

Resultatrapport for NFR-prosjekt 172 179 Pancreas disease in Atlantic salmon and rainbow trout: pathogenesis and risk factors

Prosjektet ble startet fordi antall utbrudd av pankreassykdom (PD) var økende, fordi sykdommen medførte store økonomiske tap, og næring og forvaltning trengte mer kunnskap om sykdomsutvikling og risikofaktorer som grunnlag for bekjempelsesarbeidet. Det var for eksempel uenighet mellom forskningmiljøer om smitteveier. Det var heller ikke kjent i hvilken grad klinisk frisk fisk var skjult infisert med PD-virus, som er klassifisert som et salmonid alfavirus, SAV. Fra næringen sin side ble det reist en rekke spørsmål om spredningsmønster mellom anlegg og mellom merder innen et anlegg og om ulike driftstiltak på anlegget kunne bidra til reduserte tap ved sykdomsutbrudd.

Mål

Hovedmål: å fremskaffe mer kunnskap om PD, fokusert på sykdomsutvikling og risikofaktorer

Delmål:

1. Undersøke forekomst av SAV hos oppdrettslaks, evaluere risikofaktorer knyttet til PD og SAV, økonomiske konsekvenser og å registrere sykdomsbegrensende driftstiltak
2. Beskrive spredning av SAV og PD mellom merder og modellere spredning innen lokalitet
3. Studere vertsrespons etter infeksjon med SAV fra sjøsetting til slakt
4. Molekylær karakterisering av SAV og forbedre påvisningsmetoder

Gjennomføring

Prosjektet startet i januar 2006 med å arrangere en internasjonal diagnostikk workshop i Oslo der temaet var "Pancreas disease (PD) and similar diseases". Det var totalt 54 deltagere fra forskningsmiljøer, næring og forvaltning, de fleste fra Irland, Skottland og Norge. Diagnostikerne diskuterte kriterier for PD-diagnose for bruk i prosjekter i de ulike landene, og epidemiologene fulgte opp med møte i Skottland litt seinere for å utarbeide felles strategier for epidemiologiske studier av PD, inklusive for dette prosjektet. Dette tre-nasjonale samarbeidet la grunnlaget for en utvidet kunnskapsplattform og en effektiv kunnskapsutveksling mellom forskere og næring.

I januar startet også planleggingen av den store epidemiologisk undersøkelsen som skulle være "ryggraden" i prosjektet. Der fulgte vi smoltgrupper ("kohorter") fra ferskvann og videre gjennom sjøvannsfasen. Kohortene ble plukket ut så tilfeldig som mulig. Spørreskjema vedr. driftsforhold, fiskehelse mm ble utarbeidet. Utstyr, veiledning og skjemaer ble sendt til Mattilsynet og til en rekke fiskehelsetjenester som hadde sagt seg villige til å delta. Utover dette fulgte fiskehelsetjenestene sine vanlige rutiner for sykdomsdiagnostikk i anleggene. Tre affiserte anlegg ble fulgt ekstra nøye med hyppigere prøveuttak fra flere merder. I perioden mellom planlegging og gjennomføring av prøveuttakene ble PD-affisert område på vestlandet utvidet nordover til å inkludere Møre og Romsdal sør for Hustadvika.

Prøveuttak fra settefiskanlegg før sjøsetting samt ca 2 og 8 måneder etter sjøsetting ble undersøkt for SAV vha real time RT-PCR mens et utvalg av virusprøvene også ble undersøkt vha dyrking i cellekultur. Fiskens reaksjon på infeksjonen ble undersøkt vha histologisk undersøkelse (eg lysmikroskopisk undersøkelse av vevsforandringer) og vha målinger av antistoff mot SAV i blodprøver. Fisk fra mange av lokalitetene ble også undersøkt ved slakt. SAV fra et utvalg av

virusprøvene fra prosjektet og fra annen sykdomsdiagnostikk ble sekvensert for å undersøke om det fantes sekvensvariasjon innen ett prøveuttak, mellom merder, over tid eller mellom lokaliteter.

Prosjektledelse og laboratoriearbeid har vært utført ved Veterinærinstituttet (VI). Epidemiologien er utført i samarbeid mellom Norges veterinærhøgskolen (NVH) og VI og har inkludert utdanning av en stipendiat innen akvatisk epidemiologi ved NVH. Prosjektet har også hatt løpende kontakt innen "Tri-nation"-samarbeidet om PD og lignende sykdommer. Prosjektmedarbeidere har deltatt på møter 2 x årlig med presentasjoner og diskusjoner med forskere fra Irland, Skottland og Norge. På disse møtene har det også vært aktiv deltagelse fra representanter fra næring og forvaltning fra de tre landene. Det har også vært god kontakt med og deling av informasjon og innsamlet materiale med andre PD-prosjekter (se resultatdel).

Resultater, delmål 1

a) Forekomst av SAV hos oppdrettslaks

SAV ble ikke påvist i noen av de 46 ferskvannsanleggene som ble undersøkt. Fisk fra fire av disse anleggene fikk imidlertid PD-utbrudd kort tid etter sjøsetting. For å etterspore mulig smitteoverføring via smolten, ble prøvene fra ferskvannsfasen undersøkt ved hjelp av andre metoder for om mulig å finne indikasjoner på smitte i form av antistoff mot SAV i blodprøver eller vevsforandringer som kunne indikere PD. Alle undersøkelser ga negative resultater. Våre funn bekrefter derfor ikke påstander fra annet hold om at SAV i ferskvannsanleggene har betydning for PD-utbrudd etter sjøsetting per i dag.

Fiskegrupper fra ferskvannsanleggene ble fulgt ut til totalt 51 sjøvannslokaliteter, og prøveuttak ble gjort ca 2 og 8 måneder etter utsett i sjø. Et utvalg av lokalitetene ble også prøvetatt ved slakt, ca 1 ½ år etter sjøsetting. Femten sjøvannslokaliteter nord for Hustadvika, dvs i ikke-affisert område, ble undersøkt med negative resultater. Vi fant med andre ord ingen "ulmebrann" i form av skjult infiserte fisk i antatte PD-frie områder, men understreker likevel at en slik "ulembrann" kan forekomme etter introduksjon av smitte (se inkubasjonstid, delmål 3).

Fra PD-affisert område ble 36 lokaliteter undersøkt, og i 23 av disse (64%) ble SAV påvist. Første gangs påvisning av smitte på enkeltlokaliteter skjedde gjennom hele sjøvannsfasen, fra ca to måneder etter sjøutsett og fram til slakt. Dette dokumenterer at laks i sjøvann er følsom for smitte gjennom hele produksjonssyklus. Etter første gangs påvisning av SAV på en lokalitet fantes SAV også ved påfølgende prøveuttak, helt fram til slakt. Vi har mao funnet at det på populasjonsbasis og under oppdrettsbetingelser ikke oppstår beskyttende immunitet etter infeksjon slik resultater fra tidligere smitteforsøk har indikert.

At SAV forblir i populasjonen som en skult infeksjon i en klinisk frisk populasjon for resten av livet, er ny kunnskap som har sammenheng med etablering av en mer følsom metode for viruspåvisning (delmål 4). Dette understreker betydningen av hygieniske tiltak ved transport av fisk til slakt og betydningen av hygienisk behandling av slaktevfall mm.

Tabellen nedenfor viser laboratorieresultater fra de 23 infiserte sjøvannslokalitetene fra endemisk sone, fra manus v/Mona Dverdal Jansen et al, innsendt til Journal of Fish Diseases

Sampling point Analysis Site number	Dx	2 months post transfer			Dx	8 months post transfer			Dx	At slaughter		
		Real-time RT-PCR (positive/ examined)	Serology (positive/ examined)	Histo-pathology*		Real-time RT-PCR (positive/ examined)	Serology (positive/ examined)	Histo-pathology*		Real-time RT-PCR (positive/ examined)	Serology (positive/ examined)	Histo-pathology*
1		6/12	0/45	No		7/18	-	No	PD	11/12	53/60	PD
2	PD	10/12	5/30	PD		9/9	-	PD		No samples		
3		1/12, 1 ¹	0/30	No		0/12	0/30	No		5/6	22/30	PD
4		12/12	6/30	PD		12/12	-	PD	PD	4/6	11/30	PD
5		0/12	-	-		No samples			PD	6/6	21/30	No
6		0/12	-	-	PD	12/12	-	-		4/6	21/30	PD
7		0/12	-	-	PD ²	No samples				No samples		
8		0/12	0/30	-		8/8	12/16	-	PD	No samples		
9		0/12	-	-		12/12	-	-	PD	3/6	23/30	No
10		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	6/6	30/30	PD
11		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	No samples		
12		0/12	-	-		No samples			PD	No samples		
13		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	6/6	23/30	No
14		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	39/40	39/40	PD
15		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	No samples		
16		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	6/6	20/30	No
17		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	5/6	28/30	PD
18		0/12	-	-		0/12	-	-		6/6	16/30	No
19		0/12	-	-		0/12	-	-	PD	5/6	25/30	No
20		0/12	-	-		0/12	-	-		3/6	0/30	No
21		0/12	-	-		0/12	-	-		4/12	0/30	No
22		0/12	-	-		0/12	-	-	PD ³	No samples		
23		0/12	-	-		0/12	-	-		4/4	No sample	PD

Dx*: Diagnosis of PD with timing shown in between the project sample collections.

Histopathology*: PD = Tissue changes characteristic for PD & SAV detection, No = no diagnosis

¹ = SAV detected in a single individual sample

² = PD diagnosis at 8 months post transfer

³ = PD diagnosis on slaughter samples

- = analysis not performed

b) Risikofaktorer

Risiko for smitte og utbrudd av PD i ikke-endemisk område (nå nord for Hustadvika), er betydelig lavere enn risikoen for de anleggene som er lokalisert i endemisk område. I prosjektet hadde vi ingen smittede lokaliteter nord for Hustadvika, mens vi sør for denne smittegrensen fant smitte i 64 % av lokalitetene. Enkeltutbrudd av PD nord for endemisk sone kan ha hatt sammenheng med smolttransporter sørfra, og våre funn illustrerer hvor mye næringen har å vinne på å hindre ytterligere spredning av viruset nordover.

Innenfor endemisk område (nå sør for Hustadvika), fant vi ingen sikre forskjeller mellom de lokalitetene som ikke fikk og de som fikk PD. For disse lokalitetene ble mange potensielle risikofaktorer testet uten at statistisk signifikante sammenhenger kunne påvises. Dette kan skyldes at vi har en dominerende risikofaktor gjennom smittepresset som er i området og at

forskjeller mellom anleggene er for små i forhold til det antall lokaliteter vi greide å inkludere i prosjektet.

c) Økonomiske konsekvenser av PD. Opplysninger fra vår kohort studie ble inkludert i et stipendiatprosjekt ved Norges veterinærhøgskole (NVH) der PD ble brukt som "case" ved utarbeidelse av en modell for beregning av økonomiske tap ved sjukdom i fiskeoppdrett. Direkte kostnader knyttet til PD-utbrudd ble estimert til 14,4 millioner NOK per 500 000 sjøsatte smolt.

d) Registrering av sykdomsbegrensende driftstiltak Registrerte opplysninger var varierte, men ingen driftstiltak pekte seg ut som spesielt effektive, jfr resultater for delmål 1 b om risikofaktorer.

Fordi vi i dette prosjektet har vist at viruset forblir i populasjonen gjennom hele resten av produksjonssyklus (jfr delmål 1a), vil vi likevel understreke at alle tiltak mot videre spredning av virus, gjennom flytting av fisk, via brønnbåter som har fraktet smittet fisk etc, vil være viktige tiltak for å redusere smittepresset i næringen. Det samme gjelder trolig også brakklegging.

Resultater, delmål 2

a) Spredning av SAV og PD mellom merder

Tre merder i hver av tre sjøvannslokaliteter ble undersøkt. Merdene ble plukket ut slik at de skulle ligge mest mulig spredt innenfor lokaliteten.

På en lokalitet startet undersøkelsene flere måneder før smitte fordi dette anlegget var under risiko pga andre PD-utbrudd i samme fjord. Det ble gjort tre prøveuttak á 60 fisk der det verken fantes SAV, vevsforandringer som ved PD eller spesifikt antistoff. Da smitten første gangen ble påvist en måned etter siste negative prøveuttak, var alle de tre undersøkte merdene infiserte. Samtidig ble også vevsforandringer som ved PD og spesifikt antistoff påvist hos fisk i to av de tre merdene selv om det da ikke var registrert noe sykdomsutbrudd på lokaliteten.

I de to andre lokalitetene startet prøveuttakene da det ble registrert PD-utbrudd i en merd. Ved første prøveuttak i to tilsynelatende uaffiserte merder på hver av lokalitetene fant vi fisk som var infiserte med SAV i alle merdene. Også her fantes vevsforandringer som ved PD og/eller spesifikt antistoff hos fisk i tilsynelatende ikke-affiserte merder.

b) Modellering av spredning

Våre undersøkelser tyder på at SAV spres såpass raskt mellom merdene innen en lokalitet at det er lite en oppdretter kan gjøre for å skjerme tilsynelatende friske merder mot smitte.

I samarbeid med NFR-prosjekt 178243 ble alle kjente registreerte PD-utbrudd fra 2003-2007 sammen med lokalitets- og produksjonsdata (Havbruksregisteret og Havbruksdata) fra samme periode, knyttet sammen i en matematisk smittespredningsmodell. I denne modellen framkom en sammenstilling av avstand til PD-positive naboanlegg og biomassestørrelser (sammensatt til en "smittepress"-variabel) som den dominerende risikofaktor for PD-utbrudd. Denne modellen inneholdt et stort antall lokaliteter og samsvarer med en manglende suksess i forhold til å påvise andre mindre dominante risikofaktorer gjennom et ordinært case-kontroll studium..

Resultater, delmål 3

Studier av SAV og vertsrespons fra sjøsetting og til slakt

Påvisning av SAV er rapportert under delmål 1 og 2. Vertsrespons i form av antistoff mot SAV og vevsforandringer karakteristiske for PD ble undersøkt i et grovmasket nett i den store kohortstudien og fulgt tettere i de tre utvalgte lokalitetene.

Ved første gangs påvisning av SAV i populasjonen fantes i de fleste lokalitetene individer som hadde rukket å respondere med produksjon av spesifikt antistoff mot SAV. Prevalens av fisk med antistoff økte så vanligvis i løpet av de neste 3-4 månedene, og ved avslutning av produksjonssyklus fantes antistoff hos > 50% av fiskene, med unntak av en lokalitet der prevalensen var 37%. I lokalitetene som ble fulgt tettest, var antall fisk med antistoff ved slakt høyere enn antall fisk med SAV. I den ene av de undersøkte lokalitetene der fisken ble fulgt helt fram til stryking, ble antistoff påvist hos 94% og SAV hos 8% av fiskene som ble testet ved stryking, 19 måneder etter første PD-diagnose. Våre undersøkelser bekrefter altså at virusundersøkelse er best egnet for å avsløre smittede populasjoner den første perioden etter smitte og ved sykdomsutbrudd fordi prevalens av fisk med SAV da er høyest, mens antistoffundersøkelser kan være bedre egnet seinere i infeksjonsforløpet.

Vevsforandringer karakteristiske for PD var i hovedsak knyttet til sykdomsutbrudd, men kunne også påvises fom første påvisning av virus måneder før registrerte sykdomsutbrudd og ved alle prøveuttak på smittede lokaliteter fram tom slakt, men da med lavere prevalens og ikke på alle lokalitetene.

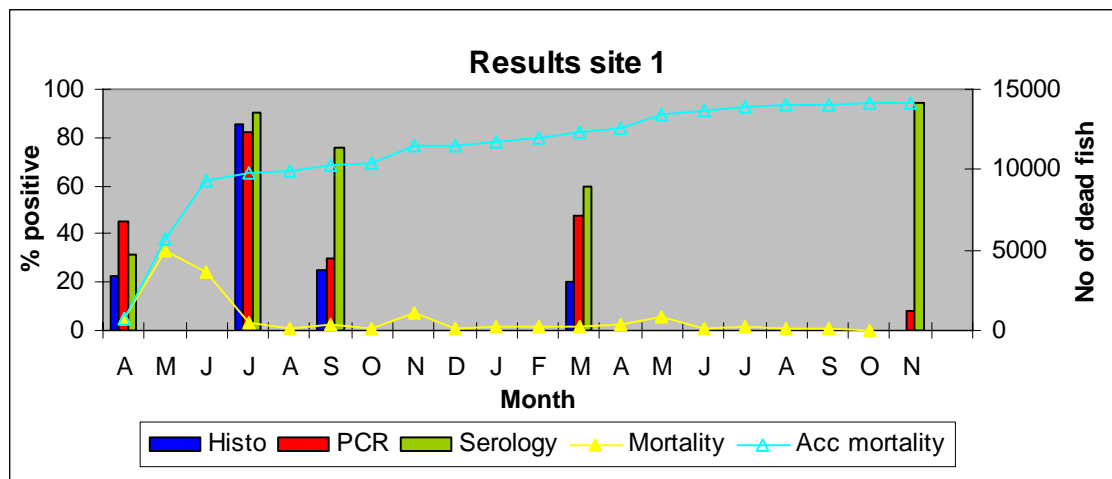
Praktisk inkubasjonstid (tid mellom smitte og registrert sykdomsutbrudd med økt dødelighet) var svært variabel. Alle de tre lokalitetene som vi fulgte tettest, hadde en PD-relatert dødelighetstopp på vår/tidlig sommer. Dette var hhv ca 1, 2 og 4 måneder etter første påvisning av SAV. I den store kohortstudien registrerte vi samme mønster. Men variasjon var stor, og det kunne vare opp til både 18 og 71 uker fra første påvisning av SAV og til det ble registrert utbrudd av PD på lokaliteten .

Vertsrespons i form av vevsforandringer i lys skjelettmuskel ("filet") blir nærmere undersøkt i samarbeid med Nofima marin sitt NFR-prosjekt 179035/S40: The impact of pancreas disease (PD) on flesh quality of Atlantic salmon.

Figuren nedenfor viser resultater på lokalitetsnivå fra en lokalitet.

X-aksen angir måned. Linjene angir hhv dødelighet per måned og akkumulert dødelighet. Søylene angir resultater av analyser av prøveuttakene der blå søyle angir andel fisk med vevsforandringer som ved PD, rød søyle angir andel fisk med SAV, og grønn søyle viser andel fisk med spesifikt antistoff mot SAV.

Fra manus v/Marit A. Wasmuth et al, under utarbeidelse for publisering.



Resultater, delmål 4

Molekylær karakterisering av SAV og forbedrete påvisningsmetoder

Inntil nylig var tre subtyper av SAV kjent, hvorav subtype 3 var den eneste som har vært påvist i Norge. I løpet av prosjektperioden har man påvist tre nye subtyper av SAV i Irland og Skottland. Dette indikerer at det fulle omfanget av subtyper og genetiske varianter av SAV ennå ikke er kjent. Målet med SAV karakteriseringen i prosjektet var å se om genetiske variasjonen kan knyttes til karakteristikk ved sykdomsutbruddet, som for eksempel dødelighetsnivå eller geografisk lokalitet, for å den måten å få en bedre forståelse av epidemiologien.

To områder av SAV genomet med størst variasjonen (nsP3 og E2) ble valgt ut basert på databaseinformasjon. Oppnådd sekvensdata fra disse områdene fra utbruddslokalitetene har blitt sammenlignet. Fremdeles er SAV3 den eneste subtypen som er funnet i Norge. SAV3 er genetisk homogen og stabil. Vi ser liten grad av variasjon hos SAV3 som påvises innen eller mellom utbruddslokaliteter og over tid. Noen spesifikke karakteristikk har blitt funnet, og utbredelsen og eventuell betydning av disse vil bli videre undersøkt med mer sekvensering.

I løpet av prosjektperioden har vi gått over til real time RT-PCR for påvisning av SAV, noe som gir både raskere og mer sensitiv viruspåvisning enn tidligere. Dette har vært avgjørende for å vise at etter ett PD-utbrudd er populasjonene fortsatt infisert for resten av produksjonssyklus, selv om fisken er klinisk frisk.

Sekvensering av mange SAV-positive prøver vil gi indikasjon på om andre deler av SAV genomet er mer variable og dermed bedre egnet til å kunne skille virusvarianter, og dette arbeidet vil forsette etter avslutning av prosjektet.

I starten av prosjektet gjorde vi en pilotstudie for å undersøke om det var forsvarlig å undersøke samleprøver i stedet for individprøver. SAV positive prøver ble fortynnet 1:5 med virusnegative prøver og testet. Slik samling (pooling) av prøver ga viruspåvising med noe lavere sensitivitet når det var lite virus i den ene positive prøven, men den tillot testing av en større prøvemengde.

Prosjektgjennomføring og ressursbruk

Prosjektet er gjennomført som planlagt, men avslutningen ble forsinket pga sykdom og svangerskap, jfr innvilget søknad om forlengeelse av prosjektperioden med ½ år. Innsamling av feltprøver og innhenting av opplysninger om driftsforhold var mer arbeidskrevende og kostbart enn vi hadde estimert. Heldigvis har det store fokuset som har vært på PD i perioden likevel bidratt til at deler av materiale fra vårt prosjekt kunne inkluderes i andre PD-prosjekter. På den måten ble det vi måtte prioritere ned, faktisk undersøkt grundigere enn det vi selv hadde planlagt. Dette gjelder særlig utredning av økonomiske konsekvenser av PD som ble inkludert i et stipendiatprosjektet på Norges veterinærhøgskole (se resultater, delmål 1) og at slakteprøver fra flere av lokalitetene i prosjektet ble tatt inn i Nofima marin sitt NFR-prosjekt 179035/S40: The impact of pancreas disease (PD) on flesh quality of Atlantic salmon. Samarbeid med NFR-prosjekt 178243 er nevnt under resultater, delmål 2 b. I ett tilfelle har vi imidlertid avslått å utlevere prøvemateriale fra prosjektet.

Marine Harvest (MH) har vært en aktiv partner i prosjektet og har bidratt med å gjøre store og dyre prøveuttak for egen regning, inkludert fra mye slaktemoden fisk. MH har også vært med i prosjektgruppa og gjennom det bidratt til at prosjektet har belyst spørsmål av praktisk betydning for næringen som helhet.

Fordi resultater fra prosjektet har vært uvanlig sterkt etterspurt fra forvaltning og næring, har vi gitt mye informasjon om resultater undervegs. Det har likevel vært en utfordring å ballansere mellom ønskene om informasjon straks og vårt behov for å vente med informasjon til kunnskapen er godt nok dokumentert. For framtidige prosjekter kan det også være verdt å merke seg at prøveuttakene var såpass arbeidskrevende for fiskehelsetjenestene at noen få trakk seg undervegs.

Vurdering av betydning/nytteverdi av prosjektet

Prosjektet har gitt ny kunnskap om SAV og PD som allerede har kommet til nytte for næring og forvaltning. Ved at prosjektet har bidratt til å dokumentere at smittepress trolig er den viktigste risikofaktoren og at de økonomiske tapene pga PD kan være betydelige, håper vi at prosjektet vil bidra til et enda sterkere fokus på å forhindre videre spredning av smitte nordover og at resultatene motiverer til videre arbeid med å dempe smittepresset innenfor endemisk sone.

Prosjektet har bidratt til forskerutdanning for en stipendiat innen akvatisk epidemiologi ved Norges veterinærhøgskole (NVH) og ved å bidra med prøvemateriale og/eller informasjon til ytterligere tre stipendiatprosjekt, ett på NVH og to via Nofima marin sitt NFR-prosjekt 179035.

Resultater som forventes ferdigstilt etter prosjektslutt

Innsendt artikkel med vekt på delmål 1 og 3 forventes publisert:

Jansen MD et al: Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in fresh water and seawater sites in Norway from 2006 to 2008 (Journal of Fish Diseases, submitted 2009).

Artikkel med vekt på delmål 2 og 3 er under utarbeidelse og forventes publisert.

M A Wasmuth et al Pancreas disease (PD) in sea reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), a prospective, longitudinal study of disease development and diagnostic test results

Virusprøver fra prosjektet vil bli videre undersøkt med mer sekvensering, jfr delmål 4.

Resultatene skal publiseres som vitenskapelig artikkel og inngå i doktorgraden til stipendiat

Mona Dverdal Jansen ved NVH, sammen med bla de to artiklene ovenfor.