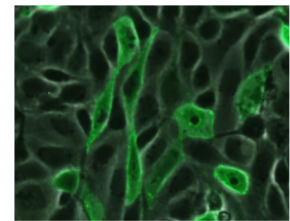
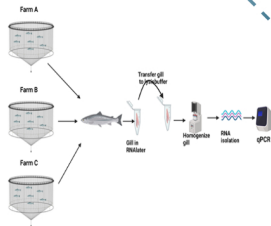
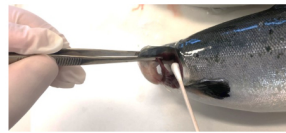
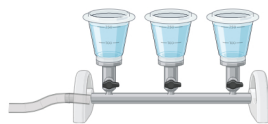




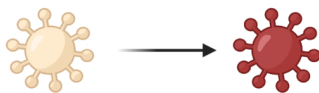
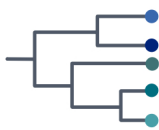
Biosikkerhetstiltak mot ILA i settefisk (ILA-SAFE) (FHF prosjekt 901674)



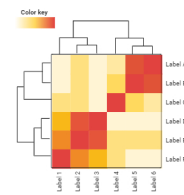
Overvåkning



Sekvensanalyser



Vertsresponser



Smittforsøk

Biosikkerhetstiltak mot ILA i settefisk (ILA-SAFE) (FHF prosjekt 901674)

Forfattere

Hilde Sindre¹, Torfinn Moldal¹, Johanna Hol Fosse¹, Simon Weli¹, Ma. Michelle Peñaranda² og Kai Ove Skaftenesmo²

1: Veterinærinstituttet, Postboks 64, 1431 Ås

2: Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen

Prosjektleder:

Hilde Sindre (hilde.sindre@vetinst.no)

Publisert 17.09.2024

Forslag til sitering

Sindre H, Moldal T, Fosse JH, Weli S, Penaranda MMD. Skaftenesmo KO. (2024) Biosikkerhetstiltak mot ILA i settefisk (ILA-SAFE). Sluttrapport FHF 901674, Veterinærinstituttets rapportserie 47-2024 Veterinærinstituttet^{□□}. © Veterinærinstituttet, kopiering tillatt når kilde gjengis

Kvalitetssikret av

Brun, Edgar, Avdelingsdirektør, Veterinærinstituttet

på www.vetinst.no

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)

© Veterinærinstituttet 2024

Oppdragsgiver

Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfinansiering

Finansiert av:



Samarbeidspartnere: Havforskningsinstituttet, Grieg Seafood, Mowi, Cermaq, Salaks, SalMar, Åkerblå (tidligere Marin Helse)

Kolofon

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Laget i BioRender med bilder fra Mona D. Jansen Veterinærinstituttet (nå Mattilsynet) - øverst, Betty Plos, Veterinærinstituttet - til høyre, Ma. Michelle Peñaranda, Havforskningsinstituttet - nederst, og Simon Weli, Veterinærinstituttet - venstre.

www.vetinst.no

Innhold

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
Summary	4
1 Bakgrunn	5
2 Resultater	8
2.1 Feltstudier (AP1)	8
2.1.1 <i>ILAV HPRO utbredelse innad i settefiskanleggene og prevalens i utvalgte fiskegrupper</i>	8
2.1.2 <i>Effekt av sanering for ILAV HPRO</i>	14
2.1.3 <i>Anleggs karakteristikk og anbefalinger til beste-praksis sikkerhetstiltak</i>	14
2.2 Eksperimentelle studier (AP2.2).....	15
2.2.1 <i>Forsøk på etablering av ILAV HPRO overføringmodell ved samtidig infeksjon med gjellepatogen eller stressinduksjon for å identifisere faktorer som kan drive overgang fra ILAV HPRO til ILAV HPRΔ i laks</i> ,	16
2.2.2 <i>Etablere en overføringsmodell for ILAV HPRO i atlantisk laks med levende smittet fisk som ILAV HPRO smittekilde</i>	18
2.3 Genetisk karakterisering av ILAV HPRO (AP2.1).....	21
2.3.1 <i>Illumina (amplicon)-sekvensering (Veterinærinstituttet)</i>	22
2.3.2 <i>Nanopore “long read amplicon” sekvensering (Havforskningsinstituttet)</i>	24
2.4 Identifisere virus-vertsinteraksjoner som påvirker overgangen fra ILAV HPRO til HPRΔ (AP3). ..	28
2.4.1 <i>Kartlegging av fiskens respons på HPRO ILA-virusinfeksjon (AP3.1)</i>	29
2.4.2 <i>Utvikle verktøy for å påvise proteaser i slim og andre faktorer som kløyver ILAV eller på annen måte påvirker ILAV evne til å trenge inn i vertscellen (AP3.2-3)</i>	30
3 Oppsummering	33
4 Faglige leveranser	35
5 Referanser	36

Sammendrag

Infeksiøs lakseanemi, ILA, er en alvorlig smittsom sykdom hos oppdrettslaks i Norge. De siste årene har flere tilfeller blitt sporet tilbake til påvisninger av den avirulente varianten, ILAV HPR0, og til og med den virulente varianten, ILAV HPRΔ, i settefiskanlegg. Utfra denne situasjonen er det nødvendig å sette fokus på hvordan virusmitte blir introdusert til og vedlikeholdes i settefiskanleggene over tid, forsøke å etablere modeller for å identifisere eventuelle drivere for endring til mer sykdomsframkallende virus og forstå samspillet mellom virus og vert slik at næringen kan målrette biosikkerhetsarbeidet og få verktøy for tidlig å oppdage og unngå virulensutvikling.

Gjennom ILA-SAFE-prosjektet har vi testet ut og videreutviklet metoder for å påvise virus med miljøprøver og vist at både vann og svaberprøver fra kar og fisk fungerer like godt for overvåkning av ILA-virus i settefiskanlegg sammenlignet med tradisjonelle fiskeprøver, og med langt mindre ressursbruk både til prøvetaking og analyse. Vi har også vist at ILAV HPR0 etableres i infiserte anlegg og at omfattende tiltak må settes i verk for å bli kvitt viruset. Men prosjektet har også vist at ILAV HPR0 ikke kunne påvises gjennom prosjektperioden for halvparten av settefiskanleggene i studien. Genetisk karakterisering av virus fra ulike settefiskanlegg og matfiskanlegg som har fått fisk fra disse, viser nært slektskap. Analyser over tid viser også at de ulike settefiskanleggene har sine «husstammer» av viruset. I prosjektet har vi for første gang lyktes i å etablere en smittemodell for overføring av ILAV HPR0 til naiv fisk gjennom 3 passasjer. Modellen gir mulighet til å undersøke videre hvilke drivere som påvirker overgang fra avirulent til sykdomsframkallende virusvariant og karakterisere både viruset og samspill mellom virus og vert, med de redskaper som er etablert i andre deler av prosjektet. Analyser av fiskens respons på HPR0 ILA-virusinfeksjon har identifisert et panel av sju gener som var robust oppregulert i infisert fisk sammenlignet med ikke-infisert fisk fra tre undersøkte settefiskanlegg. Alle de identifiserte responsgenene er tidligere beskrevet i forbindelse med andre virus-infeksjoner, noe som støtter at de stimuleres av ILAV HPR0. I prosjektet er det også etablert flere komplementære verktøy som kan brukes til å måle hvordan forskjellige substanser påvirker ILAV aktivering, og disse verktøyene vil være svært nyttige i videre studier av virus-vertsinteraksjoner.

Summary

Infectious salmon anemia (ISA) is a serious transferrable disease in farmed salmon in Norway. The last years, several outbreaks at sea have been traced back to detections of the avirulent variant, ISAV HPR0, and even the virulent variant, ILAV HPRΔ, in hatcheries. The current situation makes it necessary to focus more on how virus is introduced to and maintained in the hatcheries over time, establish experimental models to test the effect of possible drivers for the change to more virulent virus variant, and to develop tools to investigate the virus-host interactions to provide the fish farming industry with important knowledge on how to take the appropriate biosecurity measures to prevent introduction of the virus, and tools for early detection to prevent spread and transition to virulent ISAV.

In the ILA-SAFE-project, we have tested and refined methods for virus detection in environmental samples like water and swabs, and shown that these samples are just as suited for virus surveillance as traditional samples from fish, and are time and cost efficient. We have also found that ISAV HPR0 establishes in the infected hatcheries and that extensive measures have to be taken to remove the virus, once introduced. But the project has also demonstrated that for half of the hatcheries in the study, virus could not be detected at all. Genetic characterization of virus from hatcheries and sea water farms with an ISA diagnoses which had received fish from these hatcheries showed that these clustered together, indicating a clear link. In addition, the analysis showed that the ISAV HPR0 positive hatcheries had established «house strains» of the virus. In this project we have succeeded for the first time to establish an experimental model for transmission of ISAV HPR0 to naïve salmon and have maintained the infection through 3 passages. This model provides us with a tool to investigate possible drivers for transition from avirulent to virulent ISAV, and to further characterize the virus and virus-host interactions with the tools developed through this project. Salmon samples from three different hatcheries have been investigated and a panel of seven genes which were significantly upregulated in infected compared to uninfected fish. All of these response genes have been described earlier in connection to other virus infections, which supports that they are stimulated by ISAV HPR0. Several complementary tools for measuring the effect of various substances on ISAV activation have also been established in the project, and these tools will be very useful in further studies of virus-host interactions.

1 Bakgrunn

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er den eneste smittsomme sykdommen som har ført til nedstenging av lakseoppdrett i hele land (Chile og Færøyene). I Norge unngikk vi dette gjennom effektive biosikkerhetstiltak og bedre struktur i næringen. Antall utbrudd ble redusert fra mer enn 80 i 1990 til mellom 1 og 25 de senere årene (1). Noen av utbruddene knyttes til horisontal spredning fra primærutbrudd, men flere tilfeller kan spores tilbake til påvisninger av den avirulente varianten, ILAV HPR0, og til og med den virulente varianten, ILAV HPRΔ, i settefiskanlegg. Når virulensutviklingen starter i settefiskfasen, blir resultatet fort svært kostbare utbrudd i sjø siden de kommer for tidligere med tanke på slakt. Samtidig er spredningspotensialet fra settefiskanlegg større enn fra matfiskanlegg, siden et settefiskanlegg kan levere til matfiskanlegg langt fra hverandre. Utfra denne situasjonen er det nødvendig å sette fokus på hva som skjer i settefiskfasen; karakterisering av endringer i ILAV HPR0 og driverne bak denne endringen, og identifisering av andre faktorer av betydning for introduksjon av viruset i settefiskfasen, utvikling av ILA-sykdom slik at næringen kan målrette biosikkerhetsarbeidet og få verktøy for tidlig å oppdage og unngå virulensutvikling.

Selv om de ulike selskapene har kunnskap basert på sine screeninger finnes det per i dag ingen offisiell, samlet oversikt over forekomst av ILAV HPR0 i norske settefiskanlegg, noe som gjør det vanskelig å fastslå hvor utbredt denne varianten er og betydningen den har for utvikling av ILA-sykdom i sjøfasen. Systematisk overvåking gjennom flere år av færøyske settefiskanlegg har vist at det er en stor variasjon i prevalens av ILAV HPR0, både mellom settefiskanlegg og innad i settefiskanlegg fulgt over tid, og at det etablerer seg «husstammer» av ILAV HPR0 i enkelte anlegg(2, 3). Siden 2019 har Mattilsynet hatt et kartleggingsprogram for ILAV HPR0 i settefiskanlegg. Programmet innebærer at det skal tas prøver fra 90 fisk hvert annet år på alle settefiskanlegg. Det er påvist ILAV HPR0 i minst én prøve på omkring ett av ti anlegg (7-14 prosent) hvert år, og overvåkningsprogrammet for 2023 viste 8 % positive anlegg (6 av 75, [lenke rapport](#)). Det reelle antallet antas å være langt høyere fordi det kun er ett prøveuttak hvert annet år og det ikke tas prøver fra fisk i alle kar. Det er som tidligere år vist økt forekomst på anlegg med både gjennomstrømning og RAS eller bare RAS sammenlignet med bare gjennomstrømning (4). Slektskapsstudier basert på sekvenser for segment 5 og segment 6 tilsier at samme virusvariant har etablert seg på anlegg hvor det er påvist ILAV HPR0 i flere år.

Dagens testregime bygger i all hovedsak på prøvetaking av gjellelev fra fisken, noe som er ressurskrevende og derfor lite egnet til overvåking av anleggene over tid. Et tidligere FHF-prosjekt (FHF 901181) har demonstrert at svaberprøver er mer sensitive enn prøver fra indre organer for påvisning av ILAV HPRΔ i populasjoner med en ILA-diagnose. Svaberprøver tatt på slakteri viser at metoden også er i stand til å fange opp ILAV HPR0. I tillegg har Veterinærinstituttet utviklet en metode for analysering av vannprøver for ulike smittestoff, inkludert ILAV, og denne fanger også opp ILAV HPR0 i feltprøver. Hvis det er mulig å gå over fra testing av fisk til testing av vann- og miljøprøver, gir dette et kostnadseffektivt alternativ for å overvåke forekomst av ILAV HPR0 og deleterte varianter med lite ressurskrevende prøvetaking, langt færre analyser, bedre sensitivitet på anleggsnivå og uten å måtte avlive frisk fisk for prøvetaking.

For at næringen skal få kunnskap og verktøy for å unngå at ILAV HPR0 til stadighet utvikler virulens må vi forstå driverne, det vil si oppdrettsbetingelsene som øker risikoen for

virulensutvikling. For å forstå disse driverne må vi også forstå de biologiske mekanismene involvert i infeksjonen. Vi kjenner godt til forskjellene mellom ILAV HPRO og endepunktet ILAV HPRΔ, men ikke hvilke endringer som er avgjørende for å føre HPRO på vei mot sykdomsframkallende HPRΔ-varianter. Er det nok med en enkel mutasjon eller en aminosyreendring i en spesifikk posisjon for å sette i gang denne prosessen, eller trengs det en rekke ulike endringer av genomet? Dette er av stor betydning for å vurdere risikoen for å utvikle HPRΔ fra HPRO. I prosjektet er dypsekvenseringsanalyser av prøver hentet over tid fra settefiskanlegg utført. Slike studier fortelle også mye om variasjonen innen begge varianter av viruset og forekomst av quasi-species (5). Sekvensering av hele ILAV-genomet gir også mer høyoppløselige data til bruk ved slektskapsstudier og smittesporing, da sjansen for å oppdage eventuelle ulike varianter innen et ILAV-utbrudd økes betraktelig.

Observasjoner fra felt gjennom flere år tyder på at kronisk gjellebetennelse i settefiskanlegg med hus-stammer av HPRO kan være en høy-risiko situasjon. Det er flere eksempler på at skifte fra ILAV HPRO til ILAV HPRΔ har startet i settefiskanlegg med store gjelle-helseproblemer. Influensavirus, som er i samme familie som ILAV får forhøyede mutasjonsrater ved replikasjon under lave oksygennivåer (6, 7). Dette indikerer at cellulær patologi kan endre virulens. Når HPRO opptrer samtidig som andre ulike gjellepatogener kan sammenklebinger av lameller gjøre at HPRO infiserte celler på lamell-overflaten fanges i betennelsesvevet (se figur under). Til betennelsen kommer også makrofager som «spiser» fremmede partikler inkludert virus, noe som antyder at cellulære forhold assosiert med patologi, som celleskade, kan bidra til endring av virulens. Overgangen fra ikke-virulent til virulent virustype hos ILAV er definert av mutasjoner i HE proteinet som binder celleoverflaten og F proteinet som hjelper viruset å komme inn i cellen (8, 9). Makrofager kan så vandre videre til andre deler av fisken. Dette stemmer overens med funn fra infisert fisk som viser at ikke-virulent ILA HPRO bare infiserer epitelceller på fiskens overflate (10), mens virulent ILA virus klarer å infisere flere celletyper, hovedsakelig endotelceller på innsiden av blodkar, og kan spre seg til indre organer og skape sykdom (11). Evnen til å trenge inn i andre celler enn overflateepitel kan derfor være avgjørende for evnen til å fremkalle sykdom. Hvilke faktorer som bidrar til dette er ikke kjent, men på bakgrunn av hva vi vet om aktiveringsprosessen og om andre influensalignende virus, er det naturlig å tenke på muligheten av at proteaser uttrykt av vertsceller eller andre patogener kan spille en rolle (12). I sum finner en både et mutagent miljø og et nytt, annerledes selektivt press på HPRO i gjellebetennelsen. Veterinærinstituttet har allerede etablert en smittemodell for laksepox (SGPV) som kan brukes til å indusere gjellebetennelse (13). Ved å kombinere kjent kunnskap ble en modell for å teste effekten gjellebetennelse har på ILAV HPRO-infeksjon i kontrollerte laboratorieforhold testet. I tillegg ble levende ILAV HPRO-smittet fisk fra settefiskanlegg i studien benyttet som smittemateriale alene for overføring av virus til usmittet frisk lakseyngel.

Dette prosjektet har vært en omfattende dugnad hvor forskere og akvakulturnæringen har samarbeidet tett for å øke kunnskapen om utbredelse og betydning av ILAV HPRO i norske settefiskanlegg. Introduksjon og vedlikehold av smitte/infeksjon, inkludert hvordan viruset sprer seg i anleggene, er kartlagt, og virusuavhengige faktorer som kan bidra til sykdomsutvikling er forsøkt identifisert. Utviklingen av virusinfeksjonen og fiskens responser over tid er undersøkt og både smittet fisk og andre viktige prøver på ulike stadier til bruk i laboratoriestudier for identifisering av biologiske drivere er også samlet inn. Systematiske overvåking av anleggene har også sikret materiale for genetiske studier av virusvariasjon innad i en populasjon infisert med ILAV HPRO, overgangsfaser mot ILAV HPRΔ og variasjon innen ILA-utbrudd.. Hovedfokus i prosjektet har vært settefiskfasen, men både uttesting av nye påvisningsstrategier og kunnskap om viruset og endringer til sykdomsframkallende varianter, vil være relevant også for sjøfasen.

Målsetning

Å øke kunnskapen om overgang fra ikke-virulent til virulent virus og utarbeide beste-praksis biosikkerhetstiltak for settefiskanlegg for å redusere risiko for endring til og spredning av virulent ILAV.

Delmål

- Kartlegge prevalens og utbredelse av ILAV HPR0 i settefiskfasen (AP1)
- Estimere effekt av sanering for ILAV HPR0 (AP1)
- Kartlegge sammenheng mellom påvisning av ILAV HPR0 i settefisk og forekomst av ILA i sjø (AP1, AP2)
- Identifisere risikofaktorer/drivere for utvikling av sykdomsframkallende ILAV (AP1, 2 og 3)
- Etablere testregimer for målrettet påvisning av både ILAV HPR0 og ILAV HPRΔ (AP1, AP2)
- Utarbeide anbefalinger om beste-praksis biosikkerhetstiltak basert på eksisterende og ny kunnskap for å begrense spredning og minske risiko for endring av ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ (AP1)
- Karakterisere dynamikken (spesielt rekkefølgen) av de genomiske endringene fra HPR0 til HPRΔ (AP2)
- Belyse om nedsatt gjellehelse/gjellebetennelser kan virke som driver for endring av HPR0 til HPRΔ (AP2)

2 Resultater

2.1 Feltstudier (AP1)

Torfinn Moldal og Hilde Sindre (VI)

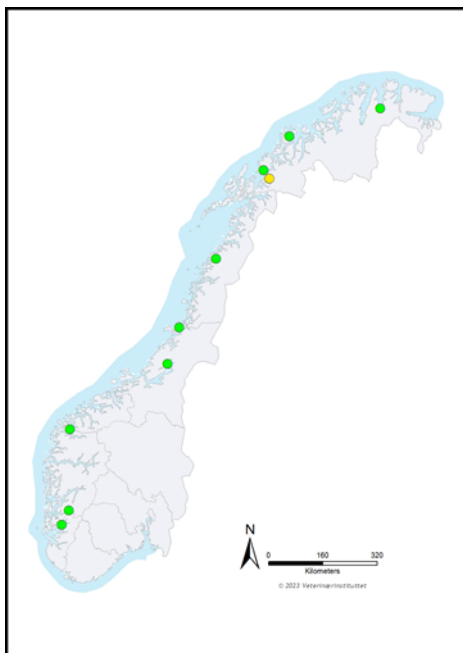
Lasse Solgren (Salaks AS) (knyttet til 4.1.2 Sanering)

Målsetninger:

Arbeidspakke 1 har to hovedmålsettinger. Først å forstå prevalens og utbredelse av ILAV HPRO i de deltagende settefiskanleggene og dets betydning for funn i sjøfasen. Deretter å identifisere beste-praksis biosikkerhetstiltak for å begrense effekt av ILAV HPRO i settefiskanlegg.

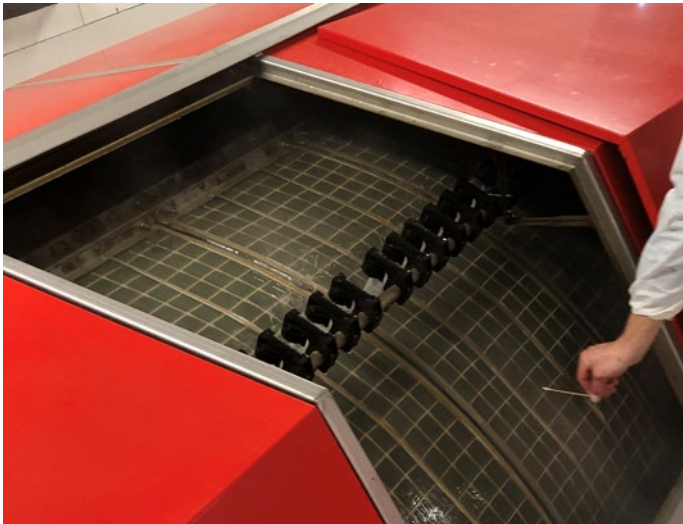
2.1.1 ILAV HPRO utbredelse innad i settefiskanleggene og prevalens i utvalgte fiskegrupper

Ti settefiskanlegg ble fulgt opp i minst ett år. Anlegga er eid av flere selskap og ligger spredt langs kysten fra Rogaland i sørvest til Finnmark i nord (Figur 1). Ett anlegg hadde kun gjennomstrømming, mens øvrige hadde en eller flere avdeling(er) med resirkulering av vann.



Figur 1. Kart som viser settefiskanleggenes beliggenhet. Laget av Attila Tarpai.

Ved oppstart av prosjektet ble det tatt svaberprøver (bomullspinner som ble plassert på rør med lysisbuffer etter svabring) fra karvegger, silkasser, veggen ved innløpet og utløpet i RAS-enhetene og trommelfiltre) samt vannprøver fra de samme kara, inntaksvann (både sjøvann og ferskvann før og etter desinfeksjon) og eventuelle RAS-enheter (Figur 2).



Figur 2. Svabring av trommelfilter. Foto: Mona Dverdal Jansen, Veterinærinstituttet/nå Mattilsynet.

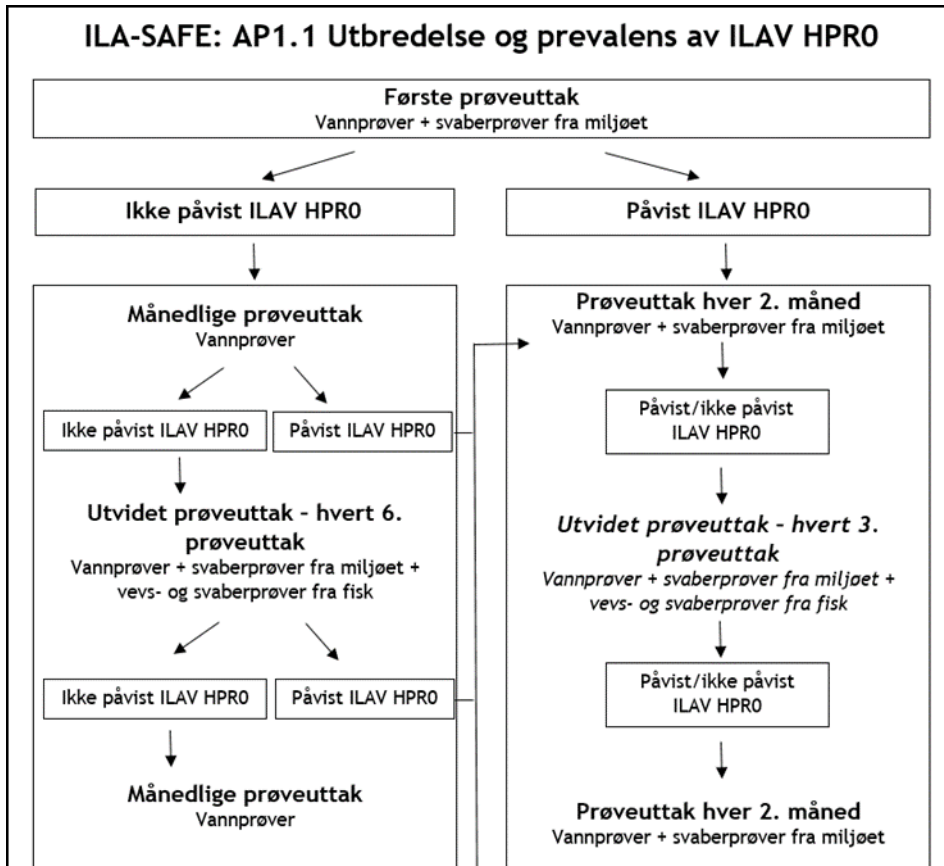
Vannprøvene ble filtrert med metode utviklet og videre optimalisert på Veterinærinstituttet gjennom dette og andre prosjekter (Figur 3). Metoden er innsendt til publisering. Filtrene ble lagt i petriskåler med lysisbuffer, og nukleinsyrer ble ekstrahert fra lysisbufferen.



Figur 3. Filtrering av vannprøver. Foto: Marit Måsøy Amundsen.

Videre prøvetaking ble bestemt ut ifra om det ble påvist ILAV HPR0 eller ikke (Figur 4). Anlegg hvor det ble påvist ILA-virus ble fulgt opp med svaberprøver fra miljøet og vannprøver annenhver måned. Anlegg hvor det ikke ble påvist ILAV HPR0 ble fulgt opp med vannprøver hver måned. Fra alle anlegg bortsett fra ett anlegg hvor det ble påvist ILA fem måneder etter

første prøveuttak ble det omtrent halvveis i året tatt vannprøver, svaberprøver fra miljøet samt gjellelev på RNAlater, gjellesvaber og hudsvaber fra 30 fisk i hver avdeling. Anlegget hvor det ble påvist ILA ble fulgt opp med svaberprøver og vannprøver ei tid etter sanering og deretter vannprøver hvert halvår fram til april 2024 (se også punkt 4.1.2).



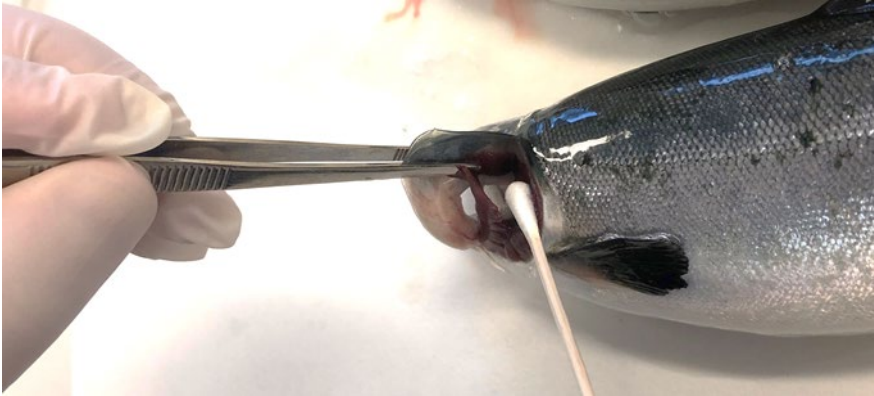
Figur 4. Flytskjema som viser prøveuttak.

Alle prøvene ble undersøkt med real-time RT-PCR for ILA-virus (14). Ved påvisning av virus, ble virus oppformert med HPR-spesifikke primere (15)[lenke WOAH-manual ILAV](#)). PCR-produkt ble sekvensert med de samme primerne for å karakterisere virus.

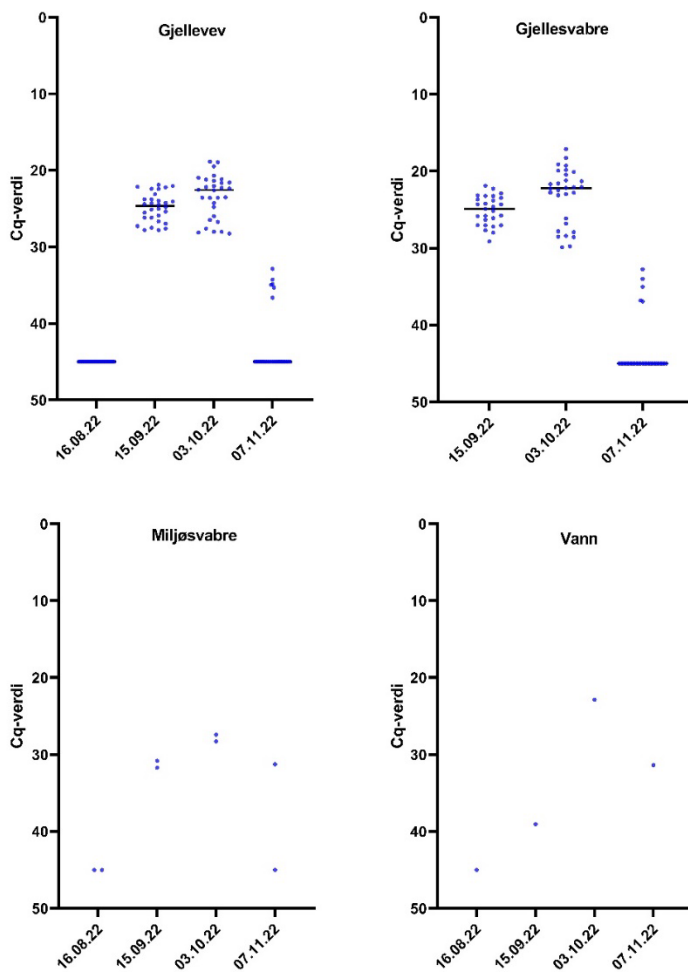
Ett anlegg hvor det ikke ble påvist ILA-virus i prosjektperioden ble tatt inn igjen i prosjektet fordi det kort tid etter siste ordinære prøvetaking i ILA-SAFE ble påvist ILAV HPR0 i prøver som anlegget hadde tatt på eget initiativ. Totalt ble det påvist ILAV HPR0 på fem anlegg inkludert anlegget hvor det ble påvist ILA. På to anlegg hvor det var vaksinert med vaksiner som inneholder ILA-virus ble det ved en anledning på hvert av anlegga påvist virus med identisk sekvens som vaksineviruset i HPR.

Generelt var det god overenstemmelse mellom de ulike prøvetypene for påvisning av ILA-virus på anleggsnivå, mens det var noe variasjon innen enkelte avdelinger. Virus ble påvist fra yngel til postsmolt. Det ble ikke påvist ILA-virus i rogn eller prøver fra fisk eller miljøet i klekkeri.

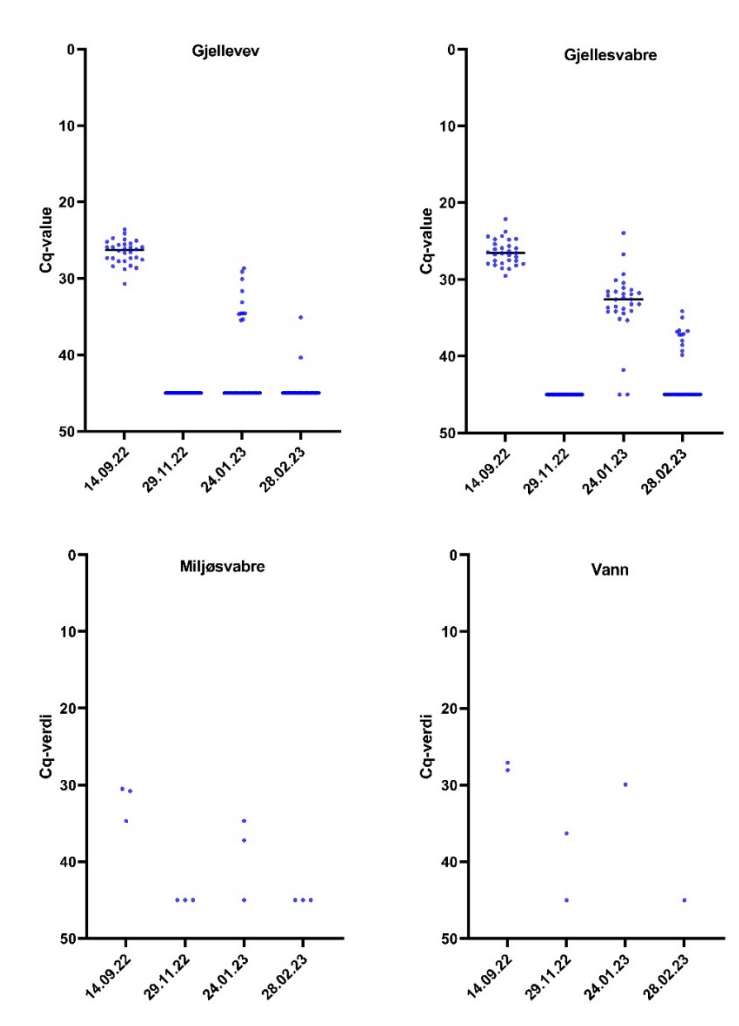
Ei fiskegruppe på tre settefiskanlegg ble fulgt opp med prøvetaking av gjellevev og gjellesvabre fra 30 fisk fra parrstadiet til sjøsetting (Figur 5). I tillegg ble det tatt svabre og vannprøver fra karet hvor fisken stod ved prøvetaking. Cq-verdiene for ILA-virus er vist i plottene under (Figur 6-Figur 8). Prøver uten Cq-verdi har fått Cq=45, som tilsvarer antall sykluser i PCR-programmet, for å kunne vise resultatet grafisk.



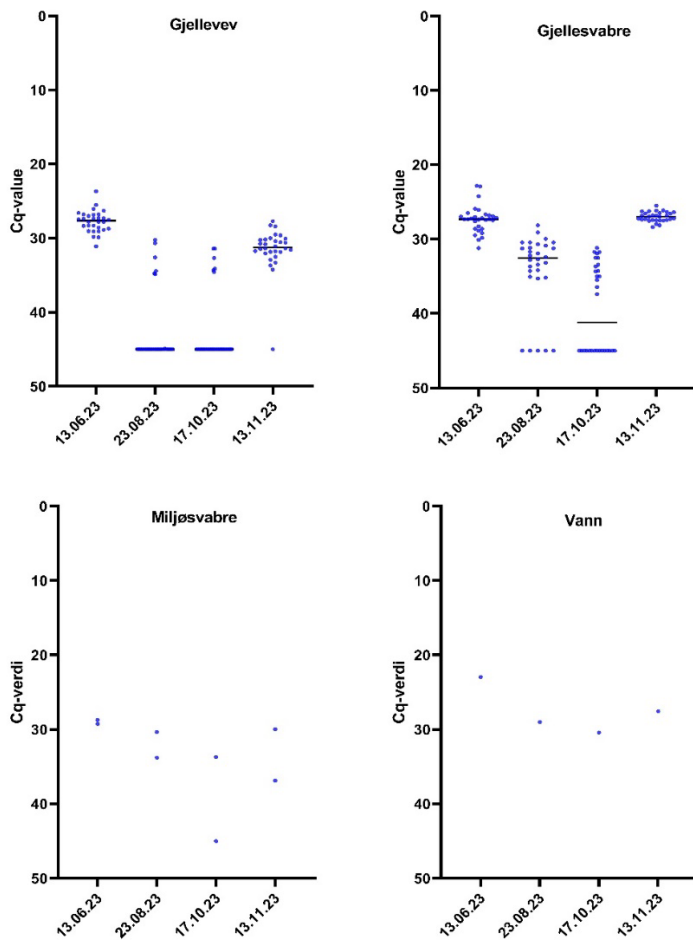
Figur 5. Svabring av gjelle. Foto: Mona Dverdal Jansen Veterinærinstituttet/nå Mattilsynet.



Figur 6. Plot som viser Cq-verdiene for prøver fra anlegg 1. Prøver uten Cq-verdi har fått Cq=45.



Figur 7. Plot som viser Cq-verdiene for prøver fra anlegg 2. Prøver uten Cq-verdi har fått Cq=45.



Figur 8. Plot som viser Cq-verdiene for prøver fra anlegg 3. Prøver uten Cq-verdi har fått Cq=45.

Resultatene for anlegg 1 er i overenstemmelse med oppfatninga om at ILAV HPR0 er en forbigående infeksjon. Det ble ikke påvist ILA-virus i noen prøver ved første prøvetaking, mens det ble påvist ILA-virus i samtlige prøver inkludert miljøsvabrene og vannprøvene ved prøvetaking omlag fire og sju uker seinere. Ved siste prøvetaking før sjøutsett ble det påvist virus i relativt få prøver fra fiskene. Det er imidlertid verdt å merke seg at det ble påvist virus vannprøvene og en av miljøsvabrene.

Fisken på anlegg 2 synes å ha vært på infeksjonstoppen ved første prøvetaking, og ved prøvetaking drøyt to måneder seinere ble det ikke påvist virus verken i gjellelev eller gjellesvabre. En av vannprøvene var imidlertid svakt positiv. Slik sett stemmer også disse resultatene overens med oppfatninga om at ILAV HPR0 gir en forbigående infeksjon. Ved prøvetaking to måneder seinere, ble det imidlertid påvist virus i de fleste gjellesvabrene og enkelte vevsprøver samt to av tre miljøsvabre og vannprøven. En del av fisken i karet var frasortert mellom andre og tredje prøvetaking, og stress i forbindelse med sortering kan ha medvirka til oppblomstring av infeksjonen. Ved siste prøvetaking en drøy måned seinere ble det påvist virus i flere gjellesvabre enn vevsprøver, mens det ikke ble påvist virus i miljøsvabrene eller vannprøven.

Det ble påvist virus i samtlige vevsprøver og gjellesvabre ved første prøvetaking også på anlegg 3, og ILA-virus ble påvist i relativt mange gjellesvabre og enkelte vevsprøver også ved de to kommende prøvetakingene. Ved fjerde og siste prøvetaking ble det påvist virus i samtlige prøver. Fisken var flytta mellom tredje og fjerde prøvetaking, og stress kan også her ha bidratt til oppblomstring av infeksjonen.

Gjellesvabre synes å være vel så godt eigna som gjellelev for prøvetaking ettersom det ble påvist virus i flere svaberprøver og med lavere Cq-verdier enn for vevsprøver. Det ble også påvist virus i miljøsvabre og vannprøver ved infeksjonstoppene, mens det er mer variabelt resultat for disse prøvetypene når infeksjonen er i ferd med å dabbe av.

2.1.2 Effekt av sanering for ILAV HPRO

Et anlegg hvor ILAV HPRO ble påvist første gang høsten 2019 bestemte seg for å utføre såkalt revisjonsvask med mål om å kvitte seg med viruset. Arbeidet starta i desember 2020 og ble ferdigstilt i februar 2022. Påvisning av ILA på anlegget sommeren 2021 gjorde at betydningen av å lykkes økte.

Et rogninnlegg ble avbestilt, og vaskeprosessen starta i klekkeriet. Utstyr ble demontert, og det var et stort fokus på logistikk, dokumentasjon, plassering av vaskestasjoner, rekkefølgen for nedvask og skiller mellom rein og skitten sone. Det ble satt opp et telt for lagring av reine deler og utstyr, og vaskemetode var avhengig av materialer og plassering. Det ble kun brukt godkjente desinfiseringsmiddel.

Med unntak av antatt vaksinevirus er det ikke påvist ILA-virus på anlegget siden avslutta revisjonsvask. Anlegget framholder at arbeidet ga de ansatte en god mulighet til å sette seg inn i anleggets oppbygging og øke forståelsen av prosesser. På den andre siden var det utfordringer med funksjon på biofilter etter revisjonsvasken, noe som var ressurskrevende og både førte til høye utgifter og tapt produksjon. Håndtering av avfall som biochip og bioblokker var også utfordrende.

Foruten revisjonsvask, ble eksisterende UV-enhet for sjøvann bygd om, og det ble satt inn ny UV-enhet i serie til hver avdeling. Anlegget satte et større fokus på forutsigbarhet i produksjonsplanen og å sikre avbrudd i produksjon mellom innlegg - helst tre uker. Anlegget stiller også krav til rognleverandør om at rogn blir undersøkt for ILA-virus.

2.1.3 Anleggskarakteristikker og anbefalinger til beste-praksis sikkerhetstiltak

Det ble foretatt intervjuer med nøkkelpersonell på hvert enkelt anlegg på Teams. Mal for intervjuene ble sendt ut til intervjudeltakerne på forhånd, og enkelte anlegg har sendt tilleggsdokumentasjon i ettertid.

Intervjuene dreide seg om tre hovedtema:

- Opphav
- Inntaksvann (både ferskvann og sjøvann)
- Rutiner på anlegget

Anlegga som har deltatt i ILA-SAFE har mottatt rogn fra flere produsenter i Norge og på Island, og stamfisken har stått på en rekke lokaliteter. Det er varierende kunnskap om screening av stamfisken - enkelte anlegg hadde svært god oversikt og stilte krav om undersøkelser av stamfisk og rogn, mens avgjørelsene i andre tilfeller var overlatt til fiskehelsepersonell sentralt i

selskapet. Vi hadde imidlertid inntrykk av at i alle fall en andel stamfisk i alle grupper ble screena blant annet for ILA-virus både i sjø og ved ilandsetting og stryking. De fleste anlegg hadde filtrering og desinfeksjon av ferskvann ved inntak sjøl om dette ikke er påkrevd når det ikke er anadrom fisk i vannkilden, og alle anlegg desinifiserte sjøvann ved inntak. Anlegga hadde også regelmessig hygienekontroll av vann før og etter desinfeksjon, og det var fastsatte rutiner for innslusing både av personell og besøkende, innslusing av utstyr og smoltlevering (vann og personell). Medarbeidere som jobber i flere avdelinger samme dag, starter alltid med den minste fisken. Ved uforutsette hendelser, kan det imidlertid skje at en medarbeider må gå fra ei avdeling med større fisk til ei avdeling med mindre fisk samme dag.

Intervjuene avdekket en viss variasjon når det gjelder generasjonsskiller, tomtid i ei avdeling mellom fiskegrupper, håndtering og forebygging av rørfisk samt vask og desinfeksjon. De fleste anlegga hadde ei målsetning om to ukers tomtid mellom fiskegrupper i ei avdeling, men det må av og til inngås kompromisser både når det gjelder tomtid og blanding mellom flere generasjoner i samme avdeling. Av og til var det heller ikke mulig å foreta omfattende vask og desinfeksjon av kar i ei avdeling mellom generasjoner, og det kunne være at dette ble utsatt til etter første innlegg fra neste generasjon.

Halvparten av anlegga forble negative for ILAV gjennom hele prosjektperioden, mens ILAV HPRO sirkulerer på positive anlegg og gir infeksjon i nye fiskegrupper, selv etter nedvask av tanker. For tre av anlegga hvor det er påvist ILA-virus har vi sekvenser fra to eller flere tidspunkt, og slektskapsundersøkelsene tilsier at samme virusvariant har holdt seg på anlegget over tid sjøl om nye introduksjoner ikke kan utelukkes. Omfattende tiltak må på plass for å bli kvitt viruset fra anlegg etter introduksjon. Bioreaktor er en særlig utfordring.

Fokus bør derfor være på å minimere risiko for introduksjon. Et annet fokusområde vil kunne være å påvirke hvordan anlegg blir bygd for å gjøre det enklere å inspisere, tømme, vaske og desinifisere avdelinger for å fjerne smittestoffer.

Introduksjon av ILA-virus med sjøvann synes å være sentralt. Ett anlegg var tydelig på at viruset var introdusert nettopp med sjøvann, mens et annet anlegg mente at virus kunne være introdusert i forbindelse med spyling med sjøvann. I sistnevnte tilfelle er ILA-viruset som er påvist på anlegget identisk virus som er påvist på matfisklokaliteter noe lenger nord for noen år siden i de undersøkte områdene av segment 5 og segment 6. ILA-virus som er påvist på et tredje anlegg er nært beslekta virus som er påvist på et annet anlegg i samme fjord, noe som tyder på at ILA-virus sirkulerer i sjøen.

2.2 Eksperimentelle studier (AP2.2)

Ma. Michelle Peñaranda, HyeongJin Roh, Dhamotharan Kannimuthu, Craig Morton, and Søren Grove (Havforskningsinstituttet)
Simon Weli, Torfinn Moldal, Sonal Patel og Hilde Sindre (Veterinærinstituttet)

Arbeidspakken er et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet og Veterinærinstituttet. Fisken som ble brukt i alle studiene var atlantisk laks, og forsøkene ble utført på i Havforskningsinstituttets våtlaborier i Bergen. Godkjenning til bruk av fisk til forsøkene var gitt av Mattilsynet (FOTS ID 30094). Fisken var uvaksinert og var undersøkt og vist negativ for ILAV, salmonid alphavirus (SAV), infeksjøs pankreatisk nekrose virus (IPNV), Piscine myocarditis

virus (PMCV), Piscine orthoreovirus (PRV), og Salmon gill poxvirus (SGPV) (for forsøk 2.2.1). Foreldrefisk var også undersøkt for de samme virusene, med unntak av SGPV.

Arbeidspakken hadde to hovedformål:

- Etablere en overføringsmodell for ILAV HPR0 i laks
- Teste eksperimentelt faktorer som kan være drivere for overgang fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ i laks

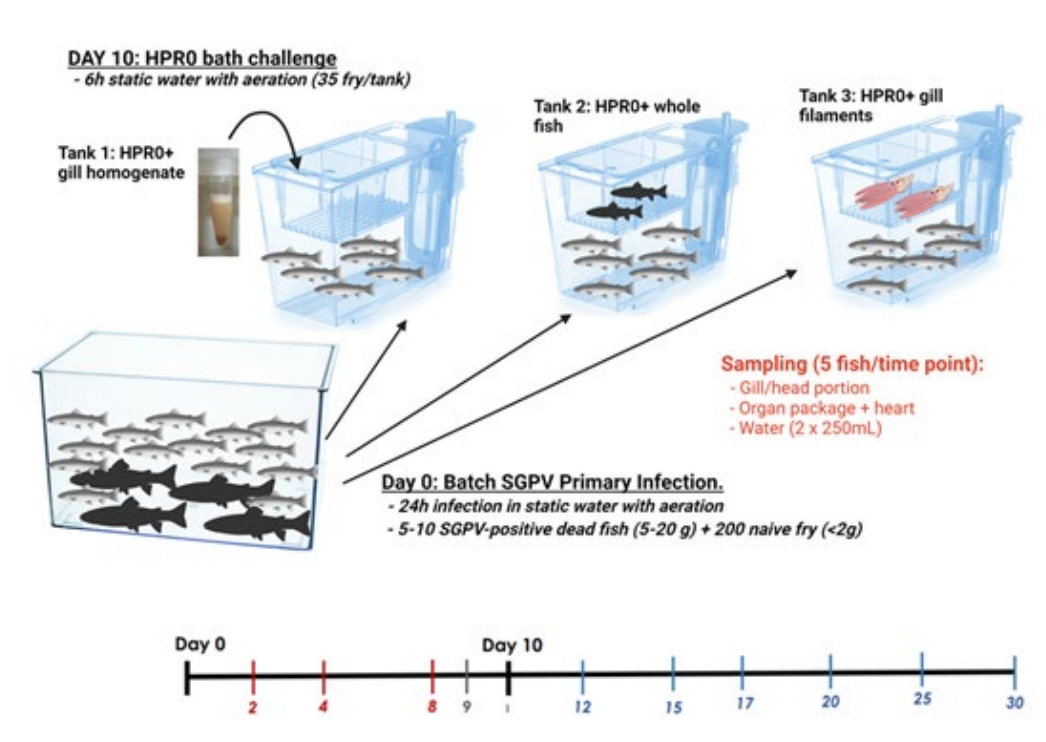
2.2.1 Forsøk på etablering av ILAV HPR0 overføringmodell ved samtidig infeksjon med gjellepatogen eller stressinduksjon for å identifisere faktorer som kan drive overgang fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ i laks,

Feltobservasjoner gjennom flere år indikerer at kronisk gjellebetennelse i settefiskanlegg med gjentatt ILAV HPR0 smitte kan være en høy-risiko situasjon. Det har vært eksempel på overgang fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ i anlegg med utfordringer knyttet til gjellehelse, noe som kan antyde at svekket gjellefunksjon kan påvirket overgang til mer virulent virus. Men risikofaktorer og drivere for denne endringen er fremdeles ikke definert, og en av hovedutfordringene for å kunne studere dette har vært at *in vitro* oppformering av ILAV HPR0 i cellekultur så langt ikke har vært mulig. Flere forsøk på å etablere *in vivo* smitte modeller ved bruk av smittet feltmateriale har ikke lyktes. I denne studien, forsøkte vi å etablere smitte modeller via flere ulike strategier. Vi ko-infiserte med et gjellepatogen (salmon gill poxvirus, SGPV) og ILAV HPR0, med mål om å inducere gjelle-endringer på cellulært nivå assosiert med patologi, slik som gjellebetennelse og celledød, noe som kunne bidra til å endre virulens og tillate oppformering av ILA-virus. Det er i tillegg kjent for flere ulike virussykdommer at stress kan være en driver for sykdomsutvikling. Kortisol ble derfor inkludert i forsøk 2 for å stresse fisken.

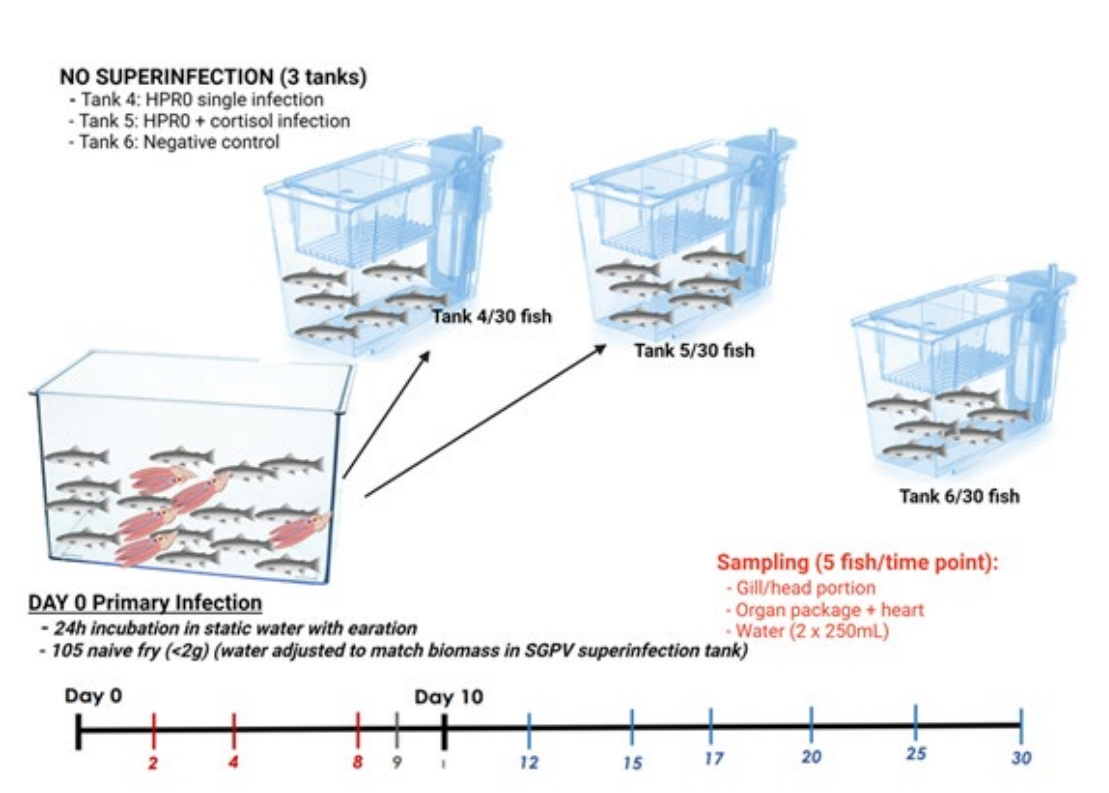
To badeksperimenter med SGPV ble gjennomført for å identifisere faktorer som kan være drivere i endring fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ som vist i figurene 9 and 10:

1. Smitteforsøk med eksperimentell super-infeksjon med SGPV-pox som en drivende faktor, med tre ulike ILAV HPR0 smitte materialer (ILAV HPR0 positivt gjellehomogenat, ILAV HPR0 positive gjellefilamenter og ILAV HPR0 smitte hel død fisk).
2. Smitteforsøk med to ulike ILAV HPR0 positive organmaterialer (ILAV HPR0 positivt gjellehomogenat, ILAV HPR0 gjellehomogenat + kortisol and negativ kontroll).

Begge smitteforsøkene hadde en varighet på 30 dager, og fem fisk (gjelle/hode og organpakke inkludert hjerte) og 2 x 250 ml vannprøver ble samlet ved hvert prøvepunkt. Alle prøvene ble undersøkt for ILAV ved RT-qPCR ihht WOAHA manualen ([lenke](#)).



Figur 9. Smittetest med SGPV-pox som driver, i kombinasjon med tre ulike ILAV HPR0-positive smittematerialer fra laks ILAV HPR0 positivt gjellehomogenat, ILAV HPR0 positive gjellefilamenter og ILAV HPR0 positiv hel fisk



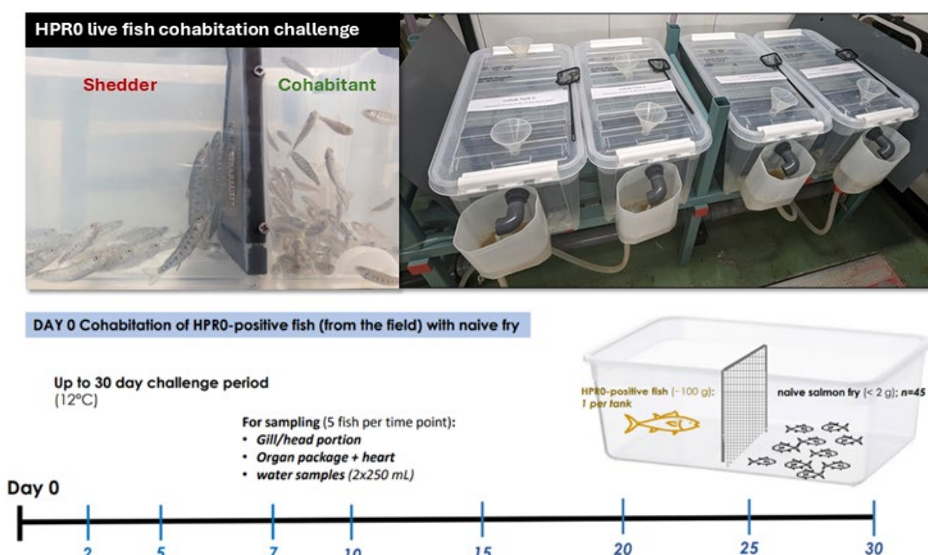
Figur 10. Infeksjonsoppsett med ILAV HPR0 positivt gjellehomogenat, ILAV HPR0 gjellehomogenat + kortisol og negativ kontroll.

Resultater:

Alle undersøkte prøver var negative for ILAV ved qRT-PCR på alle tidspunkter. Verken smitte med ILAV HPR0 materiale alene, i kombinasjon med kortisol for å indusere stress, eller superinfeksjon med SGPV-pox som drivende faktor, ga overføring av ILAV HPR0 smitte til den usmittede fisken. En utfordring kan være at det er umulig å verifisere hvorvidt materiale som er ILAV HPR0 positivt ved RT-qPCR faktisk inneholder infeksiøse viruspartikler. Siden infeksjonen i den enkelte fisk vil være forbigående kan tidsvinduet for å samle inn egnet materiale være ganske lite. I tillegg kan det være andre faktorer som er av betydning for smitteoverføring som foreløpig er ukjente.

2.2.2 Etablere en overføringsmodell for ILAV HPR0 i atlantisk laks med levende smittet fisk som ILAV HPR0 smittekilde

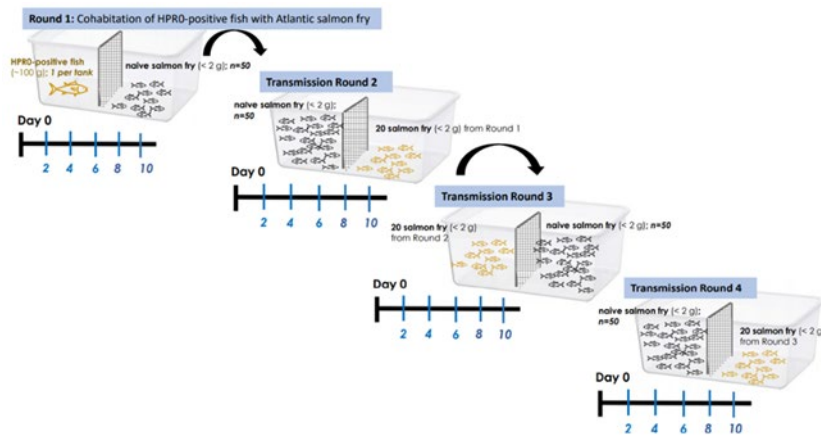
I denne studien, gjennomført i Havforskningsinstituttets våtlaboratorier i Bergen, ble levende ILAV HPR0-smittet fisk benyttet som smittekilde for å etablere en ILAV HPR0 smittemodell for laks. Levende ILAV HPR0-positiv atlantisk lakseparr fra et settefiskanlegg med pågående ILAV HPR0 infeksjon. Denne fisken ble benyttet som smitemateriale (shedder fisk) i kohabitering med usmittet lakseyngel (Figur 11). Før fisken ble benyttet i forsøket ble positiv status for ILAV HPR0 verifisert ved RT-qPCR, og virusvariant i settefiskanlegget ble fastsatt til ILAV HPR0 ved sekvensering.



Figur 11. Oppsett for bruk av levende ILAV HPR0-positiv lakseparr som sheddere for kohabitering med usmittet lakseyngel.

Fire overføringsrunder ble gjennomført, hvor levende smittede kohabitanter fra forrige runde ble brukt som sheddere sammen med nye usmittede kohabitanter. Opprinnelig plan er vist i i Figur 12, men tidsplan ble etter hvert tilpasset til resultatene av de foreløpige analysene av virusmengder i vann og fisk. Dette innebar at smitteforsøket ble forlenget, og måtte avsluttes før runde 4 kunne fullføres Totalt varte smitteforsøket i 2,5 måneder. Fiskeprøver (gjelle/hodedel, organpakke inkl. hjerte og gjellesvaber) ble samlet ved hvert prøvetakingstidspunkt fra kohabitantene. I tillegg ble det tatt vannprøver fra hvert kar. Vannprøvene ble filtrert i metode utviklet i tilknytning til arbeidspakke 1 og alle prøvene ble analysert for forekomst av ILAV HPR0 RNA ved RT-qPCR. I tillegg ble RNAScope ISAV *in situ*

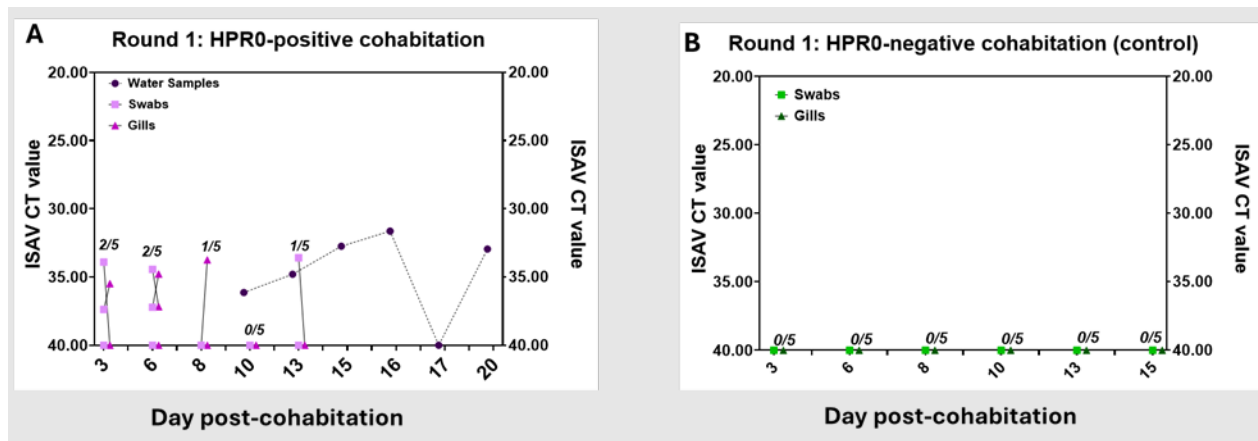
hybridisering utført på gjelle/hode og organpakke med hjerte på formalin fra fisk med påvisning av ILAV ved RT-qPCR. Viruset ble karakterisert som ILAV HPR0 ved sekvensering.



Figur 12. Oversikt over oppsett for 4 runder med smitteoverføring fra levende ILAV HPR0-positiv lakseyngel fra hver runde som virussheddere til ny usmittet lakseyngel.

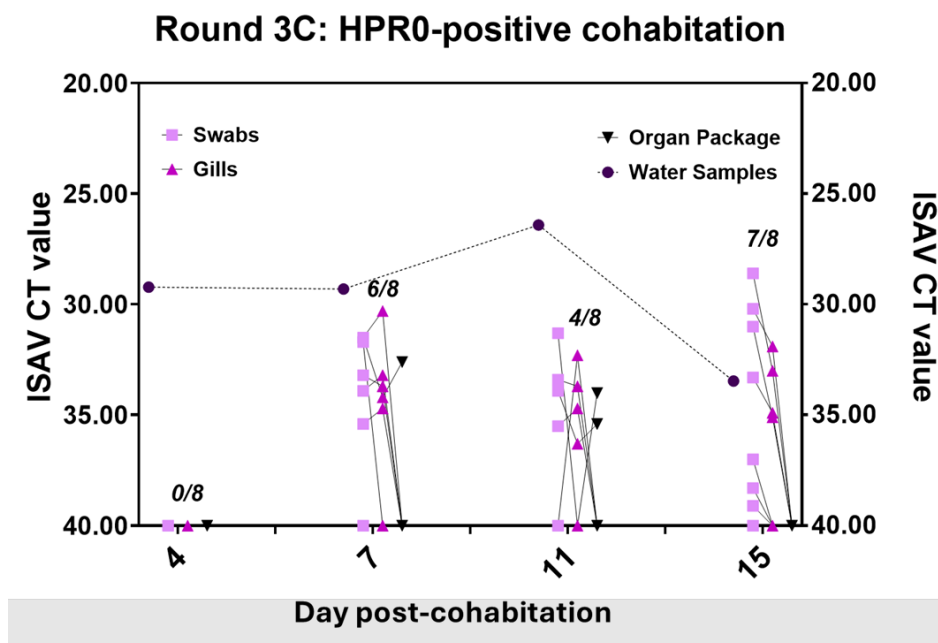
Resultater:

ILAV ble påvist ved RT-qPCR i gjellesvaber og/eller gjelleprøver fra kohabitantfisk og vann fra tanker allerede i runde 1 av oppsettet, men andelen positive fisk var lav og med høye Ct/Cq-verdier, noe som indikerer lav virusmengde (Figur 13A) I kontrolltank med negativ shedderfisk kunne virus ikke påvises (Figur 13B).



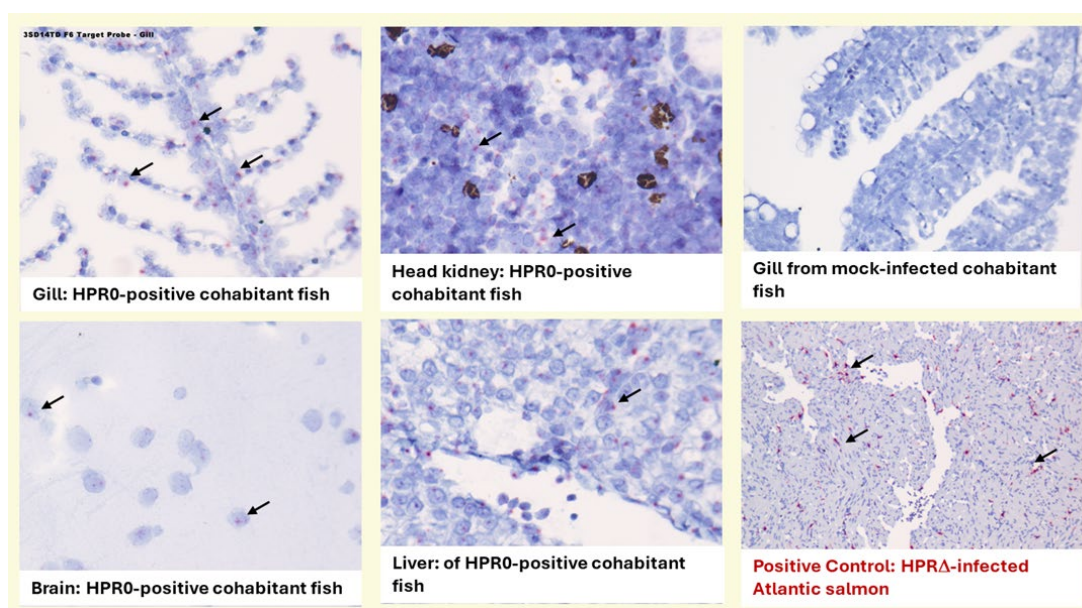
Figur 13. Påvisning av viralt RNA i første runde med kohabitering med usmittet atlantisk lakseyngel sammen med levende ILAV HPR0 smittet parr (A) and levende ILAV HPR0 negativ parr (B) som negativ kontroll. Punktene viser ILAV Ct/Cq verdier i filtrerte vannprøver (mørk lilla), gjellesvaber (lys lilla) og gjelleprøver (mørk rosa) ved ulike tidspunkter etter introduksjon av shedder fisk. Prevalens av virus-positive fisk er indikert som tall over hvert samplingspunkt. Vertikale linjer viser RT-qPCR data fra samme fisk. Stiplet linje viser kinetikk for virusutskilling i vann.

Utover i forsøket kunne økende mengde virus (indikert med lavere Ct/Cq-verdier) både for vannprøver og fiskeprøver, og høyere andel positive fisk kunne også påvises, som vist i Figur 14. fra 3. runde med passering.



Figur 14. ILAV virus mengde i fisk og vannprøver i runde 3C i av smitteforsøket. Punktene viser ILAV Ct/Cq verdier i filtrerte vannprøver (mørk lilla), gjellesvaber (lys lilla) og gjelleprøver (mørk rosa) ved ulike tidspunkter etter introduksjon av shedder fisk. Prevalens av virus-positive fisk er indikert som tall over hvert samplingspunkt. Vertikale linjer viser RT-qPCR data fra samme fisk. Stiplet linje viser kinetikk for virusutskilling i vann.

Påvisning av virus i gjelle og andre organer i den positive fisken ble bekreftet med RNAScope ISAV in situ hybridisering (Figur 15), hvor virus antigen kan påvises direkte i vevet med høy sensitivitet (16, 17). Prøver fra smitteforsøket vil også bli analysert med dypsekvenseringsverktøy etablert i arbeidspakke 2.1, for å studere eventuelle endringer i viruset i løpet av smitteperioden. Disse analysene pågår fortsatt.



Figur 15. Påvisning av ILAV viralt RNA i vev fra ILAV HPR0-koehabitant fisk (runde 3) ved bruk av RNAScope in situ hybridiseringsassay. Positive resultater vises som rød farging, og er indikert med svarte piler i fisk infisert med enten ILA-HPR0 or HPR0 (positiv kontroll).

Gjennom dette prosjektet har vi lyktes i å etablere en ILAV HPRO smittemodell hvor infeksjon kunne vedlikeholde i minst 3 passasjer. Denne første kjente ILAV HPRO-smitte modellen er et verktøy som tillater undersøkelser av HPRO infeksjonsdynamikk under kontrollerte laboratorieforhold. Dette muliggjør studier av ulike faktorer, og kombinasjoner av disse, som kan være viktige som drivere av endringer i viruset fra avirulente til mer sykdomsframkallende ISAV HPRΔ-varianter. Informasjonen fra slike studier kan være av store betydning for å utforme biosikkerhetstiltak for å minimere risiko for overgang fra avirulent til virulent ILAV, og for å begrense spredning av virus i det enkelte settefiskanlegg.

2.3 Genetisk karakterisering av ILAV HPRO (AP2.1)

Simon Weli, Torfinn Moldal, Magnus Leithaug, Arvind Sundaram, Bjørn Spilsberg og Hilde Sindre (Veterinærinstituttet)

Kai Ove Skaftnesmo, Michelle Peñaranda, Søren Grove, Craig Morton (Havforskningsinstituttet)

Arbeidspakken er et samarbeid mellom Veterinærinstituttet og Havforskningsinstituttet (HI).

Målsetning:

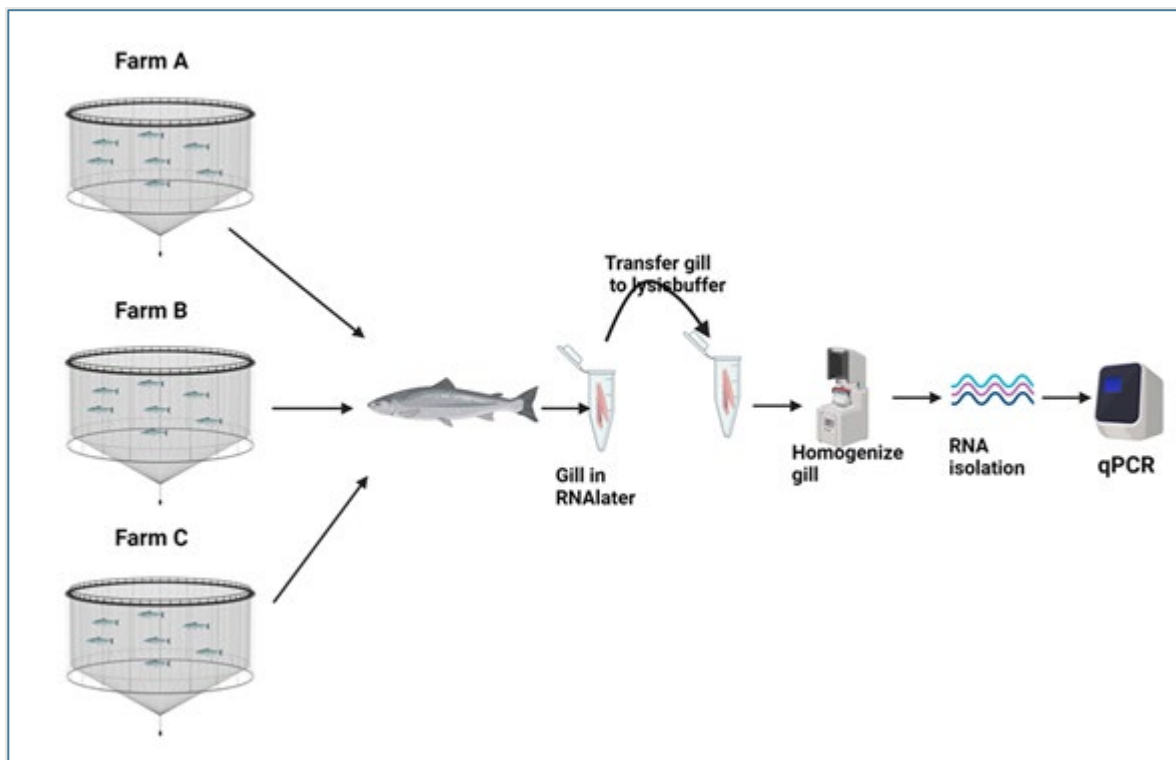
Kartlegge genetisk variasjon innen ILAV HPRO og karakterisere dynamikken i de genomiske endringene som fører fra ILAV HPRO til ILAV HPRΔ, med spesielt fokus på rekkefølgen av endringer.

Ved påvisning av ILA-virus sekvenserer Veterinærinstituttet rutinemessig HPR for å bestemme om det dreier seg om ILAV HPRO eller ILAV HPRΔ og dessuten segment 5 og segment 6 for slektskapsundersøkelse. Per i dag gjøres sekvensering med Sanger-teknologi, og ved forekomst av to eller flere virusvarianter i en prøve, vil en formentlig få sekvenser for den dominerende varianten.

I løpet av de siste ti åra er ILAV HPRO som er identisk eller nært beslektet virus som er påvist i forbindelse med ILA-utbrudd i sjø påvist på et titalls settefiskanlegg. Tre av disse settefiskanlegga har deltatt i ILA-SAFE, og prøver som er tatt i ulike sammenhenger og på flere tidspunkt på disse settefiskanlegga er undersøkt med dypsekvensering av HPR for å avdekke om ILAV HPRΔ også finnes.

Kartlegging av genom-endringer av betydning for overgang fra ILAV HPRO til ILAV HPRΔ

Forskjeller mellom ILAV HPRO og ISAV HPRΔ er godt beskrevet. Likevel er fremdeles overgang fra ILAV HPRO til patogen ILAV HPRΔ fremdeles ikke godt karakterisert. Er det enkeltmutasjoner eller aminosyreendringer ispesifikke posisjoner, eller er det flere ulike endringer i genomet som må til for å initiere denne prosessen. Dette er viktige spørsmål når man skal vurdere risiko for å utvikle HPRΔ fra HPRO. I denne studien, har vi brukt dyp- og fullgenom-sekvensering, for å analysere prøver tatt over tid fra settefiskanlegg, og inkluderer også prøver fra matfiskfasen, hvor det er aktuelt. Det eksperimentelle oppsettet baserte seg på innhenting av fisk og vannprøver fra ILAV HPRO positive anlegg i løpet av en lengre tidsperiode, i tilknytning til prøveinnhenting beskrevet i kapittel 2.1. Totalt ble prøver fra 28 gjeller og vannprøver samlet fra tre ulike settefiskanlegg (A = 8), (B = 11) og (C = 9) og prosessert som vist i Figur 16. Alle prøvene var bekreftet ILAV HPRO ved RT-qPCR og sekvensering for ILAV som beskrevet i WOAH manualen med primere for segment 6 HPR ([lenke WOAH-manual ILAV](#)).



Figur 16. Steg for prøveprosessering

2.3.1 Illumina (amplicon)-sekvensering (Veterinærinstituttet)

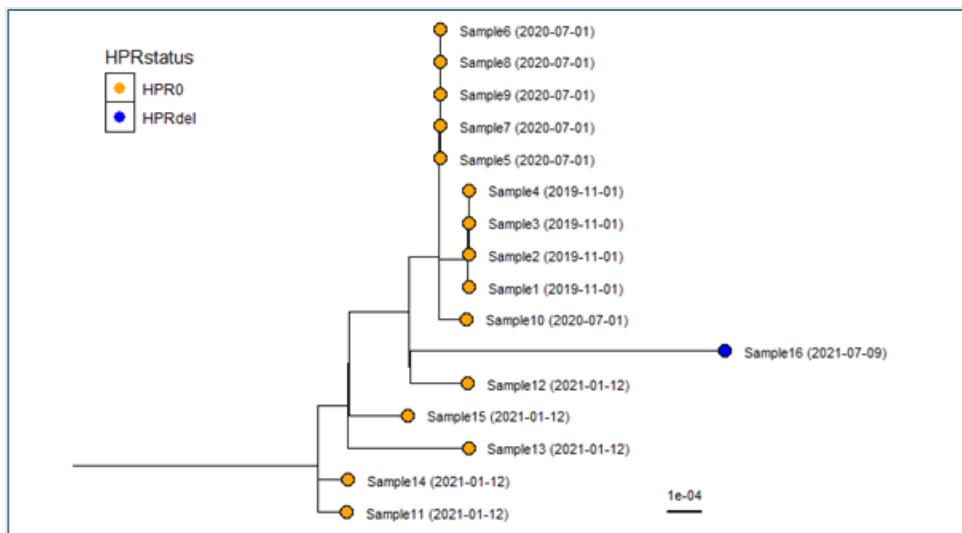
To ulike tilnærminger ble brukt for å se på endringer i ILAV genomet over tid:

Dypsekvensering fokusert på spesifikke områder som kunne dekkes av et read ble benyttet for samtidig sekvensering av mange prøvesett raskt og kostnadseffektivt og med en mer håndterlig datasett enn for helgenomsekvensering. Protokollen fokuserte spesielt på virulensmarkørene i kløyvingssetet for fusjonsproteingenet (segment 5) og ILAV HPR-området i hemagglutinin-esterasegenet (segment 6). Foreløpige data fra HPR-spesifikk dypsekvensering viser spesifikke mutasjoner/delesjoner, som ser ut til å øke i forekomst over tid. Dette datasettet er fremdeles under analysering, og protokollen benyttes også til analyser av prøver fra smitteforsøket beskrevet i 2.2.2. En WGS-protokoll (helgenomsekvensering) for ILAV HPR0, utviklet av Spilsberg et al.(18), tillater bruk av både store og små prøveserier, og ble utviklet for å levere høy-oppløselige data. Metoden er benyttet for å oppnå helgenomsekvens for 16 ulike ILAV HPR0-prøver fra 3 ulike settefiskanlegg i Norge (Tabell 1)

Year	Sample #	Sample ID
2019 (4)	1	Sample 1 (2019-11-01)
	2	Sample 2 (2019-11-01)
	3	Sample 3 (2019-11-01)
	4	Sample 4 (2019-11-01)
2020 (6)	5	Sample 5 (2020-07-01)
	6	Sample 6 (2020-07-01)
	7	Sample 7 (2020-07-01)
	8	Sample 8 (2020-07-01)
	9	Sample 9 (2020-07-01)
	10	Sample 10 (2020-07-01)
2021 (4)	11	Sample 11 (2021-01-12)
	12	Sample 12 (2021-01-12)
	13	Sample 13 (2021-01-12)
	14	Sample 14 (2021-01-12)
2021-ISAV del	15	Sample 15 (2021-01-12)

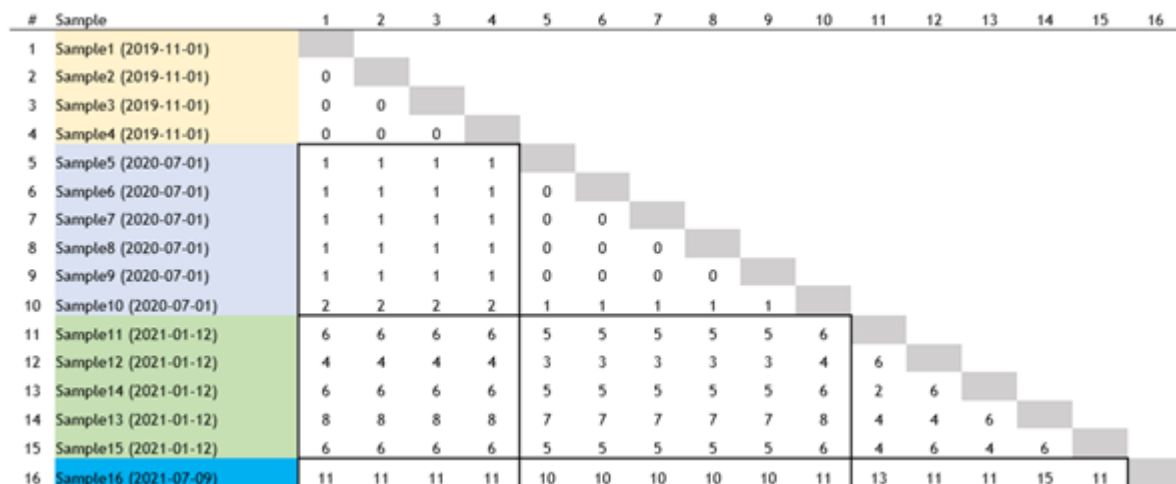
Tabell 1. Antall og ID for prøver analysert med helgenomsekvensering

Resultater: Genom-sekvensanalyser av de 16 prøvene avdekket ingen signifikante forskjeller i mutasjonsrate over tid, ved sammenligning med ILAV HPRΔ (Figur 17).



Figur 17. Maximum Likelihood (HKY modell, SNP tre) for 16 ILAV HPR0 prøver mot ISAV HPRΔ genomet avdekket ingen signifikante forskjeller i mutasjonsrate over tid..

Men analysene av antallet enkelt nukleotidpolymorfismer (SNPs for hele ILAV-genomet indikerer likevel at antallet mutasjoner stiger over tid fra 2019 - 2020 (Figur 18). Siden vi ikke vet hvor lang overgang fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ tar, er det mulig at vi ved en økning av prøvetakingsperioden, kunne avdekket flere delesjonshendelser, som igjen kunne resultere i signifikante forskjeller i mutasjoner sammenlignet med ILAV HPRΔ.



Figur 18. Antallet SNPs i hele ILAV-genomet indikerer økning i mutasjoner over tid fra 2019 - 2020.

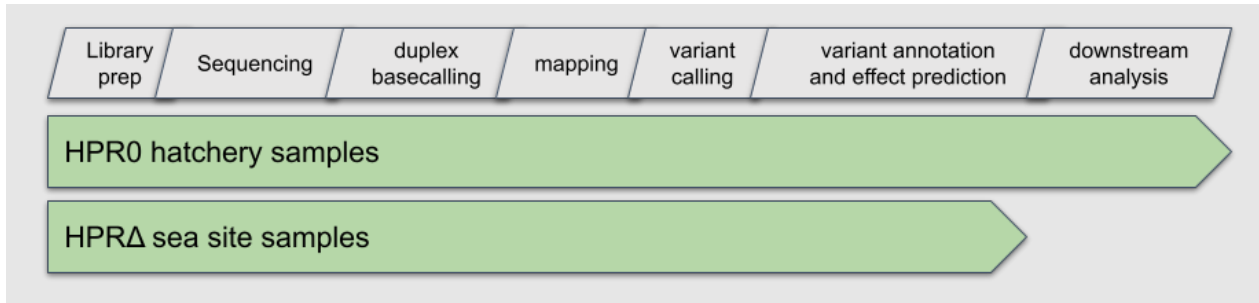
2.3.2 Nanopore “long read amplicon” sekvensering (Havforskningsinstituttet)

I tillegg til Illumina helgenomsekvensering utført på Veterinærinstituttet, er det også utført Nanopore “long read amplicon” sekvensering, hvor alle segmenter av ILA ble sekvensert i helhet. Dette ble benyttet på prøvesett presentert under (Tabell 2). Prøvesettet består av prøver tatt på ulike tidspunkter i 3 ulike ILAV HPR0 positive settefiskanlegg, og fra matfiskanlegg som har fått fisk fra disse settefiskanleggene og påfølgende utbrudd av ILA.

Tabell 2: Oversikt over prøver til Nanopore-sekvensering

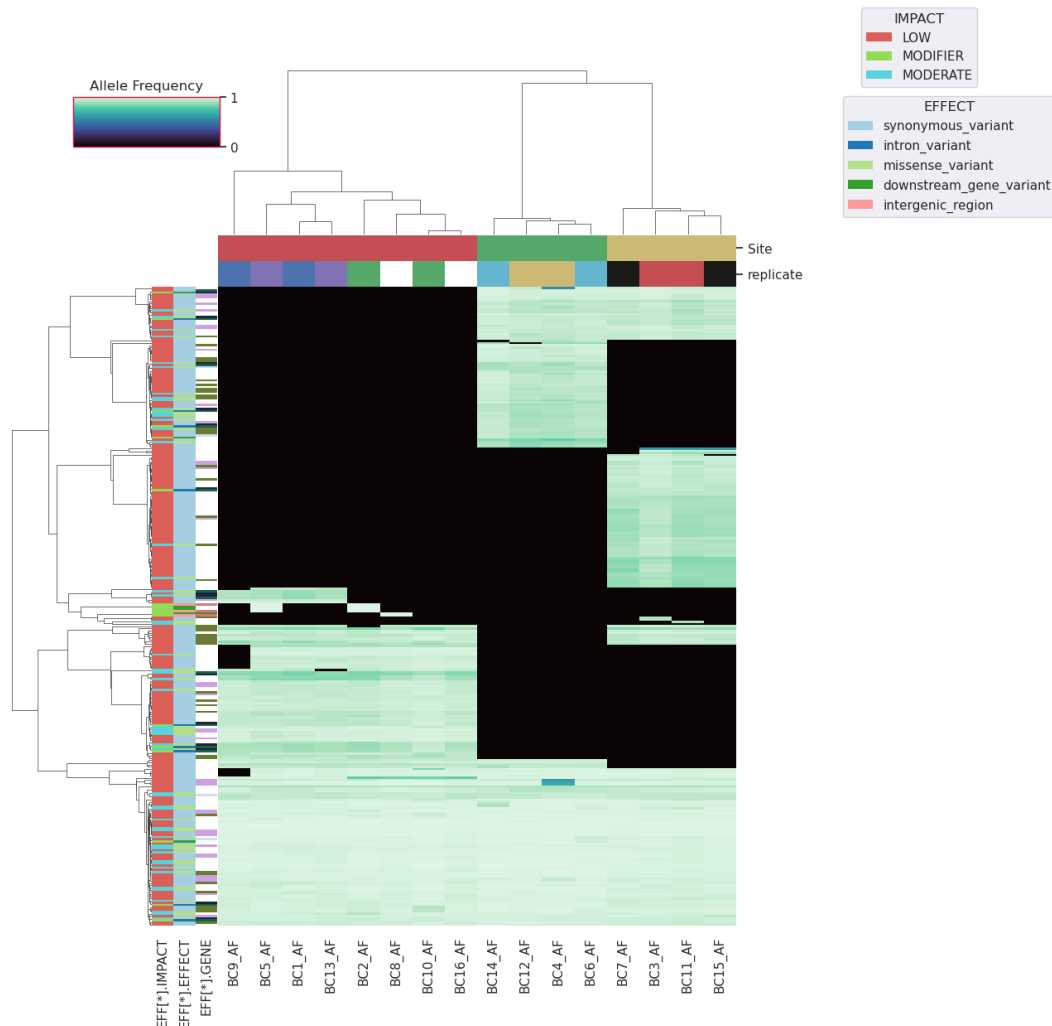
Site	Sampling date	Information
B	07-05-19	Hatchery ISAV HPR0
B	07-05-19	Hatchery ISAV HPR0
B	19-01-21	Hatchery ISAV HPR0
B	19-01-21	Hatchery ISAV HPR0
B	03-10-22	Hatchery ISAV HPR0
B	03-10-22	Hatchery ISAV HPR0
B1	16-01-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site B
B2	21-08-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site B
B3	09-10-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site B
B4	16-10-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site B
C	01-11-19	Hatchery ISAV HPR0
C	01-11-19	Hatchery ISAV HPR0
C	09-07-21	Hatchery ISAV ISAV HPRΔ
C1	14-10-19	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site C
C2	25-05-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site C
C3	30-06-20	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site C
C4	17-06-21	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site C
A	29-04-21	Hatchery ISAV HPR0
A	29-04-21	Hatchery ISAV HPR0
A	14-09-22	Hatchery ISAV HPR0
A	14-09-22	Hatchery ISAV HPR0
A1	27-11-19	Sea site ISAV HPRΔ; received fish from site A

Vi har til nå sekvensert alle prøver, men en foreløpig analyse inkluderer bare prøver fra settefiskanlegg. GANNT kartet nedenfor illustrerer hvor langt vi er kommet med de foreløpige analysene (fig 19).



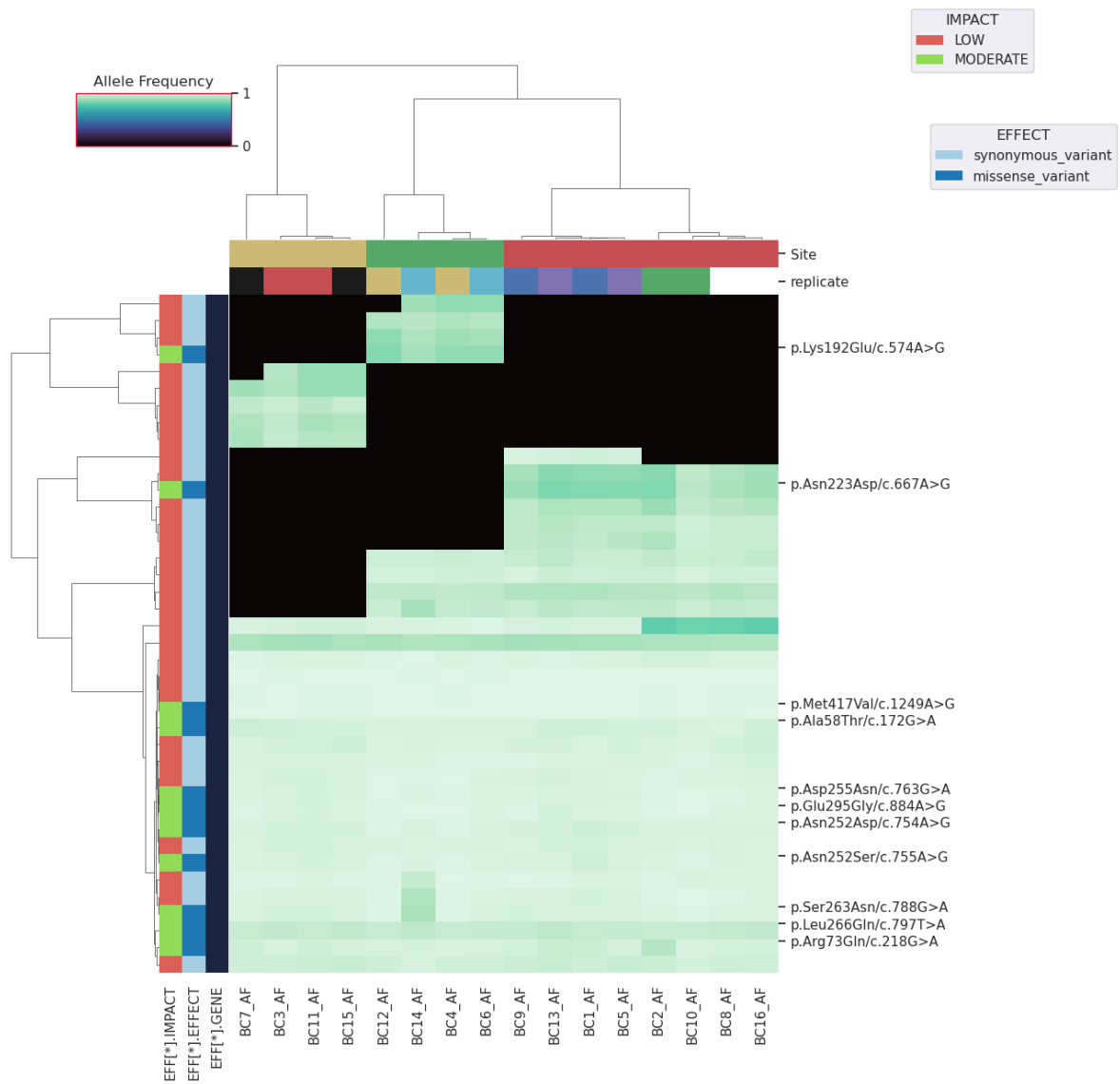
Figur 19: GANNT kart over analyseframdrift

En unsupervised Hierarkisk clustering av dataene (Figur 20) viser at prøver fra de samme settefisk anlegg tenderer til å gruppere sammen og viser større genetisk likhet med hverandre enn prøver fra andre settefiskanlegg.

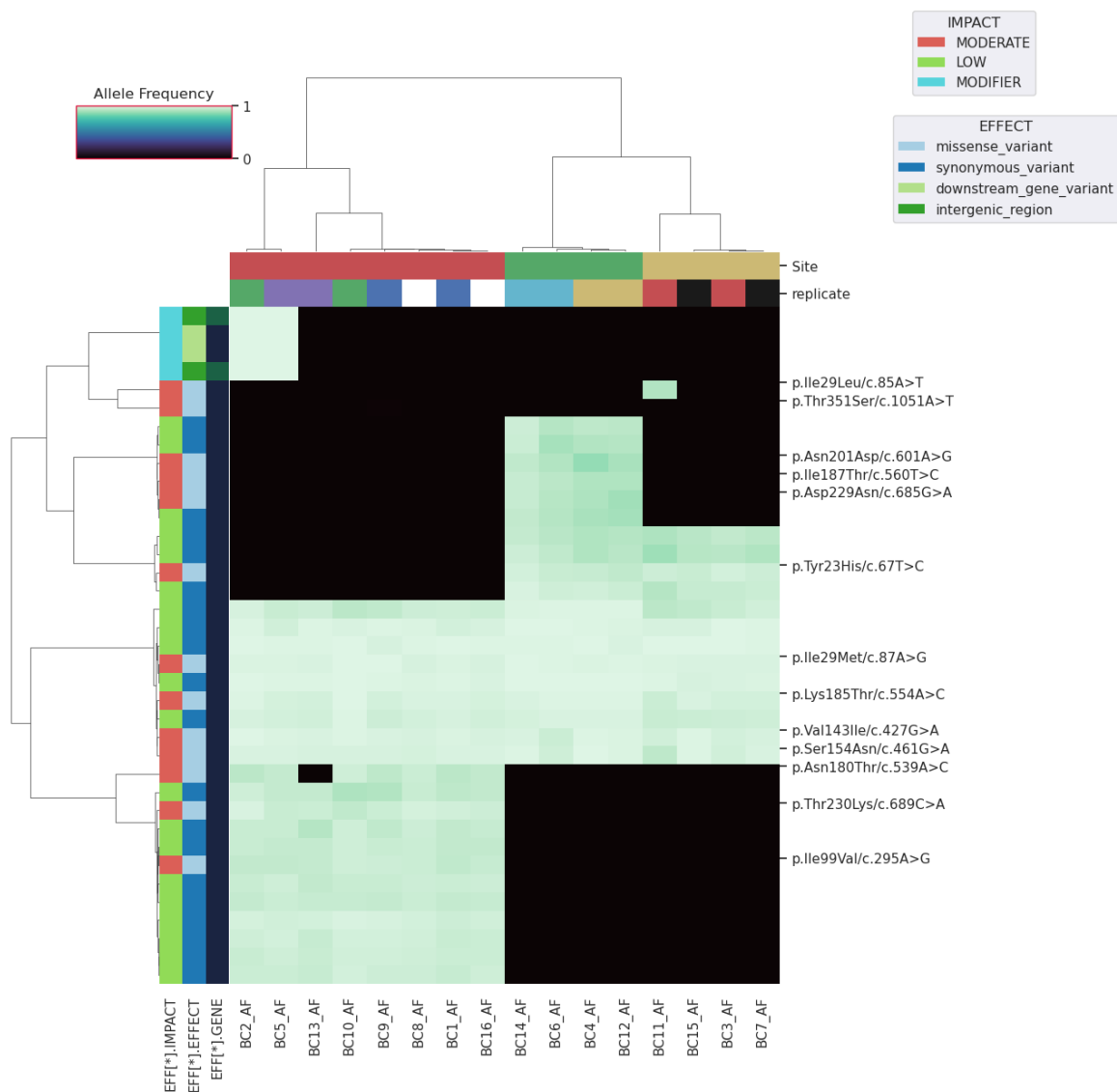


Figur 20. Unsupervised Hierarkisk clustering analyse av varianter identifisert med helgenom Nanopore sekvensering av ILA virus fra settefiskanlegg. Allel-frekvenser med verdi mellom 0 og 1 er plottet vertikalt for hver prøve. Hver prøve er sekvensert i teknisk replikat angitt med fargekode (replikat). Hvilken lokalitet prøvene er fra er og fargekodet (Sites). Fargekodene i de tre kolonnene til venstre indikerer funksjonell gradering av konsekvens av variant ($EFF[*].IMPACT$), hvilken type variant ($EFF[*].EFFECT$) og på hvilket gen ($EFF[*].GENE$) SNV variantene forekommer. Kategorier for disse er i tillegg vist i legends.

I figur 21 og 22 er utdrag av data for segment 5 og 6 vist. Også for disse datautdragene er det tydelig at prøvene grupperer etter prøvelokalitet (settefiskanlegg). Endringene i segment 5 og 6 ser derfor ut til å være spesifikk for lokalitet. Her er i tillegg SNV varianter som fører til endringer i aminosyrer (misense varianter) vist til høyre i diagrammet.



Figur 21. Unsupervised Hierarkisk clustering analyse av varianter for segment5 identifisert med helgenom Nanopore sekvensering av ILA virus fra settefiskanlegg.



Figur 22. Unsupervised Hierarkisk clustering analyse av varianter for segment6 identifisert med helgenom Nanopore sekvensering av ILA virus fra settefiskanlegg.

Det gjenstår foreløpig analyser fra prøver tatt fra sjøanlegg, samt en analyse av hvorvidt varianter endrer seg innenfor hver lokalitet som funksjon av prøve tidspunkt.

2.4 Identifisere virus-vertsinteraksjoner som påvirker overgangen fra ILAV HPR0 til HPRΔ (AP3).

Johanna Hol Fosse, Maria K. Dahle, Ottavia Benedicenti, Frieda Betty Ploss, Shokouh Makvandi-Nejad, Adriana Magalhaes Santos Andresen (Veterinærinstituttet)

Hovedmål

- undersøke faktorer som kan fremme overgangen fra ILAV HPR0 til ILAV HPRΔ
- etablere verktøy som gjør oss i stand til å teste hvordan disse faktorene påvirker virusaktivering.

Overgangen fra ILAV HPRO til HPRΔ gjør at viruset blir i stand til å infisere nye celletyper, noe som gir tilgang til indre organer og gjør fisken syk. Noen av de viktigste faktorene som bestemmer hvilke celletyper som kan infiseres av et virus er evnen til å binde og trenge inn i cellen (AP3.2-3), og deretter unngå vertens forsøk på å eliminere infeksjonen (AP3.1).

2.4.1 Kartlegging av fiskens respons på HPRO ILA-virusinfeksjon (AP3.1)

ILAV HPRO infeksjon er en lokal slimhinneinfeksjon som ikke fører til tegn på sykdom. Det finnes lite informasjon om hvordan fiskens immunsystem kontrollerer og begrenser infeksjon med HPRO ILAV, noe som kan bidra til å hindre overgang til ILAV HPRΔ. En tidligere studie fra Veterinærinstituttet rapporterte at HPRO ILAV-infeksjon var knyttet til aktivering av et enkelt gamma-interferon-respons gen (gamma-IP) og muligens også aktivering av Mx, et antiviralt gen som typisk stimuleres av alfa/beta-interferon i infiserte celler(10). Imidlertid har det totale genuttrykket ved ILAV HPRO-infeksjon aldri vært kartlagt.

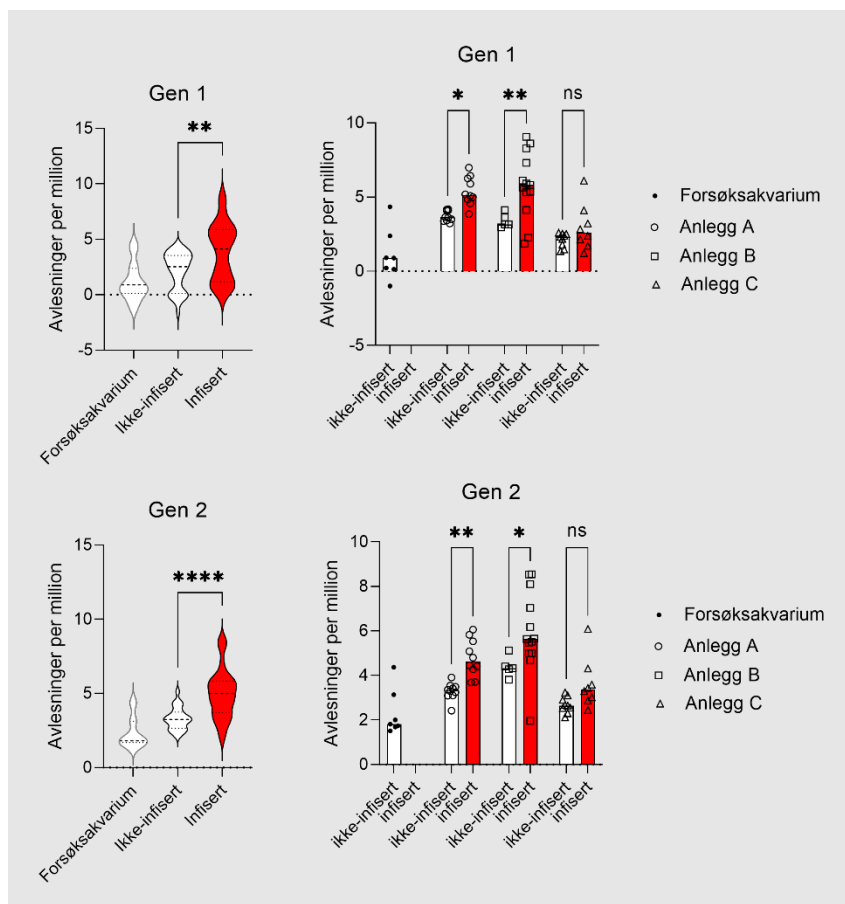
For å forstå hvordan fisken kontrollerer replikasjon av ILAV HPRO og dermed reduserer risikoen for at ILAV HPRΔ skal oppstå, har vi brukt RNA-sekvensering og bioinformatiske analyser til å kartlegge det totale genuttrykket i gjeller hos HPRO ILAV-infisert fisk (RT-qPCR-positiv for ILAV segment 8) ved tre settefiskanlegg.

Som forventet i feltstudier observerte vi stor variasjon i genuttrykk mellom fisk fra forskjellige anlegg og kar. Siden ILAV HPRO-infeksjon ikke forårsaker tegn på sykdom må prøvene som skal analyseres nødvendigvis velges ut etter at de har blitt undersøkt for ILAV ved PCR. Dette gjør at det er vanskelig å forutsi hvor mange positive og negative prøver som er tilgjengelige og hvilket stadium av infeksjonsforløpet de positive prøvene stammer fra. Den omfattende prøvetakingen i ILA-SAFE har derfor vært en viktig forutsetning for å skaffe tilstrekkelig materiale til å oppnå robuste analyser.

Det har også vært utfordrende å identifisere gode negative kontroller, det vil si ikke-infisert fisk til sammenligning. Vi har derfor valgt å sammenligne infisert fisk både med ikke-infisert (RT-qPCR-negativ for ILAV segment 8) fisk fra samme anlegg og med fisk fra et forsøksakvarium hvor ILAV HPRO ikke har vært påvist. Det har ikke vært mulig å fullstendig unngå forskjeller i indre og ytre faktorer som potensielt kan påvirke genuttrykket i gjellene, som genetisk bakgrunn, størrelse, samt kjente og ukjente miljøfaktorer. Til sammen kan dette føre til forskjeller i genuttrykk som skyldes andre forhold enn HPRO infeksjon. Muligheten til å inkludere fisk fra tre forskjellige settefiskanlegg i analysen har derfor vært en viktig faktor for å filtrere ut tilfeldig støy og lykkes med å **identifisere en robust HPRO responsprofil**.

Analysene våre identifiserte et **panel av sju gener** som var robust oppregulert i infisert fisk sammenlignet med ikke-infisert fisk fra de tre anleggene. Alle de identifiserte responsgenene er tidligere beskrevet i forbindelse med andre virus-infeksjoner, noe som støtter at de stimuleres av ILAV HPRO.

Resultatene fra arbeidet i AP3.1 sendes inn for fagfelleevaluering i løpet av 2024. Den aksepterte artikkelen, inkludert panelet som identifiserer en typisk HPRO responsprofil vil gjøres fritt tilgjengelig ved åpen publisering. I henhold til FAIR prinsippene for datahåndtering vil datasettet med RNA-sekvenseringsdata deponeres i et fritt tilgjengelig arkiv for å legge til rette for gjenbruk og videre analyser(19).



Figur 23: Uttrykk av to av de 7 identifiserte HPR0-responsgenene i ikke-infisert (hvit) og infisert (rød) fisk. Log2 fold change >1 og Benjamini-Hochberg korrigert p-verdi <0.05 for alle responsgener ble påvist ved hjelp av EdgeR v4.2.0 (TMM) og Limma v3.60.0. Symbolene i figuren angir p-verdier fra Mann-Whitney U, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

2.4.2 Utvikle verktøy for å påvise proteaser i slim og andre faktorer som kløyver ILAV eller på annen måte påvirker ILAV evne til å trenge inn i vertscellen (AP3.2-3).

De genetiske endringene som kjennetegner overgangen fra ILAV HPR0 til HPRΔ fører til forandringer i virusets to overflateproteiner, hemagglutinin esterase (HE) og fusjons (F) - proteinet. Disse proteinene har som oppgave å binde vertscellen og deretter hjelpe viruset å forsure plasmamembranen for å få tilgang til cellens indre. Tidligere studier tyder på at forandringene som kjennetegner HPRΔ ILAV fremmer virusaktivering og inntrenging i cellen(20).

Enzymatisk kløyving av F proteinet er en viktig del av den overfor nevnte virusaktiveringen som gjør ILAV i stand til å trenge inn i vertscellen(20). Selv om trypsin har vært brukt eksperimentelt av oss og andre for å utføre denne kløyvingen, er det ikke kjent hvilke(n) protease(r) som faktisk kløyver ILAV i fisken.

For å kunne måle hvordan ulike faktorer som finnes i fisken og dens miljø kan påvirke virusaktivering og inntrenging i cellen, har vi etablert et tidligere beskrevet fusjonsassay og validert dette ved å sammenligne to nært beslektede norske ILAV HPR0 og HPRΔ (AP3.2). Vi har også utviklet et kulebasert assay som kan påvise proteaser som kløyver F proteinets kløyvingssete, for eksempel i slim, og måle deres aktivitet (AP3.3). Begge verktøyene er

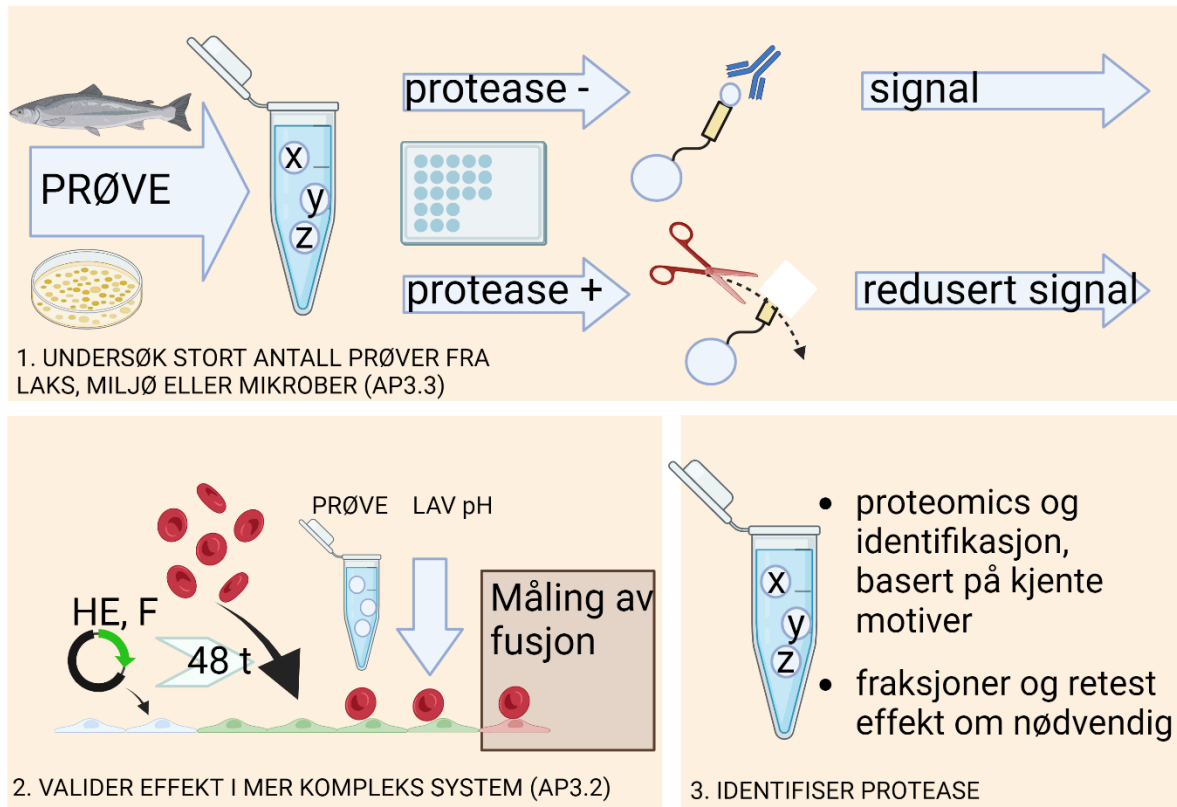
uavhengig av virusdyrkning i cellekultur. Dette er spesielt viktig for å kunne måle aktivering av ILAV HPR0, som vanligvis ikke infiserer dyrkede celler.

Fusjonsassayet er et komplekst verktøy som måler både samspillet mellom HE og F og hvordan ytre faktorer som lav pH og forskjellige proteaser påvirker virusaktivering og inntrenging i cellen. Bruken begrenses noe av at verktøyet er relativt arbeids- og ressurskrevende. Assayet bruker evnen til å immobilisere røde blodceller (funksjonelt mål på uttrykk av HE på celleoverflaten) for å normalisere for forskjeller i transfeksjonseffektivitet. Det har derimot ikke vært mulig å normalisere for nivået av F, og assayet forutsetter dermed at HE og F uttrykkes likt. Dette kan begrense egnetheten til å sammenligne kombinasjoner av HE og F fra ulike isolater. Assayet er imidlertid godt egnet til å måle hvordan ulike substanser (slim, spesifikke proteiner, forskjellige pH verdier) påvirker aktiveringen av norske ILAV varianter, hvor effekten måles på celler fra samme transfeksjon.

Mens fusjonsassayet måler sluttresultatet av virusaktivering, er **det kulebaserte assayet** spesifikt for protease-kløyvingen av F proteinet, som er en nøkkelfaktor i virusaktiveringen. Assayet måler kløyvingen av et peptid som inneholder F proteinets kløyvingssete. Siden lengden på peptidet er begrenset, kan assayet gå glipp av effekter som avhenger av proteinets tredimensjonale struktur. Assayet er heller ikke egnet til å måle samspillet mellom HE og F. I likhet med fusjonsassayet er det kulebaserte assayet godt egnet til å måle hvordan forskjellige substanser påvirker ILAV aktivering. Fordi det er raskt, effektivt og mindre arbeids- og kostnadskrevende enn fusjonsassayet er det dessuten bedre egnet til å kartlegge om substanser som slim, miljøprøver eller supernatanter fra dyrkede celler inneholder proteaser som er relevante for ILAV aktivering. Enkelte substanser, som lysisbuffer, kan påvirke avlesningen, og er derfor dårlig egnet for testing.

Til sammen har arbeidet i AP3.2 og AP3.3 etablert komplementære verktøy som kan brukes til å måle hvordan forskjellige substanser (for eksempel i slim) påvirker ILAV aktivering. Disse verktøyene brukes nå videre i det EU-finansierte prosjektet European Partnership on Animal Health and Welfare for å undersøke et mulig samspill mellom ILAV og ulike bakterier. Et annet eksempel på mulig fremtidig bruk er å undersøke om stress-relaterte proteiner i slim kan påvirke ILAV infeksjon. Figur 24 viser et generelt oppsett for å påvise en ukjent protease med muligheten til å fremme ILAV infeksjon.

Arbeidet i AP3.2 og AP3.3 har også dannet grunnlag for en populærvitenskapelig artikkel om ILAV fusjon(21) og en masteroppgave om verktøy for å måle ILAV fusjonsaktivering, i samarbeid med Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet og det strategiske prosjektet Bio-Direct (Veterinærinstituttet)([lenke](#)). Resultatene fra valideringen av fusjonsassayet sammenfattes nå i en vitenskapelig artikkel som forventes innlevert for fagfelleevaluering i løpet av 2024. Den aksepterte artikkelen vil gjøres fritt tilgjengelig ved åpen publisering.



Figur 24: Eksempel på hvordan de nye verktøyene kan brukes til å undersøke om en prøve inneholder proteaser som påvirker ILAV evne til å trenge inn i cellen. (1) Først undersøkes et større antall prøver i det kulebaserte assayet for å finne ut av om prøvene inneholder en eller flere proteaser som er i stand til å aktivere ILAV ved å kløyve F proteinet. (2) Deretter brukes fusjonsassayet som et uavhengig verktøy for å validere om den ukjente substansen påvirker virusets evne til å trenge inn i cellen. (3) Proteaser i prøven kan deretter identifiseres ved hjelp av proteomics. Dersom prøven inneholder mange proteaser, kan materialet fraksjoneres og hver del testes for seg. Oppsettet tilpasses i henhold til målsettingen med eksperimentet.

3 Oppsummering

Tradisjonelt er vevsprøver undersøkt for ILA-virus, men resultatene fra ILA-SAFE har vist at svabring av hud, gjeller og overflater i miljøet samt vannprøver kan være gode alternativ til vevsprøver for å avdekke smittesituasjonen på settefiskanlegg. Monitorering av fiskegrupper fra parrstadiet til utsett i sjø bekrefter tidligere antagelser om at infeksjon med ILAV HPR0 er forbigående, men stressbelastning som sortering og flytting kan gi en oppblomstring.

Halvparten av anlegga som deltok i ILA-SAFE forble negative for ILAV gjennom hele prosjektperioden, mens ILAV HPR0 sirkulerer på positive anlegg og gir infeksjon i nye fiskegrupper, selv etter nedvask. Ett anlegg ser ut til å ha klart å kvitte seg med ILA-virus etter såkalt revisjonsvask. Et slikt arbeid er ressurskrevende og gir både økte kostnader og tapte inntekter, men gjør også at de ansatte kan få en forståelse av anlegget og produksjonen.

Intervjuer med fiskehelsepersonell avdekket en viss variasjon når det gjelder skille mellom generasjoner, tomtid i avdelinger mellom fiskegrupper, håndtering og forebygging av rørfisk samt vask og desinfeksjon. Av og til er det heller ikke mulig å foreta omfattende vask og desinfeksjon av kar i ei avdeling mellom generasjoner. Men den største utfordringen knyttet til å kvitte seg med ILAV HPR0 i et anlegg vil være at det er praktisk umulig, slik dagens RAS-anlegg er konstruert, å tømme anleggene fullstendig for vann og gjennomføre full vask og desinfeksjon. Spesielt er dette vanskeliggjort av at bioreaktor ikke kan tømmes eller desinfiseres, selv om virus er påvist også tilknyttet denne. Det er derfor ikke uventet at å fjerne introdusert virus er en utfordring.

Fokus bør derfor være på å minimere risiko for introduksjon av virus, for eksempel ved å sikre tilstrekkelig desinfeksjon av inntaksvann til anleggene. Et annet fokusområde vil kunne være å påvirke hvordan anlegg blir bygd for å gjøre det enklere å inspisere, tømme, vaske og desinfisere avdelinger for å fjerne smittestoff.

Prosjektet har lyktes i å etablere en smittemodell for overføring av ILAV HPR0 til naiv fisk gjennom 3 passasjer. Påvisning av virus er gjort både i fisken gjennom RT-qPCR og RNAScope *in situ* hybridisering, og er også påvist utskilt i vannet ved bruk av den etablerte filtreringsmetoden. Modellen kan nå benyttes til å undersøke videre hvilke drivere som påvirker overgang fra avirulent til sykdomsframkallende virusvariant og karakterisere både viruset og samspill mellom virus og vert, med de redskaper som er etablert i andre deler av prosjektet.

Genetisk karakterisering av virus fra ulike settefiskanlegg og matfiskanlegg som har fått fisk fra disse, viser nært slektskap. Analyser over tid viser også at de ulike settefiskanleggene har sine husstammer av viruset. Resultatene viser også at det er mutasjonsaktivitet i genomet over tid, men at tidsperioden vi har fulgt de ulike anleggene ikke er tilstrekkelig til å vise signifikante forskjeller. Prøver tatt gjennom den eksperimentelle studien er foreløpig ikke ferdig analysert.

Analyser av fiskens respons på HPR0 ILA-virusinfeksjon har identifisert et panel av sju gener som var robust oppregulert i infisert fisk sammenlignet med ikke-infisert fisk fra tre undersøkte settefiskanlegg. Alle de identifiserte responsgenene er tidligere beskrevet i forbindelse med andre virus-infeksjoner, noe som støtter at de stimuleres av ILAV HPR0.

I prosjektet er det også etablert flere komplementære verktøy som kan brukes til å måle hvordan forskjellige substanser påvirker ILAV aktivering, og disse verktøyene vil benyttes videre i nye prosjekter, hvor samspill mellom virus og bakterier undersøkes. Verktøyene muliggjør også undersøkelser av betydningen av stress-relaterte proteiner i slim på ILAV infeksjon.

4 Faglige leveranser

Type	Tittel	Forum
Populærvitenskapelig artikkel	«Hvordan oppstår sykdomsfremkallende ILA-virus?»	Norsk Fiskeoppdrett 1/21
Populærvitenskapelig artikkel AP3	Hva skal til for at en ufarlig ILA virus variant utvikler seg til sykdomsfremkallende ILA virus	Norsk Fiskeoppdrett 8/22
Populærvitenskapelig artikkel, AP1 (kommende)	ILAV HPR0 i norske settefiskanlegg	Norsk Fiskeoppdrett xxx
Foredrag	Biosikkerhetstiltak mot ILA i settefisk (ILA-SAFE	Årsmøte Sjømat Norge, Bodø, Okt. 21
Foredrag	ILAV HPR0	Frokostseminar, PureSalmon, Kaldnes, 12.2021
Foredrag		NCEA Settefiskforum Bodø, feb 2022
Foredrag	Praktisk bruk av dypsekvensering ILAV	Frisk Fisk, mai 2022
Foredrag	ILA-SAFE: Foreløpige erfaringer med ulike prøvetyper for å påvise ILAV HPR0 i settefiskanlegg	Frisk Fisk, mai 2022
Foredrag	Forekomst av ILAV HPR0 i settefiskanlegg	TEKSET, Trondheim, feb 2023
Foredrag (kommende)	Første etablering av vellykket ILAV-HPR0 overføringsmodell i atlantisk laks	Havbrukskonferansen 2024
Foredrag (kommende)	Påvisning av ILAV HPR0 i ulike matrikser	Havbrukskonferansen 2024
Foredrag (kommende)	Optimalisert metode for vannbasert overvåking av patogener i akvakultursystemer	Havbrukskonferansen 2024
Webinar	Ny kunnskap om ILA-virus hos oppdrettslaks	Veterinærinstituttet (online) 2024
Master degree (Frieda Betty Ploss)	Methods To Study Fusion Activation of Infectious Salmon Anaemia Virus	NMBU, 2022
Paper (submittert)	A refinement to eRNA and eDNA-based detection methods ...	Resubmitted following review 08, 2024
Paper	Transcriptomic response to ISAV-HPR0 infection in gills of Atlantic salmon	Manuscript draft
Paper	Pathotypic changes in genomic segment 5 and 6 are sufficient to increase infectious salmon anaemia virus fusion activation	Manuscript draft

5 Referanser

1. Sommerset I, Wiik-Nielsen J, Moldal T, Oliveira VHS, Svendsen JC, Haukaas A og Brun E. 2024. Fiskehelserapporten 2023. Veterinærinstituttets rapportserie.
2. Christiansen DH. 2017. Erfaring med ILA-overvåkning på Færøyene, https://www.vetinst.no/arrangementer/workshop-for-kontroll-med-ila/_/attachment/download/73322881-29d1-4b15-b156-4a536242afb1:597418c53ab5ded1de564463df317b52eac2d6d9/III%20Debes%20Christiansen%20Erferinger%20med%20ILA%20overv%C3%A5king%20p%C3%A5%20F%C3%A6r%C3%B8yene.pdf, ILA workshop Trondheim.
3. 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.
4. Løkslett H, Suhel F, Moldal T. 2024. The surveillance programme for infectious salmon anaemia virus HPR0 (ISAV HPR0) in Norway 2023. Veterinærinstituttet, www.vetinst.no.
5. Domingo E, Sheldon J, Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:159-216.
6. Yoshitake J, Akaike T, Akuta T, Tamura F, Ogura T, Esumi H, Maeda H. 2004. Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. *J Virol* 78:8709-19.
7. Akaike T. 2001. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol* 11:87-101.
8. Falk K, Aspehaug V, Vlasak R, Endresen C. 2004. Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus. *Journal of Virology* 78:3063-3071.
9. Aspehaug V, Mikalsen AB, Snow M, Biering E, Villoing S. 2005. Characterization of the infectious salmon anemia virus fusion protein. *J Virol* 79:12544-53.
10. Aamelfot M, Christiansen DH, Dale OB, McBeath A, Benestad SL, Falk K. 2016. Localised Infection of Atlantic Salmon Epithelial Cells by HPR0 Infectious Salmon Anaemia Virus. *PLoS One* 11:e0151723.
11. Aamelfot M, Dale OB, Falk K. 2014. Infectious salmon anaemia - pathogenesis and tropism. *J Fish Dis* 37:291-307.
12. Böttcher-Friebertshäuser E, Klenk H-D, Garten W. 2013. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathogens and Disease* 69:87-100.
13. Thoen E, Tartor H, Amundsen M, Dale OB, Sveinsson K, Rønning HP, Grønneberg E, Dahle MK, Gjessing MC. 2020. First record of experimentally induced salmon gill poxvirus disease (SGPVD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet Res* 51:63.
14. Snow M, McKay P, McBeath AJ, Black J, Doig F, Kerr R, Cunningham CO, Nylund A, Devold M. 2006. Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental Biology Basel* 126:133-145.
15. OIE. 2021. Aquatic Manual, Chapter 2.3.8. Infection with salmonid alphavirus, on OIE. <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/>. Accessed 13th August 2021.
16. Fritsvold C, Mikalsen AB, Haugland Ø, Tartor H, Sindre H. 2022. Characterization of early phases of cardiomyopathy syndrome pathogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through various diagnostic methods. *J Fish Dis* 45:1267-1279.
17. Tartor H, Bernhardt LV, Mohammad SN, Kuiper R, Weli SC. 2023. In Situ Detection of Salmonid Alphavirus 3 (SAV3) in Tissues of Atlantic Salmon in a Cohabitation Challenge Model with a Special Focus on the Immune Response to the Virus in the Pseudobranch. *Viruses* 15.
18. Spilsberg B, Leithaug M, Christiansen DH, Dahl MM, Petersen PE, Lagesen K, Fiskebeck E, Moldal T, Boye M. 2024. Development and application of a whole genome amplicon sequencing method for infectious salmon anemia virus (ISAV). *Front Microbiol* 15:1392607.

19. Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJ, Appleton G, Axton M, Baak A, Blomberg N, Boiten J-W, da Silva Santos LB, Bourne PE, Bouwman J, Brookes AJ, Clark T, Crosas M, Dillo I, Dumon O, Edmunds S, Evelo CT, Finkers R, Gonzalez-Beltran A, Gray AJG, Groth P, Goble C, Grethe JS, Heringa J, 't Hoen PAC, Hooft R, Kuhn T, Kok R, Kok J, Lusher SJ, Martone ME, Mons A, Packer AL, Persson B, Rocca-Serra P, Roos M, van Schaik R, Sansone S-A, Schultes E, Sengstag T, Slater T, Strawn G, Swertz MA, Thompson M, van der Lei J, van Mulligen E, Velterop J, Waagmeester A, Wittenburg P, et al. 2016. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data* 3:160018.
20. Fourrier M, Lester K, Markussen T, Falk K, Secombes CJ, McBeath A, Collet B. 2015. Dual Mutation Events in the Haemagglutinin-Esterase and Fusion Protein from an Infectious Salmon Anaemia Virus HPR0 Genotype Promote Viral Fusion and Activation by an Ubiquitous Host Protease. *PLoS One* 10:e0142020.
21. Fosse J, Falk K. 2021. Hvordan oppstår sykdomsfremkallende ILA-virus?, Norsk Fiskeoppdrett Januarutgave, p 56-59.

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Ås

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no