

I dette prosjektet ble vår badsmittemodell for infeksiøs pankreasnekrose (IPN) hos laksesmolt validert mot et naturlig sykdomsutbrudd, og eksperimentelt ved bruk av ulike fiskestammer og forskjellige IPN-virusisolater. I tillegg til badsmitte ble det etablert en modell for IPN-kohabitantsmitte i prosjektet. Resultatene viste at IPN-vaksinering ga meget god beskyttelse i begge eksperimentelle smittemodeller, og tilsvarende god beskyttelse kom fram ved naturlig smitte i felt. Studiet tilbakeviste derfor uklarheter og tvil om verdien av eksperimentelle smitteforsøk med IPN. I andre del av prosjektet ble vaksine med og uten IPN viruskomponent benyttet på standard oppdrettslaks, på en gruppe som var selektert for økt mottagelighet for IPN, og på en uselektert villaks-stamme. Vaksinegruppene ble utsatt for henholdsvis bad – og kohabitantsmitte og det ble brukt to ulike IPN-virusisolater. Vaksinebeskyttelsen var like god for begge smitte-isolatenes vedkommende. Resultatene viste imidlertid at forsøksfiskens genetiske bakgrunn har svært stor betydning for tilslag på IPN-smitte. I gruppen hvor dødeligheten forble lav (under 50%) kom den spesifikke beskyttelsen av IPN-vaksinene ikke tydelig fram. Vår konklusjon er derfor at man trenger IPN-mottakelig forsøksfisk dersom man skal teste effekten av IPN-vaksinering på en pålitelig måte. Gjennom dette prosjektet har vi på en solid måte dokumentert to nye smittemodeller, som nå kan brukes til utvikling av nye IPN-vaksiner samt til grunnforskning om spesifikk immunitet mot virusinfeksjoner hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.).

## Mål og forventet nytteverdi

Dette prosjektet ble igangsatt for å forbedre våre smittemodeller med IPN virus, og på en systematisk og vitenskapelig måte å dokumentere at disse modellene er nyttige og pålitelige til bruk i utvikling og dokumentasjon av nye vaksiner mot IPN. Arbeidsplanen omfattet 4 faglige delmål:

- validering av beskyttelse oppnådd ved badsmitte mot beskyttelse i felt
- validering av badsmittemodellen ved bruk av flere smitte-isolater
- validering av badsmittemodellen ved bruk av (genetisk) ulik forsøksfisk
- en kost-nyttevurdering for IPN-vaksinering av oppdrettslaks.

Forventet nytteverdi av prosjektet for VESO lå først og fremst en reduksjon av usikkerheten ved gjennomføring av IPN-smitteforsøk, som både faglig og økonomisk var betydelig. Vi håpet også at resultatene skulle føre til økt bruk av IPN-modellene både i oppdragsforskning og akademisk forskning, med dertil hørende økt aktivitet og omsetning ved vår forsøksstasjon VESO Vikan.

Forventet nytteverdi for samfunnet å få fram bedre verktøy for vaksineforskning og -utvikling, og særlig et at smittemodellen vil stimulere til utvikling og bruk av mer effektive fiskevaksiner, slik at tapene forårsaket av IPN i norsk akvakultur kan reduseres betydelig.

## Gjennomføring

Forsøkene i prosjektet ble gjennomført i 2 runder, henholdsvis høsten 2004 og høsten 2005.

### Validering av smitteforsøksresultater mot felt

Høsten 2004 ble til sammen ca. 125.000 lysmanipulerte pre-smolt av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) immunisert med 2 ulike vaksiner: Norvax Compact 6 (NC-6, som inneholder IPNV antigen) og Norvax Compact 4 (NC-4, uten IPNV-antigen og *Moritella viscosa*). Etter en immuniseringsperiode på ca. 6 uker i klekkeriet ble 120.000 smolt overført til vår forsøkskonsesjon i sjø, mens 700 smolt ble overført til VESO Vikan for eksperimentelle smitteforsøk. I de eksperimentelle smittene var det også en kontrollgruppe som ble injisert med fysiologisk saltvann.

Smitteforsøkene ble gjennomført ved badsmitte umiddelbart etter at de 3 forsøksgruppene var satt i samme kar og overført til sjøvann (1-timers eksponering i ca.  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> /ml IPNV), ca. 6 uker etter vaksinering. Etter 10-12 dager oppsto IPN-betinget dødelighet som på dag 30 i forsøket nådde over 70% hos den uvaksinerte kontrollfisk. Den relative beskyttelsen (RPS) i gruppen som var vaksinert med IPN-holdig vaksine var over 80%, mens vaksinegruppen uten IPN-komponent viste en viss (uspesifikk) beskyttelse i forhold til kontrollgruppen (RPS= 40-54%). Kalkulert IPN-spesifikk beskyttelse var 71% RPS.

De samme vaksinegruppene ble også utsatt for smitte ved kohabitasjon, ved at et antall merkede smittebærere som hadde fått injeksjon av levende IPN-virus ble merket og satt ut i samme kar. Hos smittebærerne ble det observert en lav IPN-dødelighet mellom dag 6 og dag 10. På dag 17 i forsøket brøt det så ut klinisk IPN i forsøksgruppene med samlet kontroll dødelighet over 75% på dag 30. Man observerte samme beskyttelsesmønster som i badsmitten, med en kalkulert IPN-spesifikk beskyttelse (RPS) på 71,6%.

I feltforsøket ble fisken satt ut i 2 merder, hver med ca. 9000 fettfinneklippede smolt vaksinert uten IPN-komponent og ca. 51000 umerkede smolt vaksinert med IPN-holdig vaksine. Her brøt det først ut IPN i nabomerder som hadde fått smolt fra et annet settefiskanlegg. IPN-utbruddet i våre forsøksmerder startet rundt dag 55 etter utsett og varte i ca. 8 uker. Samlet dødelighet i den IPN-uvaksinerte kontrollgruppen var da 32,6% mot 6,1% i den IPN-vaksinerte gruppen. Kalkulert IPN-spesifikk relativ beskyttelse i feltforsøket var derfor 81%. Feltforsøket ga dermed en overbevisende bekreftelse av beskyttelsesestimaterne vi oppnådde eksperimentelt (Tabell 1).

*Tabell 1: Relativ beskyttelse hos pre-smolt av Atlantisk laks etter immunisering med (NC-6) og uten (NC-4) IPNV-antigenholdig vaksine, observert i 2 eksperimentelle smittemodeller og i feltforsøk. \* = statistisk signifikant testet ved Kji-kvadrat.*

Vaccine group	NC-6		NC-4		Specific IPN vaccine protection (RPS)
	Cum. mortality	RPS (vs. saline)	Cum. Mortality	RPS (vs. saline)	
Bath challenge	10.6%	86%*	34.8%	54%*	71%*
Cohab. challenge	12.8%	82.8%*	45%	39.5%*	71.6%*
Field challenge	6.1%		32.6%		81%*

### **Validering av beskyttelsesestimater ved bruk av ulike IPN-isolater til smitte, og ved bruk av genetisk forskjellig forsøksfisk.**

Andre runde forsøk i prosjektet ble gjennomført høsten 2005, denne gang med flere stammer av forsøksfisk som hadde ulik genetisk bakgrunn: én gruppe uselektert villaks, én gruppe standard oppdrettslaks levert fra AquaGen AS og én gruppe oppdrettslaks fra stamfisk som var "selektert bort" i AquaGens avlsprogram på grunn av dårlig overlevelse i familie-testing med hensyn på IPN.

Fisk fra hver av disse gruppene ble immunisert med samme vaksiner som året tidligere, og med fysiologisk saltvann. Etter lysmanipulering og lysstyrt smoltifisering ble de 9 gruppene (3 stammer x 3 vaksinegrupper) fordelt på 5 kar,

hvorav 3 kar ble badsmittet mens 2 kar ble tilsatt IPN-infiserte smittebærere. Både immunisering og smitten ble gjennomført på samme måte som året tidligere.

Også denne gang fikk vi tilslag på IPN-smitten i alle forsøkskarene, men dødeligheten blant uvaksinerte kontroller viste tydelig forskjell hos de 3 stammene forsøksfisk. Mens mellom 75 og 87,5% av de "IPN-mottakelige" kontrollfiskene døde og samlet dødelighet hos kontrollgruppene av villfisk var mellom 63 og 83%, oppnådde vi bare mellom 26 og 36% kontrolldødelighet hos "standard-stammen" av oppdrettsfisk.

IPN-spesifikk relativ beskyttelse målt på den mottakelige fiskestammen var jevnt høy (over 68%) i alle kar, og noe lavere men relativt jevn også hos villfisken (Tabell 2). Estimaten for IPN-spesifikk beskyttelse målt på "standardfisken" var derimot svært sprikende, og i ett kar sågar ikke-signifikant. Vi konkluderte derfor at relativt høy kontrolldødelighet (anslagsvis over 50%) er nødvendig for pålitelig å kunne kvantifisere spesifikk beskyttelse etter vaksinerings mot IPN. Dette bekrefter våre foreløpige konklusjoner fra et tidligere prosjekt om eksperimentell smitte mot IPN (NFR prosjektnr. 150781/120, 2001-2003).

*Tabell 2: Kontrolldødelighet og beregning av relativ beskyttelse (RPS) for vaksinerings av Atlantisk laks med (NC-6) og uten (NC-4) IPN-komponent, i et forsøksoppsett med 3 genetisk ulike stammer av forsøksfisk.*

Virus isolate	V-1594 (2005)	V-1594 (2005)	V-1244 (2000)	V-1244 (2000)	V-1244 (2000)
Fish strain	I-1 (bad)	I-2 (bad)	I-3 (bad)	I-4(kohab)	I-5(kohab)
<b>AG standard</b>					
RPS NC-6	70.0	70.0	84.6	48.7	79.7
RPS NC-4	30.8	51.0	48.1	43.0	44.3
IPN specific RPS (NC-6 vs NC-4)	75.0	38.7	30.0	-	63.5
Ctrl mortality	34.7	33.3	26.0	30.0	35.9
<b>Wild salmon</b>					
RPS NC-6	52.9	56.5	67.7	70.4	69.2
RPS NC-4	2.5	24.4	27.4	43.7	33.3
IPN specific RPS (NC-6 vs NC-4)	51.7	42.4	55.7	51.1	53.8
Ctrl mortality	63.3	68.8	64.6	83.3	75.0
<b>IPN resistant</b>					
RPS NC-6	89.1	80.3	89.1	80.3	85.7
RPS NC-4	34.7	38.5	51.1	28.0	28.6
IPN specific RPS (NC-6 vs NC-4)	83.3	68.0	77.7	72.7	80.0
Ctrl mortality	75.0	81.3	75.0	76.3	87.5

I dette forsøket var dødelighet og beskyttelsesestimater ved bruk av det nye isolatet (V-1594) på samme nivå som for vårt standardisolat (V-1244). Det var opprinnelig også planlagt bruk av et skotsk isolat, men dessverre var dette isolatet dødt og det lyktes ikke å oppformere dette isolatet innen smitteforsøkene skulle starte.

## Kost-nytteberegning ved vaksinerings av laksesmolt mot IPN

Siste del av prosjektet besto av en enkel kost-nytteberegning som ble utført i regnearkprogrammet Microsoft Excel med grunnlagsdata hentet fra feltforsøket som ble gjennomført ved VESO Vikan høsten 2004. Ved å vaksinere et utsett på 120 000 smolt mot IPN kan man etter våre beregninger redusere det direkte tapet forårsaket av et IPN-utbrudd som vi opplevde med ca. 260 000 kroner. Dersom man legger til potensielt produksjonstap blir forskjellen med og uten IPN-komponent i vaksinen over 855 000 kroner for samme utsett.

Beregningene viser også at med de liknende forutsetninger som observert i vårt feltforsøk (IPN-dødelighet ved utbrudd =35% hos uvaksinert fisk) men med en noe lavere relativ vaksinebeskyttelse (75%) vil det være økonomisk lønnsomt å gjennomvaksinere hele smoltpopulasjonen mot IPN dersom risikoen for utbrudd er 20% eller større (dvs. hvis flere enn hver femte lokalitet får IPN-utbrudd).

## Utnyttelse av resultatene

Erfaringene og de vitenskapelige resultatene fra prosjektet er allerede innarbeidet i arbeidsprosedyrer og standardprotokoller som brukes i oppdragsforskning ved VESO Vikan. De faglige resultatene fra prosjektets første del er presentert muntlig på internasjonale vitenskapelige konferanser høsten 2005, og, arbeidet med manuskripter for vitenskapelig publisering er påbegynt. Resultatene fra forsøkene høsten 2005 vil bli presentert på Havbrukskonferansen 2006 og på relevante internasjonale fiskehelsekonferanser i 2006-2007.

## Andre forhold

Vi vil framfor alt trekke fram to erfaringer fra dette prosjektet, som vi mener har stor relevans både for vårt eget og for andres videre arbeid med IPN og særlig vedrørende immunisering mot denne virussykdommen:

- for det første at det fortsatt er betydelig biologisk variasjon når det gjelder smitteforsøk med IPN virus, med en tilsvarende risiko for at forsøk kan mislykkes eller gi resultater det ikke kan trekkes sikre konklusjoner av. Det bør derfor tas høyde for denne usikkerheten når forskningsprosjekter om IPN budsjetteres, og vokte seg mot å underbudsjettere forsøkskostnadene.
- for det andre at forsøk og forskning om vaksinerings og spesifikk immunitet mot IPN bør gjennomføres med forsøksfisk av kjent eller genetisk selektert, mottakelig stamme. Dersom man bruker forsøksfisk med genetisk betinget, uspesifikk resistens mot IPN kan resultatene hva angår spesifikke immunmekanismer ikke bli til å stole på.

## Kontraktpartners sluttvurdering

Etter vår vurdering må dette prosjektet betegnes som meget vellykket, både hva angår det faglig-vitenskapelige resultatene og hva angår dets bidrag til utvikling av nye forsøksmodeller og nye tjenester for VESO. Vi nådde de mål vi satte oss vedrørende validering av badsmittemodellen med ett lite unntak, nemlig det utenlandske IPNV-isolatet som vi ikke fikk testet. Imidlertid ble resultatene vedrørende utvikling og validering av kohabitant-modellen vesentlig bedre enn opprinnelige forutsett, og denne modellen synes faktisk å bli enda mer anvendelig i vårt framtidige arbeid enn badsmitte-modellen.

## Rapporter og publikasjoner

Ramstad A. V-1594: Quantification and field validation of IPN vaccine protection in farmed Atlantic salmon. Intern sluttrapport fra kliniske forsøk i NFR-prosjekt 159738/S40. Utgiver: Veterinærmedisinsk Oppdragscenter AS, 16. januar 2006, 11 sider. Ikke offentlig.

Midtlyng P.J. Kost-nytteberegning ved vaksinerings av laksesmolt mot IPN. Intern rapport i NFR-prosjekt 159738/S40. Utgiver: Veterinærmedisinsk Oppdragscenter AS, 28. desember 2005, 7 sider. Ikke offentlig.

A.Ramstad, A.B. Romstad, D.M. Knappskog and P.J. Midtlyng. Field validation of an experimental bath challenge model for IPN vaccines. Book of abstracts, 12th International Conference of the EAAP, 11-16 Sept 2005, Copenhagen, p. 98.

A.B. Romstad, A. Ramstad, D.M. Knappskog and P.J. Midtlyng. Vaccine protection against infectious pancreatic necrosis assessed by a cohabitant challenge model. Book of abstracts, 12th International Conference of the EAAP, 11-16 Sept 2005, Copenhagen, p. 94.

A. Ramstad, A.B. Romstad, D.M. Knappskog and P. J. Midtlyng. Field validation of bath – and cohabitant challenge models for IPN vaccines. Society for General Microbiology, Medical Microbiology, Society for Microbiology and Society for Virology, Joint Meeting 27-30 Sept 2005, Bergen.