

Utvikling fra ILA HPR0 til sykdomsfremkallende virus

Seniorforsker Knut Falk, Veterinærinstituttet

Agenda

- Generelt om ILA HPR0 og HPR0-hypotesen
- Utfordringer knyttet til HPR0
- Den internasjonale dyrehelseorganisasjonen - OIE
- Kunnskapsutvikling knyttet til ILA HPR0 virus



Kreditering:

Skotsk - færøysk - norsk forskningsnettverk - ScoFoNo

- Marine Laboratory, Aberdeen, UK:
Alastair McBeath, Iveta Matejusova, og Mickael Fourrier
- Faroese Food and Veterinary Authority:
Debes Christiansen
- Veterinærinstituttet:
Knut Falk og Maria Aamelfot

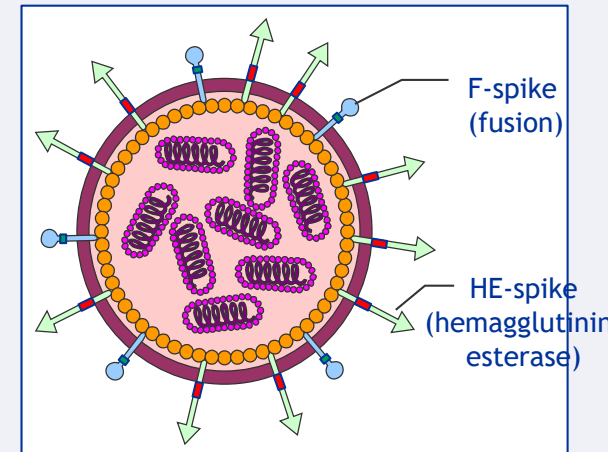
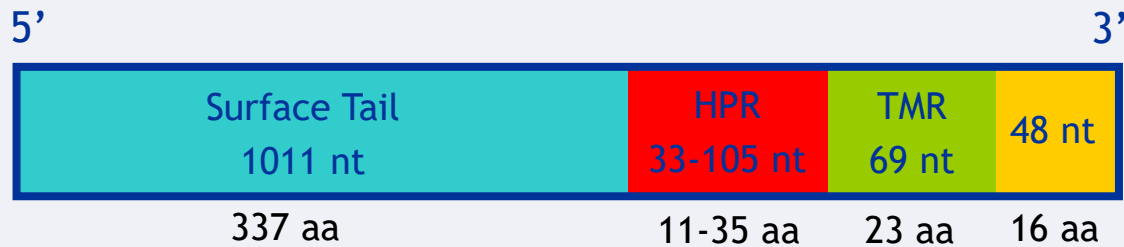
- Dessuten også delvis:
Mike Snow, Peter Østergård, Ole Bendik Dale, Turhan Markussen



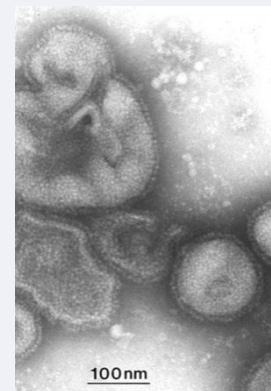
Hva er ILA HPR0-virus?

- Det er 2 biotyper av ILA-virus:
 - HPR-del virus har en forkortet HE «stilk» og gir ILA
 - HPR0 type har ikke forkortet HE «stilk» og gir ikke sykdom

HPR = hyperpolymorft område knyttet til HE-proteinet



| | 329 | HE-HPR Encoded amino acids | 372 |
|----------|-----|---|-----|
| ISAV1 | ↓ | KLQRNITDVKIRVDA-----NQVEQPATSVLSNIFISM | ↓ |
| ISAV2 | | KLQRNITDVK-----PATSVLSNIFISM | |
| ISAV3 | | BLRRNITDVGIGVDAIPPQL-----NIFISM | |
| ISAV4 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQT-----M | |
| ISAV5 | | KLQRNITDVK-----TSVLSNTFISM | |
| ISAV6 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQT-----L | |
| ISAV7 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQT-----M | |
| ISAV8 | | KLQRNITDVKIRVDAI-----QVEQPATSVLSNIFISM | |
| ISAV9 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQT-----FISM | |
| ISAV10 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQL-----ISM | |
| ISAV11 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQL-----SNIFISM | |
| SK779/06 | | KLQRNITDVKIRVDAIPPQLNQTFNNTNQVEQPATSVLSNIFISM | |



ILAV HPR0 hypotesen

- Er basert på analyse og sammenligning av gensekvenser.
- Gjeldende hypotese: Virulent (sjukdomsfremkallende) ILAV HPR-del utvikles fra HPR0 virus ved delesjoner i HPR-området på HE-proteinet (dvs «stilken» blir kortere)
- I tillegg er det påvist sekvensforandringer knyttet til aktivering av Fusjons-proteinet.
- Inntil nylig har ikke denne sammenhengen vært vist i praksis, og heller ikke hva disse forandringene fører til funksjonelt.
- I tillegg har vi nå grunner til å tro at utviklingen fra HPR0 virus til høyvirulent ILA-virus er en stegvis prosess som inkluderer lavvirulente mellomformer:



Hva karakteriserer ILAV HPR0 og infeksjon med dette viruset?

- Gir tilsynelatende ikke klinisk sjukdom, og har bare blitt påvist vha qPCR hos frisk fisk.
- Kan ikke dyrkes i cellekulturer, og det har ikke lyktes å etablere noen eksperimentell smittemodell i laks.
- Forårsaker en relativt kortvarig og forbigående infeksjon
- Infiserer slimhinne epitel på gjelle, hud og trolig tarm, i motsetning til «klassisk» ILA som infiserer endotelceller som kler innsiden av fiskens blodkarsystem, inkludert hjertet.

Forskjeller mellom HPR0-, og HPR-del ILA-virus, oppsummert:

| HPR-del ILAV | HPR0 ILAV |
|---------------------------------------|--|
| Virulent - gir sykdom | Ikke-virulent - ingen kliniske tegn |
| Generalisert infeksjon | Lokalisert infeksjon |
| Infiserer alle indre organer | Infiserer slimhinne-overflater (Gjelle og hud) |
| Mål-celler: karendotel | Mål-celler: slimhinne-epitel |
| Progredierende infeksjon, ofte dødlig | Forbigående, kortvarig infeksjon |



Utfordringer, og spørsmål knyttet til HPR0-typen - hvorfor er HPR0 viktig?

- Hva er risiko knyttet til påvisning av ILAV HPR0?
- Hva skjer på funksjonelt nivå når ikke-virulent ILAV HPR0 utvikler seg til høyvirulent ILAV HPR-del?
- Hvordan og hvorfor skjer denne overgangen?
Hva driver den?
- Hvor ofte skjer denne overgangen?
- Hvordan kan vi på en kosteffektiv og sikker måte dokumentere ILAV status på lokaliteter, og hos slaktefisk?
- Påvisning av ILAV HPR0 er rapportpliktig til OIE («notifiable disease»)

Den internasjonale dyrehelseorganisasjonen (OIE)

- OIE har 180 medlemsland, og hovedmålet til organisasjonen er å forebygge, kontrollere og hindre spredning av alvorlige smittsomme sykdommer hos dyr.
- OIE listefører bl.a. rapportpliktige infeksjoner/sykdommer (notifiable diseases) som kan skade tredje lands husdyrproduksjon, eller naturlige fauna
- Publiserer standarder for påvisning og håndtering av listeførte infeksjoner/sykdommer
- Veterinærinstituttet er OIE referanselaboratorium for ILA
- **OIE fungerer bl.a. som et instrument for WTO**
- **Ved påvisning av listeført infeksjon, vil import legalt kunne stoppes.**



Forskningsresultater, og funn de siste 8-10 årene har vært en stegvis prosess med tanke på å forstå ILA patogenese og grunnlaget/mekanismene for utvikling av ILAV HPR0 til virulent HPR-del ILAV, og inkluderer:

- Forekomst og epidemiologi knyttet til HPR0 ILAV
- Celletropisme og patogenese
- Karakterisering av sentrale mekanismer knyttet overgang HPR0 ILAV til HPR-del
- Feltobservasjoner bekrefter langt på vei HPR0-hypotesen.

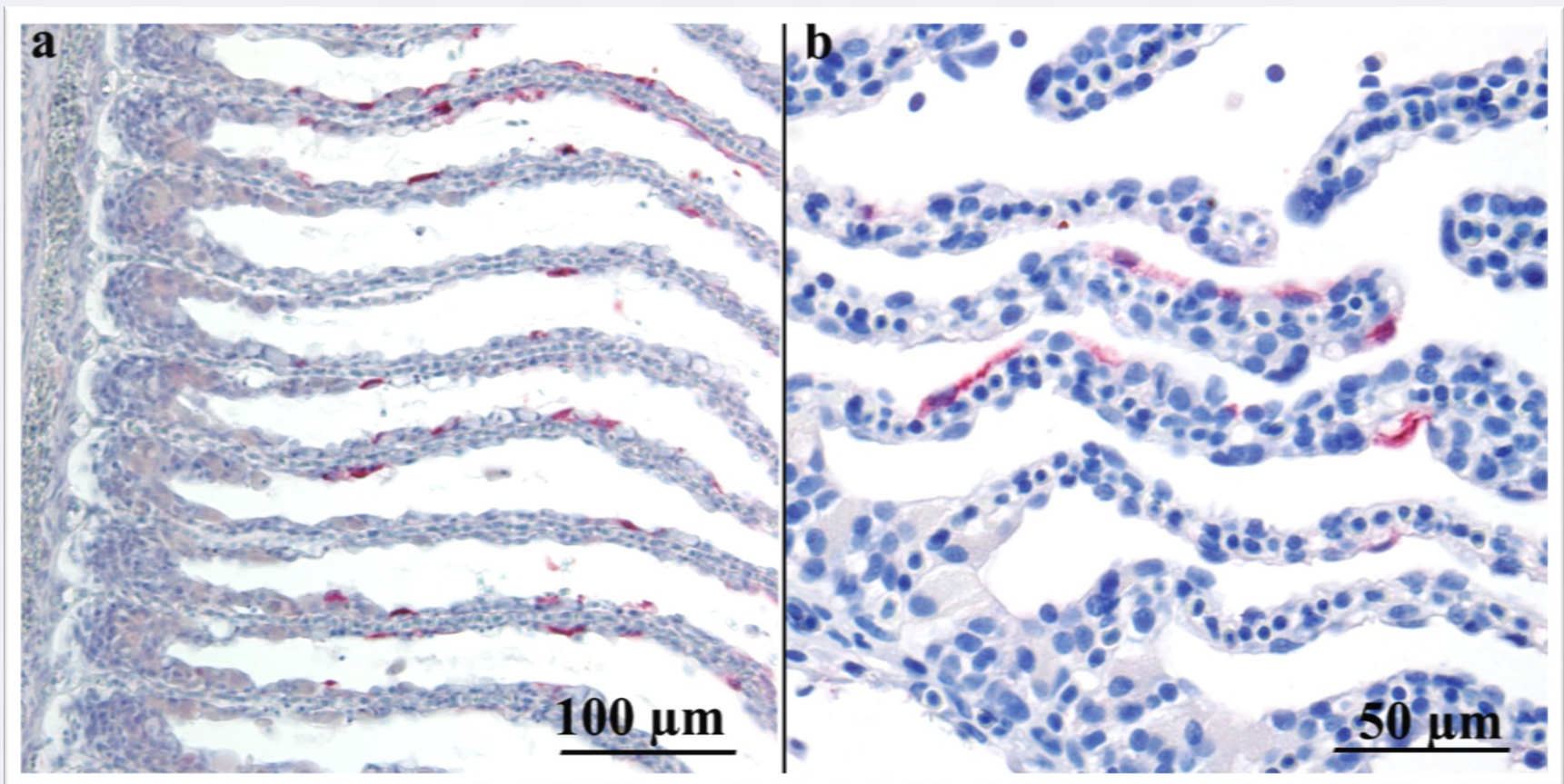


Kortvarige infeksjonsepisoder med ILAV HPR0 er vanlige hos oppdrettslaks - majoriteten av lakselokaliteter gjennomgår trolig en eller flere infeksjonsepisoder med HPR0 i løpet av en produksjonssyklus

- Analyse av resultater fra omfattende PCR screening-undersøkelser på Færøyene i perioden 2005-20110 viste:
(Se: Christiansen et al. 2011, J.Gen.Virol.)
 - ILAV HPR0 gir en kortvarig og forbigående infeksjon av gjeller og hud uten tegn på sykdom
 - Laks på alle sjø-lokaliteter gjennomgikk én eller flere kortvarige og forbigående infeksjonsepisoder med HPR0.
 - Total forekomst av ILAV HPR0 i tilfeldig undersøkte gjeller var +/- 10%
- Publisert, og ikke-publisert informasjon fra Norge, Skotland, Chile, og østkysten av Canada tyder på en tilsvarende forekomst der.
- ILAV HPR0 har ikke blitt funnet på vestkysten Canada til tross for testing av tusenvis av prøver. Det finnes ingen tilgjengelig informasjon om eventuell forekomst av ILAV HPR0 i Irland, Tasmania eller New Zealand.

Infeksjon med ILAV HPR0-virus er en overflateinfeksjon av slimhinner på gjeller og hud.

(Se: Aamelfot et al. 2016, PlosOne)



Delesjoner i HE HPR og mutasjoner i fusjonsproteinet i forbindelse med overgang fra HPR0, øker virusets fusjonsaktivitet og påvirker fusjonsaktivering - og dermed også virulens (Se: Fourrier et al. 2014, J.Gen.Virol og Fourrier et al. 2015, PlosOne)

- Virusets fusjonsaktivitet er viktig for infeksjon/opptak i cellen, og for celletropisme - dette er kjent som en viktig virulensmekanisme hos virus generelt og hos orthomyxovirus spesielt.
- Transfeksjon/cellekultur forsøk med HE-, og F-genene viste:
 - at det var et samspill mellom disse, og
 - at delesjoner og mutasjoner i forbindelse med overgang fra HPR0 til HPR-del økte fusjonsaktivitet og påvirket fusjonsaktivering.



Et færøysk ILA feltutbrudd bekrefter HPR0-hypotesen og viser at virusets fusjonsaktivitet er viktig for patogenese og virulens - Del 1

(Ref: Christiansen et al., *In Press*, J.Gen.Virol.)

■ Case Færøyene:

- Januar 2014:
 - Første påvisning av ILA HPR-del siden 2005. Tilfeldig screening i forbindelse med utslakting. 3 av 16 fisk ILAV positive med høye Ct (dvs lite virus).
 - Ikke kliniske eller patologiske funn forenlig med ILA, heller ikke generell økt dødelighet.
- Februar 2014:
 - qPCR screening av 150 fisk: ca 90% ILAV positive, vesentlig lavere Ct's, stor andel HPR0 positive, ingen kliniske tegn på sykdom.
- Smitteforsøk bekrefter lav virulens (dødlighet ~10%)
Fisken viste klassiske patologiske tegn, men mindre uttalt enn ved vanlig ILA.

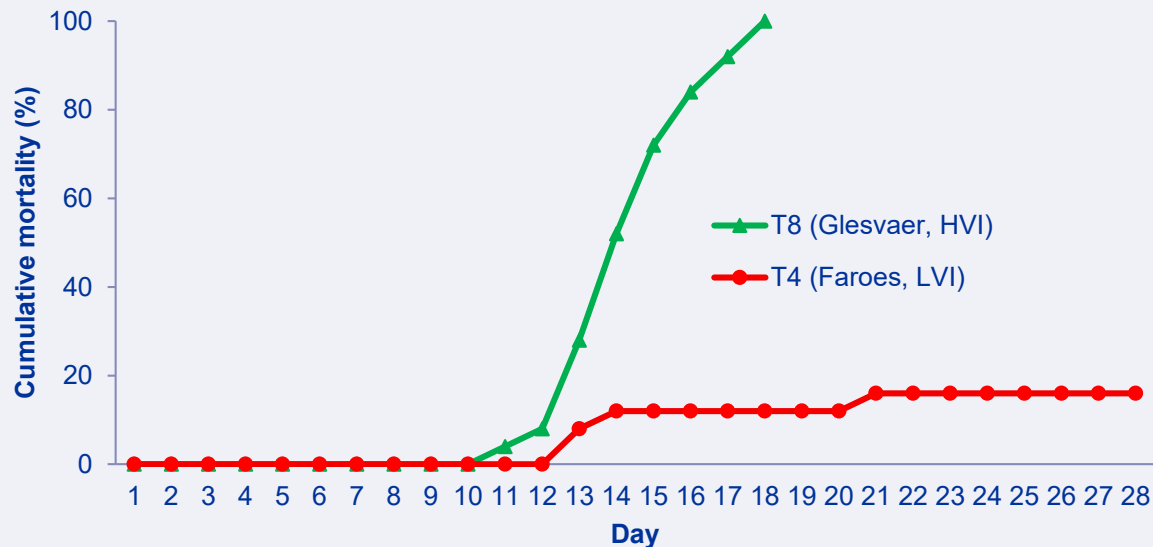
Et færøysk ILA feltutbrudd bekrefter HPR0-hypotesen og viser at virusets fusjonsaktivitet er viktig for patogenese og virulens - Del 2

■ Epidemiologiske undersøkelser:

- Anlegget hadde mottatt smolt fra 4 ulike smoltprodusenter. I ett anlegg som hadde levert smolt til ILA-infisert merd, ble det påvist et ILAV HPR0 der HE-, og F-genet var nær identisk med det nye ILAV HPR-del.
- I sjøvannsfasen var tidligere 150 prøver undersøkt vha qPCR i det aktuelle anlegget. 4 av prøvene var ILAV HPR0 positive, men ikke beslektet med det nye HPR-del viruset.
- I 6 naboanlegg (samme produksjonsområde) var ca 1600 prøver undersøkt vha qPCR. 133 var ILAV HPR0 positive, men ikke beslektet med nytt ILAV HPR-del

Et færøysk ILA feltutbrudd bekrefter HPR0-hypotesen og viser at virusets fusjonsaktivitet er viktig for patogenese og virulens - Del 3

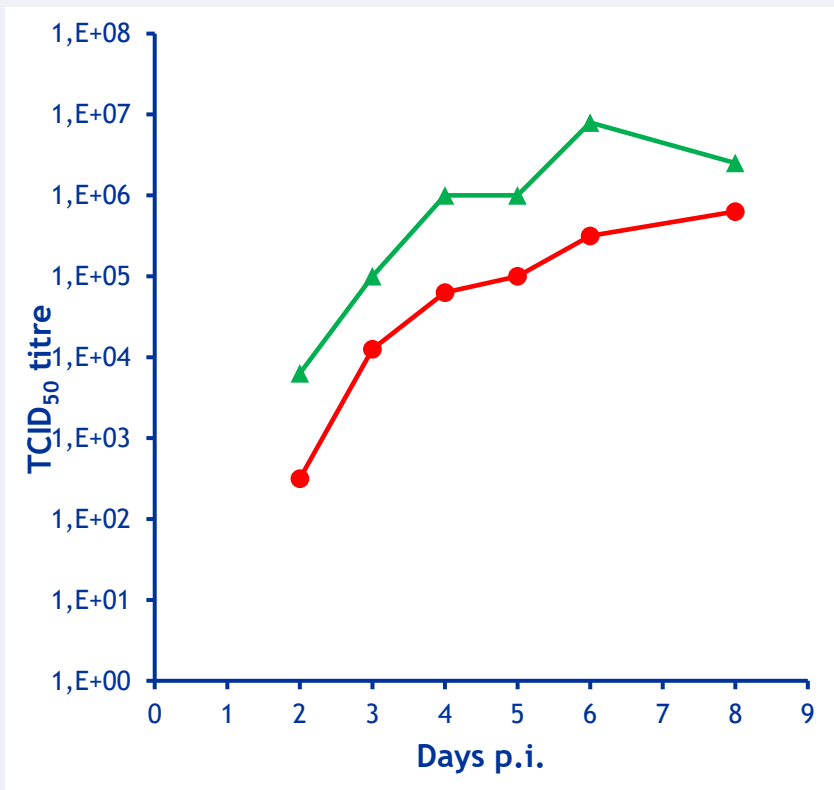
Badesmitteforsøk



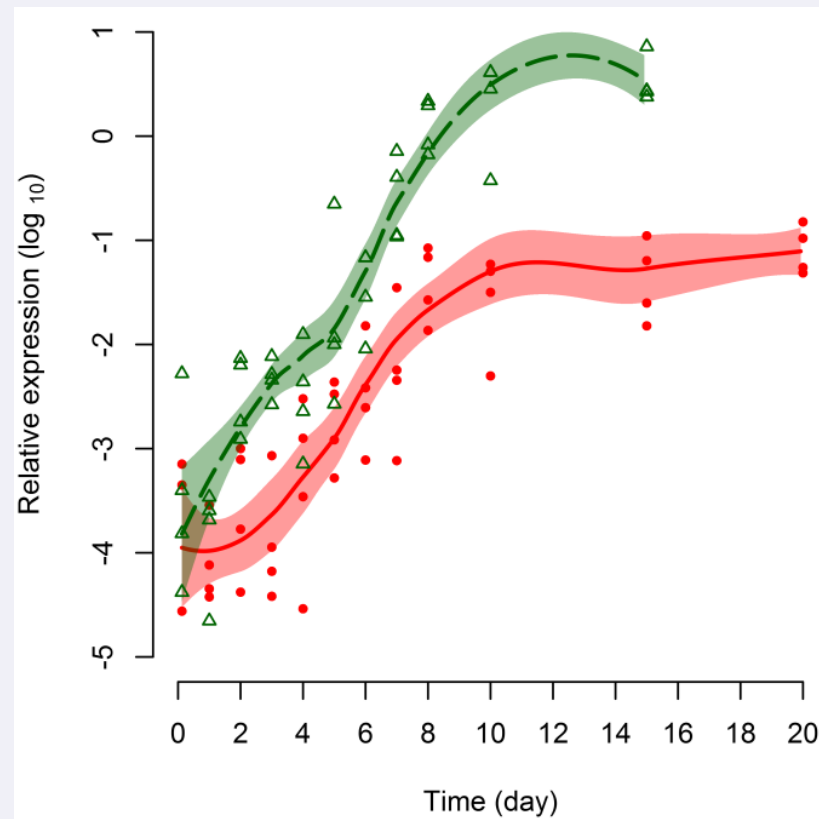
- Kliniske og patologiske tegn var lite uttalte, men typiske, inkludert typisk IHC med generalisert endotelinfeksjon.
- Lav virulens knyttes til dårligere virusproduksjon, både i cellekultur og i smitteforsøk.



Vekst i cellekultur



Virusproduksjon i gjeller (qPCR)



Et færøysk ILA feltutbrudd bekrefter HPR0-hypotesen og viser at virusets fusjonsaktivitet er viktig for patogenese og virulens - Del 4

- Hele virusgenomet for både det nye HPR-del, og HPR0 ble sekvensert
- De eneste forskjellene mellom disse var:
 - En delesjon i HPR
 - En enkel aminosyre-mutasjon i F-proteinet
- Konklusjon:
 - Ut fra våre tidligere transfeksjons cellekulturforsøk, påvirker disse forandringene fusjonsaktiviteten.
 - Forandringene var tilstrekkelige til å endre virusets tropisme og patogenese til det en ser ved vanlig ILA.
 - Men, forandringene var ikke tilstrekkelige til å gi et fullt virulent virus



Hvordan skal næring og forvaltning forholde seg til dette?

- Ja, påvisning av ILAV HPR0 representerer en risiko for ILA, men den er trolig liten forutsatt gode rutiner knyttet til biosikkerhet.
- Utvikling fra HPR0 til høyvirulent HPR-del er trolig en stegvis prosess med lavvirulente mellomformer, - og som kan være vanskelig å oppdage. Det bør være et mål å stoppe denne utviklingen tidlig.
- Klinisk overvåkning er viktig for norsk ILA-overvåkning, men klarer vi å fange opp infeksjon med lavvirulent ILAV HPR-del?
- Hvor sikker informasjon får vi ved qPCR screening i denne sammenhengen?
- **Smittehygiene er trolig det mest effektive virkemidlet for å forebygge ILA-problemer** (generell biosikkerhet, generasjonsskiller, produksjonsskiller, tidlig påvisning og smittekontroll) - målet må være å stoppe utviklingen til høyvirulent ILAV.

Oppsummering

- Undersøkelse av samspillet mellom ILAV HPR0 og HPR-del er et komplekst puslespill der vi begynner å ane et bilde på hva som foregår, - både mht virulensutvikling, dyrkning av HPR0 virus, drivere og risiko knyttet til ILAV HPR0
- Stress er trolig viktig, men samspill med andre infeksjoner er også sannsynlige faktorer.
- Resultater og observasjoner understreker viktigheten av biosikkerhet og strikte generasjonsskille som nøkkeltiltak for å unngå virulensutvikling og ILA.

