

**VALIDERING OG STANDARDISERING AV BADSMITTE-
MODELL MED IPNV FOR Å TESTE EFFEKT AV
KOMMERSIELLE IPN-VAKSINER TIL BRUK PÅ
ATLANTISK LAKS.**

**Faglig sluttrapport, NFR-prosjekt 150781/120
September 2003-29-09**

**Prosjektleder: Anne Ramstad
VESO Vikan, Vikan, 7800 NAMSOS**

Innledning

IPN har de siste åra vært en av de mest tapsbringende sjukdommer i norsk oppdrettsnæring. Vaksineprodusentene har i flere år arbeidet med utvikling av vaksiner mot IPN. Hittil har det vært få muligheter til å teste disse produktene under kontrollerte laboratoriebetingelser på batch-nivå. Dette er et ønske fra produsentene selv og regulerende myndigheter (Statens Legemiddelverk). Foruten i tidsrommet etter startfôring er det bare rett etter sjøsetting (smoltifisering) at laksen er mottakelig. Det er derfor nødvendig å lys- og temperaturmanipulere laks for å framprovosere frem smoltifisering flere ganger i året. I dette prosjektet ble det benyttet laks, lysmanipulert fire ganger gjennom et år, vaksinert og smittet etter samme regime.

Gjennomføring

Forsøksfisk var atlantisk laks fra VESO Vikan klekkeri av to årsklasser. (2001 og 2002) Befruktet øyerogn var levert av Aquagen.

Hvert vaksinasjons - og smitteregime ble gjennomført på samme måte.

Vaksinasjon - og immunisering ble utført i VESO Vikan klekkeri. Deretter ble fisken transportert til VESO Vikan for smitte.

I hvert forsøk ble fisk vaksinert i fire vaksinegrupper (derav 3 vaksiner med IPNVantigen). Den fjerde gruppen ble vaksinert med en multivalent vaksine uten IPNVantigen, og en femte gruppe ble injisert med saltvann (kontroll). Det ble vaksinert 250 fisk i hver gruppe og disse ble fordelt likt i to parallelle kar. Fisken hadde denne fordeling ble holdt slik til smitte var gjennomført.

I immuniseringsperioden ble det benyttet et standardisert lysprogram med 6 uker vinterstimulering og 6-8 uker sommerstimulering. Vaksinasjon ble utført i siste uke av vinterstimuleringsperioden.

Vanntemperaturen i immuniseringsperioden varierte mellom 2 og 16^o C i klekkeriet da det ikke var etablert et temperaturreguleringssystem. Antall døgngrader var følgelig forskjellig i de fire forsøkene.

Når fisken ble vurdert til å være klar for sjøvann (oppfølging med kloridtester) ble den transportert til VESO Vikan med bil.

Fisken ble overført til sjøvann dagen før smitte. Smittemateriale var 1. passasje IPNV (V-1244) produsert ved Veterinærinstituttet i Oslo. Virus er isolert fra et IPN-utbrudd på smolt i desember 2001, og er tidligere karakterisert av NVH (Øystein Evensen) som et høyvirulent isolat.

Groups	Treatment	Tank 1	Tank 2
A, B, C	Vaccine including IPNV antigen	3 x 125	3 x 125
D	Vaccine without IPNV antigen	125	125
E (control)	Saline	125	125
Total number of fish per tank		625	625

Smitteprosedyre:

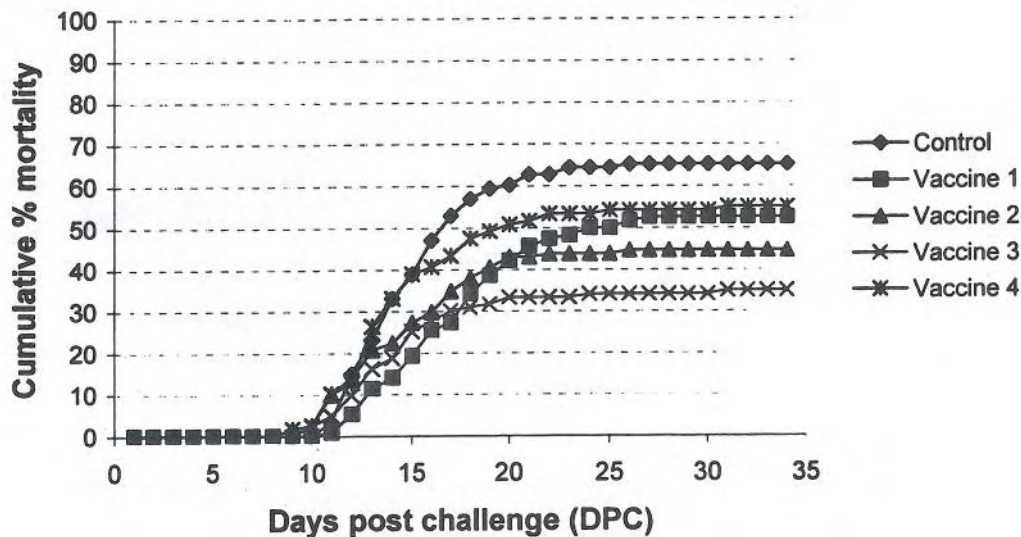
Vannstand ble tappet ned til et lavt nivå uten å stresse fisken. Virus ble tilsatt, og vannet luftet under bading. Etter en time ble normal vanngjennomstrømming gjenopprettet.

Viruskonsentrasjon blir titrert og regnet ut i ettertid da vi benyttet første passasje. Vanntemperatur i challengeperioden var 12^o C.

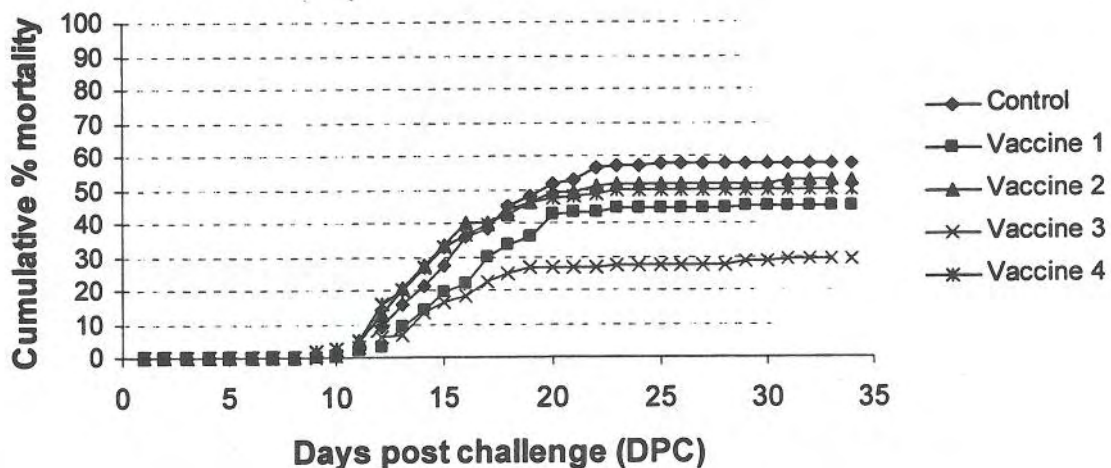
Etter smitte ble dødelighet registrert daglig etter standard prosedyrer i ca. 35 dager. Verifisering av IPN som dødsårsak ble gjort vha koagglutinasjonstest (T. Taksdal et co. 1999) på et representativt utvalg av fisken som døde. I 2., 3. og 4. smitterunde døde 1-10 fisk i enkelte av gruppene i løpet av de første dagene. Dette var parr som døde pga dårlig sjøvannstoleranse. Disse ble tatt ut i etterfølgende beregninger av relativ beskyttelse (RPS).

Resultater

1. challenge (25.04.02) - tank 1
 Bath conc. $1.25 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 120 g Day degrees: 384

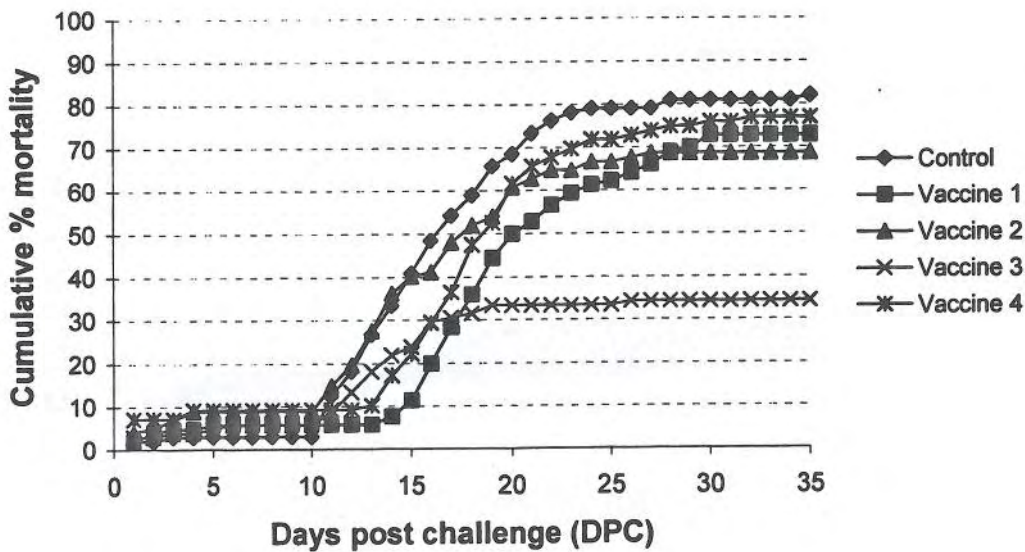


1. challenge (25.04.02) - tank 2
 Bath conc. $1.25 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 120 g Day degrees: 384

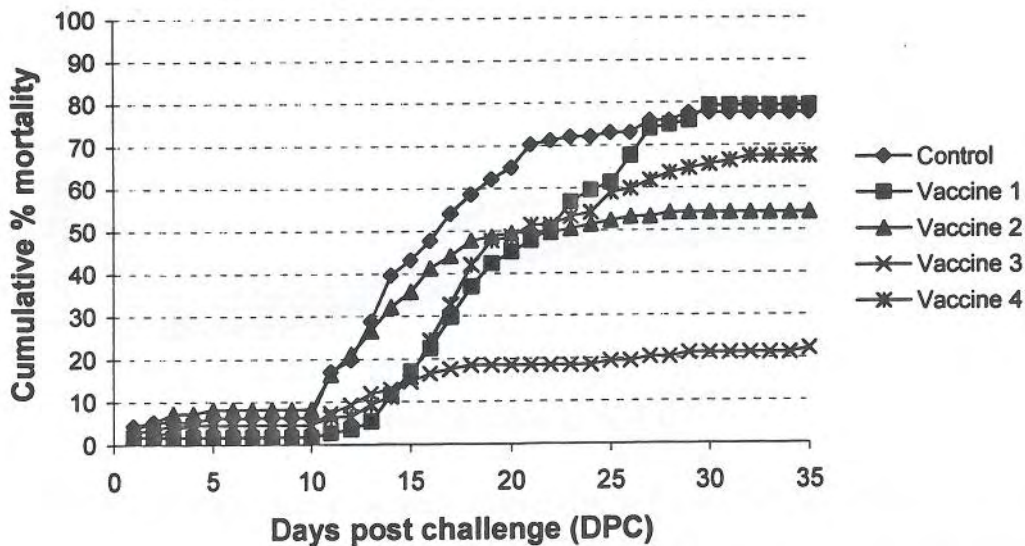


I første smitterunde startet dødeligheten på dag 11, og varte i ca. 14 dager. Kontrolldødelighet ble hhv. 65,3% og 57,9% i de to parallelle karene. Den beste av IPN-vaksinene (Vaccine 3) fikk hhv 35,0% og 29,2% dødelighet, mens den multivante vaksinen og de to andre IPN-vaksinene plasserte seg nokså likt rundt 40-50% dødelighet.

2. challenge (05.09.02) - tank 1
 Bath conc. $1.2 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 70 g Day degrees: 1044

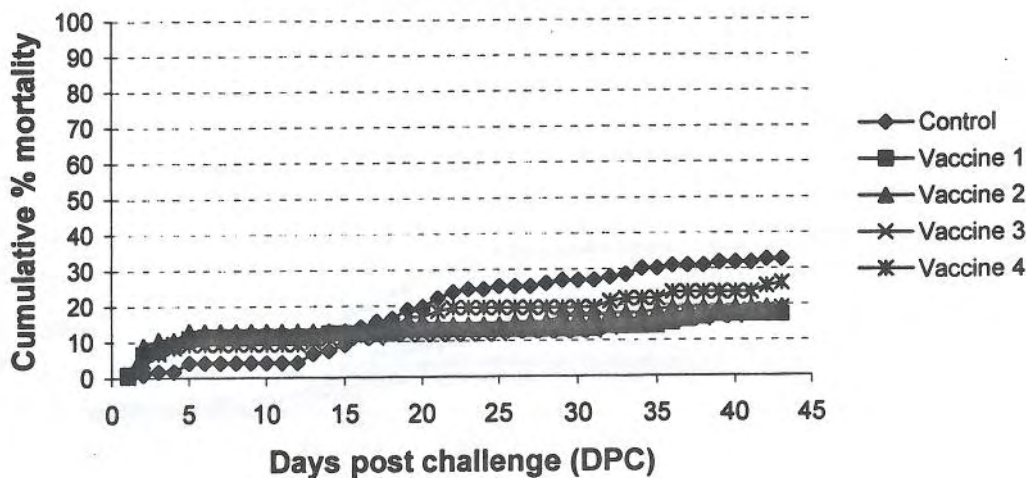


2. challenge (05.09.02) - tank 2
 Bath conc. $1.2 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 70 g Day degrees: 1044

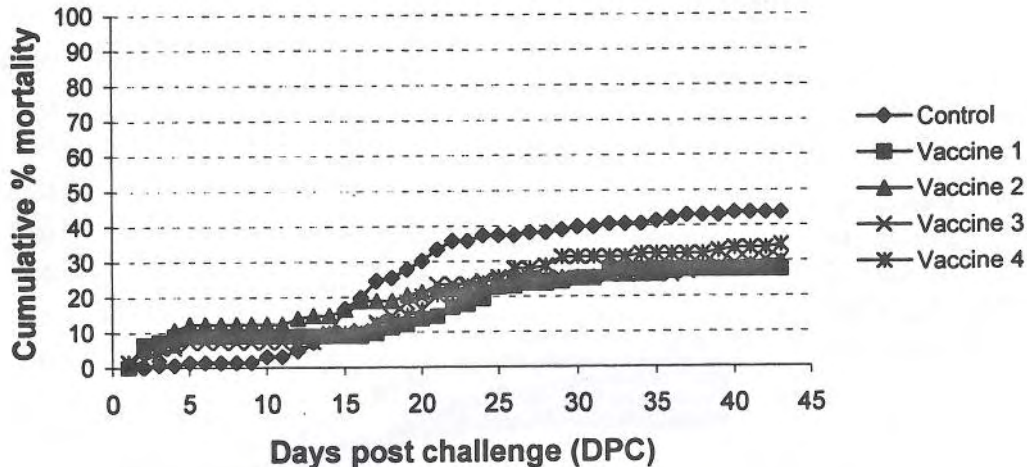


I 2. smitterunde døde 1-7 parr i enkelte grupper etter overføring til sjøvann. Disse ble tatt ut i RPS-beregninger. IPNdødeligheten startet dag 11 og varte ca. 14 dager. Vi oppnådde hhv 76 og 80% dødelighet i kontrollgruppen, 31,7% og 17,5% på vaksine 3, mens de øvrige gruppene fikk dødelighet fra 50 - 80%.

3. challenge (26.09.02) - tank 1
Bath conc. $4.6 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml
Average weight, test fish: 48 g Day degrees: 995

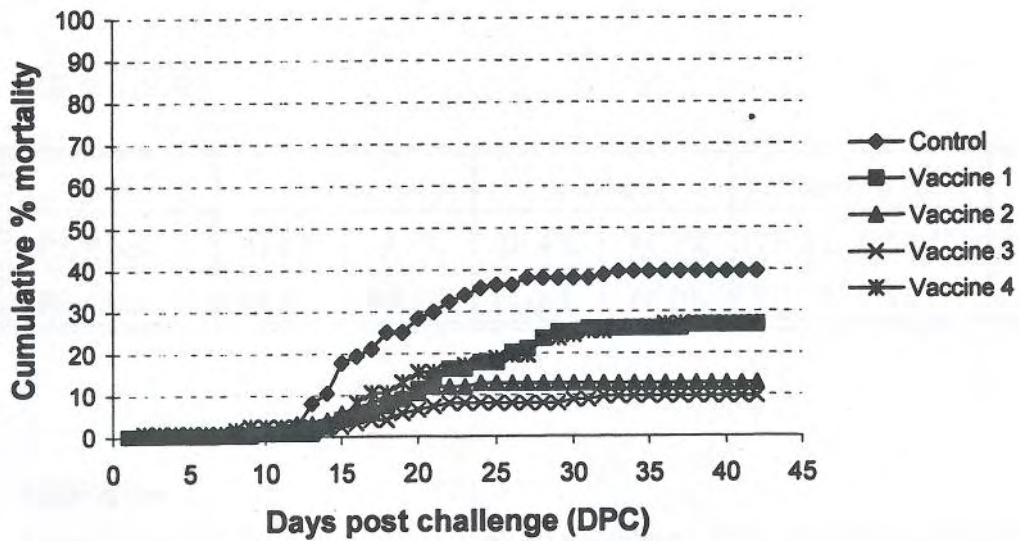


3. challenge (26.09.02) - tank 2
Bath conc. $4.6 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml
Average weight, test fish: 48 g Day degrees: 995

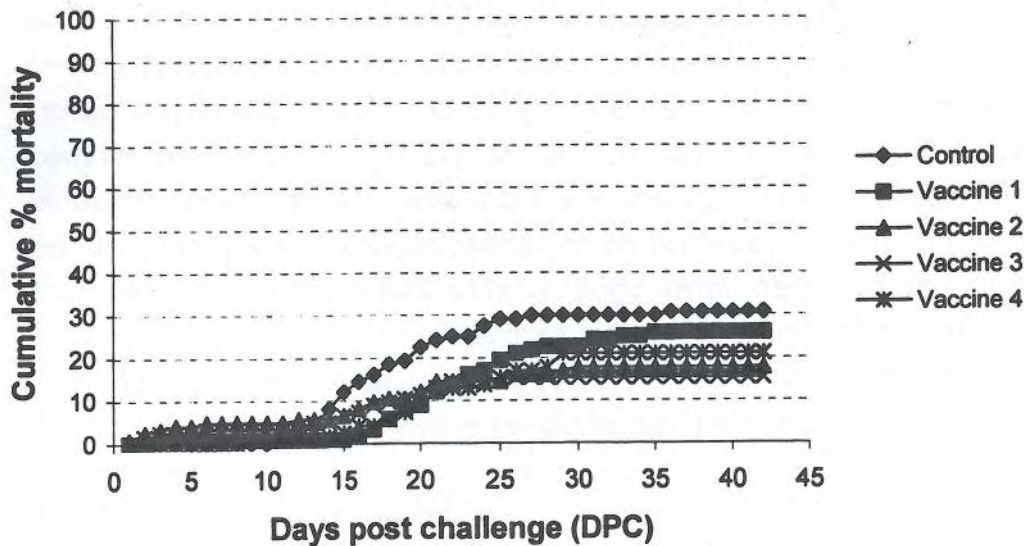


I tredje smitterunde gikk det ut mellom 1-7 parr fra hver av gruppene ved overføring til sjø. Disse ble identifisert visuelt som parr og tatt ut av beregninger. Dødelighetsforløpet startet på dag 11 med ca. 14 dagers varighet. I dette forsøket ble det oppnådd hhv 29,7% og 42,7% dødelighet i kontrollgruppen og 8,8% og 24,6% dødelighet på vaksine 3. De øvrige gruppene plasserte seg på samme nivå som vaksine 3.

4. challenge (18.12.02) - tank 1
 Bath conc. $1.2 \cdot 10^5$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 65 g Day degrees: 300



4. challenge (18.12.02) - tank 2
 Bath conc. $1.2 \cdot 10^5$ TCID₅₀/ml
 Average weight, test fish: 65 g Day degrees: 300



I den siste smitterunden startet også IPN-dødelighet på dag 11, etter at 1-5 fisk i hver gruppe var døde på grunn av mangelfull smoltifisering. Slutt dødeligheten etter at parrdødelighet var tatt ut ble hhv 39,5% og 30,6% i kontrollgruppen. Vaksine 3 oppnådde hhv 8,9 og 12,5% dødelighet, mens de andre gruppene også her plasserte seg på samme nivå.

Dersom man ser på den beste vaksinen i forsøkene, beregner RPS_{EP} (Relative prosent survival, end point) og gjør det samme på referansevaksinen uten IPN-antigen vaksinen får vi følgende resultat:

Tabell, RPS

	Smitte 1		Smitte 2		Smitte 3		Smitte 4	
RPS mock	31,6%	9,2%	18,4%	34,2%	75,3%	54,1%	67,6%	55,8%
RPS vacc 3	46,5%	49,6%	60,6%	77,0%	70,2%	42,5%	77,6%	59,2%

Diskusjon

I samtlige smitter var replikatene tilnærmet like, og starttidspunkt for dødelighet var lik. Likevel var det vesentlig forskjell på slutt dødeligheten når man sammenligner 1.+2. smitterunde med de to neste. Smittene i runde 2 og 3 er begge utført på høsten men med ganske forskjellig sluttresultat, som etter vår mening verken kan forklares med fiskestørrelse, virustiter eller andre faktorer. Bruk av to ulike forsøksfiskpopulasjoner gjenstår derfor som forklaring på fenomenet. Det er likt resultat på kontroll dødelighet innen årsklasse uavhengig av årstid. Smittene i forsøk 2 og 3 er begge utført på høsten. Det er en svakhet at viruskonsentrasjon regnes ut i ettertid, men dette er nødvendig da vi bruker ferskt virusmateriale for ikke å tape virulens. Det hadde vært ønskelig å kunne benytte høyere passasjer slik at konsentrasjon kan beregnes på forhånd. Modellen diskriminerer mellom IPNvaksinert og ikke-IPNvaksinert fisk, men det ser ut til at høy kontroll dødelighet er en forutsetning for fullt ut å skille mellom spesifikk og uspesifikk beskyttelse. Både antall døgngader, vanntemperatur i immuniseringsperioden samt vekt på fisken har variert i forsøkene men ser ikke ut til å influere vesentlig på resultatet. Disse erfaringene er samsvarende med det som er oppnådd hos andre forskningsmiljøer (personlig com.).

Konklusjon og videre oppfølging

I hovedsak kan vi konkludere med at IPN-badsmittmodellen har meget god parallelitet, er validert gjennom et år, og at den også er repeterbar og konsistent uavhengig av årstid. Resultatene avdekket imidlertid at den kan være sårbar for variasjon knyttet til forsøksfisken. Dette kan imidlertid motvirkes ved å benytte forsøksfisk av samme genetiske opphav gjennom samme år eller sesong.

Vi mener at modellen kan anvendes til å evaluere effekt av IPN-vaksiner, men at det trengs betydelig kontrollødelighet for at den skal skille mellom spesifikk og uspesifikk beskyttelse. Sett i sammenheng med resultatene ovenfor og nyere resultater om forskjellig virulens mellom ulike IPN-isolater eller -kloner, mener vi at IPN-vaksiner ideelt sett bør evalueres mot flere IPN-isolater og helst ved bruk av flere forsøkspopulasjoner. Modellen bør også evalueres mot feltobservasjoner.

Under hensyntaken til det overfor nevnte mener vi at modellen er også er anvendbar til testing av virusvirulens, til testing av genetisk resistens samt testing av effekt av antivirale og immunstimulerende stoffer.

Vi har ikke fått på plass tempertauregulering på klekkeriet , men dette kommer på plass i løpet av høsten.

Involverte institusjoner:

Veterinærinstituttet, Oslo, ved Birgit Dannevig har på anmodning produsert virus til hver smitterunde og titrert smittedosen i ettetid.

Paul J. Midtlyng, VESO FoU har bidratt ved bearbeidelse og publisering av resultatene.

Publisering/presentasjoner

Vedlagt ligger en poster som ble presentert på IABs vaksinekonferanse i Bergen i 9-11 april i år. Vedlagt ligger også et abstract som er akseptert for oral presentasjon på EAFFs konferanse på Malta i september 2003.

Resultatene vil bli bearbeidet videre for vitenskapelig og populærvitenskapelig publisering.

Consistency of an IPNV bath challenge model in normal and out-of season Atlantic salmon smolts

Arne Ramstad and Paul J. Midtving, VESO Vikan, N-7800 HAMSØS, Norway

INTRODUCTION

There is an urgent need to evaluate the effectiveness of various prophylaxis and control procedures against infectious pancreatic necrosis (IPN) in farmed Atlantic salmon. Bath challenge models, inducing clinical disease and specific mortality, have been successfully applied on start-feeding fry and on smolts following sea water transfer. The current study was undertaken to verify the reproducibility and consistency of the bath challenge model, in particular when smoltification of the experimental fish was induced off-season by photoperiod manipulation.

MATERIALS AND METHODS

Atlantic salmon smolts from VESO Vikan Hatchery were assigned to four vaccination and challenge trials of identical design. Trial 1 and 2 comprised the 2001 year class (spawned autumn 2000), whereas trial 3 and 4 comprised the 2002 year class (spawned autumn 2001). The fish were reared in freshwater at ambient temperatures and were exposed to a standardised light regime (6 weeks of L:D = 12:12 and minimum 6 weeks of L:D = 24:0) after having reached a minimum size of 20 g.

Fish were marked and vaccinated with one of 4 vaccines or 0.9% saline (negative control group) at the end of the L:D = 12:12 period. Smoltification status of the fish was confirmed by sea water tolerance tests. Sea-worthy smolts were transferred to VESO Vikan experimental facility into two tanks. Fish were transferred to 12°C sea water the day before challenge (table 1) after a short acclimation period.

Table 1:
Test groups included in all 4 IPNV vaccine – and bath challenge experiments

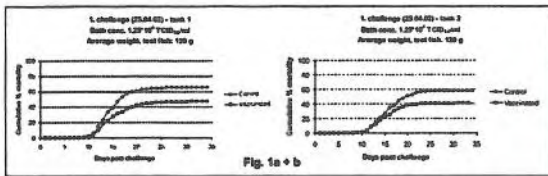
Groups	Treatment	Tank 1	Tank 2
A, B, C	Vaccines including IPNV antigen	3 x 125	3 x 125
D	Vaccine without IPNV antigen	125	125
E (control)	Saline	125	125
Total number of fish per tank		625	625

The challenge material was a first-passage IPNV serotype Sp supernatant produced in BF2-cells at the National Veterinary Institute in Oslo. Challenge was performed by stopping the water flow and lowering the water level equally in the tanks before the IPNV supernatant was added. The fish were kept for 1 hour under aeration before normal water flow was restored.

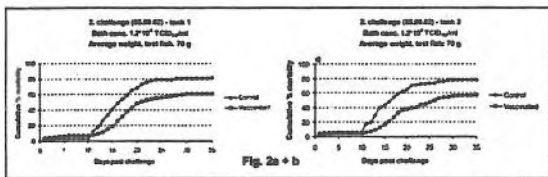
Mortality was registered daily according to standard procedures, and the presence of IPNV in dead fish was confirmed by an IPNV co-agglutination test (Taksdøl et al. 1999).

RESULTS

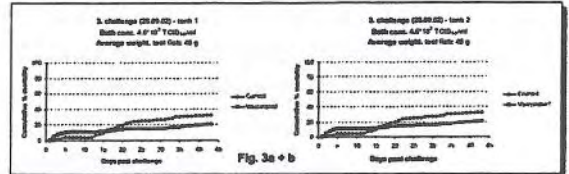
Mortality curves for unvaccinated groups (E) and 3 groups of IPN-vaccinated fish (A,B,C) are presented in figures as follows:



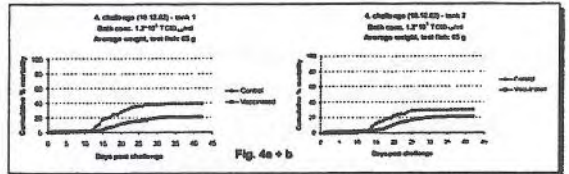
In the first trial (challenged April 2002) mortality in both tanks commenced on day 11, lasted for approximately 14 days and finally reached approximately 60% in unvaccinated controls and 45% among IPN-vaccinated fish (figure 1a +b).



In the second trial (challenged early Sept. 2002) a few fish died initially due to sea water intolerance. IPN-specific mortality started 11 days after virus exposure and lasted for 2-3 weeks, reaching approximately 80% in the control group (Figure 2a + b).



In the third trial (challenged late Sept 2002), 5-10% early, non-specific mortality was seen due to sea water intolerance. A rather gentle IPN epizootic commenced after 13 days reaching slightly above 30% in the control fish, but with very few specific mortalities among vaccinated fish (Figure 3a+3b).



In the fourth trial (challenged December 2002) the IPN-specific mortality commenced on day 11 and reached between 30 and 40% among control fish at trial termination (Figure 4a+b).

DISCUSSION

In all challenges, replicates were implicitly similar both in terms of onset and progression of mortality. Differences in IPNV susceptibility between the two year classes utilised for the challenges may explain the difference in mortality levels between trial 1 + 2 and trial 3+4, respectively. A remarkable similarity was, however found between challenges performed with the same year class of fish, irrespective of season.

First passage of the challenge organism was used to avoid loss of virulence. In consequence, the concentration of virus had to be determined retrospectively and challenge dose could not be standardised. This underlines the need for calibrating the challenge system to each source population of fish, and suggests that further work is needed to enable assessment of virus concentration and virulence prior to challenge exposure.

Our IPNV bath challenge model consistently discriminated between IPNV-vaccinated and unvaccinated groups in replicate tanks in all trials, thus satisfying an important criterion of any system for vaccine testing. Protection estimates varied however between groups and trials. The data from these trial series will be further analysed for consistency between relative protection estimates, for consistency in ranking between groups, and other parameters allowing for further documentation and validation of the test system.

CONCLUSION

In conclusion, the results suggest that the IPNV bath challenge model in Atlantic salmon smolts is reproducible and consistent, independently of season. We believe that the model can be used to evaluate vaccine protection, assess genetically determined disease resistance and document the efficacy of anti-viral substances and immunostimulants in salmonid fish. We also believe that the model should be employed for virulence studies of different IPNV isolates.

REFERENCES

- Stangeland, K, Hale, S, Taksdøl, T. (1997) Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. *Journal of Fish Diseases* Vol 19, 323-327
- Taksdøl, T, Ramstad, A, Stangeland, K, Dannevig BH (1998) Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in coarcted Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *Journal of Fish Diseases* Vol 21, 193-204
- Taksdøl, T, Thorud, K. (1999) Evaluation of a rapid coagglutination (COA) test for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in tissue samples of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* Vol 22, 117-124

VALIDATION OF A BATH CHALLENGE MODEL FOR IPN VACCINES IN ATLANTIC SALMON

A. Ramstad*¹ and P. J. Midtlyng²

¹VESO Vikan, Namsos, Norway; ²VESO Head Office, Oslo, Norway

There is an urgent need for effective vaccines to prevent outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) after sea transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. In our laboratory, experimental infection of start-feeding salmon fry using bath exposure is generally successful, whereas the bath challenge model for smolts has shown considerable variation. A series of experiments were therefore undertaken to verify the reproducibility and consistency of the model. The purpose of the current study was to assess the validity of the model to discriminate between specific and non-specific protection after immunisation with oil-adjuvanted, multivalent vaccines.

Atlantic salmon smolts from the one hatchery of origin were included in 4 vaccination-and-challenge trials. In each of the trials, fish were allocated by random to vaccine groups or to the unvaccinated control group. In all trials, the fish were subjected to temperature – and light manipulation in order to provoke smoltification. When ready for sea, the fish were transported to the VESO Vikan experimental laboratory, transferred to 12 °C seawater and exposed to virulent first passage IPN virus by bath exposure.

In all four challenges, IPN-specific mortality commenced from about days 10 to 12 after virus exposure and lasted for approx. 14 days. Replicates were implicitly similar. In trials 1 and 2 where control mortality reached 62-82%, one IPNV vaccinated group showed between 50-75% relative protection and significantly higher survival than the vaccine group receiving multivalent vaccine without IPNV antigen. In trials 3 and 4 where control mortality consistently was below 50%, no significant difference was seen between groups immunised with or without IPNV antigen component. In conclusion, the results suggest that control mortality above 50% is required to effectively discriminate between specific and non-specific vaccine protection against IPN.