

Nodavirus hos marin fisk og laks

Kjetil Korsnes^{1,3*}, Magnus Devold², Audun H. Nerland³ og Are Nylund²

¹Høgskolen i Bodø, 8049 Bodø

²Biologisk Institutt, Universitetet i Bergen, 5020 Bergen

³Havforskningsinstituttet, Postboks 1870 Nordnes, 5817 Bergen

* E-post: kjetil.korsnes@hibo.no

Innledning

Infeksjoner med nodavirus er et stort problem i oppdrett av marine arter rundt om i verden, og i Norge har det vært utbrudd av sykdom på yngel av kveite og piggvar. Sykdom som følge av nodavirusinfeksjoner regnes som svært alvorlige og er klassifisert i B-gruppen, med tilhørende restriksjoner på anlegg. Med en økende interesse for oppdrett av marine arter er det all grunn til å ta sykdommen på alvor. Dessverre er det begrenset kunnskap om sykdomsstatusen i Norge, hvordan viruset sprer seg, risiko for utbrudd og effektive forebyggende tiltak. Med utgangspunkt i dette belyses ulike mulige risikofaktorer og tiltak for å håndtere sykdommen. På bakgrunn av en rekke EU-tilpasninger av lovverket rundt fiskehelse den siste tiden, vil forebygging og bekjemping av sykdommer i større grad enn før gjøres på lokalitetsnivå. Dette gjør at oppdretterne selv må ta et større ansvar for å forebygge og hindre spredning av dette viruset.

VNN eller VER?

Infeksjoner med nodavirus er gitt navnet “viral encefalopati og retinopati” (VER) av Office International des Epizooties (2003). Flere bruker likevel “viral nervøs nekrose” (VNN), som var det første navnet sykdommen fikk (Yoshikoshi & Inoue 1990). Sykdomsbildet er nervøse symptomer som spiralsvømming og ukoordinerte bevegelser på grunn av at viruset infiserer og formerer seg i sentralnervesystemet til fisken. Viruset forårsaker vakuolisering av nerveceller og degenerering, vanligvis i retina (øye), hjerne og ryggmarg. Disse typiske patologiske endringene er opphavet til navnet VER. I Norge er sykdommen så langt påvist hos kveite og piggvar.

Nodavirus

Nodavirus har fått sitt navn fra den japanske landsbyen Nodamura hvor denne typen virus i 1956 ble påvist (fra døde insekter) første gang. Karakteristisk for denne virustypen var: størrelse på 25-40 nm der kapsidet har en ikosahedral form, er nakne, har positiv-sense enkeltrådet RNA som består av to segmenter kalt henholdsvis RNA1 og RNA2. RNA1 (H⁺ 3100 nt) koder for den RNA-avhengige RNA polymerasen (protein A), mens RNA2 (H⁺ 1400 nt) koder for kapsidproteiniet. I tillegg blir det med utgangspunkt i RNA1 dannet et intermediært segment, RNA3 som bare er tilstede i infiserte celler og ikke i viruspartiklene. RNA3 koder for proteinet B2 som man ennå ikke er helt sikker på funksjonen til, men det er vist at B2 kan hemme

vertscellens evne til å motstå virusinfeksjon (Ahlquist 2002).

I 1992 ble virus med tilsvarende oppbygging påvist hos fisk. Disse ble nå kalt betanodavirus, mens de som var isolert fra insekter ble kalt alfanodavirus. I 1999 ble det rapportert om nodavirus isolert fra ferskvannsker (Arcier et al. 1999). Fellesnevneren for alle disse isolatene er oppbyggingen. Viruspartiklene er av samme størrelsesorden, det samme er lengden på de to RNA segmentene og deres åpne leserammer. Hvis man sammenligner nodavirus isolert fra insekter, fisk eller reker vil man imidlertid finne at sekvenslikhet på nukleotid- eller aminosyrenivå er forbausende lav. Selv innenfor noen av de forskjellige isolatene fra insekter er sekvenslikheten lav. Det er derfor usikkert om det er snakk om felles opphav, eller om dette er virus som har oppstått uavhengig, men som har fått store likhetstrekk morfologisk fordi dette er en hensiktsmessig måte for naturen å organisere et virus på.

Nodavirus er blant de aller minste og enkleste oppbygde virus man kjenner til. Denne enkle oppbyggingen er kanskje grunnen til at nodavirus kan replikere i celler fra forskjellige organismer. Alfaodavirus kan formere seg i mammalske celler, planteceller og til og med i gjærceller hvis de først kommer inn i cellene. Nodavirus er det eneste viruset fra høyerestående eukaryote organismer som har vist seg i stand til å danne infeksiose viruspartikler i

gjærceller (Price *et al.* 2002). Viruset mangler imidlertid evnen til å smitte fra celle til celle, og vil derfor ikke formere seg i en kultur av gjærceller. Betanodavirus blir hovedsakelig funnet i nervevev hos fisk. Men viruset kan også replikere i celler fra andre typer fiskevev (Sommerset *et al.* 2005) selv om disse cellene mangler reseptorene som er nødvendige for at viruset effektivt kan smitte fra celle til celle. Et virus som har en slik evne til å replikere i alle typer celler bør man være spesielt oppmerksom på. Mutasjoner kan medføre at viruset kan tilpasse seg andre reseptorer og dermed vil kunne infisere andre vertsorganismer.

Fylogenetisk slektskap mellom betanodavirus

Fylogenetiske analyser av betanodavirus har hovedsakelig vært gjort på RNA2 segmentet, og 4-7 ulike genotyper er foreslått (Nishizawa *et al.* 1997, Chi *et al.* 2001, Dalla Valle *et al.* 2001, Johnson *et al.* 2002, Gagne *et al.* 2004, Johansen *et al.* 2004). En av genotypene er omtalt som kaldtvannsguppen (barfin flounder nodavirus), der virus på kommersielt viktige arter som stillehavstorsk (Nishizawa *et al.* 1997), atlantisk torsk (Starkey *et al.* 2001, Johnson *et al.* 2002), atlantisk kveite (Aspehaug *et al.* 1999, Grotmol *et al.* 2000) og hyse (Johnson *et al.* 2002, Gagne *et al.* 2004) viser nært slektskap. Skillet mellom varmt- og kaldtvannsgenotyper av viruset kan tyde på en vertsspesifisitet eller temperaturavhengighet (Chi *et al.* 1999). Andre funn viser at virus klassifisert som tilhørende barfin flounder genotypen kan infisere varmtvannsarter (Thiery *et al.* 2004). Det er diskutert mulige årsaker til den store utbredelsen av viruset og flere teorier er foreslått, som omfattende handel med fisk (Nishizawa *et al.* 1997, Skliris *et al.* 2001) eller koevolusjon og tilpasning til varmt vann (Dalla Valle *et al.* 2001, Chi *et al.* 2003). Det er grunn til å anta at nodavirus har en lav vertsspesifisitet, og at genotypeplasseringen er et utslag av hvilke arter (populasjoner) viruset er etablert i. Når en ser på innbyrdes fordeling av virus i kaldtvannsguppen, kan den gi grunnlag for skille på geografisk plassering eller utbredelse. Dette er i så fall noe som kan være nyttig for epidemiologiske studier. Her i Norge viser undersøkelser av nodavirus fra både kliniske utbrudd av VER og hos persistent infisert fisk en klar forskjell i nukleotidsekvens på RNA2, og det er per i dag

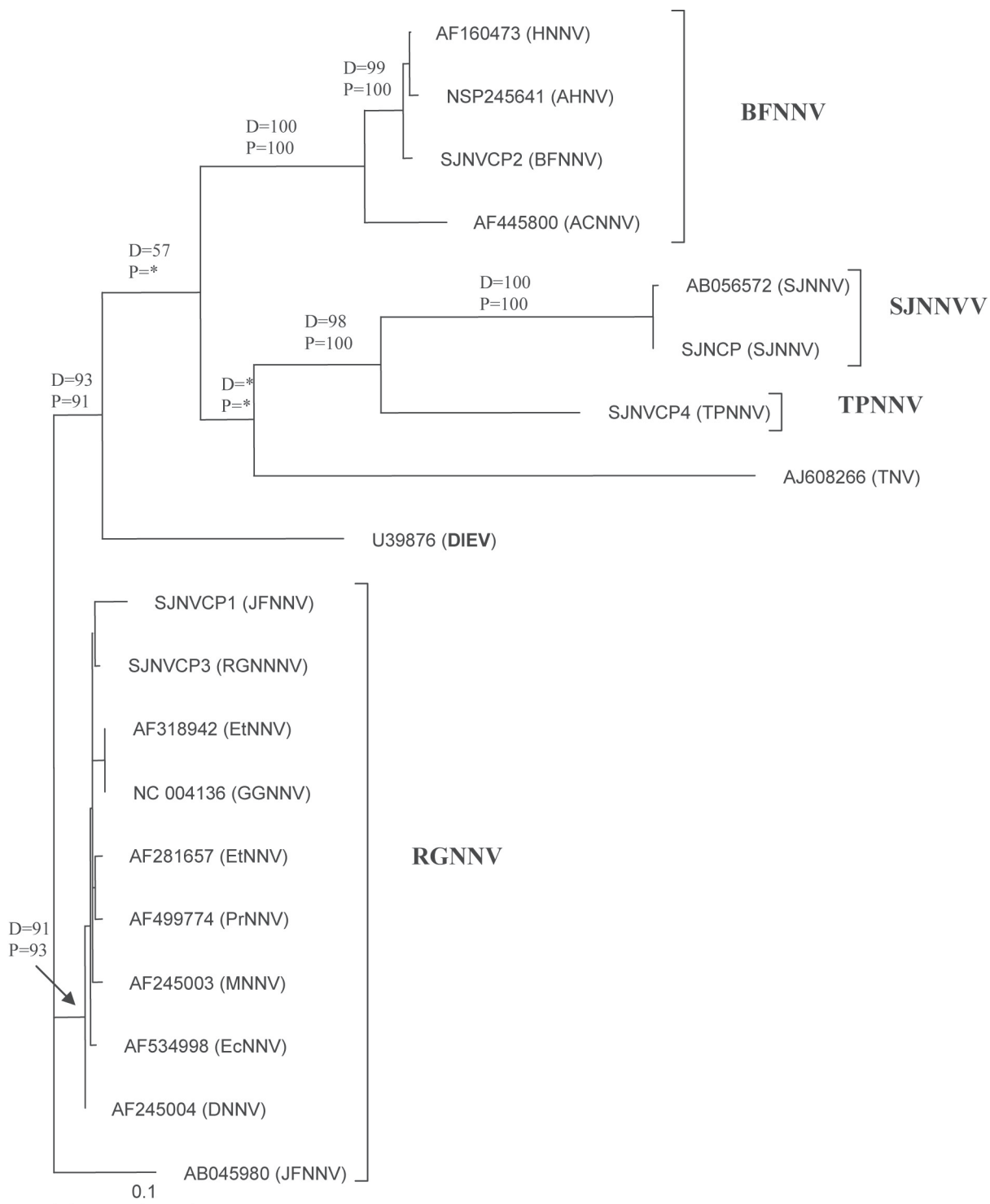
mulig å skille både på vertsart og lokalitet (upubliserte data).

Vertsregister

Nodavirusinfeksjoner er beskrevet fra en rekke ulike fiskearter over hele verden, og i oppdretts-sammenheng assosieres viruset i hovedsak til marine teleoster (Munday *et al.* 2002). Det er imidlertid også rapporter på mottaklighet hos fisk i ferskvann (Athanasopoulou *et al.* 2003, Chi *et al.* 2003, Hegde *et al.* 2003), noe som tyder på at nodavirus har et svært stort vertsregister. I oppdretts-sammenheng har det derfor vært interessant å se hvilke arter som kan være mottakelige for viruset.

Det er gjort flere forsøk med eksperimentell smitteoverføring på ulike fiskearter for å undersøke mottakelighet. Her i Norge er det vist at intraperitonealt smittet kveite på 20 gram tar opp viruset i hjernevev (Grove *et al.* 2003). Lignende forsøk er gjort på steinbit, der 10 grams yngel døde etter tilsvarende smittemodell (Sommer *et al.* 2004). Nylig er det vist at intraperitonealt smittet laks (smolt) på 110 gram utviklet nervøse symptomer, der fisk begynte å dø 34 dager etter smitte (Korsnes *et al.* manuskript). I dette forsøket ble en økning i mengde nodavirus påvist i hjernevev på den smittede laksen, og fisken forble positiv gjennom de 125 dager forsøket pågikk. Nervøse symptomer på smolt er rapportert tidligere, blant annet på smolt i sjø (Scullion *et al.* 1996), uten at årsaken til dette ble avdekket. Det er funnet nodaviruslignende partikler i hjerte hos laks med CMS (Grotmol *et al.* 1997a, Nylund 2001), uten at dette er verifisert. Mottakelighet hos laks gjør at det bør undersøkes for nodavirus ved tilstedeværelse av nervøse symptomer, blant annet ved lidelsen nervøst yngelsyndrom (NYS) som er rapportert fra startforing. Med utgangspunkt i mottakelighet i eksperimentelle forsøk, bør en unngå oppdrett av laks og marinfisk i umiddelbar nærhet inntil flere studier er gjort.

Det er også gjort smitteforsøk på torsk (100 gram) som er produsert i Norge, der viruset ble påvist i hjerne og retina (upubliserte data, figur 3). Med utgangspunkt i slike forsøk ser nodavirus ut til å ha en stor evne til å etablere seg og overleve lenge i verten. Derfor er det også gjort undersøkelser av mottaklighet i mus, der det er vist at intramuskulær



Figur 1: Fylogenetisk tre basert på analyse av RNA2 fra 19 isolat av betanodavirus fra Johansen et al. (2004). Identitetsnummer angir accession nr i GenBank. NNV = nodavirus, BF = barfin flounder, SJ = striped jack, TNV = turbot nodavirus, DIEV = *Dicentrarchus labrax* encephalitis virus, TP= tiger puffer, RG = red grouper.

og intraperitoneal injeksjon ikke gir deteksjon av virus i målorganene hjerne, ryggmarg eller øye (Banu & Nakai 2004). Betanodavirus ser derfor ikke ut til å gi sykdom hos pattedyr, innbefattet mennesker.

En av forutsetningene for å håndtere VER er sensitive metoder for påvisning av viruset. Dette er viktig

for å stille pålitelige diagnoser og ikke minst muliggjøre screening av populasjoner for å avdekke bærere. Smitteveier for viruset er ikke kjent i detalj for kaldtvannsfisk, men det er gjort flere studier på andre arter. I likhet med flere andre patogener spiller sannsynligvis persistent infiserte bærere en viktig rolle i spredningen.

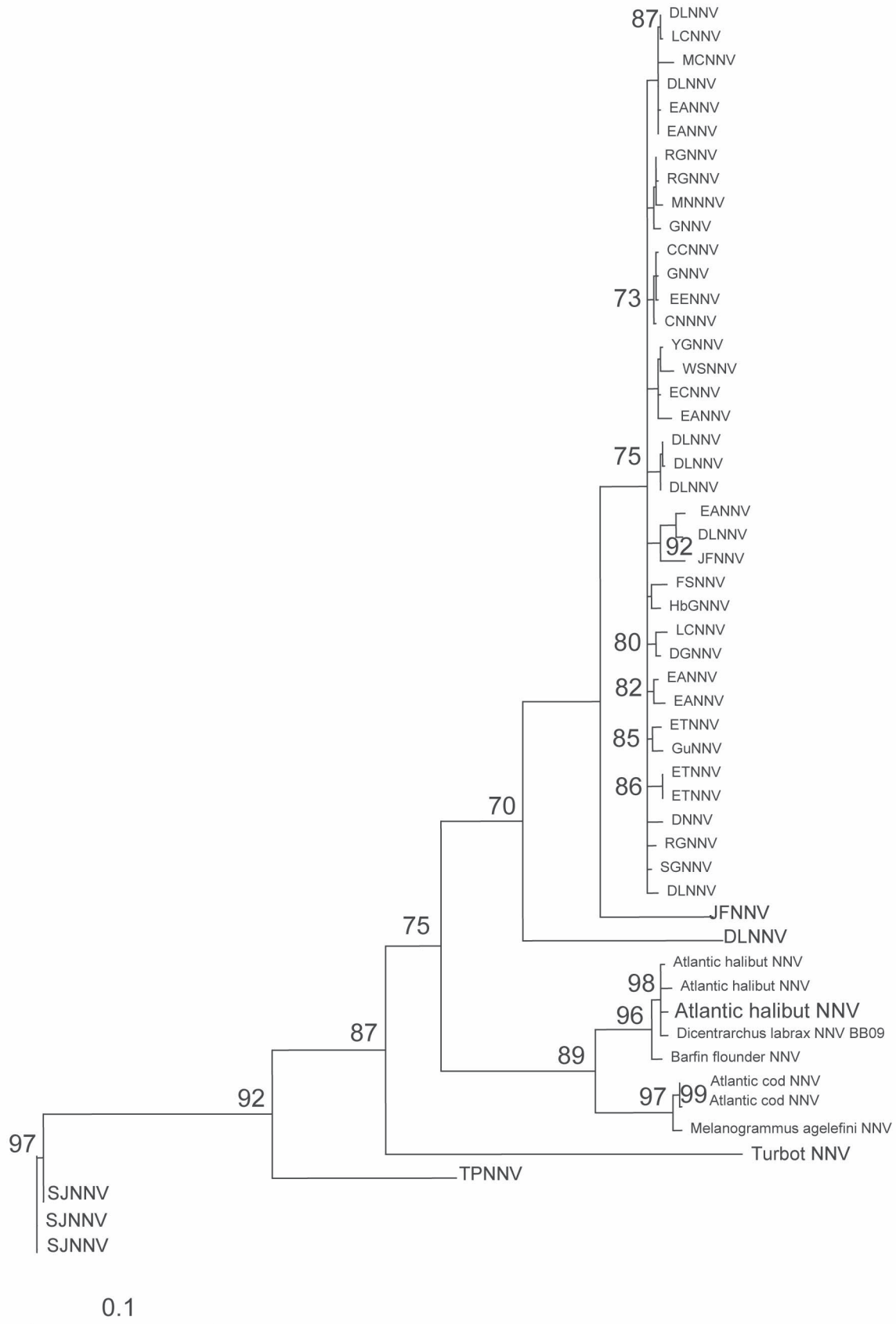
Smittespredning – horisontal versus vertikal overføring

Nodavirus er påvist i befruktete egg fra varmtvannsarter som striped jack (Arimoto *et al.* 1992). Det er vist at nodavirus kan eksperimentelt overføres vertikalt hos sea bass (Breuil *et al.* 2002). I Norge er nodavirus påvist i stor kveite (Aspehaug *et al.* 1999), og det ser ut til at viruset har en vertikal overføring. Det er også vist at desinfeksjon av kveiteegg med ozon ga en økt overlevelse (Grotmol & Totland 2000). Det er usikkert hvorvidt viruset går inn i egget eller bare befinner seg på overflaten, men en overflatedesinfeksjon gav positiv effekt. Videre er det usikkert om hannfisk kan overføre viruset til egg med sperm. Det finnes i dag metoder for påvisning i prøver fra egg, men det gjenstår å utvikle sikre metoder for påvisning fra sperm. Undersøkelse av stamdyr (screening) er derfor interessant for å avdekke potensielle bærere, men vevsfordelingen av viruset er ikke studert på kaldtvannssarter. Bærere kan undersøkes ved uttak av vevsprøve (biopsi) for påvisning av nodavirus, og målorgan er vanligvis hjernevev (*medulla oblongata*). Dette medfører imidlertid at individet blir avlivet, og det bør undersøkes om andre organer kan være egnet, slik at stamdyret ikke må avlives. Undersøkelse av vevsfordeling (tropisme) er gjort for noen fiskearter, der blant annet kjønnsprodukter (egg) og blod er undersøkt med spesifikke antistoffer mot nodavirus (Mushiake *et al.* 1994, Breuil *et al.* 2000, Watanabe *et al.* 2000). Et annet studie har sett på fordeling av nodavirus i 13 år gamle stamdyr av striped jack (som var positive i PCR test), og fant ved bruk av immunohistokjemi (spesifikke antistoff) at gonader, tarm, mage, nyre og lever var positive. Konklusjonen var at overføring av virus ser her ut til å forekomme fra gonader og tarm til egg (Nguyen *et al.* 1997). Her i Norge er et forsøk på torsk og kveite initiert ved Universitetet i Bergen og Havforskningsinstituttet, der vevstropisme etter eksperimentell smitte av en kveitegenotype skal undersøkes for egnede organer for biopsi.

Det er vist kohabitant (horisontal) smitte mellom larver av striped jack i forsøk (Arimoto *et al.* 1993). Andre har vist horisontal overføring av nodavirus mellom sea bream (havkaruss) og sea bass (havabbor). Her var sea bream asymptomatisk bærer og overførte viruset til sea bass når disse var holdt i samme tank (Castric *et al.* 2001). Ett studie

beskriver nodavirusinfeksjon i Taiwan, og her mener forfatterne at smitte overføres med fisk som transporteres. Viruset ser ut til å kunne overføres i anlegg gjennom resirkulering og bruk av utstyr (Chi *et al.* 2003). Dette er sannsynligvis også tilfelle for kaldtvannsarter som torsk og kveite, der viruset kan overføres mellom individer, både bærere og mottakelige verter. Den nære slektskapen i kaldtvannsgruppen av nodavirus gjør at en sannsynligvis har en risiko for overføring av viruset mellom ulike kaldtvannsarter.

Det er gjort flere forsøk med ulike desinfeksjonsmidler mot nodavirus, blant annet at nodavirus fra striped jack ble inaktivert ved bruk av 50 ppm natrium hypokloritt, kalsium hypokloritt, benzalkonium klorid og jod i 10 minutter ved 20 °C. Formalin hadde ingen effekt på inaktivering, mens inaktivering ble observert ved høy pH (12) i 10 minutter ved 20 °C og med varmebehandling (60 °C) i 30 minutter. Inaktivering ved UV ble observert ved 410 iW cm⁻² i 244 sekunder, og ozon ved 0,1 i g ml⁻¹ som total oksidantmengde i 2,5 minutter (Arimoto *et al.* 1996). Andre har vist at sea bass nodavirus er infektive i cellekultur, selv etter lagring i 6 til 12 måneder på 15 °C. Nodavirus suspendert i vann tåler eksponeringer med pH 2-11 uten mengdereduksjon i 24 timer. Virus holdt i ferskvann ble nedbrutt etter 6 måneders lagring ved 15 °C. Dette studiet viste også at varmebehandling (60 °C) i 30 minutter og UV (440 iW cm⁻²) i 8 minutter gav en reduksjon av virus på 99,9 %. Også her var behandling med formalin (2 % løsning) lite effektiv med en liten reduksjon av virus etter 6 timers eksponering ved 15 °C. Bruk av klor- og jodbaserte midler og Virkon gav en redusert effekt når organisk materiale var til stede i løsningen, mens en virussuspensjon i destillert vann ble inaktivert etter 5 minutter med 50 ppm klor og 25 ppm jod. Bruk av Virkon gav best resultat, med reduksjon av virusmengde etter 5 minutter og total inaktivering etter 30 minutter. Bruk av ozon (opptil 4 mg O₃l⁻¹) på kveiteegg gav en høyere overlevelse, men noe redusert klekking (Grotmol & Totland 2000). Konsentrasjoner av ozon som er høyere enn denne konsentrasjonen gav negativ effekt på klekking, og det er vist i forsøk med kveite, torsk og piggvar at en konsentrasjon på 2 mg O₃l⁻¹ i 2 minutter gir en normal klekkeprosent (Grotmol *et al.* 2003). Egg fra piggvar ser ut til å være mer tolerante enn egg fra



Figur 2: Fylogenetisk tre basert på analyse av RNA2, som viser hovedgruppene av nodavirus med vekt på kaldtvannsguppen. En genotype fra sea bass (*Dicentrarchus labrax*) havner her i kaldtvannsguppen, og denne har gitt infeksjoner på varmtvannsfisk i tillegg (Thiery et al. 2004).

både kveite og torsk. Generelt viser disse forsøkene at nodavirus er svært resistente, og effekt av desinfeksjon er avhengig av hvilket middel som brukes, virketiden og om det er organisk materiale til stede (skitten overflate eller partikler i vann).

Virusets resistente egenskaper gjør at det nå undersøkes for mulig vektorstatus hos andre organismer knyttet til oppdrett. Samlokalisering-prosjektet på laks og blåskjell, og eventuelt samlokalisering av marin fisk og blåskjell, gjør at det må undersøkes om skjellet kan fungere som vektor. Havforskningsinstituttet gjør nå forsøk for å se om nodavirus overlever i blåskjell, for å se om viruspartiklene brytes ned i skjellet og om slike virus vil kunne smitte fisk. Tilsvarende forsøk er gjort på ILA-viruset, som ikke lar seg påvise i skjellet 48 timer etter eksperimentell smitte (Skår, pers.med 2005).

Mekanismene som utløser VER er ikke godt kjent, men spredning horisontalt kan være en følge av tetthet (Arimoto *et al.* 1993), temperatur og egenskapene til genotypen (Tanaka *et al.* 1998). Virusets resistente egenskaper mot nedbryting er sannsynligvis også avgjørende for både spredning (overlevelse i miljøet) og virulens (overlevelse inne i verten). Det ser også ut til at det er forskjeller i virulens mellom genotyper, uten at dette er studert nærmere (egne observasjoner).

Diagnostikk og påvisningsmetoder

VER medfører kliniske tegn som reflekterer den virale påvirkning av sentralnervesystemet, og består av ukoordinerte bevegelser, økt svømmefrekvens, tap av likevekt og spiralsvømming. Ofte sees pigmentforandringer (nervøst stimulert) og tap av appetitt (Munday *et al.* 2002). Histopatologisk sees ofte vakuolisering (blæredannelse) i hjernevev og ødeleggelse av vevet i retina (øye). Høy dødelighet forekommer i yngelfasen med opp mot 100 % dødelighet, noe som blant annet er beskrevet for kveiteyngel (Grotmol *et al.* 1997b). Persistent infeksjon manifesterer seg vanligvis ikke med kliniske tegn eller dødelighet, selv om dette er observert på stor kveite (Aspehaug *et al.* 1999). Problemer med VER avtar med økende alder på fisken, og sykdommen regnes i hovedsak å være yngelrelatert. Mottakelighet ser ut til å ha en sammenheng med

art, genetikk, immunsystemets utvikling og virusets genotype (Sommerset, 2004).

Diagnostikk av VER baseres på bruk av immunohistokjemi (IHC), med spesifikke antistoff mot virusets kapsidprotein, og visualiseres som fluorescens i vevsprøver (som oftest nervevev som hjerne og retina). Denne metoden fungerer bra for å påvise VER, der fisk som undersøkes ofte har massiv infeksjon med mye virus. Imidlertid er metoden ikke like optimal for påvisning av bærere der mengde virus i vevet kan være lite, og positive prøver vanskelig å oppdage. Det er også brukt enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for påvisning (Arimoto *et al.* 1992, Breuil & Romestand 1999), men dette er en indirekte påvisning av virus. I tillegg til immunologiske metoder brukes revers-transkriptase PCR (RT-PCR) med spesifikke primere for virusets RNA2 (Nishizawa *et al.* 1994), med optimaliserte protokoller for blant annet kveitenodavirus (Aspehaug *et al.* 1999, Grotmol *et al.* 2000). Bruk av IHC, ELISA og PCR er godt egnede metoder for å stille diagnosen VER, men når det gjelder deteksjon av bærere finnes en mer sensitiv metode.

Real-time PCR har vist seg å være et nyttig verktøy for påvisning av nodavirus, og er opptil 100 ganger mer sensitiv enn en RT-PCR (Starkey *et al.* 2004). Denne egenskapen gjør at metoden er godt egnet for bruk i screening av fisk for å identifisere eventuelle bærere av viruset. Positive prøver kan undersøkes med RT-PCR, og deretter sekvenseres for bestemmelse av genotype. Bruk av flere metoder for påvisning er viktig for å verifisere funn.

Ulike cellelinjer er utviklet for å dyrke viruset, men den mest vanlige (SSN-1) er fra striped snakehead (Frerichs *et al.* 1996). Denne cellelinjen er kjent å være mottakelig for flere genotyper, og er også brukt i Norge (Dannevig *et al.* 2000). Temperaturoptimum for SSN-1 cellene ligger over 20 °C, noe som kan ha negativ innvirkning for replikasjonen av virus fra kaldtvannsarter, og fra kveite er en av genotypene så langt ikke dyrkbar i disse cellene (Korsnes *et al.* manuskript).

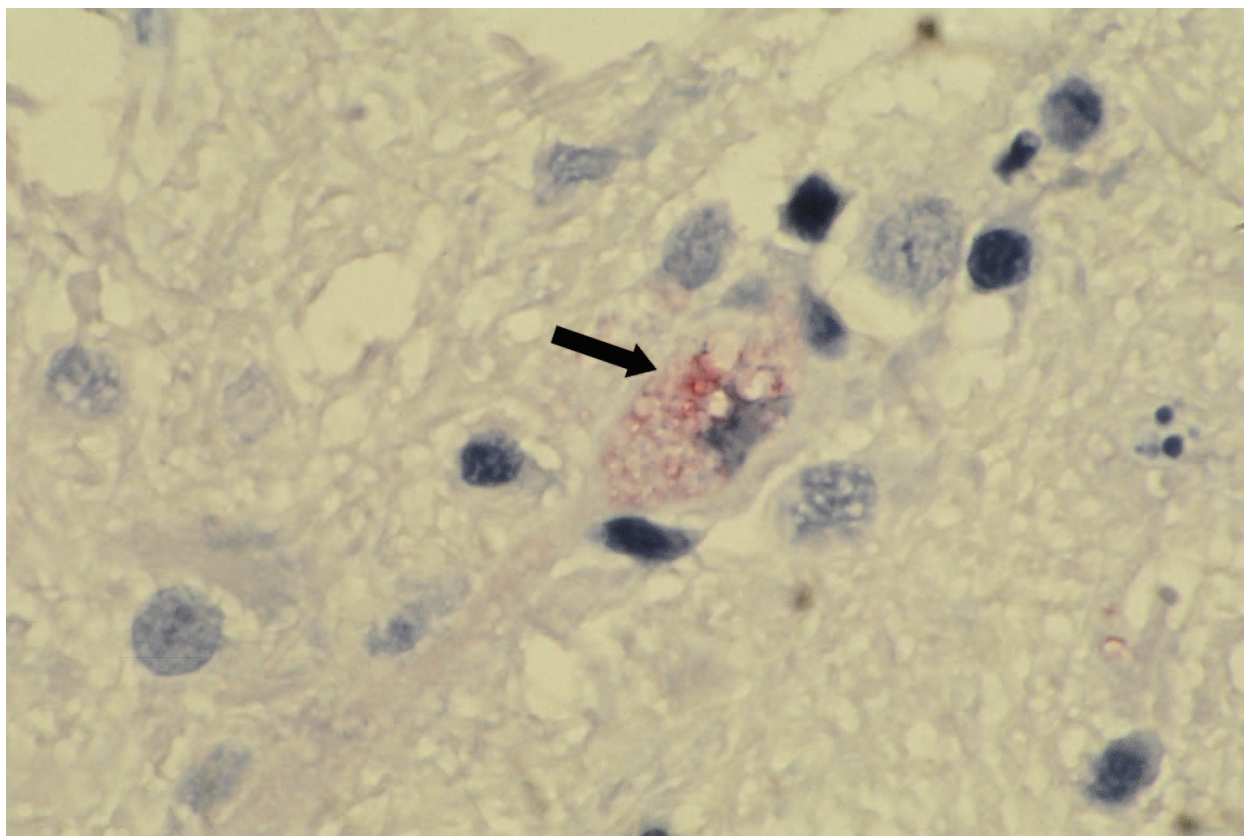
Sykdomsstatus for VER i Norge

De første påvisningene av nodavirus fra Norge ble gjort hos piggvar- og kveiteyngel (Bloch *et al.* 1991,

Grotmol *et al.* 1995), men dødelighet assosiert med VER er registrert tilbake til 1988 hos yngel av piggvar. I perioden 1995 til 1998 ble det påvist flere utbrudd i Sør-Norge, og disse problemene gav utslag i etablering av et overvåkningsprogram i 1999. Dette programmet har fått aktivt tilsendt yngelprøver fra kveite-, torsk- og piggvaranlegg rundt om i Norge. Overvåkningsprogrammet har fokusert på larver siden disse transporteres til flere lokaliteter, og fra 2000 ble importert kveite og piggvar, samt norskprodusert torsk med i overvåkingen. Resultatet har vært at det i perioden frem til 2004 ble avdekket to tilfeller av persistens og to utbrudd av VER. Disse fordelte seg på positive funn hos kveite i 1999 og 2002 uten klinisk bilde, og utbrudd av VER på kveite i 2001 (Hellberg og Dannevig 2002, Johansen 2004). For piggvar ble det påvist ett utbrudd av VER i 2002 (Johansen 2004). I tillegg er det også gjort sporadiske positive funn av nodavirus av forskningsmiljøer som ikke har vært del av overvåkingen. Dette gjør at utbredelsen ser ut til å være på flere lokaliteter (upublisererte data). Det kan derfor stilles spørsmål ved om hvorvidt overvåkningsprogrammet har gitt et riktig bilde av virusutbredelsen. At overvåkningsprogrammet ikke har klart å få med alle påvisningene, kan forklares

med hvilke metoder som er brukt. Videre kan det stilles spørsmål ved hvordan prøvetakning og individutvalg har blitt gjort i anleggene, både med hensyn til antall og hvilke individer som er undersøkt. Overvåkningsprogrammet har i stor grad basert seg på uttak gjort av de tidligere distriktsveterinærene eller oppdretteren selv. Med tanke på at VER er en B-sykdom, vil en påvisning være av økonomisk betydning for oppdretteren. Problemstillingen dette gir kan kanskje best illustreres ved at enkelte oppdrettere har nektet å selge fisk eller levere prøver til bruk i forskningsprosjekter, i frykt for påvisning av viruset.

Funn av nodavirus i et begrenset antall anonyme innsendte prøver kan tyde på at viruset er mer utbredt enn antatt, og kan gi grunnlag for å si at en per i dag ikke har noen oversikt over utbredelsen, verken i vill- eller oppdrettspopulasjoner av marin fisk i Norge. Slik situasjonen er nå bør viruset betraktes som endemisk i oppdrettspopulasjoner av kveite og piggvar. Ser en på våre naboland i EU er ikke VER en rapporteringspliktig sykdom. Dette gjør at sykdommen sannsynlig vil bli fjernet fra vår B-gruppe (Johansen 2004). De siste årene har det norske regelverket endret seg radikalt som følge av



Figur 3: *Medulla oblongata* fra laks eksperimentelt smittet med nodavirus. Snittet er farget med antistoff (Ø150), og positive områder farges rødt (sort pil). Foto: Ingrid U. Fiksdal.

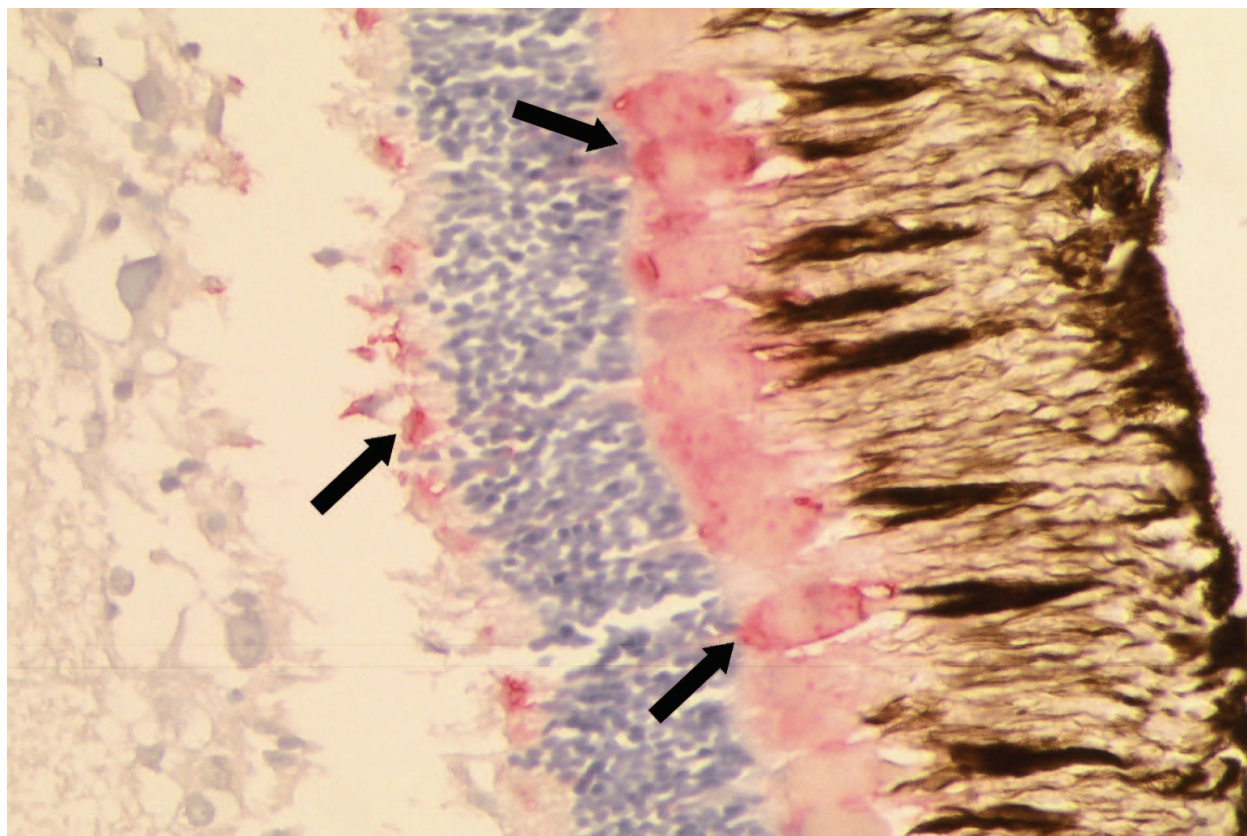
nye retningslinjer og direktiver fra EU, med den konsekvens at blant annet overvåkningsprogrammet for VER ble avsluttet i 2003. Harmoniseringen en har sett av norsk lovverk fører til at oppdretterne selv må ta et større ansvar for å hindre spredning av sykdom, blant annet gjennom rutiner for kjøp og salg av levende materiale. Kunnskap om utbredelse av nodavirus er derfor viktig for å hindre og begrense spredning i og fra oppdrettspopulasjoner. Ettersom screeningprosjekter flere ganger ikke har fått finansiering, vet en ikke hvor stor denne faren er eller hvilke populasjoner av fisk som er utsatt. Det har likevel blitt gjort noe begrenset screening av torsk, uten at viruset er påvist (pers. observasjon).

I litteraturen er flere norske genotyper publisert, og disse kommer fra kveite (Aspehaug *et al.* 1999, Grotmol *et al.* 2000, Sommerset & Nerland 2004, Korsnes *et al.* manuskript) og piggvar (Johansen *et al.* 2004). Analyser av RNA2 segmentet viser at virusene fra kveite faller inn under kaldtvannsgruppen, mens piggvarviruset skiller seg ut og er foreslått som en helt egen genotype (TNV, turbot nodavirus). Selv om viruset ikke er funnet hos torsk i Norge, er det kjent at VER er et stort problem i torskøyngelanlegg i USA og Canada, med høy

dødelighet både i 2002 og 2004 (Nardi, pers med. 2004). Viruset er også isolert fra anlegg med klinisk syk torskøyngel i Skottland (Starkey *et al.* 2001). VER bør derfor være en problemstilling for norske torskeoppdrettere, både yngelproduksjon og i stamfiskhold.

Vaksineringstrategier

Sekvensering av hele nodavirusgenomet har gjort det mulig å lage rekombinante vaksiner. Genet som koder for kapsidprotein er blitt klonet inn i egnede vektorer for uttrykk av rekombinant kapsidprotein i bakteriekulturer. Opprenset rekombinant protein er så blitt brukt som vaksine. Ved vaksinering og påfølgende smitteforsøk har slik vaksine gitt høy beskyttelse hos forskjellige typer grupper (Tanaka *et al.* 2001, Yuasa *et al.* 2002) og hos piggvar (Husgard *et al.* 2001, Sommerset *et al.* 2005). Problemet er imidlertid at nodavirus normalt affekterer fisk på et så tidlig livsstadium at det både er vanskelig å utføre vaksinering rent praktisk i tillegg til at fiskens immunsystem er lite utviklet. Et alternativ ville være å vaksinere stamfisken. Muligens ville en kraftig immunrespons hindret vertikal smitte fra stamfisk til avkom.



Figur 4: Retina fra torsk eksperimentelt smittet med nodavirus. Snittet er farget med antistoff (Ø150), og positive områder farges rødt (sorte piler). Foto: Ingrid U. Fiksdal.

Det er ikke blitt testet hvilken effekt den rekombinante vaksinen vil ha på fisk som har en latent nodavirusinfeksjon. Det ønskelige ville være å ha en vaksine som medførte at fiskens immunsystem klarte å kvitte seg med persistente virus og på den måten satte en stopper for smitteprosessen.

Kontroll med sykdommen – forebyggende tiltak

Den begrensede kunnskapen om hvordan viruset spres og hva som utløser sykdommen gjør det vanskelig å iverksette presise og gode tiltak. I første omgang er det viktig å sette et klart skille mellom diagnostikk (påvisning av VER) og screening (påvisning av bærere). Slik påvisninger har blitt håndtert frem til nå, har det vært svært vanskelig å få tilgang til anlegg for prøvetakning grunnet risiko for restriksjoner ved eventuelle funn. En prioritert oppgave bør derfor være å etablere et screening-program som ikke medfører restriksjoner ved slike påvisninger. Undersøkelse av både vill- og oppdrettspopulasjoner av kveite og torsk vil gi oss et utgangspunkt (nullpunkt) før oppdrett av marin fisk tar skikkelig av i omfang og volum, og gi et grunnlag for å avgjøre hvilke forebyggende tiltak som er best egnet.

Tilstedeværelse av bærere har sannsynligvis ført til at nodavirus er spredd til flere anlegg gjennom kjøp og salg av både yngel og stamfisk. En smittefri bestand av stam- og avlsdyr er en av forutsetningene for å lykkes med en stabil og forutsigbar produksjon av marin yngel, og ut fra dagens situasjon bør stam- og avlsanlegg derfor være restriktive med å hente individer fra oppdrett, både for oppdrett av kveite og torsk. Dette gjelder spesielt dersom slike individer vurderes hentet fra anlegg med ukjent eller lite kartlagt VER status.

Tradisjonelt har forebygging fokusert på tiltak for å begrense spredning både innenfor og mellom oppdrettsanlegg. Derfor vil transport av fisk som er smittet representere en risiko, og for å avdekke eventuell smittestatus bør det kreves testing av fisk som flyttes. Dette er viktig når en flytter fisk over lengre avstander, som til andre regioner av landet. Med dagens deteksjonsteknologi, er det mulig å påvise bærere av viruset og dette vil være med på å redusere risiko for introduksjon til andre anlegg. Slik

testing av fisk må kreves av oppdrettere selv, ettersom det ikke er grunnlag for et slikt pålegg fra veterinærmyndighetene (jmf EU direktiv 91/67). En forutsetning for at dette skal kunne gjennomføres i praksis er at påvisning av bærere ikke automatisk medfører restriksjoner for anlegget.

Påvisning av bærere medfører ikke nødvendigvis at VER bryter ut, men representerer en risiko. Mekanismene som utløser utbrudd av VER er ikke godt studert, men stress spiller sannsynligvis en rolle, og derfor bør en sette fokus på tiltak for å redusere stressbelastningen. Dette har implikasjoner for stamfiskhold, der stress kan medføre en økning i virusmengde i persistent infiserte individer med overføring til kjønnsprodukter. Kjønnsmodning og reproduksjon i seg selv er stressutløsende, og i oppdrettssammenheng bør en unngå å øke belastningen på fisken i denne fasen.

Virusets resistente egenskaper mot nedbryting gjør at type desinfeksjon og hvilke rutiner som benyttes er avgjørende for hvilken effekt som oppnås. Risiko for spredning av viruset internt i anlegget er stor ved mangelfull desinfeksjon eller ved dårlige rutiner. Viruset kan overleve og være infektivt lenge i miljøet, og det er derfor mye å hente i kvalitetssikring av rutinene. Ved påvisning av persistens bør en være ekstra oppmerksom på faren for spredning. Bruk av ozon til desinfeksjon av vann og egg er dokumentert å ha effekt, og flere andre midler til bruk på utstyr er dokumentert å ha god virkning. Det kan stilles et stort spørsmål ved bruk av resirkulering av vann, som vil kreve særskilt gode rutiner for desinfeksjon for å unngå en spredning. Generelt vil anleggets utforming og driftsrutiner være avgjørende for effektivitet til desinfeksjon og risiko for spredning internt.

Vaksiner som hos større fisk gir høy beskyttelse mot nodavirus er allerede utviklet. Bruk av slike vaksiner på larvestadiet er vanskelig og vil trolig heller ikke gi noen effekt. Den beste strategien er å holde settefiskanleggene frie for nodavirus. Dette vil kunne gjøres ved å screene all stamfisk før den tas inn på anlegget og deretter vaksinere fisken. Vaksinering av avkommet på 5-10 gram størrelse ville hindre infeksjon og etablering av asymptomatiske bærere senere i livssyklus.

Eksperimentell smitte med nodavirus fra kveite viser at viruset er i stand til å formere seg i både torsk, piggvar og laks. Inntil flere studier avklarer risikoen for smitteoverføring mellom disse artene, er samlokalisering ikke å anbefale. Tilsvarende studier bør gjøres på andre marine organismer som eventuelt skal samlokaliseres.

Denne mottakelighet hos våre viktigste oppdrettsarter gjør at infeksjoner med nodavirus må tas på alvor, og oppdrettsnæringen er ikke tjent med en ukontrollert spredning av viruset. Både ervervet kunnskap og tilgjengelig teknologi for screening og diagnostikk må tas i bruk for å kontrollere sykdommen. Her hviler det et klart ansvar på både næringen selv og forvaltningsmyndighetene.

Referanser

- Ahlquist, P (2002) RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science*, 296:1270-1273
- Arcier JM, Herman F, Lightner DV, Redman RM, Mari J, Bonami JR (1999) A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of aquatic organisms* 38: 177-181
- Arimoto M, Mori K, Nakai T, Muroga K, Furusawa I (1993) Pathogenicity of the Causative Agent of Viral Nervous Necrosis Disease in Striped Jack, *Pseudocaranx-Dentex* (Bloch and Schneider). *Journal of Fish Diseases* 16:461-469
- Arimoto M, Mushiaki K, Mizuta Y, Nakai T, Muroga K, Furusawa I (1992) Detection of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (Sjnnv) by Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (Elisa). *Fish Pathology* 27:191-195
- Arimoto M, Sato J, Maruyama K, Mimura G, Furusawa I (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143:15-22
- Aspehaug V, Devold M, Nylund A (1999) The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19:196-202
- Athanassopoulou F, Billinis C, Psychas V, Karipoglou K (2003) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece. *Journal of Fish Diseases* 26:361-365
- Banu GR, Nakai T (2004) Inoculation of BALB/c mice with fish-pathogenic nodaviruses. *Journal of Comparative Pathology* 130:202-204
- Bloch B, Gravningen K, Larsen JL (1991) Encephalomyelitis among Turbot Associated with a Picornavirus-Like Agent. *Diseases of Aquatic Organisms* 10:65-70
- Breuil G, Pepin JF, Castric J, Fauvel C, Thiery R (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: Application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 20:95-100
- Breuil G, Pepin JFP, Boscher S, Thiery R (2002) Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 25:697-702
- Breuil G, Romestand B (1999) A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *Journal of Fish Diseases* 22:45-52
- Castric J, Thiery R, Jeffroy J, de Kinkelin P, Raymond JC (2001) Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:33-38
- Chi SC, Lo BJ, Lin SC (2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases* 24:3-13
- Chi SC, Shieh JR, Lin SJ (2003) Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis Aquat Organ* 55:221-228
- Dalla Valle L, Negrisolo E, Patarnello P, Zanella L, Maltese C, Bovo G, Colombo L (2001) Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Archives of Virology* 146:1125-1137
- Dannevig BH, Nilsen R, Modahl I, Jankowska M, Taksdal T, Press CM (2000) Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:183-189
- Frerichs GN, Rodger HD, Peric Z (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology* 77:2067-2071
- Gagne N, Johnson SC, Cook-Versloot M, MacKinnon AM, Olivier G (2004) Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms* 62:181-189
- Grotmol S, Dahl-Paulsen E, Totland GK (2003) Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture* 221:245-254
- Grotmol S, Nerland AH, Biering E, Totland GK, Nishizawa T (2000) Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:79-88
- Grotmol S, Totland GK (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:89-96
- Grotmol S, Totland GK, A. K, K. F, A.B. O (1995) Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) associated with the presence of virus-like particles in the central nervous system and retina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 15:176-180
- Grotmol S, Totland GK, Kryvi H (1997a) Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Diseases of Aquatic Organisms* 29:79-84

- Grotmol S, Totland GK, Thorud K, Hjeltnes BK (1997b) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: A probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29:85-97
- Grove S, Johansen R, Dannevig BH, Reitan LJ, Ranheim T (2003) Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:211-221
- Hegde A, Teh HC, Lam TJ, Sin YM (2003) Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology* 148:575-586
- Hellberg H, Dannevig B (2002) The surveillance and control programme for viral nervous necrosis (VNN) in Norway. Annual Report 2002. National Veterinary Institute
- Husgard S, Grotmol S, Hjeltnes BK, Rodseth OM, Biering E (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms* 45:33-55
- Johansen R (2004) Helsestatusjonen hos marin oppdrettsfisk. I: Angnalt A, Ervik A, Kristiansen TS, Oppedal F (red.) Havbruksrapport 2004. Fisken og havet, særnr. 3-2004
- Johansen R, Sommerset I, Torud B, Korsnes K, Hjortaas MJ, Nilsen F, Nerland AH, Dannevig BH (2004) Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 27:591-601
- Johnson SC, Sperker SA, Leggiadro CT, Groman DB, Griffiths SG, Ritchie RJ, Cook MD, Cusack RR (2002) Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic coast of North America. *Journal of Aquatic Animal Health* 14:124-133
- Korsnes K, Devold M, Nerland AH, Nylund A (manuskript) Challenge of Atlantic salmon *Salmo salar* using a nodavirus from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* suffering from viral encephalopathy and retinopathy VER.
- Munday BL, Kwang J, Moody N (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 25:127-142
- Mushiaki K, Nishizawa T, Nakai T, Furusawa I, Muroga K (1994) Control of Vnn in Striped Jack - Selection of Spawners Based on the Detection of Sjnnv Gene by Polymerase Chain-Reaction (Pcr). *Fish Pathology* 29:177-182
- Nguyen HD, Mushiaki K, Nakai T, Muroga K (1997) Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of Aquatic Organisms* 28:87-91
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1633-1636
- Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I, Muroga K (1994) Polymerase Chain-Reaction (PCR) Amplification of RNA of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (Sjnnv). *Diseases of Aquatic Organisms* 18:103-107
- Nylund A (2001) Hjertesprekk, kardiomyopatisyndrom (CMS). *Fiskehelse* 1:29-37
- Price BD, Ahlquist P, Ball LA (2002) DNA-directed expression of an animal virus RNA for replication-dependent colony formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of virology* 76:1610-1616
- Schneemann A, Reddy V, Johnson JE (1998) The structure and function of nodavirus particles: A paradigm for understanding chemical biology. *Advances in Virus Research*, Vol 50 50:381-446
- Scullion FT, Scullion MG, Sparrow D, Rodger HD, Sheahan BJ (1996) Encephalitis and mass mortality of farmed salmon smolts in an isolated sea bay in Ireland. *Veterinary Record* 138:161-162
- Skliris GP, Krontiris JV, Sideris DC, Shinn AP, Starkey WG, Richards RH (2001) Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research* 75:59-67
- Sommer AI, Strand MA, Rasmussen E, Mennen S (2004) Susceptibility of spotted wolffish *Anarhichas minor* to experimental infection with nodavirus and infectious pancreatic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 59:101-108
- Sommerset I, Nerland AH (2004) Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis Aquat Organ* 58:117-125
- Sommerset I, Skern R, Biering E, Bleie H, Fiksdal IU, Grove S, Nerland AH (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 18 (1): 13-29
- Starkey WG, Ireland JH, Muir KF, Jenkins ME, Roy WJ, Richards RH, Ferguson HW (2001) Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Veterinary Record* 149:179-181
- Starkey WG, Millar RM, Jenkins ME, Ireland JH, Muir KF, Richards RH (2004) Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Diseases of Aquatic Organisms* 59:93-100
- Tanaka A, Aoki H, Nakai T (1998) Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology* 33:31-36
- Tanaka S, Mori K, Arimoto M, Iwamoto T, Nakai T (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of fish diseases* 24 (1): 15-22
- Thiery R, Cozien J, de Boissesson C, Kerbart-Boscher S, Nevarez L (2004) Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *J Gen Virol* 85:3079-3087
- Watanabe K, Nishizawa T, Yoshimizu M (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 41:219-223
- Yoshikoshi K, Inoue K (1990) Viral Nervous Necrosis in Hatchery-Reared Larvae and Juveniles of Japanese Parrotfish, *Oplegnathus-Fasciatus* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 13:69-77
- Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J, Chamberlain JS, Xiao X, Takeda S (2002) Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Therapy* 9 (23): 1576-1588