

FHF prosjekt nr 900658: Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett

Prosjektperiode høsten 2011- våren 2015



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



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



Nina Santi



Vidar Aspehaug

Styringsgruppe:

Kristin Ottesen, HaVet fiskehelse (leder)

Olav Breck, Marine Harvest

Nina Santi, AquaGen AS

Vidar Nikolaisen, Lerøy Seafood Group (avløst av Håvard Hårstad; avløst av Eirik Monsen)

Arne Guttvik, Salmar

Merete B. Schrøder, FHF (observatør)

Samarbeid med pågående HSMB prosjekter finansiert av NFR og FHF

Hovedmål

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

Delmål:

- Evaluere effekten av ulike variabler på utviklingen av HSMB;
 - genetisk resistens mot IPN
 - IPNV bærer status og reaktivering
 - vaksinerings
 - kombinasjoner av disse
- Evaluere relasjoner i felt mellom IPN status (QTL+/- fisk, IPNV bærerstatus, IPNV reaktivering) i laks i sjøfasen og utbrudd/virustitre av HSMB/PRV
- 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

Gjennomføring av prosjektet:

Delt i 2 arbeidspakker:

- AP1 Eksperimentelt modellstudie
- AP2 Feltstudie.

Arbeidspakke 1:

1. Eksperimentelt smitteforsøk ved Havbruksstasjonen i Tromsø:
 - Vaksinert (med kommersielle vaksiner) og uvaksinert fisk, med og uten IPN QTL
 - a) Smitte og etablering av IPNV bærertilstand i ferskvann
 - b) smitte med PRV ved overføring til sjøvann
 - også grupper med dobbeltinfeksjon IPNV og PRV
2. Genekspresjonsanalyser av laks før, under og etter smoltifisering
 - Fokus på immunfunksjoner i usmittet fisk og fisk smittet med PRV
3. Genekspresjonsanalyser – sammenligning av PD og HSMB

1. Eksperimentell smittestudie

- Infeksiøse virus og IPNV transkripter ble påvist i hele forsøksperioden (ferskvann og sjøvann) på 22 uker
 - Vaksinert IPN QTL fisk hadde lavere prevalens og lavere mengder virustranskripter enn vaksinert og uvaksinert fisk uten IPN QTL
- Ingen reaktivering av IPNV (økende virusmengder, påvisbar sykdom) påvist etter overføring til sjøvann.
 - Tidligere vist i flere eksperimentelle forsøk (Stangeland et al 1996, Johansen et al 2001, 2009, Julin et al 2014).
- Uventet resultat; førte til at en ikke kunne konkludere på problemstillinger som:
 - evaluering av effekten av vaksinerings av IPN QTL laks mot IPN
 - evaluering av effekten av klinisk IPN på utvikling av HSMB

Forts. eksperimentell smittestudie

-God smittemodell for HSMB etablert;

- 59 av 60 undersøkte fisk diagnostisert med HSMB 7 uker etter smitte
- høye virusmengder, hjertepatologi (histologisk undersøkelse)

-HSMB utviklet seg likt i:

- IPNV bærere og ikke-bærere

-En bærertilstand med lave IPNV titre påvirker ikke utviklingen av HSMB

- Fisk med og uten IPN QTL

-IPN QTL fisk er ikke beskyttet mot HSMB

-Multikomponentvaksiner med IPNV antigen gir ikke uspesifikk beskyttelse mot HSMB

-Ingen økning i IPNV mengder i HSMB smittet fisk

-HSMB påvirker ikke en bærertilstand av IPNV

2. Transkriptomanalyser av prøver fra oppdrettslaks før, under og etter smoltifisering (ferskvann og sjøvann)

a) under normale oppdrettsbetingelser:

-Smoltifiseringen reduserte viktige immunfunksjoner –spesielt antiviral immunitet

-Ingen bedring ble observert 3 uker etter sjøvannsoverføring

-Resultatene kan forklare økt mottagelighet for sykdom i tidsrommet rett etter sjøvannsoverføring

Forts 2. b) HSMB i parr og smolt: Transkriptomanalyser av HSMB smittet laks i ferskvann og sjøvann

- Under smoltifiseringen var immunforsvaret noe nedregulert (under normale oppdrettsbetingelser)
- Immunresponsen mot HSMB ble aktivert raskere i parr enn i smolt
- Smoltifisering kan redusere beskyttelsen mot HSMB

Konklusjon av studie a og b: Smoltifisering påvirker immunforsvaret hos oppdrettslaksen negativt!

Spørsmål som gjenstår:

- Ulik grad av nedregulering av immunforsvaret er observert under og etter smoltifisering– hvorfor?
 - Stamme- eller familieforskjeller?
 - Forskjeller i oppdrettsbetingelser?
- Hvor lenge varer nedreguleringen etter overføring til sjø?
- Hvilken effekt har dette på sykdomsresistensen?

3. Sammenligning av genresponser ved PD og HSMB i Atlantisk laks

	HSMB	PD
Forløp	Sakte	Moderat raskt
Medfødte antivirale responser	Moderat	Sterk
Betennelsesreaksjoner	Lik mht karakter og styrke	
Lymfocytt differensiering	Lik mht karakter og styrke	
T-celler	Sterk (cytotoksisk)	Svak
B-celler, Immunoglobuliner	Sterk	Svak
Virusmengder relatert til patologi og genuttrykk (hjerte)	Svak	Sterk

-PRV infeksjonen gav en sterkere adaptiv immunrespons enn SAV infeksjonen, mens den medfødte immunresponsen var sterkest ved en SAV infeksjon.

-Resultatene gir viktig bakgrunnskunnskap om immunresponsene ved de respektive infeksjonene som kan være nyttig i forhold til utvikling av vaksiner

-Gener som er sykdomspesifikke ble identifisert

-kan danne grunnlag for bruk som markører i tidlig-diagnostikk

Arbeidspakke 2:

Evaluere relasjoner i felt mellom IPN status (QTL+/- fisk, IPNV bærerstatus, IPNV reaktivering) i laks i sjøfasen og utbrudd/virustitre av HSMB/PRV

Undersøkt i fire delpakker:

- Statistisk analyse av risikofaktorer for HSMB
- Statistisk analyse av risikofaktorer for IPN-utbrudd og dødelighet ved IPN-utbrudd
- Undersøkelse av Infeksjonstidspunkt for PRV, HSMB inkubasjonsperiode og HSMB-assosiert mortalitet, samt effekten av IPNV og SAV koinfeksjoner
- Molekylærepidemiologisk analyse av reaktivering av IPNV i sjø

Arbeidspakke 2: Statistisk analyse av risikofaktorer for HSMB

• Resultat:

- Infeksjonspress er den viktigste faktor for utvikling av HSMB i felt
- Små fisk er mer mottakelige enn store fisk
- I tillegg til lokalt infeksjonspress, var det store forskjeller mellom sør-, midt,- og nord i forhold til risiko for HSMB
- Det ble utviklet en modell som beregner risikoen for HSMB i hver enkelt kohorte

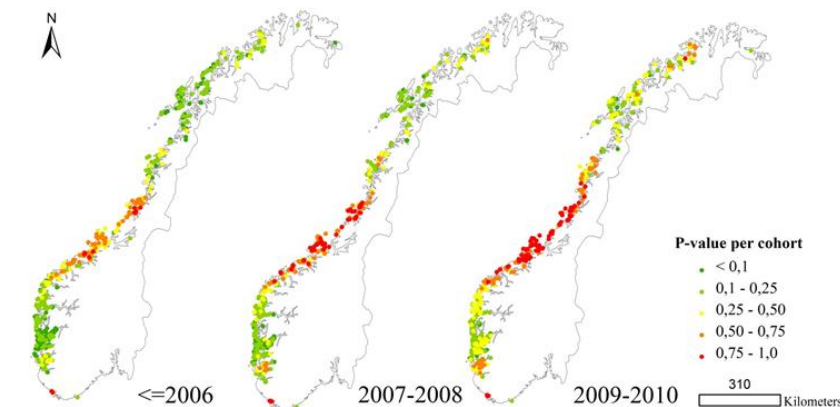
• Nytteverdi:

- Siden infeksjonspress er så viktig for utviklingen av HSMB, vil den mest effektive måten å begrense sykdommen være å fjerne infiserte kohorter eller å bruke vaksinasjon for å minske smittepresset

• Metode:

- Data innsamlet fra havbruksregistret og VI på alle kohorter sjøsatt mellom 2002 og 2009
- Design av logistisk regressjonsmodell basert på disse data.

- Mer info: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.012>



Arbeidspakke 2: Statistisk analyse av risikofaktorer for IPN-utbrudd og dødelighet ved IPN-utbrudd

- **Resultat:**

- Risiko for IPN-utbrudd i sjø –se figur:

- **Nytteverdi:**

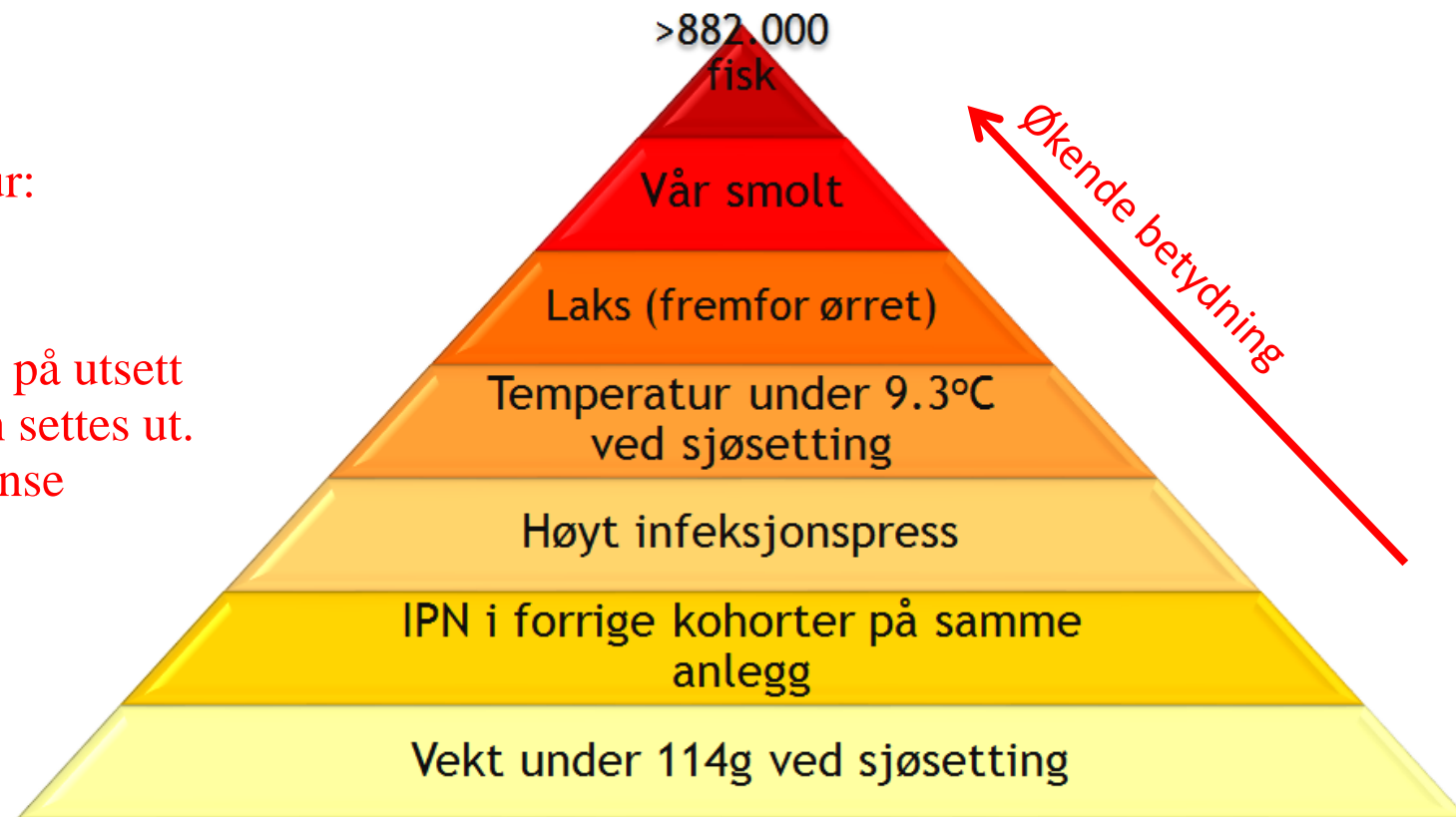
- Oppdretteren kan selv styre størrelse på utsett og fisk samt type smolt og når den settes ut.
- Som for HSMB er det viktig å begrense infeksjonspresset

- **Metode:**

- Data innsamlet fra havbruksregistret og VI på alle kohorter sjøsatt mellom 2009 og 2012
- Design av logistisk regressjonsmodell basert på disse data.

- **Mer info:**

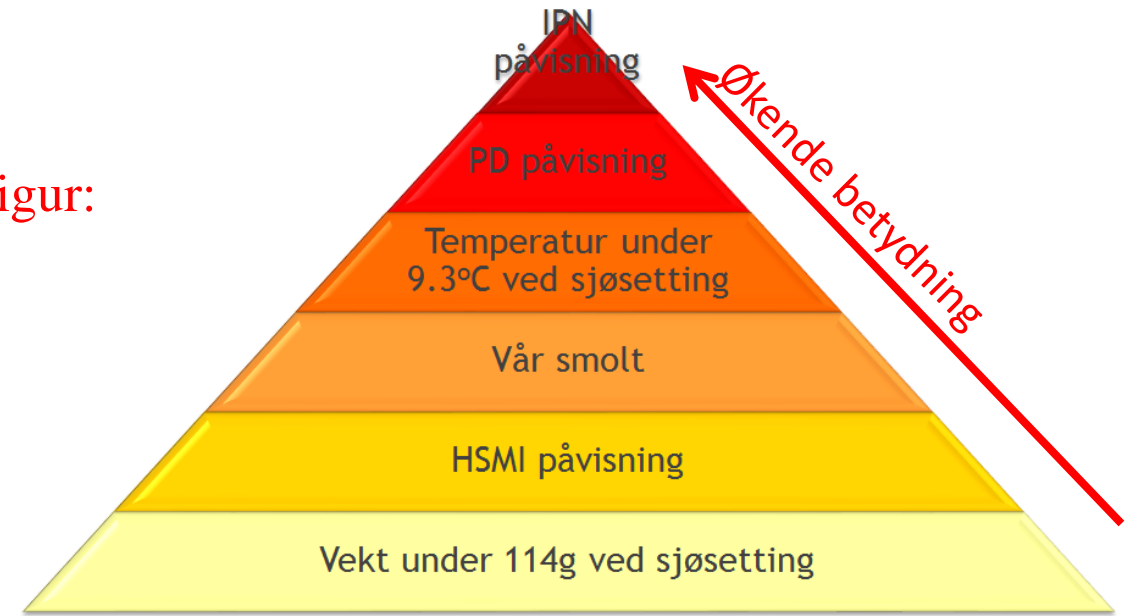
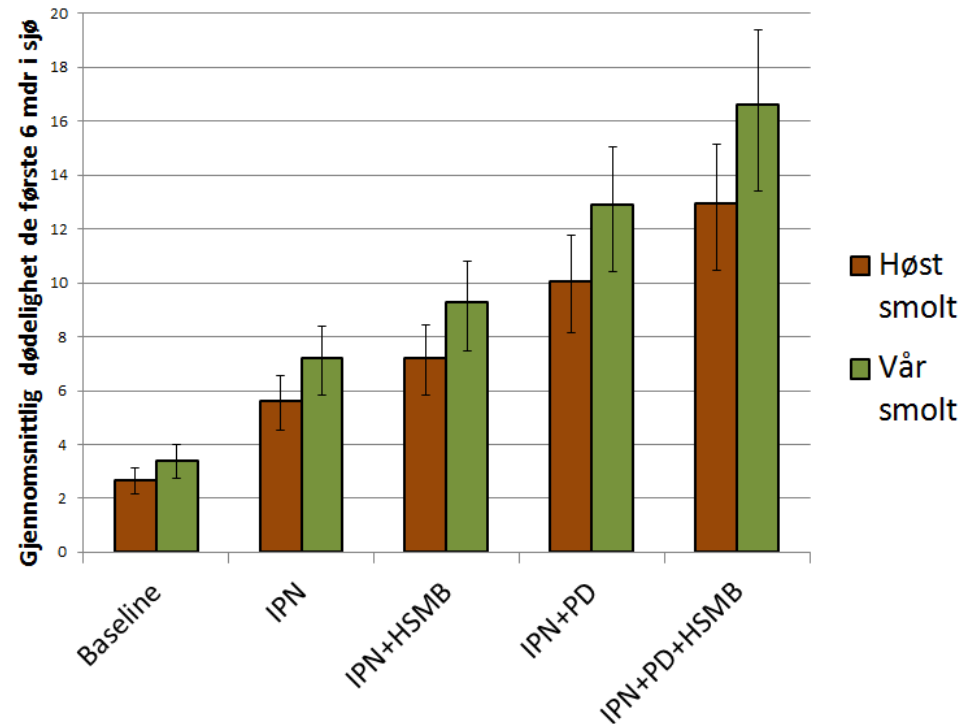
- http://www.int-res.com/articles/dao_oa/d114p177.pdf



Arbeidspakke 2: Statistisk analyse av risikofaktorer for IPN-utbrudd og dødelighet ved IPN-utbrudd

• Resultat:

- Risiko for økt dødelighet første 6 mdr i sjø –se figur:
- Betydning av koinfeksjoner:



• Nytteverdi:

- Mortalitet avhenger ikke bare av IPN eller ikke – kombinasjon med andre sykdommer har mye å si
- Å kontrollere en sykdom vil redusere effekten av andre

• Metode & Mer info: Se forrige slide

Arbeidspakke 2: Undersøkelse av infeksjonstidspunkt for PRV, HSMB inkubasjonsperiode og HSMB-assosiert mortalitet, samt effekten av IPNV og SAV ko-infeksjoner

• Resultat:

- Alle de studerte utsettene fikk PRV påvist og/eller en HSMB diagnose
- Tidsintervallet mellom utsett og PRV-påvisning, samt mellom PRV-påvisning og HSMB-utbrudd, varierte betydelig i studiematerialet
- Det kunne ikke påvises noen effekt av koinfeksjoner med SAV eller IPNV i dette materialet

• Nytteverdi:

- Resultatene støtter hypotesen om utbredt PRV infeksjon på utsettene
- Det er stor variasjon i tidspunkt for PRV infeksjon, samt i tidsintervall mellom PRV påvisning og HSMB diagnose

• Metode:

- Benyttet prøvemateriale som allerede var innsendt til Patogen Analyse AS for SAV screening og/eller IPNV screening. Prøvene ble i tillegg screenet for PRV
- Resultatene av SAV-, IPNV- og PRV-screening inkludert i studiet
- Spørreskjema benyttet for å innhente tilleggsinformasjon fra lokalitetene

Arbeidspakke 2: Molekylærepidemiologisk analyse av reaktivering av IPNV i sjø

- **Resultat:**

- Eksistensen av husstammer av IPNV i settefiskanlegg er bevist med statistisk signifikans
- Det er bevist med molekylærepidemiologiske metoder, at den samme virussekvensen følger med smolten fra settefiskanlegget til sjøen

- **Nytteverdi:**

- Sanering av settefiskanlegg for å bli kvitt husstammer er det viktigste tiltaket for å redusere IPN i norsk lakseoppdrett
- Screening av stamfisk for å unngå transmission av IPNV til settefisken er et annet viktig tiltak

- **Metode:**

- Statisk analyse av forskjellene mellom 113 IPNV sekvenser fra settefisk og matfisk

Publikasjoner fra prosjektet:

A.B. Kristoffersen, B.B. Jensen , P.A. Jansen 2013: Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming. Preventive Veterinary Medicine, 109; 1–2, 136–143

Ingrid Moan 2013: Masteroppgave med tittel «Studier av HSMB i Atlantisk laks – effekter av IPNV og vaksinasjon på utviklingen av HSMB *i vivo* og etablering av primærkulturer av hjerteceller for dyrking av PRV *in vitro*» (UiT Norges Arktiske Universitet, Tromsø)

Johansen L-H og Krasnov A 2015: «Immunsystemet svekket hos laksesmolt» NF Expert/ Norsk Fiskeoppdrett januar 2015.

L-H Johansen et al 2015: Comparison of transcriptomic responses to pancreas disease (PD) and heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Journal of Fish and Shellfish Immunology (<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.023>)

Britt Bang Jensen & Anja B. Kristoffersen, 2015: »Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming». Diseases of Aquatic Organisms Vol. 114: 177–187 (http://www.int-res.com/articles/dao_0a/d114p177.pdf).

Lill-Heidi Johansen, Britt Bang-Jensen, Mona Dverdal Jansen, Torunn Taksdal og Aleksei Krasnov 2015. Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett, Rapport 32/2015.