

TriNation 2024: God biosikkerhet for å redusere PD og CMS er positivt også for andre infeksjoner

På årets TriNation-møte fikk deltakerne høre oppdatert status i Norge, Skottland, Irland og nytt av året; Færøyene, på hjertelidelsene PD, CMS og HSMB. Her får du et innblikk i noe av den kunnskapen som ble formidlet.

Tore Hovland, Aqua Kompetanse, Norge;
Samantha White, Marine Institute, Irland og
Sonal Patel, Veterinærinstituttet, Norge

Årets TriNation-konferanse, den 19. i rekken, ble avholdt i Bergen tidligere i år og samlet 119 deltakere fra hele 12 land; Irland, Skottland, Norge, Færøyene, Island, Danmark, Chile, Storbritannia, Spania, Sveits, Canada og USA, for en gjennomgang av det siste på status fra felt og forskning for hjertelidelsene PD, CMS og HSMB.

I tillegg til oppdateringer fra de tre arangørlandene fikk vi i år også en statusrapport fra Færøyene.

Statusoppdateringer

Norge

Trenden fortsetter fra fjoråret med en nedgang i PD-tilfeller i Norge, men der lokale påvisninger i områder nord for endemisk PD-sonen gir grunn til å understreke viktigheten av å prioritere kontinuerlig arbeid med biosikkerhet. Dette er avgjørende for å unngå at smitten får etablere seg. Av forklaringer på den generelle nedgangen i antall registrerte PD-tilfeller nevnes tidlig screening, fokus på biosikkerhet, koordinert brakklegging, operasjonelle- og miljørelaterte faktorer i tillegg til økt vaksineringsgrad.

Aktører som har klart å samarbeide godt sammen der biosikkerhet har vært prioritert over tid har hindret introduksjon av PD-smitte og dermed unngått sykdomsutbrudd.

Når det gjelder de ikke rapporteringspliktige sykdommene; CMS og HSMB er sistnevnte med virusvariant PRV-1 svært

utbredt hos atlantisk laks og påvises ofte i settefiskanlegg og matfiskanlegg i Norge. Påvisning av PRV-3 hos regnbueørret ble rapportert fra 9 anlegg i 2023 som er på samme nivå som året før. Både CMS og HSMB rangeres på bakgrunn av årlige innsendte spørreskjemaer å være innenfor de 10 viktigste årsakene til dødelighet i 2023, og dermed utgjør disse to virusykdommene større problemer for næringen i dag enn tilfellet er for PD. Fordi det for CMS og HSMB ikke foreligger krav om rapportering til myndighetene antas det at det reelle antallet av tilfeller kan være høyere enn det som er registrert.

Irland

Anleggene i Irland drives økologisk og er alle lokalisert til vestkysten og ligger veldig eksponert. Produksjonen er liten sammenlignet med Norge; utsettet er på bare 5 millioner fisk. De største helseutfordringene nevnes å være PD og CMS, i tillegg nevnes Piscirickettsiose, Tenacibaculose og gjelleproblemer forårsaket av alvorlige tilfeller med AGD, maneter og algeoppblomstringer. På den positive siden er det registrert de laveste lusenivåene på 20 år, noe som har medført en markant nedgang i antall mekaniske lusebehandlinger.

For 2023 generasjonen var ni av tolv lokaliteter vaksinert mot SAV, og det ble brukt tre ulike SAV-vaksiner, der DNA-vaksine rapporteres å prestere best. Både genotype SAV 1 og 4 ble registrert på de positive lokalitetene. Etter lave nivåer av SAV registrert i 2012 med økning i 2013 har trenden vært fallende frem mot 2020,



TriNation 2024 i Bergen. Deltakere fra 12 land samlet for å utveksle erfaringer og diskutere videre satsing for å redusere hjertelaterte utfordringer med PD, CMS og HSMB.

for deretter igjen å øke. Det rapporteres om en økning i kliniske SAV-caser med alvorlig muskelpatologi og taperfisk, men samtidig observeres det mindre grad av hjertepatologi. Kan det skyldes en endring i virus-tropisme? Screening for SAV i Irland gjennomføres med blodprøvetaking og med analyse for virusnøytralisering, serologi, og måling av CPK-nivåer i tillegg til histologisk undersøkelse av organer ved alvorlige tilfeller av muskelpatologi.

PRV /HSMB er utbredt i Irland uten de store innvirkningene og kun ett klinisk tilfelle så langt er registrert (2015) og da med lav dødelighet.

CMS er registrert med få alvorlige kliniske tilfeller i 2023 og disse var da på hovedsakelig stor slakteklar fisk. Det første CMS utbruddet ble registrert i 2012 med påfølgende få tilfeller frem til 2016. Deretter har det vært registrert CMS på fisk allerede fra 4 måneder etter sjøsetting der ungfisk har hatt et mer akutt forløp. Fra 2016 har det vært en stadig økning



PD TriNation-initiativet ble etablert i 2005 med mål om å integrere og fokusere aktivitetene til akademia og industrien fra Norge, Irland, Skottland og mer nylig andre regioner innen lakseoppdrett.

Dette industriledede initiativet har gjort betydelige bidrag til å utvikle en bedre forståelse av PD og relaterte tilstander ved å oppmuntre til ny og samarbeidende forskning, samt dele resultater på en åpen måte.

TriNation-initiativet styres av en styringskomité som består av én representant fra hvert land, en lokal arrangør og en sekretær.

Styringskomiteen har vært revidert og består av:

President: Tore Hovland, Aqua Kompetanse, Norge
 Komitémedlem og sekretær: Sonal Patel, Veterinærinstituttet, Norge
 Komitémedlemmer: Marit Stormoen, NMBU, Norge; Sven Martin Jørgensen, FHF, Norge; Kim Thompson, Moredun Scientific, Skottland; Kimberley McKinnell, Bakkafrost, Skottland; Susie Mitchell, Pharmaq Analytiq, Irland; Samantha White, Marine Institute, Irland

Referansegruppen har også vært revidert og består nå av: Chris Mitchell (WellFish Tech), Skottland; Anne Berit Olsen (Veterinærinstituttet); Iain Berrill (Salmon Scotland); Paul Savage (Agri-Food and Biosciences Institute), Irland
 Marian McLoughlin, Irland har takket ja til å fortsette samarbeidet i en Mentor-rolle.



Det var stort engasjement blant deltakerne med diskusjoner om blant annet vaksineringsstrategier, overvåkningsmetoder, biosikkerhetstiltak og andre faktorer som kan være med på å forhindre sykdomsutbrudd.

i tilfeller fra år til år og nå er omkring 30% av lokalitetene positive. Samtidig har det de to siste årene igjen blitt registrert flest tilfeller på stor fisk. Virus påvises gjerne i flere merder, men klinikk utvikles gjerne bare i enkeltmerder. Når kliniske tegn blir synlig, er tendensen at dødeligheten vedvarer frem til slakt. Kliniske tegn og histopatologi korrelerer med virusmengde. Dødeligheten øker ved stressituasjoner og håndteringer, og det sees ikke tegn til restitusjon av affisert fisk. Håndtering av CMS-fisk inkluderer ofte forsert slakt etter at overvåking av utvikling i virusmengde og evalueringer av alvorlighetsgrad hos klinisk affisert fisk er foretatt og når CMS-dødelighet begynner å gjøre seg gjeldende. Selektiv avl av resistens mot CMS pågår.

Det er behov for mere forskning rundt epidemiologien til sykdommen og hva risikoen for vertikaloverføring betyr, samt vaksineutvikling og om det vil være mulig med behandling. Det er også behov for å kartlegge kostnader i forbindelse med selektiv avl.

Skottland

Siden mars 2021 har Salmon Scotland endret på rapporteringen av dødelighet. Det betyr at alle virussykdommer grup-

peres sammen, inkludert PD, CMS og HSMB. Dette begrenser derfor muligheten til å studere mer detaljert utbredelsen av de enkelte virussykdommene.

Næringen har imidlertid akseptert anbefalingen fra «The Farmed Fish Health and Welfare Working Committee» at ekstraordinære dødelighetshendelser skal rapporteres til «The Marine Directorate, Fish Health Inspectorate». Kriteriene for produksjon av laks i sjø er nå tatt inn som del av «Code of Good Practice (CoGP)».

CoGP-dødelighetsdata viser en økning i antall tilfeller med virale sykdommer fra 2022 til 2023 for hhv.; CMS (31 til 45), HSMB (6 til 7) og PD (7 til 15).

Færøyene

I år fikk vi for første gang også en oppdatering fra Færøyene på et TriNation møte. I statusoppdateringen kom det frem at hovedårsaker til dødelighet i fjor har vært linket til håndtering, sår, smoltifisering, noe sykdom og selangrep. Det kom frem at prevalensen av CMS korrelerer med antall termiske behandlinger mot lus. Det rapporteres videre om at utbrudd av HSMB viser en økning og at det fortsatt er en del usikkerhet rundt årsaker til det. Det vises imidlertid til at forskjeller

i virulensen til PRV-1 ligger i genomet til viruset, der 10 aminosyrer (aa) synes å definere lav- vs. høyvirulent PRV-1. De fleste PRV-1 variantene fra Færøyene bærer lavvirulent variant. Når det gjelder SAV har det aldri vært påvist på Færøyene.

Produksjon av storsmolt fremheves som hovedstrategi for å redusere håndtering og sykdom knyttet til dødelighet på sjø-lokaliteter. Redusert oppholdstid i sjø gir behov for færre lusebehandlinger. Det er fokus på å utføre skånsomme avlusinger og metoder som ferskvann og Flatsetsund Engineering (FLS) trekkes frem som eksempler.

Biosikkerhet har høy prioritet for å hindre spredning av patogener mellom lokalitetene. Testing av relevante patogener ved hjelp av svabere og vannprøver utføres etter at vask og desinfeksjon av brønnbåter og andre fartøy er gjennomført. Dette er faktorer som settes i sammenheng med færre antall av CMS-utbrudd.

Satsing på forbedrede biosikkerhets-tiltak i norsk lakseproduksjon

I Norge er det etablert et felles biosikkerhetsprogram der det søkes å finne svar på sentrale spørsmål som: Hva bør komme først? Kan næringen enes om prioriterte områder å arbeide med, frivillig og kostnadseffektivt? Sentrale temaer som prioriteres er passiv overføring med vann og aktiv overføring med utstyr, transporttrafikk og brakklegging.

Alle stadier i produksjonen må inkluderes i vurderingene: Infeksjon gjennom smolt-produksjonen, overføring til sjø, flytting innen- og mellom lokaliteter og områder, samt fisk som skal transporteres til slakt.

Trafikkgrenser for flytting av fisk og utstyr – hvilke spesifikke kriterier skal implementeres for bruk? Arbeidsgrupper er etablert for å utvikle strategiske planer for hvert område.

Innsikt i fiskehelse og verktøy for myopatiser ved overvåking av blod

Blodprøvetaking er per nå ansett som letal prøvetakingsmetode og er derfor lite undersøkt i Norge. Blodbasert biokjemi måler biologiske prosesser som foregår i

cellene og de fysiologiske responsene. Det ble presentert to innlegg, begge basert på kommersielt tilgjengelige analyser av blodbiomarkører/ blodkjemi vurdert som en ikke-letal metode for å følge med på endringer utover et normalnivå.

Det ene firmaet har funnet frem til 18 standard biomarkører som kan gi helseindekser for gjeller, hjerte, lever og osmoregulering. Dette kan potensielt brukes for eksempel knyttet til ferskvanns-lakselusbehandlinger for å redusere sykdomsproblematikk ved tidlig indikasjon. Det ble påpekt at fordi blodprøvetaking i Norge ikke er regulert som ikke-letal må mye fisk avlives. Dermed er det et behov for å undersøke og vurdere revidering av regelverket på dette området.

Det andre firmaet presenterte resultater fra et blod biokjemiforsøk som ble utført på uvaksinert SAV2-infisert fisk ved bruk av 3 ulike plattformer for biokjemi. Blodprøver, PCR og histologi ble samlet inn for å undersøke biomarkører i hjerte, skjelettmuskel, pankreasvev og generell robusthet (LDH og ALT-leverhelse). Hjertemarkører viste stor økning sammenlignet med scoring av hjertehistopatologi etter 8 uker. En økning i generell robusthetsmarkører var synlig gjennom hele forsøket. Dette anses som et nyttig verktøy da forandringer i biomarkører vises før patologi blir synlig.

PMCV-forsøk pågår med samme oppsett som for SAV, men her ser en også på Troponin-biomarkører og bruk av KI-plattform for scoring av hjertepatologi.

Verktøyet med overvåking av blod biokjemi kan gi verdifull informasjon på klinikk og for å se det store bilde, men krever at det tas prøver og analysing av fiskehelsen over tid for tolking av endringer.

Pankreassyke (PD)

Erfaringer med PD i kombinasjon med maneter

I en case-studie fra Skottland kom det frem at fisk fra lokalitet med påvist PD forårsaket større problemer med dødelighet sammen med skadelige maneter enn lokalitet der fisken ikke

hadde påvist PD. Dette til tross for at det var et større manetangrep (i konsentrasjon og varighet) på lokaliteten som ikke hadde PD påvist. Det konkluderes med at det er en sammenheng mellom kompromitterte hjerter som følge av PD og det mer alvorlige utfallet dette gir for fisken når den også affiseres av skadelige maneter.

Biosikkerhet og kontrollstrategier med koordinert drift

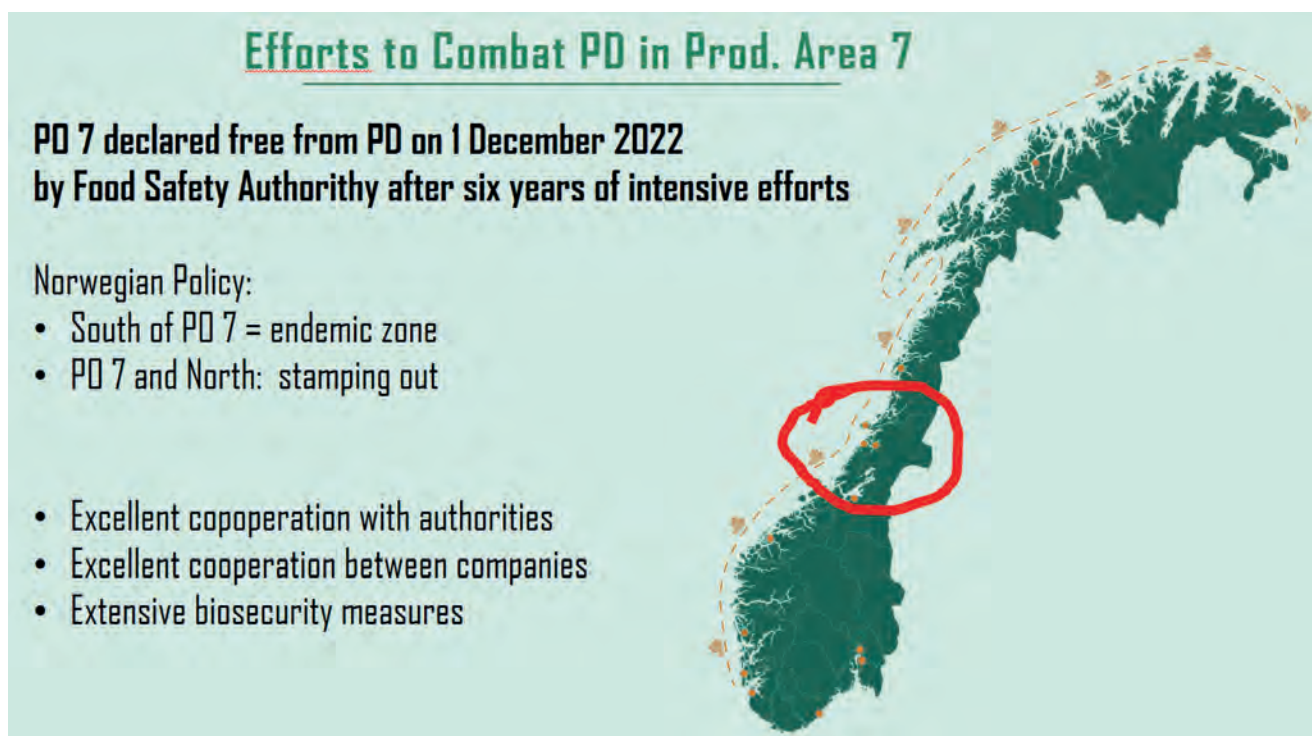
Suksesshistorie med PD-bekjempelse i PO7

Forebyggende innsats gjennom samarbeid mellom produsentene er essensielt for å sikre god biosikkerhet for produksjonen i sjø. **Se også figur 1.** Enkeltaktører kan bare i begrenset utstrekning alene klare å hindre spredning av smittsom sykdom ved utbrudd. Tiltak som har vist seg effektive for å holde smitte unna er organisering av marine produksjonsområder i mindre og funksjonelle soner der produksjonssyklusen koordineres, og det praktiseres felles brakklegginger. Samarbeidet i PO7 er et godt eksempel der aktørene i området har lyktes med å holde området fri for PD på femte året.

Inngåelse av felles forpliktende biosikkerhetsplaner for områder med strenge krav til hygiene og trafikk med brønnbåter inkludert trafikk over landegrensene trekkes frem som viktige punkter i arbeidet. Dette gjelder også for servicebåter og behandlingsfartøy mot lakselus, samt en felles vaksinasjonsstrategi for å eliminere PD. Strenge kriterier til smolt-transporter, ventemerdssetting og tidlig påvisning av smitte nevnes også som viktige biosikkerhetsstrategier som benyttes.

PD i PO8 kom brått på – hva lærer vi av det?

PD-utbruddene i PO8 i 2023 ble håndtert ved utslakting som kriterier som var gjeldende for PD i PO7. Se også **figur 2.** På en lokalitet ble det bekreftet PD 3 uker etter PD mistanke og fisken ble slaktet ut fire og en halv uke etter første PCR-påvisning. Etablering av kontrollområde ble foretatt i etterkant av denne påvisningen. Smitten beveget seg videre til annen lokalitet omtrent fem uker etter første lokalitet var tømt. Denne fisken var for liten til å slaktes og ble destruert. Innen desember samme år ble enda en lokalitet påvist positiv for SAV. Det kunne konstateres at smitte til første lokalitet trolig kunne



Figur 1: Samarbeid mellom forvaltning og næringsaktører med å ivareta biosikkerhetstiltak har resultert i at PO7 er blitt PD fri. Et arbeid som pågår fortsatt, her er det ingen som hviler på laurbærene. Arbeid med biosikkerhet blir man aldri ferdig med. Illustrasjon: Anne Lene Dale, Aqua Kompetanse.

PD

Blodsamples analyzed at VI

- Ystøya first site
 - the fish had been infected a long time before detection
- Mefaldskjæret/Blomsøyrosa and Igerøy
 - second and third site; very early detection (no antibodies at all)
- Likely route of infection

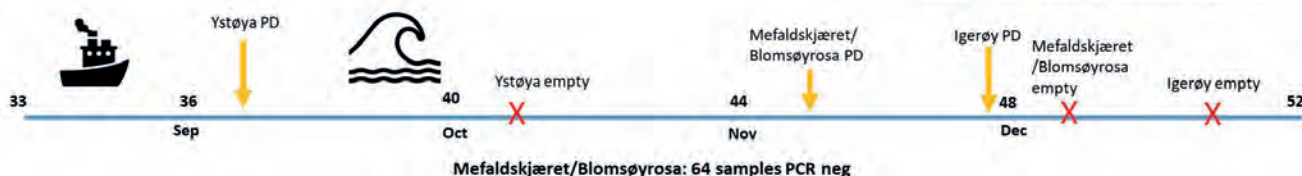


Illustration: Kristin Ottesen, HaVet

Figur 2: Områder i PO8 var sårbare når PD-smitten inntraff. Erfaringer fra hvordan situasjon ble håndtert er viktig lærdom å ta med videre for å hindre at PD får etablert seg i nye områder. Illustrasjon: Kristin Ottesen, HaVet.

knyttet til brønnbåttransport, mens lokalitet to og tre, ble smittet horisontalt med vannstrøm. De siste to lokalitetene ble sannsynligvis smittet kort tid før deteksjon kunne bekreftes. Begrenset tilgang på dokumentasjon og kunnskap om status for området, samt manglende kommunikasjon mellom selskapene gjorde PO8 sårbare når PD-smitten inntraff. Imidlertid har selskapene i ettertid begynt å samarbeide bedre etter infeksjonen i produksjonsområdet var et faktum.

Modellering av PD-smittespredning

PD viruset kan smitte gjennom vannstrøm mellom lokaliteter langs kysten der oppdrettsanlegg er lokalisert med ulik grad av vannkontakt. Det vil imidlertid kunne oppstå endringer i kreftene som virker på vannmassene som kan påvirke smittepresset fra lokalitet til lokalitet.

Hydrodynamiske strømmodeller er naturlige verktøy å benytte i soneplanleggingen. Ved hjelp av tredimensjonal hydrodynamisk modell kan spredning fra en PD-infisert lokalitet predikeres ved bruk av metoden for vannkontakt der også meteorologiske data inngår. Kartlegging av risiko for hvordan smitte sannsynlig vil kunne bevege seg med vannstrøm mellom lokaliteter med ulik grad av vannkontakt

åpner for videre tiltak. Særlig understrekes verdien av full oppslutning av tiltak blant alle aktører på tvers av selskaper. Dette stimulerer videre til godt samarbeid med myndighetene. Metoden med vannkontakt har vært anvendt ved flere tilfeller av sykdomsutbrudd langs kysten og representerer et nytt verktøy som i løpet av timer raskt kan anvendes i kampen for å finne sannsynlige smitteveier for PD.

Effekt av PD-vaksiner i atlantisk laks smittet med SAV-2

I en smittestudie ble det gjort sammenlikning og evaluering av vanlige vaksineringsstrategier mot PD som brukes i Midt-Norge (SAV-2 sone). Vaksiner fra to produsenter utgjorde flere vaksinegrupper i forsøket.

Fra konklusjonene kom det frem at gruppen med DNA vaksinen (Clynav) hadde høy prevalens (83%) av nøytraliserende antistoff. Det ble funnet noen fisk med viremi i oljebasert PD-vaksinegruppe, mens Clynav-gruppen viste seg å være negativ. Moderate til lave nivåer av pankreasnekroser med vevstap ble registrert fra alle grupper. Generelt ble det registrert mindre hjerte- og skjelettmuskel-nekroser og inflammasjon. I tillegg var både dødelighet og SAV-RNA i

hjerter 84 dager etter smitte lavere i DNA-vaksinegruppen sammenlignet med de andre gruppene.

Plattform med ny innovasjon for vaksiner i akvakultur

Dagens DNA-vaksiner er basert på plasmid-DNA mens enzymatisk dbDNA er mindre i størrelse og er uten unødvendige gener med restgen-DNA. Målet er å utvikle en ny generasjon DNA vaksiner for å redusere betydningen av infeksjøs sykdommer i akvakultur med prioritert fokus på PD, CMS og HSMB.

I første omgang er det blitt testet vaksine mot SAV3. I et smitteforsøk der dbDNA SAV-vaksiner ble testet med ulike doser, ble plasmid-DNA vaksine brukt som kontroll. Forsøket viste at dbDNA-vaksinene var minst like effektive som plasmid-DNA når det gjaldt redusert viremi og spredning til sekundære steder for replikasjon (hjerter) etter smitte. Fisk som ble vaksinert med en kodon optimert dbDNA-kandidat produserte nøytraliserende antistoffer mot både SAV3 og SAV2 ved 500 døgngader etter vaksinerings.

Virker det i fisk? Ja, men det trengs forbedringer, og vi ser frem til en videre oppdatering på dette feltet på neste møte.

Cardiomyopatisyndrom (CMS)

Miljøforhold og næringsinnhold påvirker CMS-forløp

Det ble fra Skottland rapportert om generell økning i biologiske utfordringer relatert til faktorer som; temperatur, tørt vær og endringer i havet med økt salinitet. Dette bidrar til en økning i tilfeller av kompleks gjellesykdom, og ikke minst CMS som har virket negativt inn på dødelighet og slaktevolum. Det er sett en økning i CMS-tilfeller de seneste årene og denne økningen settes i sammenheng med økte temperaturer i perioden april-august.

I et ernæringsforsøk ble det registrert reduksjon i dødelighetsrate, i CMS-relaterte forandringer og signifikant reduksjon i PMCV-virusmengde når diett med økt EPA- og DHA-innhold ble gitt til laksepopulasjonen. I analyse av fettsyresammensetningen av hjerteprøver ble det funnet økte nivåer av EPA og DHA som indikerer at en optimalisering av EPA- og DHA-nivåer kan være en fordel ved alvorlige CMS-utbrudd.

Det meldes samtidig også fra Skottland at vaksinerings av hele besetninger gir minimal klinikk som følge av PD og at HSMB forventes å opptre 3 måneder etter utsett, men at det sjelden resulterer i klinikk.

Forvaltningsstrategien inkluderer å unngå selangrep, brakklegging, få kontroll på AGD, økt biosikkerhet, følge opp fiskehelse med screening, kontinuerlig fjerning av død og døende fisk for å redusere smittepresset, samt redusert foring i risikoperioder og foreta målrettet slaktning.

Funksjonelle konsekvenser av PMCV-infeksjon

CMS trigges av PMCV-viruset og dødsårsaken knyttes til at atrium i hjerte sprekker under stressende håndteringer som avlusinger. Villfisk og eksperimentelt infisert laks utvikler, uvisst av hvilken årsak, vanligvis ikke CMS og dødelighet blir sjelden observert. En hypotese er at denne forskjellen mellom forhold som finnes hos villfisk versus de intensive forhold som er i oppdrett med høyere

temperaturer for raskere vekst og ønske om å nå smoltifisering hurtigere medfører en svekkelse av hjertefunksjonen. Under stresspåvirkninger utsettes hjertet for økte belastninger med blodtrykksøkning og det antas at, særlig det diastoliske blodtrykket blir for høyt og forårsaker ruptur av atrium i et allerede svekket hjerte, senere i produksjonssyklusen. Mindre intensive oppdrettsforhold på ferskvannsstadiet kan være positivt for både den generelle prestasjonen og fiskehelsen og i tillegg gi bedre muligheter for fisken å takle sykdommer.

Hjerte- og skjelettmuskel betennelse (HSMB)

Effekt av synkronisert brakklegging av åpne laksemerder

I en oppfølging av fem lokaliteter med en synkronisert brakkleggingsperiode på en måned, ble det tatt prøver av 20 nylig døde eller døende fisk fra hver lokalitet og screenet for forekomst av virus ved hjelp av PCR. Det ble påvist PRV-1 i 32 av de innsamlede prøvene som ble videre sekvensert for å spore mulige koblinger mellom lokaliteter og tidspunkter. Introduksjon av PRV-1 kunne spores for fire av fem lokaliteter, samt tilknytning basert på genetisk variasjon. Variantene, så nær som en skilte seg fra dem som ble isolert fra tidligere produksjonssyklus. Det indikerer at brakklegging har hindret overføring mellom fiskegenerasjoner og at hovedruten for distribuering av virusvariantene mellom lokaliteter i området har vært menneskeskapt og ikke via vannstrøm.

Disse resultatene kan gi fordeler til lakseoppdrettsindustrien i Norge ved at større områder brakklegges strategisk. Det viser også at virus som PRV-1, hvor dette er lite utbredt kan være mulig å håndtere ved hjelp av brakklegging. Og, det understrekes at mange sykdommer der det er snakk om overføring som følge av menneskelig aktivitet, som også er hovedkilde til overføring, kan håndteres med implementering av god biosikkerhet. I det ligger også viktigheten av testing av smolt før flytting. Synkronisert brakklegging av lokaliteter som er hydrodynamisk knyttet til hverandre kan bli bedre utnyttet for å muliggjøre styrket sykdomshåndtering i laksenæringen.

Brunørret er mottakelig for PRV-3

HSMB som hos laks forårsakes av PRV-1 og PRV-2 er kjent som årsak til erythrocytic inclusion body syndrom (EIBS) hos coho laks i Japan. Videre er det kjent at regnbueørret er mottakelig for PRV-3 og at dette er utbredt i oppdrett av denne arten og assosieres med alvorlige sykdomstap i RAS-anlegg.

I et kohabiterings-smittetest forsøk der det ble sett på mottakelighet av PRV-3 hos brunørret kom det frem at PRV-3 var i stand til å reproducere i shedder-fisken som var intraperitonealt-injisert (i.p) med PRV-3 infisert blod fra regnbueørret. Forsøket viste også at PRV-3 horisontalt ble overført til kohabitantene. Hjertelesjoner forenlig med det som kommer frem hos laks med HSMB kunne påvises både i shedder- og kohabitantfisk, men det ble ikke registrert redusert overlevelse gjennom forsøksperioden som gikk over 10 uker.

Forsøket demonstrerte at en i brunørret har en mottakelig art for PRV-3 hvor viruset kan formere seg og videre bli skilt ut og tatt opp av nye mottakelige fisker (regnbueørret og brunørret). Forsøket gir et bidrag til en bedre forståelse av rollen til brunørret i epidemiologien til PRV-3 ved at brunørret kan tjene som reservoar for viruset.

Fiskepatogenovervåking for flere agens samtidig ved hjelp av ny metode

PRV-3 har vært assosiert med høy dødelighet i regnbueørret produsert i RAS-anlegg i Danmark siden 2017. Imidlertid har det vært få anlegg med sykdomsutbrudd selv om de hadde positiv påvisning av viruset. Det ble ikke funnet forskjeller i genomet fra isolater assosiert med- eller uten sykdom. Høyere virusmengde er observert i forsøk ved lave temperaturer, men uten dødelighet. Fra feltobservasjoner har det imidlertid kommet frem tilstedeværelse av andre patogener ved PRV-3 assosiert dødelighet. I den forbindelse ble det utviklet et High throughput microfluidic (HT-qPCR) diagnostisk verktøy for samtidig å kunne avdekke hele 22 patogener som affiserer laks og regnbueørret. Prøver ble samlet fra et RAS-anlegg over en 7 måneders periode fra fisk med PRV-3 sykdom. Det ble påvist *Candidatus Branchiomonas cysticola* ved alle

uttakene foretatt gjennom prøveperioden. Høy forekomst ble funnet ved tidspunkt for sykdomsutbruddet som varte i 5 uker og som resulterte i dødelighet som utgjorde hele 2,2 tonn fisk. Fiskegruppen hadde blitt flyttet til en ny enhet få dager før utbruddet og det er sannsynlig at håndteringsstress i den forbindelse har vært en medvirkende faktor. Vannprøver var negative for PRV-3, mens flere andre patogener ble påvist i vannet og som bare sporadisk ble påvist i fisk, inkludert *Yersinia ruckeri* og *Flavobacterium psychrophilum*. Det viser at sykdom i RAS-anlegg kan være kompleks med flere patogener involvert. Miljøprøver fra vannet er gjerne ikke en god nok indikator for å beskrive patogensituasjonen i et anlegg eller enhet. Derfor bør undersøkelser for patogener i miljøet i RAS-anlegg også inkludere prøvetaking av fisken.

Pågående forskning

SAV akkumulerer defekte genomer til høye tettheter under replikasjon i cellekultur

De fleste RNA-virus produserer defekte virale genomer (DVG-er) gjennom infeksjon, og disse har vært vanlig ansett som unyttige genomer, men er viktig i virale infeksjoner ettersom de blander seg med replikasjon og immunstimulering og gjenkjennes av patogen-gjenkjenningsreseptorer. SAV akkumulerer spesifikke genom-deleteringsvarianter i ulike deler av genomet gjennom replikasjon i cellekultur. DVG-er kan forekomme ved ulike frekvenser. Både i strukturelle- eller ikke-strukturelle gener. Ved å kombinere «neste generasjons sekvensering» (NGS) og en beregningsmessig tilnærming viste dette at det totale antallet DVG-er, så vel som type og frekvenser av forskjellige slettinger som produseres, at alle øker under passasje av SAV3 i chinook laksehjerteceller (CHH-1). De DVG-ene som produseres med svært høye frekvenser inkluderer både store delesjonstyper som dekker omtrent halvparten av virusgenomet og mindre delesjonstyper (titalls til hundrevis av nukleotider i størrelse), der sistnevnte hovedsakelig lokaliseres til de strukturelle genene.

Informasjon om DVG-ene som produseres med høye frekvenser under SAV-infeksjon



Styringskomiteen og medlemmer av referansegruppen som var tilstede under TriNation 2024.

kan potensielt benyttes i utviklingen av bedre vaksineformuleringer og/eller ha terapeutiske anvendelser.

PMCV- infeksjon og doserespons

Det ble stilt spørsmål til om PMCV primært infiserer laks. Transkripsjon av viruset sitt enkelttrådet RNA skjer hovedsakelig i hjertet, men selv om nyreceller er mottakelig for infeksjon så hindres replikasjon i disse cellene. Ved hjelp av RNA-scope in situ-hybridisering ble viralt RNA funnet som intens- og punktfarging av myokardceller i stratum spongiosum, med et skarpt skille mot stratum compactum-laget i hjertet. Det er ingen indikasjon på spredning mellom disse to delene av hjertet.

Generelt gjenstår det en del på forståelsen av patogenisiteten og infeksjonsdynamikken til PMCV-viruset. I ett forsøk ble postsmolt av atlantisk laks infisert med ulike konsentrasjoner av hjertehomogenat fra infisert fisk. Resultatene viste varierte nivåer av virusreplikasjon avhengig av dose, og også mellom ulike vev. De histopatologiske endringene i hjertets ventrikel korrelerte med økt smittedose.

Utvikling og bruk av genomiske verktøy

Genomisk sporing av PMC-viruset hos atlantisk laks

Det er fortsatt uklartheter omkring hvilke faktorer som er viktige i spredning og overføringen av PMC-viruset. Genomisk epidemiologiske undersøkelser ved hjelp av helgenomsekvensering av 280 PMCV-prøver fra skotske- og norske anlegg for å spore spredning av PMCV-isolater har gitt interessante resultater.

Resultatene avdekket klare grupperinger av norske- og skotske genomer. Det indikerer at virusgenomene spres innen- eller enn mellom disse to landene, og man ser regionvise clustere og det på produksjonsområde nivå. Men, til tross for dette ble det observert flere introduksjoner av PMCV-avstamminger inn til Skottland. Det ene clusteret grupperer seg med Shetland og Orknøyene, og at andre inkluderer de vestlige øyene og vestkysten. Det var samtidig lite bevegelse å rapportere om av virusgenomene mellom disse to regionene. I Norge har stammer av PMCV mest sannsynlig dukket opp i sør og blitt spredt videre nordover i landet. Hvilke

faktorer som forårsaker dette mønsteret, og om det er en vertikal eller horisontal forklaring er mer uvisst.

Historiske nasjonale data for lakseoppdrett og båttrafikk ble brukt for å teste hvilke faktorer som best kan forklare de observerte epidemiologiske mønstre og for å kvantifisere relativ viktighet av vertikal og horisontal overføring for opprettholdelse og spredning av PMCV. Båtforbindelsesmatrise viser at det er forbindelse mellom produksjonsområdene i Norge, og det er flere forbindelser mellom nære anlegg enn for anlegg som ligger mer spredt. Modellen viser at brønnbåtforbindelser øker PMCV spredning mellom lokaliteter, mens andre båtforbindelser (ikke-akvakulturrelaterte) var ubetydelige. Har tetthet av anlegg betydning for virusspredning? Ja, det kom frem at dette er en stor bidragsyter.

PMCV påvises også i stamfisk, og modellen viser en signifikant korrelasjon med vertikal overføring og virusspredning.

Genomiske analyser avdekker lav genetisk diversitet og ingen kontinuerlig reintroduksjon av PMC-virus i færøysk oppdrettslaks

Fylogenetiske analyser fra 23 lakse-lokaliteter og fra tilbakevandrende villaks over en 12 årsperiode fra Færøyene viser at PMCV er svært homogent og det ble avdekket et monofyletisk færøysk cluster som stammet fra oppdrettslaks. Genomet fra tilbakevandrende villaks viste imidlertid signifikante forskjeller mellom prøver fra Færøyene, Norge og Irland. Kombinasjon av fylogeni og metadata, inkludert informasjon om rogn og smoltoppnning viste ingen reintroduksjon av PMCV til Færøysk lakseoppdrett. Det ble ikke funnet bevis på vertikaloverføring som hoved overføringsvei og heller ingen tilsynelatende korrelasjon mellom CMS tilfeller og mulige virulensmarkører.

Utfordringer med PMCV som infiserer fisk på ett anlegg er uforutsigbarheten som knyttes til infeksjonen, spredning i- og mellom anlegg og variasjoner som kan sees mellom årsklasser.

Egenskapene i kapsidstruktur vil påvirke replikasjon og effektivitet i spredning og dermed også virulensen til viruset. Ved karakteriseringen av proteinprodukter fra PMCV ble et unikt tredje gen, p33 hos PMCV sett på. Det tyder på at dette kan ha en rolle i replikasjon og frigjøring av viruset. Det bidrar til å gi en bedre forståelse om hvordan viruset infiserer, formerer seg og spres fra celle til celle og fra fisk til fisk, og dermed hvordan en best kan håndtere infeksjonen.

Viral genomisk overvåking – støtte for sykdomskontroll hos oppdrettslaks

Bruk av viral-genomiske sekvenserings-data fra WGS (Oxford nanopore-teknologi) kan gi bedre forståelse av genetisk mangfold og overføringsscenarioer for virus. Det kan også identifisere fremveksten av nye virale undertyper og kartlegge overføringer av virale avstamninger. Et arbeid på dette fokuserer på IPN, SAV og PRV. Prosjektet har som mål å utvikle Nanopore-basert sekvens-assay for disse virusene og videre utvikle en database over helgenom sekvenser assosiert med epidemiologiske metadata. Det ble hovedsakelig vist resultater fra arbeidet med IPN som var kommet lengst, mens arbeid på SAV er påbegynt og vi kan vente utfyllende resultater på neste møte. Viral-genomisk overvåking av virus som

SAV, PRV og IPNV helgenomsekvensdata koblet til epidemiologiske metadata kan gi en bedre forståelse av viral evolusjon og overføring. Det kan videre bidra til forbedringer i håndtering av virussykdommer som spres. I tillegg, gi bedre innsikt i geografisk fordeling av ulike virale subtyper og deres relative bidrag til regionale utbrudd.

Karakterisering av viral genetisk diversitet er nøkkelfaktor for å identifisere evolusjon av nye virusstammer.

Mer detaljert og oppdatert informasjon om viral molekylær epidemiologi kan videre åpne for mer målrettede kontrolltiltak ved infeksjon. I tillegg kan denne tilnærmingen brukes til å rekonstruere historiske og nyere overføringshendelser mellom land og oppdrettsregioner.

Kan antiviral immunitet fra en PRV-variant gi beskyttelse til en annen PRV-variant?

PRV-3 induserer sterk antiviral immunitet, som kan beskytte mot PRV-1. De ulike PRV-genotypene (PRV1-3) kan kryss-infisere mellom arter, men det er bare PRV-1 som gir HSMB hos atlantisk laks. Røde blodceller er målceller for alle PRV genotypene.

I et forsøk ble det gjort sammenlikninger av transkriptom-responser i blodceller hos atlantisk laks injisert med PRV-1, 2 eller 3,

Analyser av blodceller infisert med PRV-1 og PRV-3 var karakterisert av induksjon av gener involvert i transkripsjonell regulering og medfødt immunitet. PRV-3 infisert fisk viste høyere antiviral respons sammenlignet med PRV-1 i tidlig infeksjonsfase mens det var ingen forskjell mellom disse gruppene etter 5 uker. For PRV-2 ble det ikke registrert induksjon i antivirale responser som registrert hos PRV-1 og 3. Snarere ble det funnet en undertrykking av genene involvert i apoptose signalisering og proteinfolding. Funnene indikerer at PRV-3 induserer sterk antiviral immunitet, som også beskytter mot PRV-1 i laks. Kanskje kan utvikling av en vaksine ta utgangspunkt i den sterke immunresponsen observert med PRV-3? ●