

Tverrfaglige studier av HSMB – nye veier til sykdomsforebyggende kunnskap

FHF prosjekt nr 900658: Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett

Prosjektdeltagere



Aleksei Krasnov, Sven Martin Jørgensen, Lill-Heidi Johansen (prosjektleder)



Britt Bang-Jensen, Anja Kristoffersen, Edgar Brun, Seksjon for Epidemiologi
Torunn Taksdal, Seksjon for Patologi



Nina Santi



Vidar Aspehaug

Styringsgruppe:

Kristin Ottesen, Helgeland Havbruksstasjon (leder)

Olav Breck, Marine Harvest

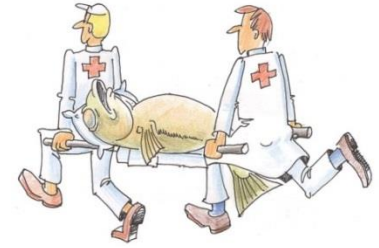
Nina Santi, AquaGen AS

Håvard Hårstad, Lerøy Seafood Group

Arne Guttvik, Salmar

Merete B. Schrøder, FHF (observatør)

Bakgrunn



Infeksiøse agens, ofte virus, er årsak til en stor del av tapet i lakseproduksjonen!

Vol. 81: 99–107, 2008
doi: 10.3354/dao01954

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published August 27

Methods for investigating patterns of mortality and quantifying cause-specific mortality in sea-farmed Atlantic salmon *Salmo salar*

A. Aunsmo^{1*}, T. Bruheim², M. Sandberg¹, E. Skjerve¹, S. Romstad³, R. B. Larssen¹

¹Norwegian School of Veterinary Science, PO Box 8146 Dep, 0033 Oslo, Norway

²National Veterinary Institute, Tungasletta 2, 7485 Trondheim, Norway

³Norwegian Food Safety Authority, Veritsgata 48, 7800 Namsos, Norway

Undersøkelser av 2006G:

-Dødsårsak klarlagt for 92% av de som døde

-Infeksiøse agens involvert i 64 % av den totale dødeligheten

Forts. bakgrunn

-Noen patogener forårsaker sykdom og dødelighet i kombinasjon med:

- Andre patogener
- Miljøfaktorer
- Stress forårsaket av driftsmessige forhold
- Fysiologiske / endokrine endringer (pre- og post-smolt, kjønnsmodning)

-Bærervirus kan aktiveres og forårsake sykdomsutbrudd

-Eksempler på virussykdommer der forløp og utfall kan påvirkes av flere faktorer:

- PD (Pancreas Disease)
- HSMB (hjerte og skjellettmuskel betennelse)
- CMS (Cardiomyopati syndrom)

Forts. Bakgrunn- Feltstatus 2011

- **Troms og Finnmark**

- IPN i over 50 % av anleggene
- Parvicapsulose i 25 % av anleggene, ofte i kombinasjon med andre infeksjoner
- HSMB og CMS i mange anlegg (stressrelatert, registrert som bakgrunnsdødelighet)

- **Møre og Romsdal, Trøndelagsfylkene og Nordland:**

- ”Suksess avhenger av om du får IPN eller ikke”
 - Problemer forbundet med lusebehandling – lav effekt av anti-lusfôr pga redusert appetitt under/etter virussykdom
 - stress pga badebehandling og håndtering =>øker risikoen for nye virussykdommer
- IPN og HSMB ofte sett i kombinasjon

Forts. Bakgrunn **Feltobservasjoner**

Lus

Ofte etter utbrudd av
IPN og HSMB

IPN

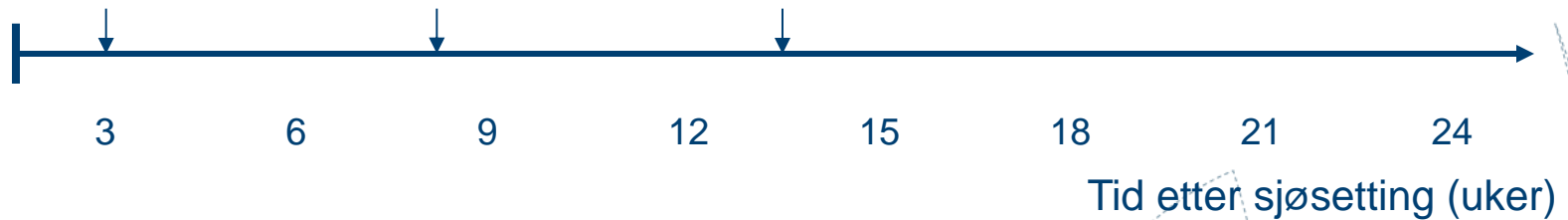
3-6 uker etter
sjøsetting

HSMB

Ofte etter IPN:
Høst på vårs molt
Vår på høstsmolt

Sår

Ofte etter IPN, HSMB og lus



Flere håndteringssituasjoner i sjøfasen

Forts. Bakgrunn

- IPNV bærertilstand en viktig risikofaktor
 - Reaktivering gir direkte tap og påvirker laksens motstand mot andre patogener.
 - Selv om ulike infeksjoner og patogener observeres i tilknytning til hverandre, er det ikke klart om, eller hvordan IPNV påvirker mottakelighet for HSMB.
- Avl og vaksinerings hovedstrategier for forebygging og reduksjon av IPN.
 - AquaGen: markør assistert genseleksjon (QTL) av laks for IPN resistens.
 - Lovende, men:
 - Vil QTL positive fisk utvikle langvarig IPN-virus bærertilstand?
 - Gir genetisk resistens mot IPN forbedret eller redusert beskyttelse mot andre virussykdommer, som HSMB?

Forts. Bakgrunn

- IPN vaksiner
 - forhindrer ikke fullt ut sykdom og dødelighet
 - fjerner ikke viruset.
- Komplekse interaksjoner mellom patogener og andre faktorer gir variabel effekt av forebyggende tiltak i felt sammenliknet med eksperimentelle forsøk.
- Avvik mellom modellforsøk og felt kompliserer fiskehelsearbeidet, risikovurderingen og utarbeidelsen av gode strategier for forebygging og tiltak.
 - Behov for å øke kunnskapen om multifaktorielle sykdommer og bedre forståelsen av interaksjoner mellom patogen og vert og mellom ulike patogener.

Tverrfaglig tilnærming nødvendig for å løse multifaktorielle sykdomsproblemer

Virologi, immunologi, patologi, bioinformatikk, molekylærbiologi, epidemiologi.....

-Benytte "high throughput" metoder (microarray, qPCR, metabolomics) i kombinasjon med tradisjonelle analyseverktøy og epidemiologi for å avklare sammenhenger og årsaksforhold i modellstudier og i felt.

Hovedmål:

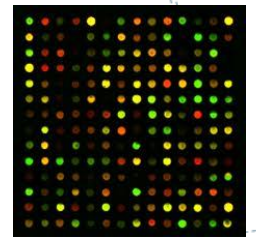
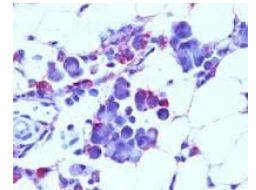
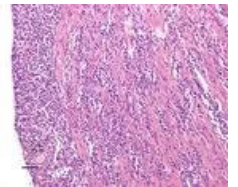
- Øke kunnskapen om utviklingen av multifaktorielle sykdommer;
 - vurdere effekten av ulike variabler og deres interaksjon.

Delmål:

- 1. Evaluere effekten av ulike variabler på utviklingen av HSMB;
 - genetisk resistens mot IPN
 - IPNV bærer status
 - IPNV reaktivering
 - vaksinerings
 - kombinasjoner av disse
- 2. Evaluere effekten av QTL for IPN resistens på utviklingen av
 - IPNV bærertilstand
 - reaktivering av viruset i post-smolt
 - mottagelighet for HSMB.

Forts. delmål

- 3. Evaluere relasjoner i felt mellom IPN status (QTL+/- fisk, IPNV bærerstatus, IPNV reaktivering) i laks i sjøfasen og utbrudd/virustitre av HSMB/PRV
- 4. Identifisere sykdomsmarkører som kan brukes for bedre å kunne evaluere helsestatus på fisken.

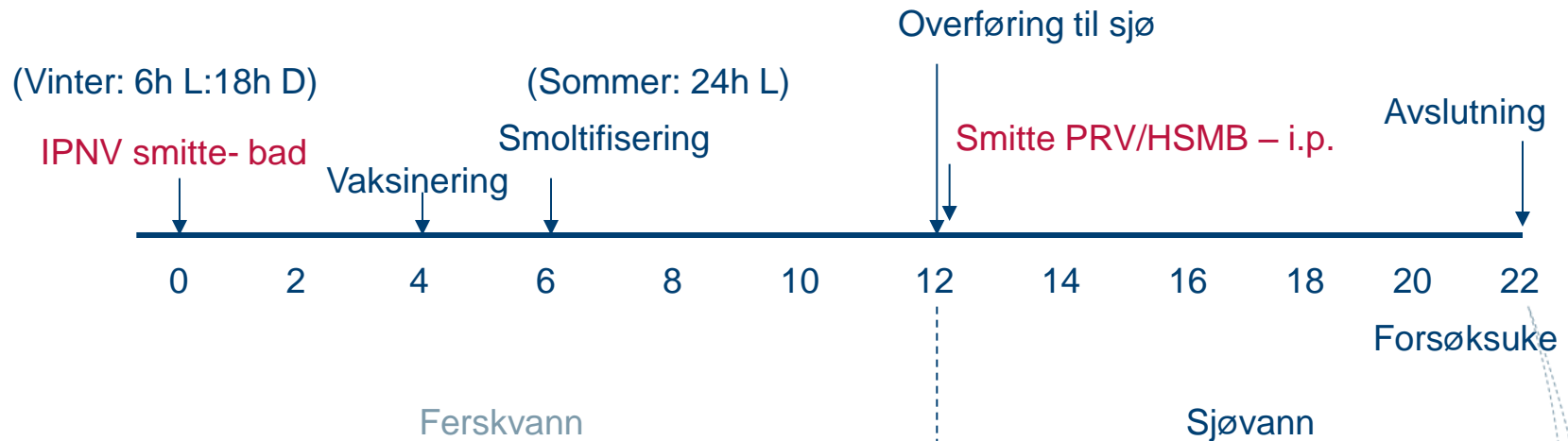


Leveranser

- En risikovurdering av IPN-virusbærere og interaksjoner mellom ulike patogener og stressorer
- Vurdere effekten av vaksinerings av IPN-resistent laks
- Økt kunnskap om resistens, toleranse og vert-patogen interaksjoner
- Kunnskap om hvor en best skal sette inn krefter og penger for å redusere tap med multifaktorielle årsaksforhold



AP1: eksperimentelt studie



Forsøkene utført ved
Havbruksstasjonen i Tromsø/
Fiskehelselab.



Ferskvannsfase (12 uker)

- IPNV bærertesting før smitte med IPNV
- Etablere forsøksgrupper;
 - QTL+ og QTL-
 - IPNV smittet og usmittet
 - Vaksinert og uvaksinert
 - Vaksine uten IPNV komponent
 - Vaksine med IPNV komponent
 - Salin kontroll

Prøvetaking:

- Følge utvikling av IPNV infeksjon
- Prøver til genekspresjonsanalyser og metabolomics (akutfase)
- Smoltifiserings-/sjøvannstester

Sjøvannsfase (10 uker)

- IPNV reaktivering:
 - IPNV påvisning (titrering, qPCR)
 - Registrere evt dødelighet
 - Histopatologi (pancreasvev)
- Følge utviklingen av HSMB:
 - Histopatologi (hjerte)
 - PRV påvisning (qPCR) hjerte
- Prøver til genekspresjonsanalyser
 - Fokus på beskyttelse, toleranse og patologi
- Prøver til lipidomics analyser
 - Karakterisere lipidendringer/lipidprofilering

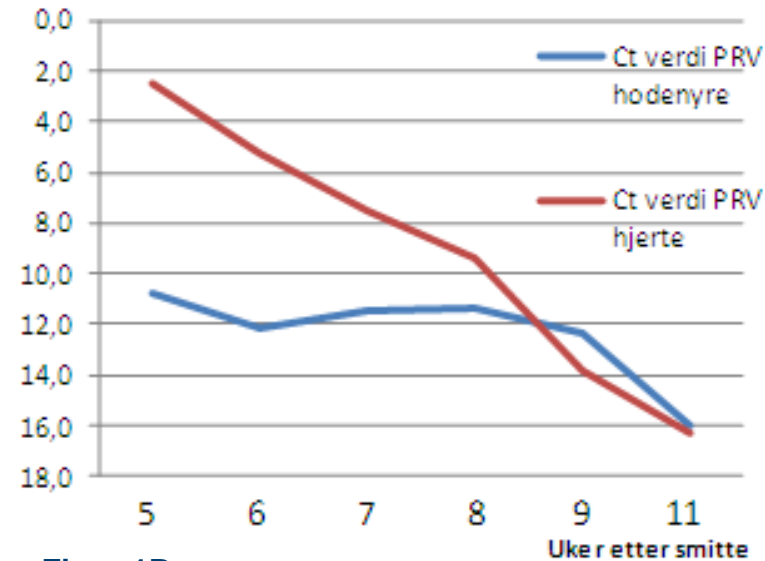
Pre-test - HSMB smitte

- Test av HSMB materiale til smitteforsøk– i.p. smittemodell
- Hjertemateriale fra 3 HSMB utbrudd i 2011
 - Smitte ved sjøvannsoverføring
 - Vaksinerert og uvaksinerert fisk
 - Følge infeksjonsforløpet ved histopatologi og qPCR
 - Uttak av hjerte, nyre og milt ukentlig 5-11 uker etter smitte (+0-prøver før smitte)
 - Histopatologi på hjerteprøver, 3 fisk per gruppe uke 6-11
 - qPCR på hjerte- og hodenyreprøver– påvisning av PRV i 6 fisk per gruppe uke 5-11
 - Microarray på prøver fra uvaksinerert QTL - fisk, 6 fisk per gruppe uke 5-11

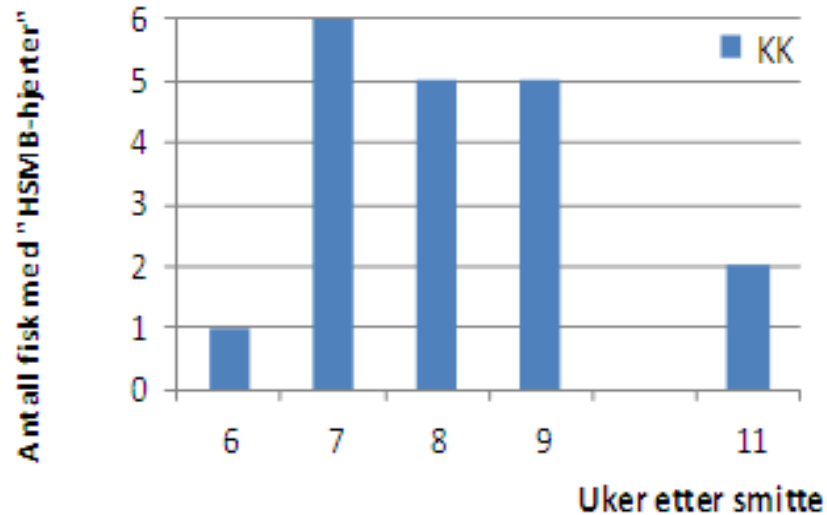
HSMB utvikling 5-11 uker etter smitte i pre-testen

Figur 1A

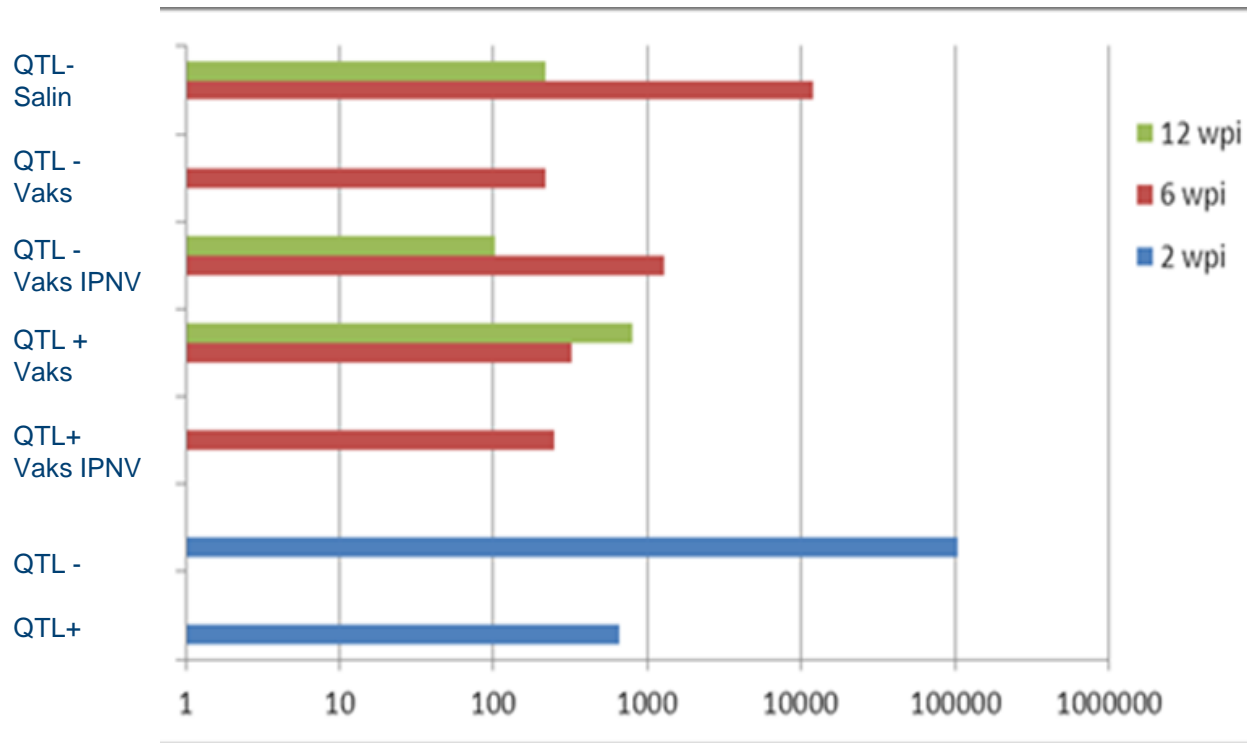
Norm. Ct verdi



Figur 1B



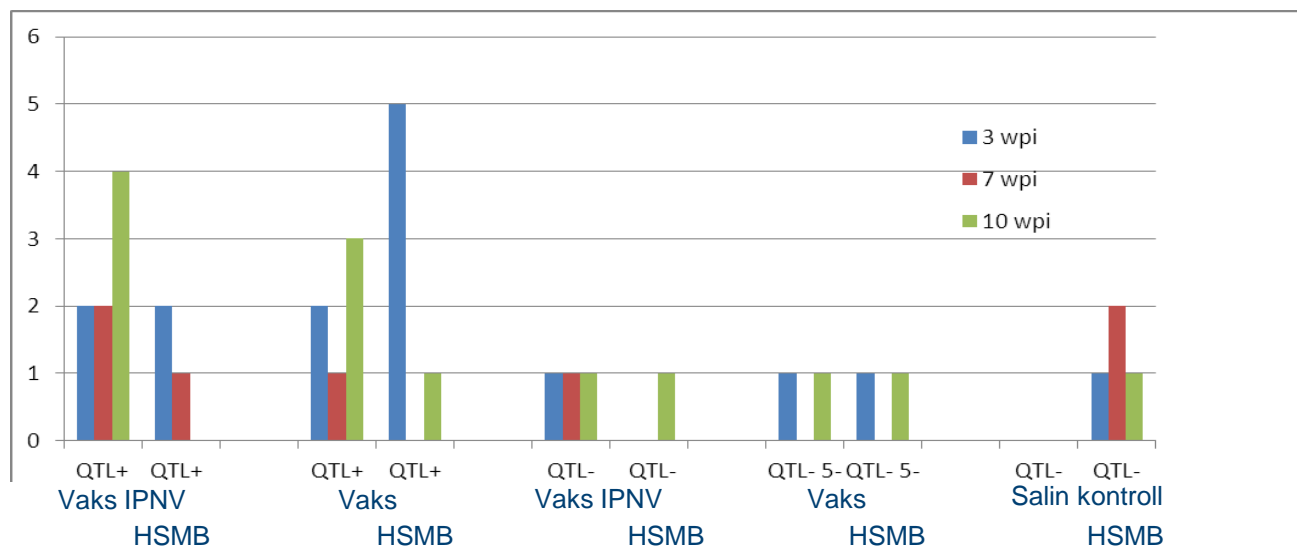
IPN virustitre 2-12 uker etter smitte - ferskvann



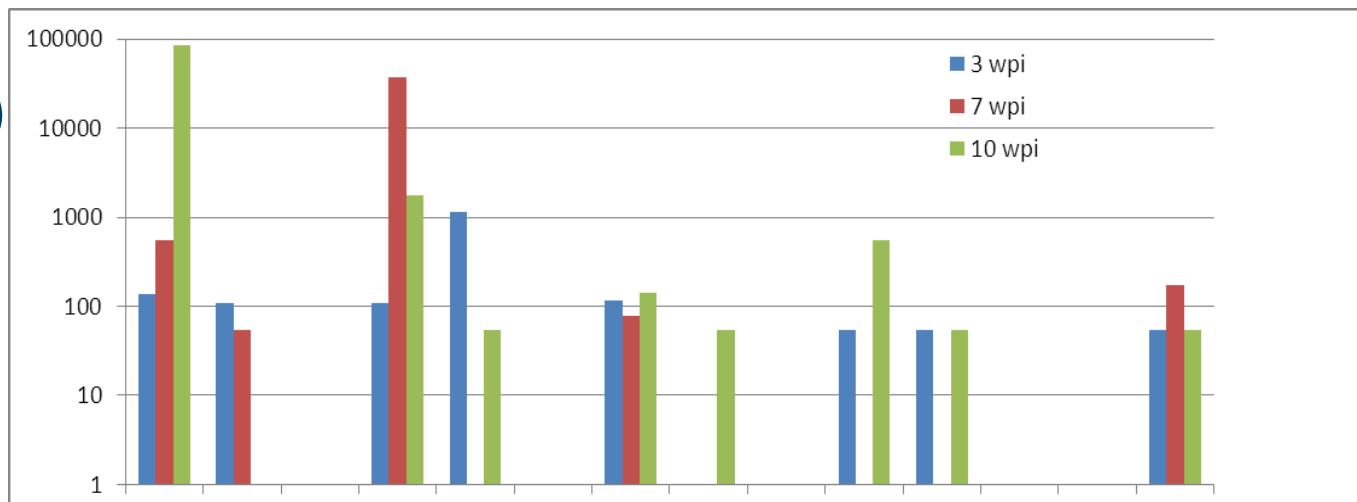
i.e./gr vev

IPN virustitre i sjøfasen/etter HSMB smitte (15-22 wpi)

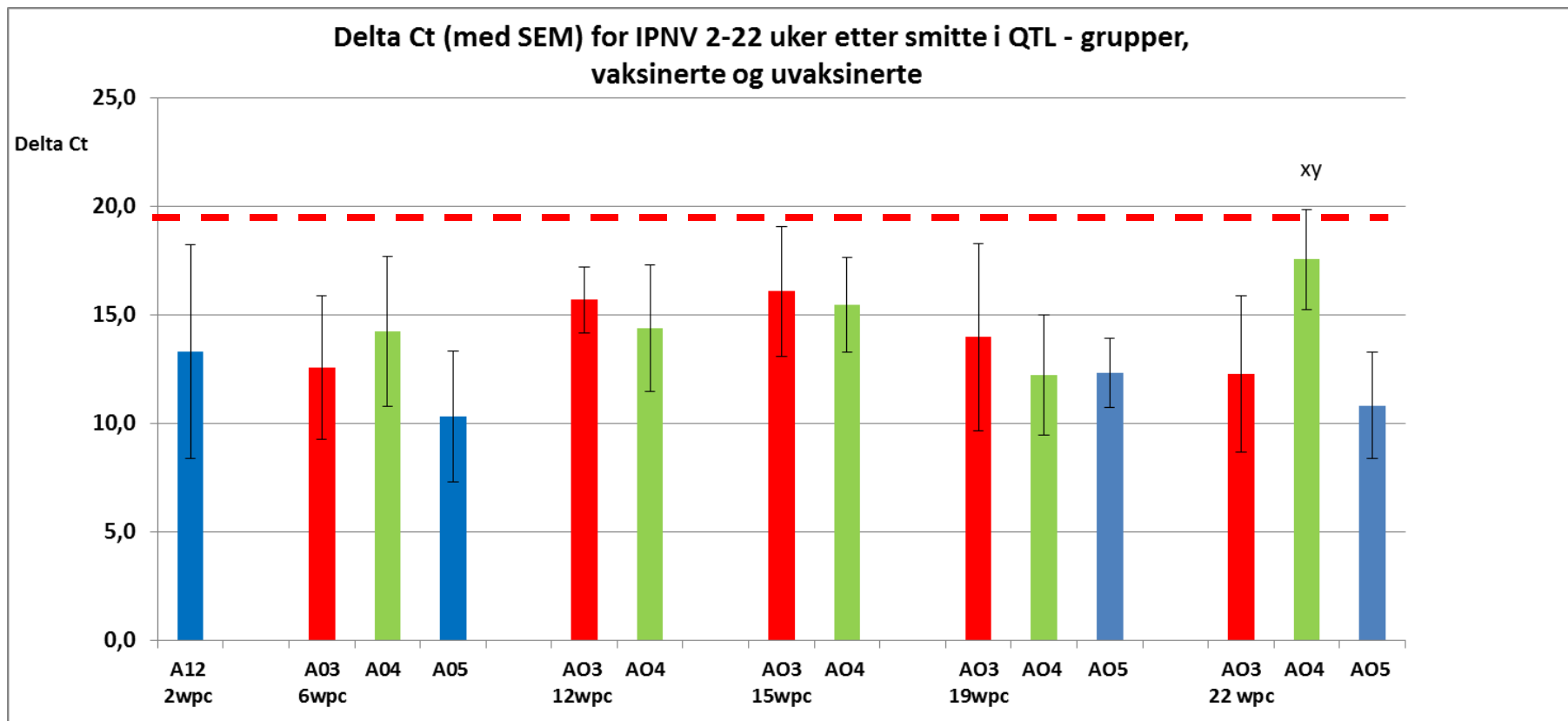
Antall positive



Titer (log)

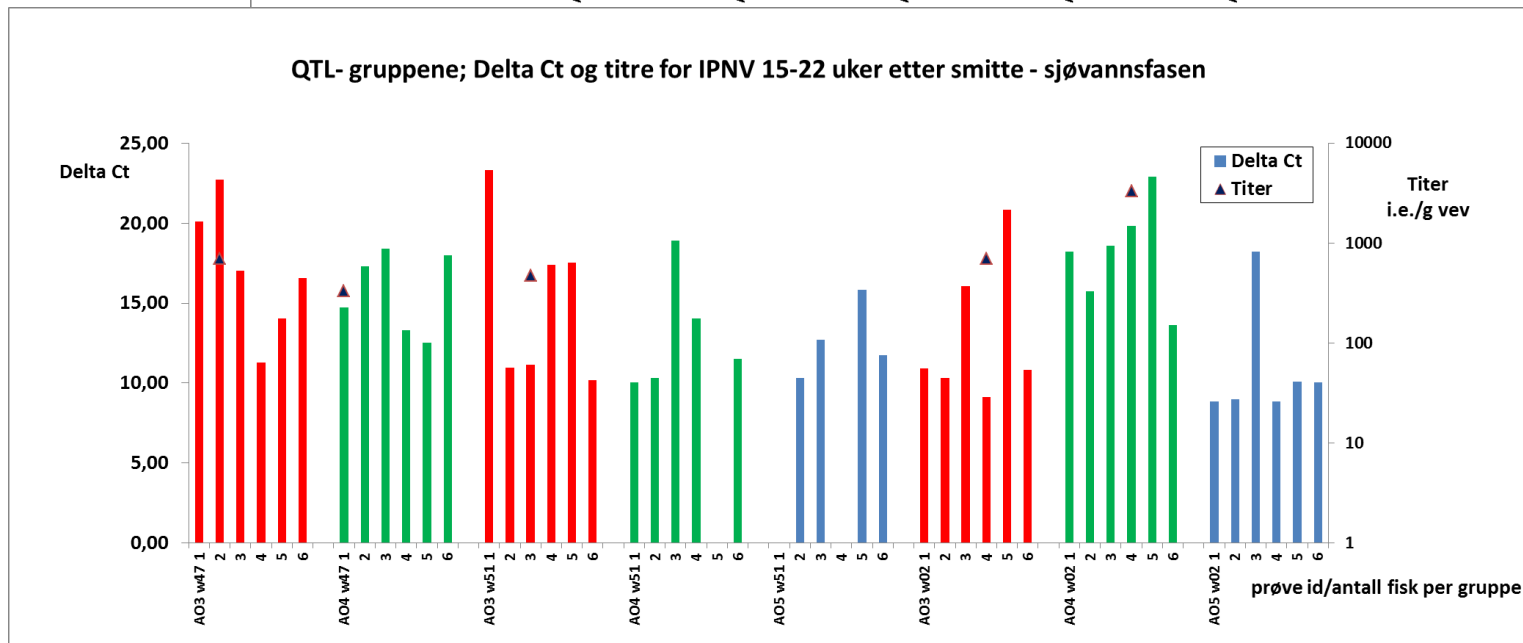
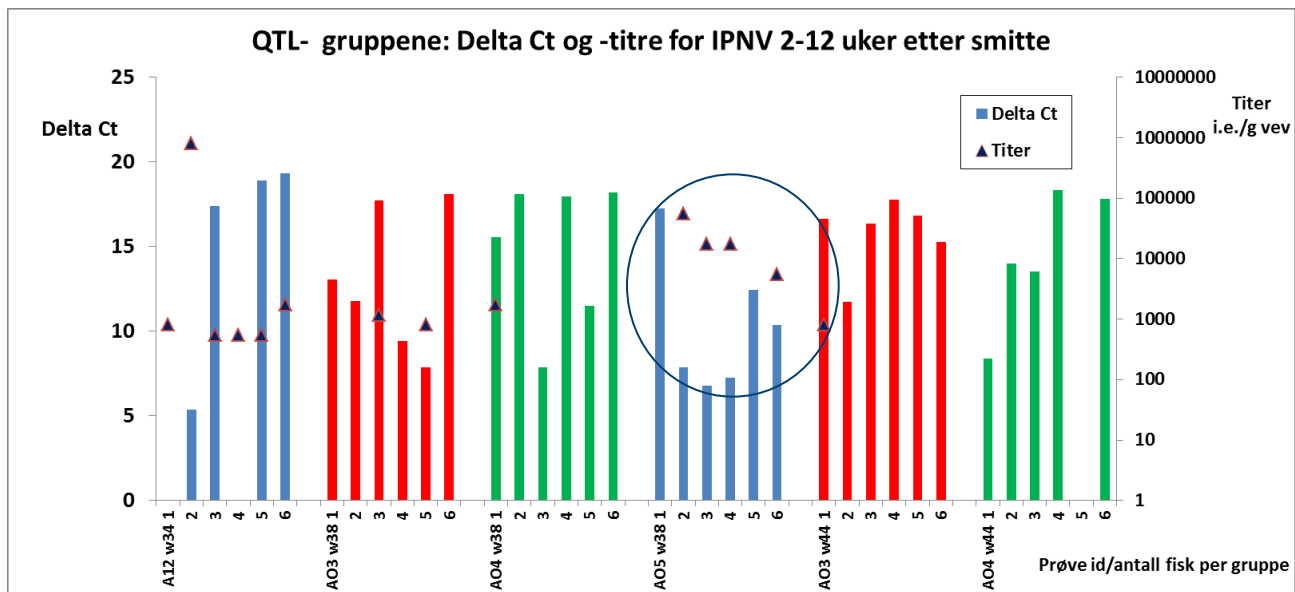


IPNV påvisning ved Real time RT-PCR i QTL - gruppene



- Uvaksinert
- Vaksinert IPNV
- Vaksinert

- Uvaksinert
- Vaksinert IPNV
- Vaksinert



IPNV smitte: Foreløpige resultater

- Fisken ble infisert med IPNV etter badsmitte i ferskvann
 - Gjelder både vaksinerte og uvaksinerte grupper og både QTL- og QTL+ fisk
- På gruppenivå ble det etablert en langvarig bærertilstand
 - Ingen reaktivering av viruset som gav økende virusmengder eller påvisbar sykdom etter overføring til sjøvann.
- Real time RT-PCR synes å være mer sensitiv enn titrering
 - IPNV transkripter funnet i langt flere fisk enn det ble påvist infeksiose viruspartikler ved titrering
 - God korrelasjon mellom metodene ved høye titre (over 10000 iu/g vev);
 - Prøver med høye IPNV titre har de laveste Ct verdiene, dvs størst mengde IPNV transkripter.
 - Dårlig korrelasjon mellom metodene ved lavere titre.
 - Virus (transkripter) kun påvisbar med Real time RT-PCR

Histologisk undersøkelse av hjerter fra HSMB smittede fisk

3, 7 og 10 uker etter smitte, 6 fisk/gruppe/tidspunkt
Totalt 20 grupper/360 hjerteprøver undersøkt

HSMB positive prøver:

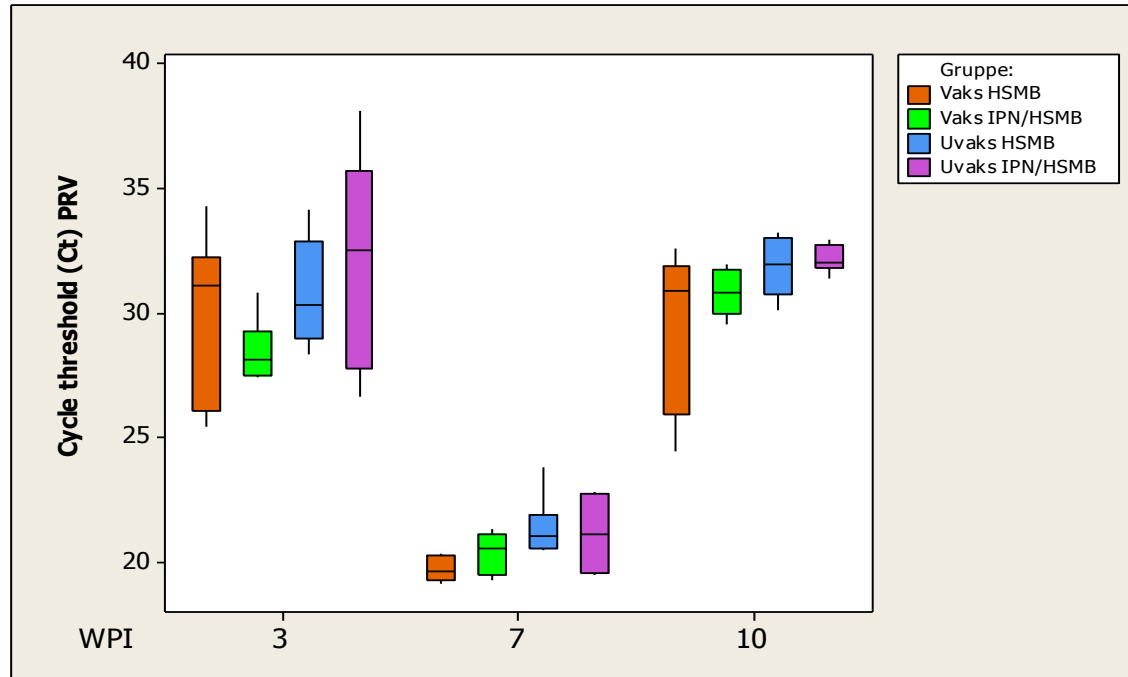
3 uker: 1/60 (vaksinert QTL-)

7 uker: 59/60

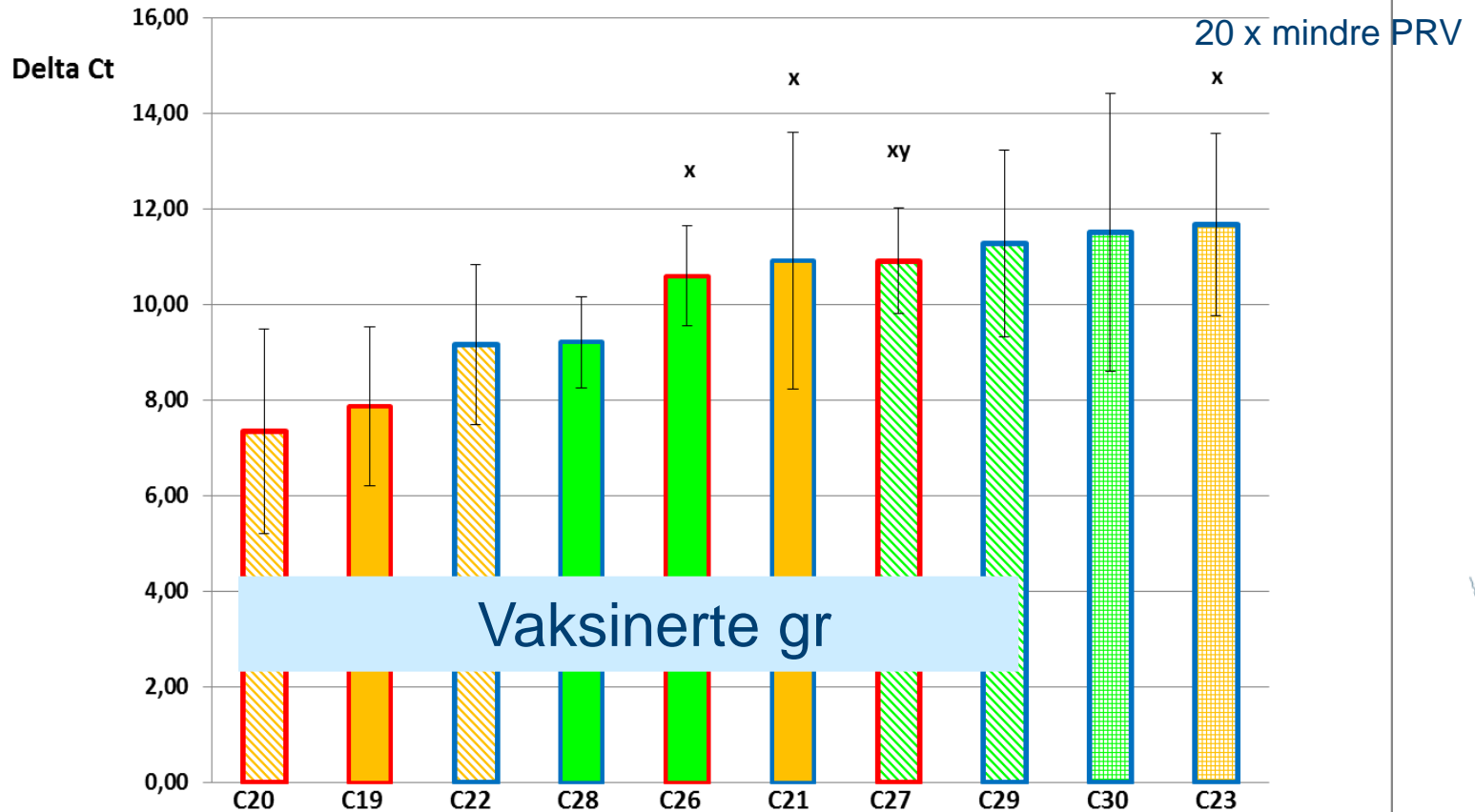
10 uker: 50/60

Kun funnet endringer forenelig med HSMB i fisk i.p. smittet med PRV positivt hjertehomogenat

PRV Ct- verdier 3, 7 og 10 uker etter smitte i QTL- gruppene



Delta Ct verdier PRV 3 uker etter HSMB smitte



QTL+/vaks u. IPNVAg

QTL-/vaks u. IPNVAg

QTL+/vaks m. IPNVAg/+IPNVsmitte

QTL+/ vaks u. IPNVAg /+IPNV smitte

QTL-/uvaks/+IPNV smitte

QTL+/vaks m. IPNVAg

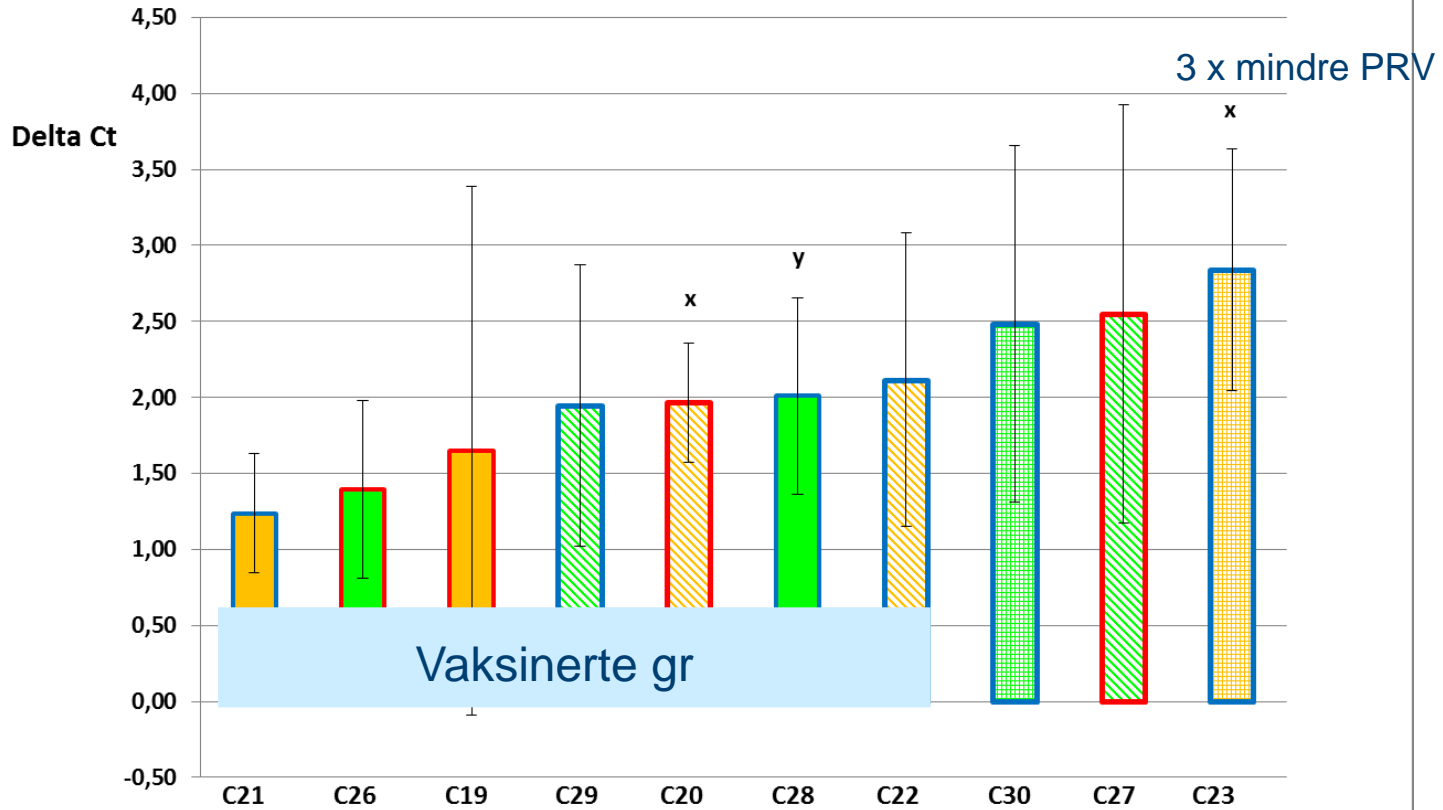
QTL-/ vaks m. IPNVAg/+IPNV smitte

QTL-/ vaks m. IPNV Ag

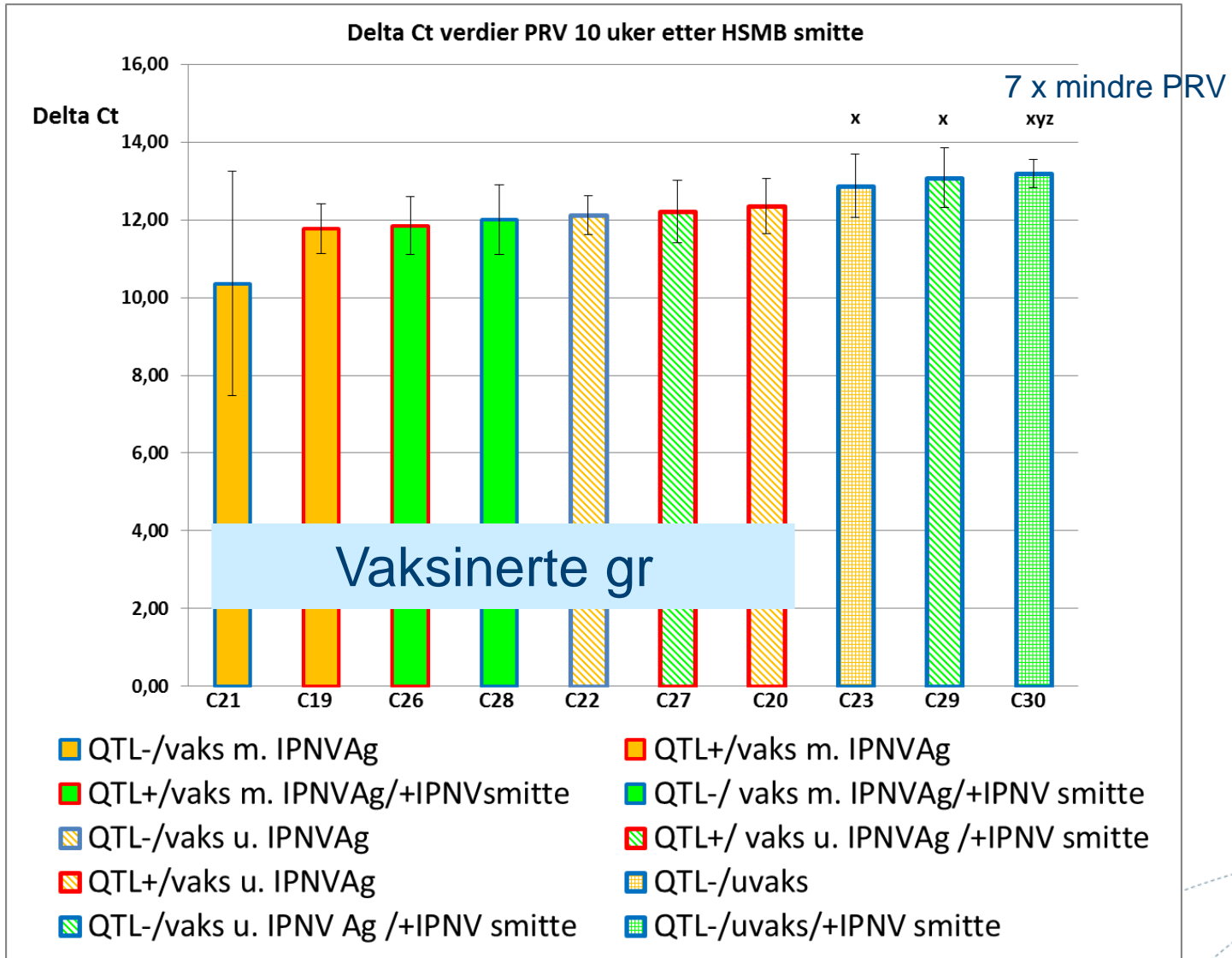
QTL-/vaks m. IPNV Ag /+IPNV smitte

QTL-/uvaks

Delta Ct verdier PRV 7 uker etter HSMB smitte



- QTL-/ vaks m. IPNV Ag
- QTL+/vaks m. IPNVAg
- QTL+/vaks u. IPNVAg
- QTL-/vaks u. IPNVAg
- QTL+/ vaks u. IPNVAg /+IPNV smitte
- QTL+/vaks m. IPNVAg/+IPNVsmitte
- QTL-/vaks m. IPNV Ag /+IPNV smitte
- QTL-/ vaks m. IPNVAg/+IPNV smitte
- QTL-/uvaks/+IPNV smitte
- QTL-/uvaks



Foreløpig oppsummering, HSMB smitteforsøk

-Alle gruppene utvikler HSMB etter smitte og følger noenlunde samme forløp med hensyn til utvikling av mengde PRV transkripter 3, 7 og 10 uker etter smitte.

- QTL status har ikke betydning
- Vaksinasjon har ikke betydning
- IPNV smitten som ble utført i FV, 12 uker før HSMB smitten, påvirket ikke utviklingen av HSMB.
 - IPNV bærertilstand med lave titre påvirker ikke forløpet av sekundær infeksjon

-Syv uker etter smitte:

- Høyest PRV mengder påvist
- 59/60 undersøkte fisk fikk HSMB diagnose

-Noen forskjeller observert gruppene i mellom.

- uvaksinert fisk har lavere mengder PRV transkripter på alle tidspunkt sammenlignet med vaksinert fisk.

Feltstudiet:

Sammenheng mellom IPN/IPNV status, QTL status og infeksjon med PRV på utbrudd på laks i sjøfasen

-Undersøkes vha data som allerede er tilgjengelig

-Utbruddsdata (Veterinærinstituttet)

-IPNV/PRV screeningdata (PatoGen/oppdrettsselskaper)

-Havbruksdata (produksjonsfaktorer)

-Info om IPN i settefiskfasen (fra smoltprodusenter)

-QTL status på lokalitetsnivå (info fra AquaGen/oppdrettere)

-Opphav til fiskegrupper på lokaliteter (oppdrettere)

-kan følge de fra settefisk til sjø

-Screening for PRV og IPNV: Bruke enten allerede innsamlede prøver eller prøver for fra nytt overvåkingsprogram for SAV i Midt Norge; analysere prøver for IPNV og PRV (i samarbeid med PatoGen, oppdrettsselskaper)

Foreløpige resultater

Sammenheng mellom IPN og HSMB

- Utbruddsdata januar 2009 - desember 2011.
- Totalt 659 utsett, alle slaktet før desember 2011
 - 152 fikk IPN
 - 134 fikk HSMB
 - 61 fikk begge deler

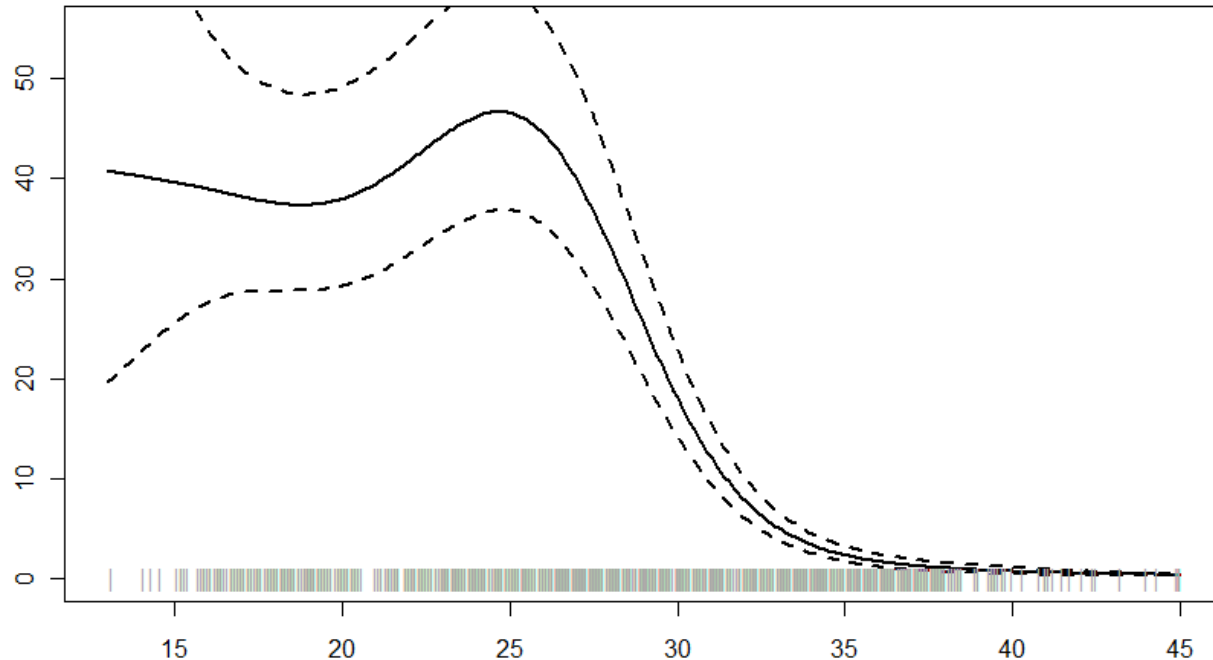
Har et utsett hatt IPN har det større sannsynlighet for å få HSMB ($p < 0.001$ chi-square test)

Sammenheng mellom PRV og HSMB

Datsett fra Patogen og VI's egne.

PRV Ct-verdier sammenlignet med sannsynligheten for å få HSMB.

**Oddsratio
for å få HSMB**



Ct-verdi

-Lav Ct verdi gir ca 40 x så stor oddsratio for å ha HSMB enn hvis Ct verdien er lav.

-Analyse kun med prøver med positiv Ct verdi:

-oddsratio for å ha HSMB er 3 x så høy hvis Ct verdi er mindre enn 25.

Dødelighet ved IPN og HSMB-utbrudd

Data = utsett fra januar 2010 tom august 2011.

-registrert utbrudd fem første mnd i sjø

-registrert dødelighet på hvert av anleggene og i alle merdene på disse tidspunktene.

Tester med ulike indikatorer som utfall:

-På merdnivå:

-Merd med max dødelighet i en enkelt måned.

IPN lokalitet	Andre lokaliteter	
20.2%	8.6%	$p < 0.001$

-Merd med max gjennomsnittlig dødelighet over alle 5 månedene.

IPN lokalitet	Andre lokaliteter	
8.2%	2.8%	$p < 0.001$

På lokalitetsnivå:

-Max dødelighet i en enkelt måned:

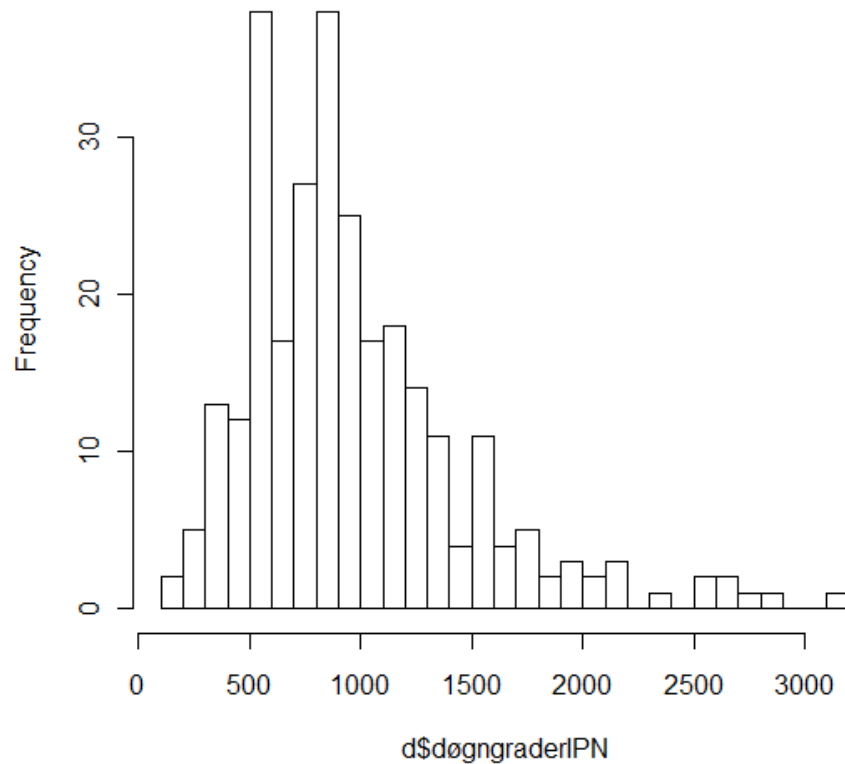
IPN lokalitet	Andre lokaliteter	
8.2%	3.7%	p<0.001

-Gjennomsnitt dødelighet over alle fem månedene:

IPN lokalitet	Andre lokaliteter	
3.0%	1.3%	p<0.001

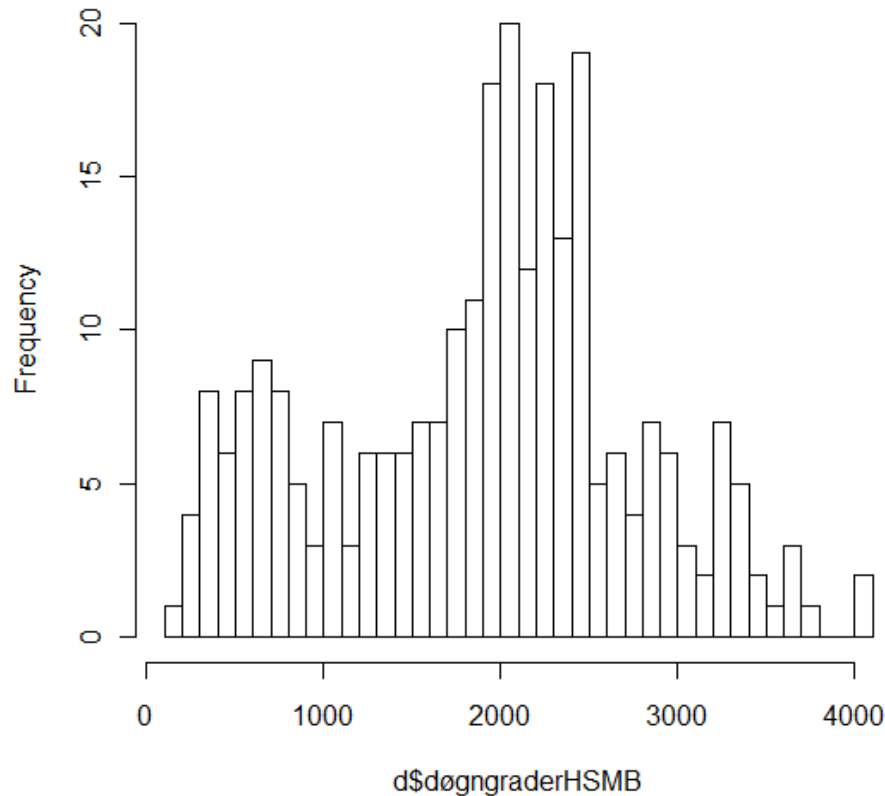
Alle 4 utfall: Signifikant forskjell i dødelighet mellom lokaliteter som får IPN og lokaliteter som ikke får IPN

Sammenheng mellom døgngrader og IPN-utbrudd.



For IPN skjer de fleste utbruddene mellom 500 og 1500 døgngrader. Ingen forskjell mellom vår- og høstutsett – (gjenstår å gjøre mer detaljerte analyser på dette)

Sammenheng mellom døgngrader og HSMB-utbrudd.



HSMB utbrudd skjer oftest mellom ca 1800-2500 døgngrader. Dette gjelder uansett om det er vår- eller høstutsett.

Foreløpige konklusjoner- epidemiologisk analyse

- Har et utsett hatt IPN, er det større sannsynlighet for å få HSMB.
- Utsett med lav PRV Ct verdi (dvs høy virusmengde) har høyere odds for å ha HSMB enn utsett med høy PRV Ct verdi (lav virusmengde).
- Dødeligheten i utsett er høyere de fem første månedene i sjø, hvis fisken har hatt IPN i perioden.
- IPN-utbrudd (i sjøfasen) skjer oftest mellom 500 og 1500 døgngrader
- HSMB-utbrudd skjer oftest mellom 1800 og 2500 døgngrader

Anbefaling:

- **Ha kontroll med IPNV for å redusere tap i sjø!**