV ved Real-Time RT-PCR. I slim, feces og lakselus fra laks var det funn av SAV og PMCV. I fettavsivet fra pylorus- og buk fett fra dødlaks med PD ble SAV påvist. SAV i fettavsivet ble undersøkt for replikerende virus i cellekultur og det ble bekreftet infektivitet ved immunfarging.

Gjennom dette prosjektet så har man ikke fått noen indikasjoner på at fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton er reservoar for SAV. Det innsamlede materialet for PMCV er kun fra ett anlegg – men gir de samme indikasjonene som for SAV. Selv om det ikke har blitt identifisert reservoarer i fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten o.a. for SAV og PMCV så ansees brakklegging og rengjøring nødvendig for å sikre at lokaliteten renses for eventuell opphoping av organisk materiale mellom utsett. Det kan også tenkes at andre agens kan ha reservoar i andre organismer enn laks (eks. *Paramoeba Perurans*).

Dette prosjektet indikerer at laksen selv utgjør hovedreservoaret for virus og at fett som flyter på overflaten i et anlegg med høyt smittepress kan være en faktor for spredning av PD. Brakklegging og rengjøring av utstyr vil hindre overføring av virus til nyutsatt smolt ved at organisk materiale fra laks blir fjernet. Bedre dødfiskhåndtering vil være viktig for å forhindre smittespredning siden fettfilm kan transporteres med de øvre vannmasser.

I denne rapporten er noe datamateriale i resultatdelen utelatt. Dette fordi vitenskapelig publisering er under arbeid. Den fullstendige rapporten vil få rapportnummer: MA14-07.

SUMMARY

The diseases pancreas disease (PD) and cardiomyopathy syndrome (CMS) give significant economic losses in marine aquaculture. PD is caused by salmonid alphavirus (SAV) and CMS by piscine myocarditis virus (PMCV). PD is a major problem in Norway from Rogaland to Sør-Trøndelag and CMS is a problem all along the Norwegian coast [1]. With the attempt to try to reduce spread of PD, the regulation named “Zone regulation to prevent infection and reduce pancreas disease in aquaculture animals” has been introduced. In § 13 of this regulation, it is stated that boats, barges, floating rings, and other products from aquaculture facilities with clinical PD should be cleaned and disinfected before further usage.

The purpose of this project was to identify potential virus reservoir and new transmission routes for SAV and PMCV. In the project, samples were collected from facilities during disease outbreak - to make sure that the virus was present at the site. Samples from sessile and free-living organisms on the cage, benthic organisms, sediment, biofilm, and plankton were collected. Salmon hearts from the sites were also collected as a reference. In addition, mucus, feces and salmonlice from salmon was sampled and examined. Fatleakage from excised pylorus and abdominal fat from dead salmon with PD was also examined for virus.

Of the collected material, all organisms from cage and bottom, sediment, biofilm and planktonic were negative for SAV and PMCV by Real-Time RT-PCR. In mucus, feces and salmon lice from salmon, SAV and PMCV were identified. In fatleakage from excised pylorus and abdominalfat from PD-dead salmon, SAV was identified. SAV in the fatleakage were examined for infectivity on fish cells and infectivity of SAV was confirmed by immunostaining.

Results from this project give no indication that sessile and free-living organisms on the cage, benthic organisms, sediment, biofilm and plankton are reservoirs for SAV or PMCV. The collected material analysed for SAV is from three plants and for PMCV from one plant. Although there have not been identified reservoirs for the viruses, fallowing and cleaning is required to ensure that the site is cleaned for organic material between stocks. It is also possible that other agents may have reservoirs other than salmon (e.g. *Paramoeba perurans*).

This project indicates that the salmon are the main reservoir for SAV and PMCV and that fat floating on the surface from plant with disease outbreak and high viral load may be a factor in the spread of PD. By fallowing and cleaning of equipment, organic matter from salmon will be removed and transmission of virus to recently released smolt will be prevented. Better routines for handling of dead salmon will be important to prevent the spread of infection since oil film can be transported by the upper waters from salmon farms with high viral load.

1 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn for prosjektet

Pankreassyke (PD) og kardiomyopatisyndrom (CMS) er virussykdommer som gir betydelige tap i norsk akvakulturnæring [2] [3] [4]. Kan virusene som forårsaker disse sykdommene ha reservoar i andre organismer, biofilm eller sediment på eller ved et anlegg, eller finnes virus bare i laksen selv? Er reglene i forbindelse med rengjøring og desinfisering på et anlegg etter PD-utbrudd nødvendig? SAV er blitt identifisert i flatfisk [5], og nylig i gråsteinbit (pers.kom. Renate Johansen). SAV har lite genetisk variasjon [6] og mange alfavirus har en artropod mellomvert [7] noe som tilsier at kanskje SAV også kan ha en mellomvert. SAV er i familien

CMS er en sykdom som tiltrer sent i sjøfasen, 14-18 mnd etter sjøsetting, og er forårsaket av PMCV [8] [9]. I 2011 ble metodikk for påvisning av PMCV utarbeidet [8]. PMCV er et virus som ikke tidligere er sett hos høyere vertebrater og derfor ønsket en å undersøke også innledningsvis for reservoar for PMCV på en CMS-lokalitet [10]. PMCV hører til familien *Totiviridae*. Virus i denne familien infiserer et bredt antall verter fra sopp til protozoer, reker, mygg, crayfish og flaggermus [11-15]. PMCV har vært påvist i en annen marin fiskeart, vassild (*Argentinus silus*) og i vill laks [16, 17]. Det er lav sekvensvariasjonen mellom norske PMCV isolat og et homogent virusreservoar er foreslått [18].

I 2008-2010 støttet Møre og Romsdal fylkeskommune et RUP-prosjekt (108/2008) der fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment og biofilm fra et PD-anlegg ble undersøkt for tilstedeværelse av SAV. I forlengelse av dette prosjektet ønsket en å få stort nok datamateriale til å konkludere og publisere funnene. I RUP-prosjektet ble SAV påvist med Real-Time PCR i sekresjonsprodukter, ekskresjon og lakselus fra smittet laks [19]. I 2012 viste Graham at SAV i avføring fra PD-laks inneholdt virus og at disse var infektive [20]. Virus i avføring og fett på vannoverflaten kan lett bli spredt med strøm og vind [21]. En ønsket derfor å undersøke om det var virus i fettavsisv fra død PD-laks og om dette viruset var infektivt.

1.2 Prosjektets omfang

Arbeidet i dette prosjektet ble delt inn i tre arbeidspakker og foregikk fra desember 2011 – april 2014:

WP 1: Konkludere på reservoarer for NSAV på marine akvakulturanlegg – 3 anlegg

I denne arbeidspakken ble fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton samlet fra tre PD-anlegg med pågående PD-utbrudd. Prøvene ble analysert ved real-time RT-PCR for å undersøke for tilstedeværelse av SAV. Det ble også samlet inn hjerter fra laks for å fastslå mengde virus i anleggene. I tillegg ble slim og feces undersøkt fra laks på PD-anlegg 1, og lakselus fra alle PD-anleggene.

WP2: Undersøkelse av potensielle reservoarer for PMCV – 1 anlegg

I denne arbeidspakken ble fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton samlet fra ett CMS-anlegg. Arbeidet var tilsvarende som for SAV i RUP-prosjekt (108/2008). Prøvene ble analysert ved real-time RT-PCR for å undersøke for tilstedeværelse av PMCV. Det ble også samlet inn hjerter fra laks som referanseprøver. I tillegg ble slim, feces og lakselus fra laks undersøkt.

WP3: Undersøke infektivitet i fettavsisv fra PD-dødlaks

I denne arbeidspakken ble metode for å undersøke fettavsisv fra pylorus- og buk fett og smitteforsøk på celler etablert. Fettavsisvet ble analysert ved real-time RT-PCR for å undersøke for tilstedeværelse av SAV og inokulert på fiskeceller for å undersøke infektivitet. Virus som replikerer i fiskeceller ble spesifikt påvist ved hjelp av immunfarging og bruk av SAV-spesifikke antistoffer.

1.3 Prosjektorganisering

Prosjektgruppen bestod av: Anne Stene, Vidar Aspehaug og Audny Hellebø (prosjektleder)

Prosjektmedarbeidere: Astrid Woll, Stein Eric Solevåg, Snorre Bakke, Anne-Marie Simonnes, Kristine Kvangarsnes og Turid Standal Fylling.

Styringsgruppen: Nina Santi (AquaGen), Vidar Aspehaug, Kristian Straume-Lie (Lerøy). Sistnevnte sluttet i Lerøy og ble erstattet av Ragnhild Aukan 29.04.2013.

Observatør for FHF: Merete Bjørgan Schrøder

1.4 Prosjektets effektmål

Effektmålet med dette prosjektet er å redusere spredning av PD og CMS i akvakulturnæringen. Begge disse sykdommene gir betydelige økonomiske tap for akvakulturnæringen og en bedre forståelse av smitteveier for SAV og PMCV kan gi muligheter til å iverksette tiltak for å redusere tap og bedre fiskevelferd.

1.5 Prosjektets resultatmål

- Innhenting og analysering av prøvemateriale fra SAV- og PMCV-smittede anlegg
- Systematisering av ovenstående prøvesvar og publisering
- Undersøke fettavsisv fra PD-død laks for SAV og undersøke virusinfektivitet i cellekultur
- Evaluere retningslinjene for brakklegging, desinfeksjon og dødfisk håndtering
- Foreslå tiltak som kan bidra til å begrense overføring av de patogene virusene

2 MATERIALE OG METODE

2.1 Valg av forskningsmetode

I prosjektet ble det valgt en risikobasert innfallsvinkel – prøvematerialer fra anlegg ble samlet inn når virus mengden i anlegget var høy i forbindelse med sykdomsutbrudd. Prøvemateriale som ble innsamlet var fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton. Tankegangen ved å velge en risikobasert innfallsvinkel var, at dersom virus ikke ble påvist i innsamlet prøvemateriale under høyt smittepress, så anså man sjansen for at prøvematerialet kan fungere som reservoar for SAV og PMCV etter brakklegging som lav.

For å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av SAV eller PMCV ble analysemetoden Real-Time RT-PCR benyttet. Denne metoden ble valgt grunnet den høye følsomheten. PatoGen Analyse AS (Larsgårdsveien 4, 6009 Ålesund) utførte alle PCR analysene. PatoGen er akkreditert etter den internasjonale standarden ISO17025. De har kvalitetssikring av analysene og analysen er inkorporert i automatiserte system.

For å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av infektivt SAV ble fiskeceller inokulert med fettavsvivet. Immunfluorescense antibody testing (IFAT) og Real-Time RT-PCR ble benyttet på cellekulturen for å påvise SAV.

2.2 Gjennomføring av prosjektet

2.2.1 Anleggene

To av de tre PD-anleggene som ble undersøkt befinner seg innenfor den endemiske sonen for PD (se tabell 2-1). Anlegg 1 og 2 hadde PD forårsaket av SAV3 og anlegg 3 hadde SAV2. Anlegget med CMS befant seg i Midt-Norge. Alle anleggene ble valgt på bakgrunn av prøvesvar fra regelmessig PCR-screening. Prøver fra alle anleggene ble samlet inn i forbindelse med sykdomsutbrudd da virusmengden i anleggene var antatt høy. Fra PD-anlegg X ble laks tatt ut til arbeidspakke 3 – undersøke fettavsviv fra PD-laks.

Anlegg	Prøvetakingstidspunkt	Dybde (m)	Laksestr (g)	virus	Fylke
CMS	April 2012	100	10000-15000	PMCV	16
PD-anlegg 1	Februar 2012	250-300*	600	SAV3	12
PD-anlegg 2	Mai 2013	50-100	600	SAV3	12
PD-anlegg 3	Oktober 2013	100-150	420	SAV2	16
PD-anlegg X	Februar 2013	irrelevant	4000	SAV3	15

Tabell 2-1 viser oversikt over anleggene som inngår i prosjektet. *= for dypt for å ta sedimentprøve

2.2.2 Prøver fra anleggene

Prøver av fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton ble samlet inn fra hvert anlegg. 20 av hver organisme ble forsøkt samlet av fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten. Av bunnlevende organismer ble de man fant prøvetatt. Ett til tre plankontrekk og sedimentprøver ble gjennomført. Biofilmprøver ble tatt på ulike anleggskonstruksjoner og på anleggsbåten. Det ble tatt 3 parallelle prøver fra hvert

sted. I tillegg ble hjerteprøver fra tyve laks inkludert som referanse på smittestatus i anlegget. Fra PD-anlegg 1 ble også slim og feces fra de tyve referanselaksene undersøkt. Fra alle PD-anleggene ble lakselus på de tyve laksene undersøkt. Prøvene fra laks ble skjært til sist for å forhindre kontaminering. 2 mm x 2 mm prøver ble skjært fra organismene og laks og overført til RNAlater (Qiagen, 76104). Mindre organismer ble overført hele til RNAlater.

Plankton ble samlet med planktonhåv med maskevidde på 100 µm og overført til 50ml rør.

Sediment ble tatt med Van Veen grabb. Bunnlevende organismer ble prøvetatt som over. Det øverste sedimentlaget ble overført til 50 ml rør.

Biofilm ble skrapet av fra flytering, anleggsbåt, alger og tauverk med svaber og overført til rør med transportmedium.

Alle 50ml rør og rør med transportmedium ble oppbevart ved +4 °C frem til levering hos PatoGen.

2.2.3 Dødfisk og fettavsviv

10 dødfisker (ikke i oppløsning) fra PD-anlegg 1 ble fordelt i 3 grupper. I gruppe 1 og 2 var det 3 dødfisker og i gruppe 3 var det 4 dødfisker. Pylorus- og buk fettvev fra dødfiskene ble skjært ut og lagt i beholdere med sterilt sjøvann. Vevet ble fordelt på to beholdere og inkubert ved +4 og +15 °C. Etter 2 dager ble fettavsvivet som hadde dannet seg på toppen tatt av og i) undersøkt for tilstedeværelse av SAV ved Real-Time RT-PCR og ii) lagt på CHSE celler for å undersøke infektivitet. Etter 4 dager ble fettfraksjon tatt av på ny og undersøkt for SAV ved Real-Time RT-PCR.

2.2.4 Inokulering av fettavsviv på cellekultur

CHSE (ATCC, CRL-1681) celler ble dyrket i Nunclon celleflasker (VWR, 734-2168) med dyrkingsmedium L-Glutamax (31415-029, Gibco) tilsatt 10% FBS (Thermo Scientific, HyClone) og splittet en gang i uken. For smittforsøk med SAV på CHSE celler, ble cellene sådd ut i 24-brønns plate (Falcon, 353047) med dekkglass (VWR, 631-1577) etter prosedyre av Christie [22] med noen endringer. I korte trekk, når celletettheten var 80 % ble cellene inokulert med 100 µl fettfraksjon og inkubert i 1t ved 15 °C. Cellene ble så vasket med Hank's saltløsning (Gibco, 14175) før 1 ml ny L-Glutamax med 0,1 mg/ml gentamicin (Gibco, 15750-037) ble tilført. Cellene ble inkubert videre ved 15 °C i en uke. Cellesupernatant ble så høstet og inkubert på nye CHSE-214 celler som beskrevet over og undersøkt for tilstedeværelse av SAV ved Real-Time RT-PCR. Cellene ble tatt videre til IFAT. Cellesupernatanten ble passert fire ganger.

2.2.5 IFAT

Cellene ble fiksert med 10 % formalin og farget med E2 SDV monoklonal antistoff (mottatt fra INRA, Frankrike) og anti-mus Alexafluor488 (Invitrogen, A11029) i henhold til Moriette [23]. Fluoroshield Mounting Medium (ABCAAB104139) ble benyttet ved montering av dekkglassene og cellene ble mikroskopert med Leica DM2000.



Bildet viser en mye brukt arbeidsstilling under prøveinnsamlingen.

2.2.6 Real-Time RT-PCR

70 µl celsesupernatant og fettavsiv ble tilsatt 750 µl QIAzol® (Qiagen, 79306) og inkubert i 10 min ved romtemperatur. Prøvene ble så oppbevart ved -20 °C frem til rensing av RNA og utføring av Real-Time RT-PCR i henhold til PatoGen sine metoder.

RNA ble rensset fra prøver på RNAlater og Real-Time RT-PCR ble utført i henhold til PatoGen Analyse sin akkrediterte metode for SAV påvisning og den lisensierte metoden for påvisning av PMCV.

2.3 AVVIK

- I arbeidspakke 1 ble et SAV2 anlegg inkludert istedenfor bare SAV3 anlegg
- To vitenskapelige publiseringer er under utarbeidelse, en er akseptert i Journal of fish diseases
- Artikkel i Norsk fiskeoppdrett (2013)
- Små justeringer i budsjettet har forekommet, men forbruket er innenfor rammene
- Avslutning av prosjekt ble utsatt med en måned

3 RESULTAT, DISKUSJON OG KONKLUSJON

3.1 Oppnådde resultater

3.1.1 Undersøkelse for SAV-reservoar på tre PD-anlegg

Tabell 3-1 viser oversikt over smittestatus i PD-anleggene på prøvetakingstidspunkt. Både på anlegg 1 og 2 er det lave Ct-verdier i hjerteprøver fra laks, disse anleggene er begge SAV3 anlegg. Lavere Ct-verdier betyr at det er mer virus i hjertevevet enn når Ct-verdien er høyere. Det tredje PD-anlegget var et SAV2 anlegg og Ct-verdiene i hjerteprøvene var høyere. Laks smittet med SAV2 har et annet sykdomsforløp og dødelighetsmønster enn SAV3 (pers.kom. Torunn Taksdal).

	Anlegg 1	Anlegg 2	Anlegg 3
Vev	hjerte	hjerte	hjerte
Antall positive	14	20	19
Ct gjennomsnitt	19,16	16,34	25,3
Ct variasjon	14,8–24,8	12,1–24,2	23-30,7
Ct SD	4,15	3,35	2,0

Tabell 3-1 Viser Ct-verdiene i hjertevevet til laks i PD-anleggene på prøvetakingstidspunkt. Tallene er basert på Real-Time RT-PCR av 20 tilfeldige laks. De ble fanget ved håv enten ved trenging av not (anlegg 1) eller ved foring (anlegg 2 og 3).

Fastsittende og frittlevende organismer på merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton ble undersøkt for SAV fra tre PD-anlegg med høyt smittepress for SAV. Det varierte hva man fant av organismer, og hvor mange på de ulike anleggene. Det ble ikke påvist SAV i noen av organismene ved merdkanten eller i bunnlevende organismer, og heller ikke i sediment, planktontrekk eller biofilm. SAV ble kun påvist i laksen selv (tabell 3-1) og i lus tatt fra laksen.

3.1.2 Undersøkelse for PMCV-reservoar på ett CMS-anlegg

Det ble samlet inn prøvemateriale fra ett CMS-anlegg. Tabell 3-2 viser smittestatus i anlegget på prøvetakingstidspunktet. Det var 100 % prevalens for PMCV og gjennomsnittlig Ct-verdi viser at det var mye virus i anlegget.

	PMCV-anlegg 1
Vev	hjerte
Antall positive	20
Ct gjennomsnitt	20,2
Ct variasjon	14,7–27,2
Ct SD	3,08

Tabell 3-2 viser Ct-verdier i CMS-anlegget på prøvetakingstidspunkt. Tallene er basert på Real-Time RT-PCR av 20 tilfeldige laks. De ble fanget ved håv ved foring.

Fastsittende og frittlevende organismer ved merdkanten, bunnlevende organismer, sediment, biofilm og plankton ble undersøkt for PMCV fra ett anlegg med høyt smittepress for PMCV. Alle analysene var negative for PMCV. Fettavsviv fra PD-dødfisk og infektivitet

10 dødfisk fra PD-anlegg 1 og PD-anlegg X ble undersøkt for SAV i hjerte, pylorus og abdomen. Det ble påvist SAV i de undersøkte vevene og det var mest virus (lavest Ct-verdi) i hjerte.

Dødfisken ble fordelt i grupper og buk fett og pylorus fett fra PD-dødfisk ble skjært ut og lagt i beholdere med sterilt sjøvann. Fettavsvivet ble tatt av etter 2 og 4 dagers inkubering ved 5 og 15 grader og undersøkt for SAV ved real-time RT-PCR. SAV ble påvist i fettavsvivet. Der var en indikasjon på økt virus fra dag 2 til 4, men der var liten forskjell mellom vev fra abdomen og pylorus inkubert ved 5 °C eller 15 °C. Siden cellekultur ikke var tilgjengelig da PD-anlegg 1 ble undersøkt ble PD-anlegg X prøvetatt og herfra ble CHSE celler inokulert med fettavsviv fra dag 2. SAV i fettavsvivet var infektivt.

3.2 Diskusjon

I dette prosjektet er ingen prøver funnet positive for SAV eller PMCV med mindre prøvene er tatt fra laks eller har opprinnelse fra laks. I forkant av prøveuttakene ble det diskutert hvilken del av påvekstorganismene som skulle prøvetas. For de fleste organismer ble det derfor besluttet å ta prøve fra munndelen eller fordøyelsesorgan/fordøyelsessystem. Det er ikke gjennomført vevstropisme for SAV eller PMCV for hver organisme, det er derfor en mulighet for at feil del av organismen er tatt ut. En annen tilnærming i prosjektet kunne vært å lage homogenat av hele organismen og tatt ut prøver av homogenatet til Real-Time RT-PCR. En av ulemper med denne innfallsvinkelen ville da være vanskeligere prøveopparbeiding.

Sedimentprøver var en utfordring pga sjødybden og hvilken bunntype som var under anleggene. På anlegg 1 var dybden under anlegget 250-300m og derfor ble ikke sedimentprøver tatt herfra. På de andre anleggene falt grabben ofte på stengrunn og det var derfor tidkrevende å få tatt sedimentprøver. Sedimentprøvene ble tatt nedstrøms for anleggene evt der det var grunnest. Der en lykkes, ble sedimentet levert på 50ml rør til PatoGen Analyse AS for påvisning av virus. Alle sedimentprøvene var negative. Dette var altså prøver fra enkelte punkt under anlegget, og det kan derfor være vanskelig å generalisere resultatet til hele bunnen.

Anleggene ble undersøkt når det var høyt smittepress i anlegget. I tillegg skulle nøtene ikke nylig være rengjort og vårpåslaget av organismer helst skulle ha skjedd. Da nøtene rengjøres forholdsvis hyppig viste seg å være vanskelig å få optimalt på alle parameterne. Vi fikk derfor ikke like mange organismer fra hvert anlegg siden vi måtte prioritere og da var et sykdomsutbrudd i riktig fase ansett som viktigst.

Lus ble funnet positiv for både SAV og PMCV. I og med at lusa ble tatt direkte fra laksen med skalpell så kan der være en mulighet for at slim fra laksen kan ha blitt med. Dette kan ha bidratt til positiv Real-Time RT-PCR. Etter erfaringene fra PD-anlegg 1 og CMS-anlegget tok vi derfor ut lusa på rør med sjøvann ved neste uttak på anlegg 2 med PD-syk laks – vi fikk likevel SAV positiv lus. Fra dette anlegget hadde vi også flytefeces. Flytefecesen som kjennetegner laks med PD lå som gule tråder i vannoverflaten og 4/10 av disse var positive for SAV. Dette var de positive prøvene i prosjektet og disse prøvene har sittet fast på laksen eller er blitt utskilt fra laksen.

3.3 Konklusjon

Organismer og småkryp som levde på anlegg under PD-utbrudd og CMS-utbrudd med høyt smittepress ble undersøkt i dette prosjektet. Prøvene fra 3 PD-anlegg og ett CMS-anlegg var samlet inn like før notvask skulle gjennomføres. I de innsamlede organismene og substansene på merd og bunn i dette studiet, ble ikke SAV eller PMCV påvist. I prosjektet forsøkte vi å samle inn så mange påvekstorganismer som mulig – og vi kunne altså ikke spore SAV i noen av disse. Det anses derfor som lite sannsynlig at SAV har reservoar i annet enn laksen selv. Det var kun ett CMS-anlegg som ble undersøkt, men i prosjektet fikk vi ingen indikasjon på at PMCV har andre reservoarer enn laksen.

Fettrikt vev fra dødfisk fra to av de prøvetatte PD-anleggene ble lagt i sjøvann på lab. Fettfraksjonen som dannet på vannoverflaten seg etter ett døgn oppbevaring ble undersøkt for tilstedeværelse av SAV. Her ble det påvist virus og viruset viste seg å være infektivt på cellekultur. PD viruset har en kappe som inneholder lipider og kan derfor tiltrekkes fetthinnen på overflaten. Tilsvarende undersøkelser ville vært av stor relevans for andre virus for å vurdere fett som en "transportvektor". Ikke bare for virus fra død fisk, men også for virus som utskilles fra levende laks.

Resultatene fra studiet indikerer derfor at laksen i seg selv er det største reservoaret for SAV. For å begrense spredning av viruset er det viktig å begrense mengden virus som transporteres ut av anlegget. En rask og effektiv fjerning av dødfisk ansees derfor som svært viktig for å begrense dannelse av fettfilm på overflaten. Nye metoder, systemer, teknologi for bedre håndtering av dødfisk og overskuddsvann ved opptak er også viktig. Metoder for å fjerne fettfilm fra anlegg er noe vi har begynt å se på.

De gjeldende rutiner for rengjøring og brakklegging synes tilstrekkelig siden organismene som vokser på merd og på bunnen ikke inneholdt SAV og PMCV. Vi vet ikke om dette gjelder for andre patogene mikroorganismer. Amøben, *Paramoeba perurans*, antas å kunne ha et reservoar i fastsittende og eller frittlevende organismer på merden siden en nær beslektet art (*Neoparamoeba pemaquidensis* er registret i m.a. amfipoder, gul sjøpung, hydroider, blåskjell mfl. [24]). Det er fortsatt mye usikkert om reservoarer av patogener innenfor akvakulturnæringen. Det er viktig å utvikle en drift og en forvaltning som bidrar til godt omdømme, god fiskehelse og økonomisk og miljømessig bærekraft. En helhetlig tankegang og fokus på alle ledd i næringen er nødvendig.

Prosjektgruppen har levert inn innspill til to prosjektet til FHF for å undersøke betydningen av overflatefettet for spredning av andre laksepatogene virus og m.a. utnytte eksisterende prøvemateriale for å undersøke for tilstedeværelse av *Paramoeba perurans*.

Videre undersøkelse på hvilke patogene fiskevirus som kan transporteres i fettfilm og sekresjonsprodukter fra laks og transport av disse bør undersøkes nærmere.

4 LEVERANSER

Dato	Sted	Hva	Form	Tittel
28.03.2012	Oslo	FHF-møte angående mulige CMS-aktiviteter i FHF-regi	Presentasjon	CMS aktivitetene på Møreforsking
08.02.2012	Bergen	Rensefisk - Workshop - FHF	Presentasjon	Rognkjeks – mulig smittebærer for SAV?
27.03.2012		Nettavis - Kyst.no	Pressemelding	Skal forske på spredning av PD og CMS
23.03.2012		Nettsida til Høgskolen i Ålesund	Nyhets sak	Forskning på virus hos laks
26.03.2012		Radio - NRK møre og romsdal	Nyhets sak	Forskning på virus hos laks?
26.03.2012		Nettavis NRK distrikt	Nyhets sak	Forskar på laksesmitte
26.03.2012		Nettsida til Møreforsking	Nyhets sak	Forskning på reservoarer for laksevirus
27.03.2012		Nettavis - Intrafish.no	Pressemelding	Ny forskning på PD og CMS
05-06.02.2013	Bergen	Frisk Fisk	Poster	Kan småkrypp på oppdrettslokalteter med PD-syk laks bære virus?
10.06.2013	Trondheim	Workshop	Deltager	Biofouling & Gill Disease workshop
Juli 2013		Norsk fiskeoppdrett	Tema magasin	Artikkel i temanummer om PD
27.-28.08.2013	Bergen	FHF-samlingen om økt overlevelse i sjøfasen	Presentasjon	Hvor finnes sykdomsfremkallende virus i et lakseanlegg og hvordan kan vi begrense videre smitte?
05.09.2013		Nettavis - Kyst.no	Tema magasin	Artikkel: Fetthinnen på overflaten kan raskt spre PD-smitte
3-4.02.2014	Trondheim	TriNation	Presentasjon	Reservoirs and vectors of SPDV
1-3.04.2014	Tromsø	Havbrukskonferansen	Presentasjon	Hvor finnes PD-virus i lakseanlegg i sjø?
Akseptert med endringer		Journal of fish diseases	Vitenskapelig artikkel	First detection of salmonid alphavirus in liquid fat fractions leaking from dead PD infected salmon
Manus i arbeid		Vitenskapelig artikkel – trolig Journal of fish diseases	Vitenskapelig artikkel	

5 KVALITETSSIKRING

Det er Møreforsking som har hatt prosjektlederansvaret og prosjektet har fulgt Møreforsking sine rutiner. Internt i Møreforsking benytter en seg av en 9-trinnsmodell for å sikre prosjektgjennomføringen. Prosjektgruppen samt styringsgruppen har bidratt til kvalitetssikring. Rapporten er godkjent av styringsgruppen, prosjektgruppen og internt i Møreforsking. Rensing av RNA og Real-Time RT-PCR analysene er kvalitetssikret i henhold til PatoGen Analyse AS sine rutiner.

6 REFERANSER

1. Fiskehelse rapporten, *Fiskehelse rapporten 2013*. Veterinærinstituttet 2014, 2013.
2. McLoughlin, M. and D. Graham, *Alphavirus infections in salmonids—a review*. Journal of fish diseases, 2007. **30**(9): p. 511-531.
3. Brun, E., et al., *Cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: occurrence and direct financial losses for Norwegian aquaculture*. Diseases of aquatic organisms, 2003. **56**(3): p. 241-247.
4. Aldrin, M., et al., *A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway*. Preventive veterinary medicine, 2010. **93**(1): p. 51-61.
5. Snow, M., et al., *Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origins of salmon pancreas disease in aquaculture*. Diseases of aquatic organisms, 2010. **91**(3): p. 177-188.
6. Karlsen, M., et al., *Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family Togaviridae)*. Arch Virol, 2006. **151**(5): p. 861-74.
7. Powers, A.M., et al., *Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses*. Journal of Virology, 2001. **75**(21): p. 10118-10131.
8. Haugland, Ø., et al., *Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family*. Journal of virology, 2011. **85**(11): p. 5275-5286.
9. Lovoll, M., et al., *A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS)*. Virol J, 2010. **7**: p. 309.
10. Nilsen, P., et al., *dsRNA VIRUS OF FAMILY TOTIVIRIDAE CAUSES HEART RUPTURE OF SALMON*.
11. Wickner, R., C. Wang, and J. Patterson, *Family Totiviridae*. Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses, 2005: p. 571-580.
12. Yang, X., et al., *A novel totivirus-like virus isolated from bat guano*. Archives of virology, 2012. **157**(6): p. 1093-1099.
13. Longshaw, M., *Diseases of crayfish: a review*. Journal of invertebrate pathology, 2011. **106**(1): p. 54-70.
14. Zhai, Y., et al., *Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family Totiviridae*. Journal of General Virology, 2010. **91**(11): p. 2836-2845.
15. Nibert, M.L., *'2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus*. Journal of general virology, 2007. **88**(4): p. 1315-1318.
16. Böckerman, I., et al., *Prevalence of piscine myocarditis virus (PMCV) in marine fish species*. Journal of fish diseases, 2011. **34**(12): p. 955-957.
17. Garseth, Å.H., E. Biering, and T. Tengs, *Piscine myocarditis virus (PMCV) in wild Atlantic salmon *Salmo salar**. Dis Aquat Org, 2012. **102**: p. 157-161.
18. Wiik-Nielsen, J., et al., *Genetic variation in Norwegian piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.* Journal of fish diseases, 2013. **36**(2): p. 129-139.
19. RUP-prosjektrapport, *Tiltak mot spredning av virussykdommer i sjøbasert oppdrett*. 2010.

20. Graham, D., et al., *Detection of salmon pancreas disease virus in the faeces and mucus of Atlantic salmon, Salmo salar L., by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge*. Journal of fish diseases, 2012. **35**(12): p. 949-951.
21. Stene, A., et al., *Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms*. Journal of fish diseases, 2014. **37**(2): p. 123-134.
22. Christie, K., et al., *Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, Salmo salar L., in Norway*. Journal of Fish Diseases, 1998. **21**(5): p. 391-394.
23. Moriette, C., et al., *Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the Sleeping disease virus, an aquatic alphavirus*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 3119-27.
24. Tan, C.K.F., B.F. Nowak, and S.L. Hodson, *Biofouling as a reservoir of Neoparamoeba pemaquidensis (Page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon*. Aquaculture, 2002. **210**(1-4): p. 49-58.