



Kan vi bli mer effektive i jakten på ILA-viruset?

Kan en ikke-destruktiv prøvetakingsmetode være nyttig i jakten på ILA-viruset? Og hvordan fordeler ILA-viruset seg i smittede populasjoner?

Mona Dverdal Jansen, Torfinn Moldal, Knut Falk, Veterinærinstituttet
mona-dverdal.jansen@vetinst.no

Dette har et nylig avsluttet FHF-prosjekt (FHF 901181) forsøkt å belyse og vi har funnet at:

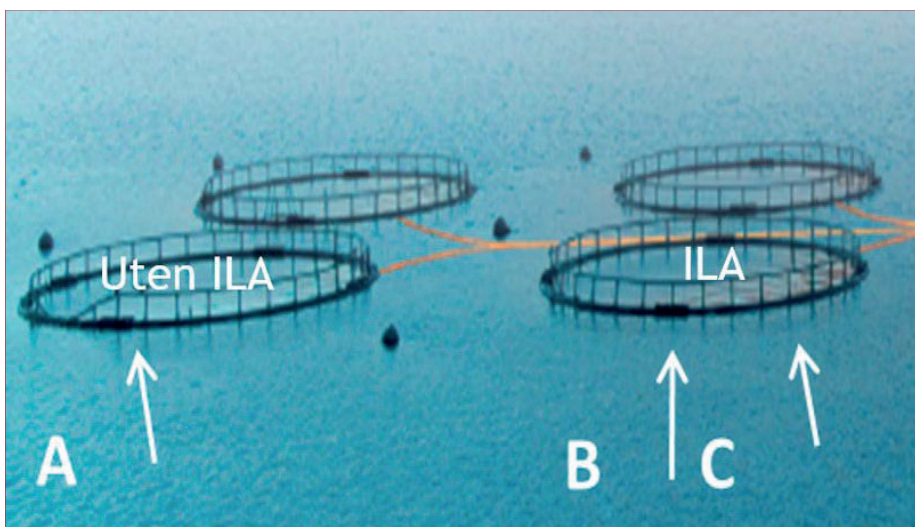
- Svabring av gjelle og hud er velegnet til å påvise ILA-virus på anleggsnivå. Dette gjelder spesielt for fisk uten kliniske tegn på ILA.
- Selv i populasjoner vi vet er smittet av ILA-virus kan det være krevende å finne ILA-virus positiv fisk, særlig der det ikke er klinisk syk fisk.
- Når relativt få fisk testes, selv med en følsom metode som PCR, er det ofte ikke mulig å sikkert skille mellom smittede og usmittede populasjoner.
- Om man antar at få fisk i populasjonen er smittet, må man øke antallet fisk som skal prøvetas.
- Svabring av fisk på slaktelinje er i de fleste tilfeller tilstrekkelig sensitiv til å påvise ILA-virus på anleggsnivå. Metoden kan dermed være egnet som en tilleggsmetode for å dokumentere ILA-status på fiskegrupper ved slakt.

Biosikkerhet og overvåking

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en alvorlig virussykdom forårsaket av den sykdomsfremkallende varianten av ILA-viruset (ILAV HPRdel). ILA er listeført av Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE) og kategorisert som C-sykdom i EU. I 2020 var det 23 stadfestede tilfeller av ILA i Norge, noe som var det høyeste antallet siden 1992. Ved utgangen av juli var det 19 stadfestede ILA-tilfeller i 2021, noe som kan tyde på at det høye antallet fra i fjor ikke blir et engangstilfelle.

Biosikkerhet er i dag et grunnprinsipp innen sykdomskontroll i akvakultur. Innføring av generelle biosikkerhetsrutiner og etablering av metoder for påvisning av virus var sentrale tiltak for å få kontroll på ILA-epidemien som herjet Norge på slutten av 80-tallet og begynnelsen av 90-tallet. For å kunne ivareta god biosikkerhet må man kunne skille smittede populasjoner fra antatt ikke-smittede populasjoner. Dermed trengs god og effektiv overvåking. For å få til dette må man ha kunnskap om hvordan et smittestoff fordeler seg i smittede populasjoner og hvilket prøvetakingsregime som med høyest sikkerhet avspeiler virkeligheten mht populasjonens eksponeringsstatus og eventuell smittestatus.

De fleste ILA-mistankene som offentliggjøres av Mattilsynet blir stadfestet. Likevel er det noen lokaliteter som blir stående med fisk i lang tid etter første påvisning av ILAV HPRdel uten at det lar seg gjøre å stadfeste en sykdomsdiagnose i henhold til sykdomskriteriene. I noen av tilfellene viser det seg vanskelig selv å påvise ILA-virus i senere prøveuttak. Et sentralt spørsmål blir da i hvilken grad fisken på



Figur 1: Gruppedeling ved prøvetaking på anlegg

en slik lokalitet utgjør en smitterisiko for lokaliteter i nærheten? Mer detaljert kunnskap om de smittede populasjonene er én del av informasjonen vi trenger for å kunne besvare dette spørsmålet.

Ressurskrevende prøveuttak

En av hovedutfordringene når det gjelder prøvetaking er at tilstrekkelig store prøveuttak ofte er svært ressurskrevende. I tillegg til lovpålagte minimumskrav for prøvetaking, for eksempel i ILA-kontrollområder, er det statistiske beregninger basert på forventet andel smittede fisk, egenskaper ved den diagnostiske testmetoden og hvor sikker man vil være på resultatet som avgjør antall fisk som bør prøvetas. Hvis man antar at få fisk er smittet, er antallet fisk som bør prøvetas betraktelig høyere enn minimumskravet for testing innen ILA-kontrollområder.

For å stille en sykdomsdiagnose for ILA må man ta prøver av indre organer. Dersom man derimot i første rekke forsøker å få informasjon om ILA-viruset er tilstede så kan kanskje en ikke-destruktiv prøvetakingsmetode som svabring være effektiv? Slike uttak krever betydelig mindre ressurser og skåner den prøvetatte fisken utover nødvendig håndtering.

Overflatesvabring av fisk på anlegg

For å teste om overflatesvabring er egnet for påvisning av ILA-virus på smittede lokaliteter tok vi prøver fra fem lokaliteter med ILA-diagnose. Vi tok prøver fra 4 til 45 dager etter offisiell ILA-mistanke, med en median på 10 dager. På hver lokalitet ble det tatt prøver av tre fiskegrupper (**Figur 1**):

- tilsynelatende friske fisk fra merd uten ILA-mistanke eller diagnose (gruppe A)
- tilsynelatende friske fisk fra merd med ILA-diagnose (gruppe B)
- klinisk syk fisk fra merd med ILA-diagnose (gruppe C)

Fra hver fisk ble det tatt vevsprøve av nyre og svaberprøve av gjelle og/eller hud og disse ble undersøkt med PCR (**Tabell 1**). Vi fant at ryggfinesvaber var den metoden som ga høyest andel positive prøver (42%), mens andelen positive nyreprøver var 21%. Siden svaberprøver fra overflaten av fisken fanger opp miljøeksponering

for ILA-viruset og ikke nødvendigvis er ensbetydende med en infeksjon var det forventet at svabringen ville gi flere positive prøver enn nyreprøver.

Et av de mest interessante funnene var mangelen på positive prøver i flere av de prøvetatte gruppene. På ett av de undersøkte anleggene (Anlegg 2) var alle prøvene negative i alle fiskegruppene. På ett annet anlegg (Anlegg 4) fant vi kun positive prøver fra gruppe C (syk fisk i ILA-merd), mens all fisk i de andre to gruppene var negativ.

Det var for øvrig få eller ingen positive prøver fra fisk i gruppe A (frisk fisk i merd uten ILA) på alle de undersøkte anleggene, og her var det kun svaberprøver som ga funn av ILA-virus. I gruppe B (frisk fisk i ILA-merd) fant vi positive prøver i tre av anleggene (Anlegg 1, 3 og 5) og for alle var det var omkring 20% positive nyreprøver. I ett av anleggene (Anlegg 3) var andelen positive svaberprøver lavere enn det som ble funnet for nyreprøver, mens andelen positive svaberprøver var høyere ved de to andre anleggene.

På de to anleggene som ble prøvetatt lengst tid etter offisiell ILA-mistanke (Anlegg 1 og 2, prøvetatt henholdsvis 45 dager og 23 dager etter offisiell ILA-mistanke) fant vi ingen eller svært få fisk å prøveta i gruppe C (syk fisk i ILA-merd), og ingen testet positivt. Det lave antallet syke fisk på disse anleggene kan ha sammenheng med påbegynt utslakting ved prøvetakingstidspunktet. På to andre anlegg (Anlegg 3 og 5, begge prøvetatt 10 dager etter offisiell ILA-mistanke) var det en høy andel positive fisk i gruppe C, både på vevsprøver og svaberprøver. På det siste anlegget (Anlegg 4, testet 4 dager etter offisiell ILA-mistanke) var en moderat andel av nyreprøvene positive (37%) og en relativt høy andel (77%) av gjelle- og ryggfinesvabre positive i gruppe C.

Overflatesvabring av fisk på slaktelinje er ofte sensitiv nok til å påvise ILA virus på anleggsnivå

Vi testet også ut overflatesvabring på slakteri. Fisk fra totalt åtte anlegg, fire uten kjent tilstedeværelse av ILA-virus og fire anlegg med ILA-diagnose, ble prøvetatt på slaktelinja (**Tabell 2**). Seks

prøveuttak ble gjort på landbasert slakteri mens to ble gjort på slaktebåt. Vi tok ryggfinesvaber fra tilfeldig utvalgte fisk fra hvert anlegg. Resultatene kan kun vurderes på anleggsnivå fordi vi antar at krysskontaminering mellom individer på slaktelinja forekom.

Fra lokaliteter uten ILA ble kun den ikke-sykdomsfremkallende ILA-virus varianten (ILAV HPR0) funnet på fisk fra ett av anleggene (Ktr 1). Henholdsvis alle og halvparten av prøvene var positive fra to ILA-anlegg (ILA 1, ILA 2) prøvetatt 12 og 10 dager etter offisiell ILA-mistanke. Fra det tredje ILA-anlegget (ILA 3, prøvetatt 18 dager etter offisiell ILA-mistanke) ble kun ILAV HPR0 funnet. Dette var fisk fra merd uten ILA-diagnose da ILA-merden var tømt. Det siste ILA-anlegget (ILA 4), prøvetatt 74 dager etter offisiell ILA-mistanke, hadde én positiv prøve. Merden antas å ha vært tidlig i sykdomsforløpet basert på resultater fra overvåkingsprøver tatt etter utslakting av ILA-merd.

Regnbueørret kan være et reservoar for ILA-virus

Det har vært begrenset med dokumentasjon på ILA-virus infeksjoner i regnbueørretpopulasjoner. For å lære mer om dette benyttet vi historiske prøver fra ILA-tilfeller på to lokaliteter som hadde både regnbueørret og atlantisk laks. På prøvetakingstidspunktet hadde laksen blitt slaktet ut mens regnbueørreten fortsatt sto i sjø. Det ble prøvetatt med svaberprøver og vevsprøver.

Resultatene viste at regnbueørretpopulasjonene opprettholdt ILA-virus infeksjonen i mange måneder etter at laksen var fjernet fra lokaliteten (Alarcon et al. 2021). Ut i fra dette mener vi at regnbueørret må anses som et reservoar for ILA-virus, og dermed må tas i betraktning ved håndtering av ILA-utbrudd.

Tabell 1: Analyseresultater fra PCR analyser på prøver fra sjøanlegg.

Anleggs-nummer	Grp	N	Vevsprøve nyre	Svaber gjelle	Svaber brystfinne	Svaber ryggfinne
			Positive n (%)	Positive n (%)	Positive n (%)	Positive n (%)
1	A	28	0	0	0	0
1	B	60	14 (23%)	18 (30%)	28 (47%)	47 (78%)
1	C	0	n/a	n/a	n/a	n/a
2	A	30	0	n/a	0	n/a
2	B	30	0	n/a	0	n/a
2	C	9	0	n/a	0	n/a
3	A	30	0	6 (20%)	0*	1 (3%)
3	B	30	6 (20%)	4 (13%)	3 (10%)	5 (17%)
3	C	30	29 (97%)	29 (97%)	29 (97%)	27 (90%)
4	A	30	0	0	0	0
4	B	30	0	0*	0	0*
4	C	30	11 (37%)	23 (77%)	12 (40%)	23 (77%)
5	A	29	0	2 (7%)	n/a	1 (3%)
5	B	30	7 (23%)	28 (93%)	n/a	20 (67%)
5	C	23	20 (87%)	23 (100%)	n/a	21 (91%)

n/a = ikke prøvetatt

* For brystfinesvaber var det 28 analyserte prøver for lokalitet 3, Gruppe A. For gjellesvaber og ryggsvaber var det 29 analyserte prøver for lokalitet 4 Gruppe B.

Bør vi forsøke å bli mer effektive i jakten på ILA-viruset?

Svabring for ILA-virus kan foreløpig ikke benyttes som eneste testmetode, spesielt ikke i tilfeller der det er mistanke om tilstedeværelse av den sykdomsfremkallende virusvarianten ILAV HPRdel eller ved klinisk sykdom. Svabring av slimhinner er imidlertid en veletablert testmetode hos landdyr og innen humanmedisin (inkludert for koronavirus), så fremtidig utvidet bruk av svabring også innen akvamedisin er ikke usannsynlig. Et av de store spørsmålene når man prøvetar overflater er om det man fanger opp i testen er intakte, smittsomme viruspartikler eller om det kun er virusfragmenter som avdekkes, og dermed om det er snakk om en reel infeksjon eller ikke. Ved hjelp av en tilleggspcr fant vi tegn på replikasjonsaktivitet i virusene, noe som antyder at det var potensielt smittsomme viruspartikler i prøvene. Dette gjaldt prøver fra laks både på anlegg og slakteri, samt i regnbueørret. En annen metode som er under utprøving er analyser av vannprøver for avdekke om ILA-virus er tilstede i vannmassene på et anlegg. I likhet med svabring av fiskeoverflater sier en slik test kun noe om eksponeringsstatus, men prøvetakingen er enda enklere og skåner fisken fullstendig. Metoden har vist seg å være effektiv for å

fange opp PD-virus (Bernhardt et al., 2021) og foreløpige resultater for ILA-virus er lovende (Weli et al., 2021).

Det er selvsagt ingen som ønsker å finne sykdomsfremkallende ILAV HPRdel da den utgjør en trussel mot fiskehelse, inntjening og markedsadgang. Selv den ikke-sykdomsfremkallende ILAV HPR0 er uønsket gitt at den kan gi opphav til ILAV HPRdel. Til tross for dette mener vi at det bør bli et større fokus på å benytte metodene, og kombinasjoner av metoder, som gir størst mulighet til å finne ILA-virus på et tidlig stadium dersom det er tilstede. Dette vil gi best mulig oversikt over tilstedeværelse og utbredelse og dermed sikre rask håndtering av ILAV HPRdel for å minimere smittespredning •

Referanser

- Alarcón, M., Moldal, T., Jansen, M. D., Aamelfot, M., Sindre, H., Lyngstad, T. M., Falk, K. (2021) *Infectious salmon anaemia virus detected by RT-qPCR in Norwegian farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)*. Journal of Fish Diseases, 44, 479-481. <https://doi.org/10.1111/jfd.13315>
- Bernhardt, L.V., Myrmel, M., Lillehaug, A., Qviller, L., Weli, S.C. (2021) *Concentration and detection of salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt salmon*

(Salmo salar) cohabitant challenge. Dis Aquat Org 144:61-73. <https://doi.org/10.3354/dao03572>

Weli, S.C., Tartor, H., Spilsberg, B., Dale, O.B., Lillehaug, A. (2021) *Short communication: Evaluation of charged membrane filters and buffers for concentration and recovery of infectious salmon anaemia virus in seawater*. PLoS ONE 16(6): e0253297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253297>

Tabell 2: Resultater fra PCR analyser av svaberprøver (ryggfinnebase) tatt på slaktelinja.

Anleggsnummer	ILA-status	Ant dager ILA-mistanke (MT) - prøvetaking	Prøvetakingssted	qPCR ant. positive/ ant. testet	Sekvensering
Ktr 1	Uten ILA	Ikke relevant	Landbasert slakteri	38/150	ILAV HPR0
Ktr 2	Uten ILA	Ikke relevant	Landbasert slakteri	0/150	Ikke relevant
Ktr 3	Uten ILA	Ikke relevant	Landbasert slakteri	0/150	Ikke relevant
Ktr 4	Uten ILA	Ikke relevant	Landbasert slakteri	0/150	Ikke relevant
ILA 1	ILA påvist	12	Slaktebåt	156/156	ILAV HPRdel Samme delesjon som ved stadfestelse
ILA 2	ILA påvist	10	Slaktebåt	78/150	HPRdel Samme delesjon som ved stadfestelse
ILA 3	ILA påvist	18	Landbasert slakteri	38/150	ILAV HPR0
ILA 4	ILA påvist	74	Landbasert slakteri	1/150	Ingen sekvens