

KUNNSKAP OM FISKEHELSE

I denne spalten vil Veterinærinstituttet i hvert nummer bidra med oppdatert kunnskap om fiskehelse. Ansvarlig for spalten er forsker Mona Gjessing
mona.gjessing@vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Hvordan oppstår utbrudd av infeksiøs lakseanemi, når skal man mistenke sykdommen og hvordan stilles diagnosen?

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en alvorlig smittsom sykdom hos atlantisk laks i oppdrett. Sykdommen er klassifisert som en liste 2 sykdom i Norge, noe som innebærer at mistanke om sykdom skal rapporteres til Mattilsynet umiddelbart. Kriterier for mistanke og påvisning av ILA følger av internasjonale retningslinjer, men når skal man fatte mistanke? Per juni 2018 ble det påvist 7 utbrudd av ILA i Norge. Totalt ble 14 utbrudd påvist i 2017. Veterinærinstituttet har valgt ILA som tema for denne og de to neste numrene av fiskehelespalten.

Av Maria Aamelfot og Mona Gjessing

ILA-virus

Sykdommen forårsakes av ILA-virus som er i slekt med influensavirusene. I viruskapen, som består av materiale fra infiserte fiskeceller, finnes også ulike virusproteiner som er viktige for hvor farlig, eller virulent, viruset er. Disse proteinene heter haemagglutinin esteraseproteinet (HE) og fusjonsproteinet (F). HE gjør at viruset fester seg til cellene som skal infiseres og sørger for at nye viruspartikler frigjøres fra smittede celler. F hjelper til når

viruset skal inn i cellen. Genet som koder for HE brukes som markør for virulens fordi det er stor variasjon i hvordan disse ser ut. Det er spesielt et område i genet som kalles hyperpolimorf region (HPR) som er interessant. Regionen forekommer i ulike lengder og det finnes varianter som betegnes som full-lengde. Disse kalles HPR0, mens de kortere variantene kalles HPRdeletert eller HPRΔ. Det er HPRΔ-variantene som kan gi sykdommen ILA hos laksen. Forskjeller mellom HPRΔ og HPR0 er listet i **tabell 1**.

Tabell 1. Forskjeller mellom HPRΔ og HPR0

HPRΔ	HPR0
Virulent, gir sykdom	Ikke-virulent, ingen kliniske tegn
Generalisert infeksjon	Lokalisert infeksjon
Infiserer ytre og indre organer	Infiserer slimhinner (gjelle og hud)
Infiserer endotel og epitel	Infiserer epitel
Langvarig, ofte dødelig	Kortvarig og forbigående

ILA i felt

Sykdommen ble diagnostisert første gangen i 1984 og de aller fleste utbrudd etter det har vært på matfiskanlegg men, ILA forekommer imidlertid også på settefisk og stamfisk. Sykdommen opptrer ofte snikende og lav dødelighet over lang tid er vanlig. De fleste utbruddene kommer rundt jul og i juli. uten at vi har en forklaring på denne sesongmessige variasjonen.

De klassiske historiske utbruddene av ILA var relativt enkle å kjenne igjen. Den syke fisken hadde tydelige tegn på anemi (blodmangel) og sirkulasjonssvikt. Nå ser det ut til at vi har flere manifestasjoner som kanskje ikke er så lette å oppdage som ILA. Det kan være flere grunner til dette, men varierende virulens av viruset, andre sykdommer som opptrer samtidig, endret avl av fisken og bruk av vaksiner kan være noe av forklaringen. Miljøet fisken lever i og hvor robust fisken er har stor betydning for om fisken faktisk utvikler sykdom (**Figur 1**).

Hvordan oppstår et utbrudd?

Utbrudd av ILA kan oppstå dersom fisken blir smittet med virulente varianter av ILA-viruset. Dette viruset kan komme fra et annet anlegg som allerede er smittet. Smitten kan da spres direkte gjennom sjøvann, via utstyr eller personell eller med fisk som har rømt. En annen mulighet er at de ufarlige HPR0-variantene endrer seg (muterer) til farlige virus-varianter.

ILA-virus og HPR0-hypotesen

Utviklingen fra en HPR0 til en virulent type av ILA virus ble beskrevet for første gang i Journal of General Virology i 2017. To mutasjoner, en delesjon i HPR-området til HE genet og en forandring av F-genet som førte til endring i en enkelt aminosyre, var tilstrekkelig til å endre viruset til en lav-virulent variant. En videre utvikling av arvematerialet til viruset vil trolig bidra til at virulensen øker i en trinnvis prosess der endringer arves og akkumuleres. Denne



Figur 1. Den etiologiske triaden

prosessen tar tid, men viser at HPR0 utgjør en risiko for utvikling av ILA.

Dagens påvisning av ILA bygger på at virusinfeksjon gir tydelige kliniske og patologiske forandringer. Selv ved intensiv bruk av screening vil lavvirulente varianter kunne eksistere uten å bli oppdaget i lengre tid. Dette kombinert med at virulensutviklingen skjer gradvis og langsomt, viser tydelig betydningen av gode rutiner for biosikkerhet. Dette gjelder spesielt separasjon av årsklasser, både i ferskvann og sjøvannsfasen. «Alt-ut, alt-inn prinsippet» må etterleves! Uten dette vil ILA-viruset få tid til å utvikle seg fra HPR0 via lavvirulente til høyvirulente varianter av viruset. Du kan lese mer om utvikling fra HPR0 til et virulent ILA-virus i en tidligere utgave av Norsk Fiskeoppdrett (Aamelfot med flere, Utvikling fra HPR0 til et virulent ILAV, 4- 2017).

Når skal ILA mistenkes?

Enhver som får mistanke om ILA har plikt til å rapportere dette til Mattilsynet. Dette gjelder oppdrettere, fiskehelsetjenester, laboratorier og Mattilsynet selv. Sykdommen skal mistenkes ved:

- obduksjonsfunn forenelig med ILA
- ved histologiske funn som tyder på ILA med eller uten kliniske funn
- ved påvisning av ILA-virus med immunhistokjemi, PCR (HPRΔ) eller ved dyrking av viruset
- epidemiologiske forbindelser til ILA-mistenkte anlegg eller anlegg der ILA er påvist, altså der det er en mulig smittekontakt til ILA utbrudd via utstyr, personell eller med flyttet fisk

Ved mistanke om ILA, bør prøver primært

sendes til Veterinærinstituttet som har det offisielle ansvaret for å stille diagnosen. Dersom prøvene blir sendt til et annet laboratorium, tar det lengre tid før diagnosen blir bekreftet. ILA virus kan spre seg til andre lokaliteter i nærheten og små epidemier kan oppstå. Derfor vil påvisning av ILA-virus på en lokalitet få store konsekvenser i form av båndlegging og andre restriksjoner. Laks infisert med ILA-virus har blitt eksportert til utlandet uten av norske myndigheter visste at fisken var smittet. Dette kunne ha fått store konsekvenser for handel av laks, da andre land kan benytte seg av OIE-regelverket og nekte import av fisk fra Norge ved mistanke om ILA-smitte.

Sykehistorie og sykdomstilstander som kan ligne ILA

Vedvarende lav dødelighet over mange måneder er typisk for ILA. Sykdommen har et snikende forløp der akkumulert dødelighet kan bli veldig høy. Unntaksvis ser vi også akutt høy dødelighet der fisk i godt hold svimer i kort tid før de dør. Sykdomstegnene er gjerne diffuse og opptrer vanligvis i en eller få merder. Fisken svømmer i øvre vannlag, snapper etter luft eller henger i notveggen før de synker og dør. Det er dessverre svært vanlig at fisken har flere helseproblemer samtidig. Andre virussykdommer og blandingsinfeksjoner kan gjøre sykdomsetterforskningen utfordrende. Differensialdiagnoser til ILA er alle tilstander som gir sirkulasjonsforandringer i fisken. ILA kan lett forveksles med for eksempel CMS eller HSMB i felt. Som en generell regel skal ILA mistenkes hvis fisken viser tegn på sirkulasjonsforstyrrelser.



Figur 2. Fisk med typiske tegn på ILA, inkludert utstående øyne, hudblødning og acites.

Anemi (blodmangel) eller lav hematokrit sammen med sirkulasjonsforstyrrelser styrker mistanken. ILA skal også mistenkes ved funn av anemi uten annen åpenbar årsak.

Klinikk

Kliniske funn hos fisk med ILA er tegn på karskade og anemi. Sirkulasjonsforandringer, blødninger i indre og ytre organer, samt væske i bukhulen (ascites) og ødemer er vanlige funn (**figur 2**). Blødningene kan forekomme i huden, i buken, i tarm og i øye. Ødemer sees bak øynene, noe som gir utstående øyne. Ødemer kan også opptre i indre organer og i skjellommer. Bleke gjeller, mørk eller lys lever og mørk milt og nyre er vanlige funn. Ved obduksjon av fisk som har ILA kan alle, noen eller ingen av disse forandringene forekomme.

Prøveuttak

Ved mistanke av ILA skal prøver tas ut av 10 klinisk syke fisker i normalt hold. Prøver skal ikke tas fra taperfisk. Anemi

og lav hematokrit styrker mistanken om ILA. Derfor er det gunstig om man tar en blodprøve og undersøker dette i felt. Anamnese, kliniske funn, obduksjonsfunn og eventuelt hematokrit noteres ned og sendes inn til VI sammen med prøvene. Det er verdt å merke seg at en fisk med tilsynelatende normal hematokrit likevel kan være syk, men at den er i et tidlig stadium av sykdommen. Prøvene VI ønsker for å kunne stille diagnosen er:

- fullt organsett på formalin
- hjerte og nyre på RNA-later
- hjerte og nyre på transportmedium

Ta gjerne kontakt med Veterinærinstituttet før innsendelsen.

Hva skal til for å stille en ILA diagnose?

For å stille diagnosen ILA skal ILA-virus påvises ved hjelp av minst to ulike metoder med uavhengige påvisningsprinsipper. ILA-virus må påvises med antistoffer i vevspreparater. I tillegg må ILA-virus påvises enten med RT-PCR eller ved

isolasjon og identifikasjon i cellekultur. Påvisning av virus med antistoffer og med RT-PCR bør skje fra samme fisk. Vi ønsker også vev for virusdyrking fra de samme fiskene. I tillegg til dette sekvenseres HPR-området i HE-genet for å bestemme om viruset som er påvist med RT-PCR er HPR Δ eller HPR Δ . Når man skal studere slektskap mellom ILA-virus, blir et større område av gensegmentene sekvensert. Dette er et godt hjelpemiddel for å kunne spore smitte.

Oppsummert

ILA ser ikke likt ut hver gang. Farlige HPR Δ kan utvikles fra HPR Δ hvis viruset får nok tid. Ved sirkulasjonssvikt må man vurdere ILA. Ved anemi må ILA mistenkes. Enhver som får mistanke om ILA har rapporteringsplikt. Ved prøveuttak; ta 10 syke fisker, men ikke tapere. Undersøk gjerne hematokrit. Gode og riktige prøver til Veterinærinstituttet gjør det enklere å stille diagnosen raskt. Minst to ulike metoder brukes for å stille en sikker diagnose •

Hva skjer med innsendte prøver?

Organsett på formalin

Prøvene må fikseres i formalin før de støpes inn i parafin og snittes. Snittene farges med ulike fargemetoder (for eksempel hematoxylin/eosin) og studeres i mikroskop.

Vanlige histologiske funn ved ILA er nekroser og blødninger i lever. Områdene i nærheten av større blodkar kan se normalt ut og nekrosene er ofte plassert bort fra karene (figur 3). I nyre kan man se tubulære nekroser og blødninger. I tarm kan man finne blødninger i tarmveggen. Hemofagocytose, altså røde blodceller som blir spise av andre celler er et relativt vanlig funn ved ILA.

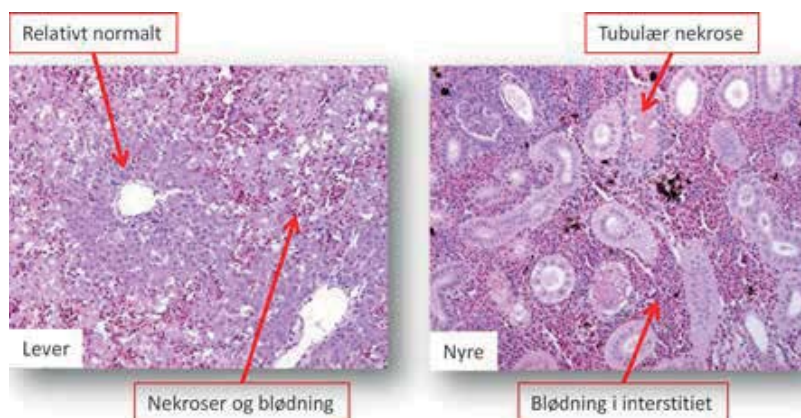
Snittene farges også med immunhistokjemi (IHC) der spesifikke antistoffer brukes for å finne smittede celler. Disse blir røde. Det er mulig å finne smittede celler i alle organer i fisken, men det er vanligst å studere nyre og hjerte da disse organene inneholder mange endotelceller (figur 4). Positiv IHC viser at viruset har infisert celler i fisken og at disse cellene har begynt å produsere materiale til nye viruspartikler.

Hjerte og nyre på RNA-later

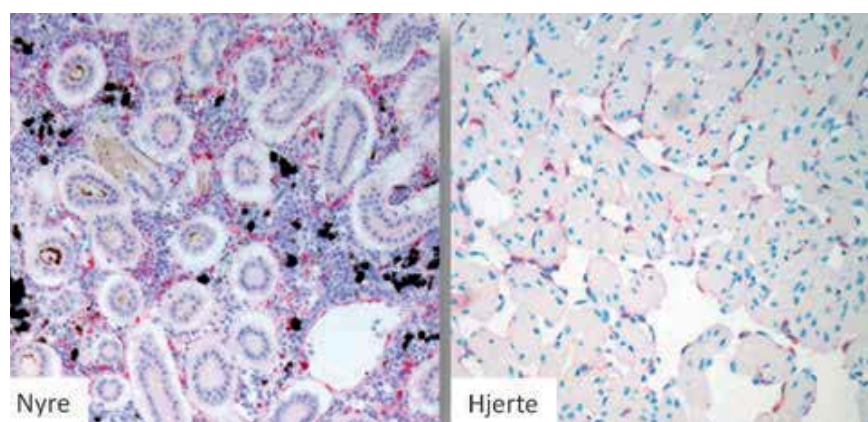
Prøvene på RNA-later analyseres med RT-PCR. En positiv PCR viser at arvematerialet, RNAet, fra viruset fantes prøven, men det sier ingenting om hvorvidt viruset har infisert celler eller om det finnes «levende» viruspartikler som kan infisere nye celler der. Dersom RT-PCRanalysen er positiv vil det i mange tilfeller være mulig å sekvensere prøven.

Hjerte og nyre på transportmedium

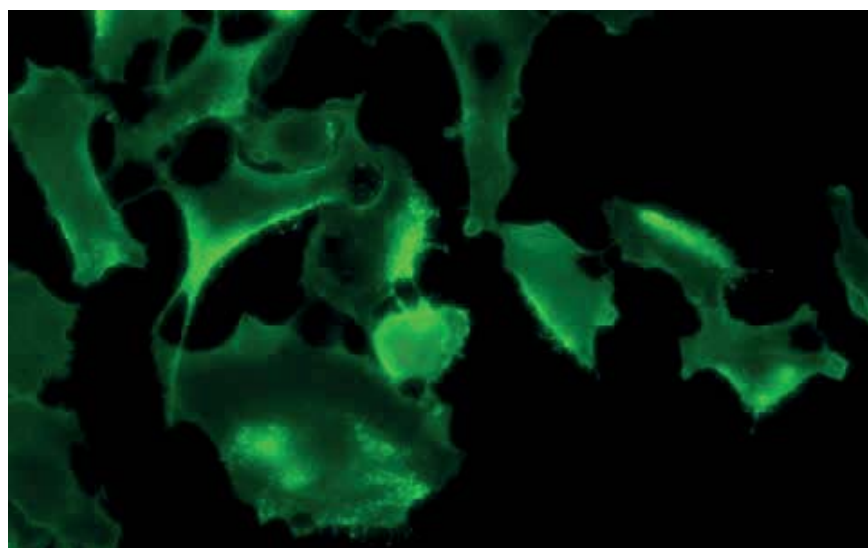
Prøven tilsettes en flaske med celler for å dyrke frem «levende» virus. Flasken med celler studeres i mikroskop for å se etter skader i cellene forårsaket av virus. Dersom det er skader i cellene, blir de også farget med antistoffer som binder seg til smittede celler (figur 5). Viruset kan isoleres og lagres slik at det kan studeres igjen senere.



Figur 3. Histologiske forandringer i fisk med ILA.



Figur 4. Positiv immunhistokjemi fra ILAsyk fisk.



Figur 5. Cellekultur med ILA-virus.