



## FAGLIG SLUTTRAPPORTERING FHF PROSJEKT 901264:

## FORSØK MED DYPP- OG STIKKVAKSINERING AV ROGNKJEKSI SMITTECELLE OG FELTFORSØK MED OPPFØLGING AV VAKSINERT FISK I SJØ

## 1. Sammendrag

Mål I prosjektet var til å dokumentere vaksinebeskyttelse mot atypisk *Aeromonas salmonicida* infeksjon i oppdrettsrognkjeks og undersøke om dypp/badevaksinering i forkant av stikkvaksinering kunne øke immunrepsjonen slik at rognkjeks kunne sjøsettes før 500 døgngrader etter stikkvaksinering. Prosjektet var delt i to sub-prosjekter, et som undersøkte vaksinebeskyttelse under kontrollert laboratorie forhold (vanntemperatur 15°C) og et som fulgte opp vaksinert og ikke vaksinert rognkjeks i feltet (vanntemperatur ca. 16°C). Det kunne ikke påvises en økte grad av beskyttelse i vaksinert fisk sammenlignet med ikkevaksinerte fisk i forsøket, hverken i i laboratorieforsøk eller i feltforsøk. Grunnen til manglende beskyttelse er ukjent men kan muligens knyttes til en ikke-optimal vaksine komposisjon eller at rognkjeksen var ikke i stand til å forsvare seg mot infeksjon ved de forholdsvis høye vanntemperaturerene benyttet/opplevde.

### Summary

The aim of the project was to investigate vaccine induced protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Norwegian farmed lump sucker. The project was split into two sub-projects, one focusing on laboratory trials and the other following up vaccinated fish in the field under farming conditions. Each sub-project was performed as a Masters Research project at the University of Bergen. The laboratory based project studied protection awarded by dip/bath vaccination, i.p. vaccination and a combination of dip/bath and i.p. vaccination was evaluated in i.p. and cohabitant challenge models at a water temperature of 15°C. The field trial followed the fate of vaccinated and unvaccinated lump sucker transferred to sea at a water temperature of approximately 16°C.

No significant degree of vaccine protection against *A. salmonicida* infection was identified following exposure either by i.p. or cohabitant exposure in the laboratory trial or by natural challenge in the field. The reasons for the lack of protection are unknown, but may include factors relating to the vaccine composition or the physiological ability of lump sucker to mount an effective immune response at high water temperatures.

## 2. Innledning

### Faglig bakgrunn

Oppdrett av rognkjeks til biologisk avlusning har blitt en betydelig næring i Norge, med over 48 settefiskkonsesjoner og en estimert total produksjon på snaut 16 millioner fisk i 2016 ([www.fiskeridir.no](http://www.fiskeridir.no)). Under forholdsvis kontrollerte forhold i settefiskstadiet ser rognkjeks ut til å være en enkelt oppdrettet og rimelig robust fisk med få alvorlige sykdommer. Det er under mindre kontrollerte forhold og spesielt etter sjøsetting i merd at problemer med sykdom og overlevelse blir mest merkbare. Til tross for et økende fokus på rognkjeksens velferd i næringen, er det ikke til å komme bort ifra at forventet levetid hos merdsatt rognkjeks fortsatt er kort og totalt svinn stort. Dødeligheten kan være akutt og betydelig, og det er ikke uvanlig at rognkjeks gjennutsettes opptil flere ganger i løpet av en oppdrettssyklus. Veterinærinstituttet utga i 2016 en rapport på oppdrag fra FHF med fokus på årsaker til dødelighet blant oppdrettsrognkjeks. Forfatterne konkluderte med at bakterielle infeksjoner, særlig infeksjon med atypisk *Aeromonas salmonicida*, var en av hovedårsakene til den redusert overlevelsen. Rapporten påpekte også at tilgjengelige vaksiner viste liten eller ingen beskyttende effekt.

Mesteparten av fisken som inngikk i veterinærinstitutt rapporten ble sannsynligvis vaksinert med vaksiner designet for bruk på torsk. Torsk infiseres vanligvis med *A. salmonicida*, A-lag type 3. I senere tid har derimot arbeid utført ved Veterinærinstituttet vist at rognkjeksen hovedsakelig blir infisert med en atypisk *A. salmonicida* subtype kjent som A-lag type 6, og færre med type 5. Norske vaksineleverandører har derfor endret vaksinen som følge av dette arbeidet og

dagens vaksiner er trolig basert på mer egnede bakteriestammer som i teorien vil gi en større grad av beskyttelse enn tidligere vaksiner. Denne eventuelt økte beskyttelsen er imidlertid enda ikke vitenskapelig dokumentert. FHF finansierte derfor dette studiet for å dokumentere beskyttelse oppnådd mot atypisk *A. salmonicida* infeksjon i rognkjeks med en vaksine basert på atypisk *A. salmonicida* type 5 og 6. De fleste vaksineselskaper anbefaler ca. 500 d°C ('døgngrader/ d°C') mellom vaksinerings og sjøsetting for å oppnå størst mulig beskyttelse. Rognkjeks vokser fort, og hurtig vekst mellom vaksinerings og sjøsetting betyr at fisken raskt blir større enn det som er ønskelig ved sjøsetting. Et sekundært formål med prosjektet var derfor å undersøke om dyppvaksinerings i forkant av stikkvaksinerings kunne øke effekt og korte ned på immuniseringsperioden.

### Prosjektets omfang

Prosjektet besto av 2 sub-prosjekter, en laboratoriebaseret og en feltbasert. Begge prosjekter ble utført som Mastergrads prosjekt ved Universitet i Bergen.

I laboratoriedelen ble 4 grupper rognkjeks vaksinert på ulike måter (for detaljer se vedlegg 1; Mastersoppgave Nordstrand). To av gruppene ble i tillegg dyppvaksinert en periode i forkant av stikkvaksinerings for å se om dyppvaksinerings kunne bidra til en økning i totalt beskyttelsesnivå, og for å se om dyppvaksinerings økte hastigheten i fiskens immunrespons før påfølgende stikkvaksinerings. Alle gruppene av fisk ble så smittet med atypisk *A. salmonicida* type 6 i en stikksmitte og kohabitant eksponeringsmodell. Fisk (ca. 30 individ) fra alle vaksinerte grupper ble eksponert for begge typer smitte ved 300, 450 og 780 d°C etter stikkvaksinerings. Dødelighet, oppførsel, prøvetaking osv. ble registrert daglig i 35-45 dager. Smitteforsøkene ble gjennomført ved 15°C som er en høy, men realistisk, sommertemperatur i et lakseanlegg.

Feltstudiet (for detaljer se vedlegg 2; Mastersoppgave Sæbjørnsen) besto av oppfølging av grupper av vaksinerte (26.500 stk) og uvaksinerte (20.500 stk) rognkjeks på ca. 40-50 g. I et lakseanlegg på Vestlandet ble fisken fordelt på 7 merder, 4 merder med vaksinert og 3 merder med uvaksinert fisk. Laksen i merdene var ca. 2,8 kg og alle merdene inneholdt i tillegg villfanget leppefisk hvor det hadde blitt påvist infeksjon med atypisk *A. salmonicida* kort tid før sjøsetting av rognkjeks. Rognkjeks dødelighet ble registrert daglig av anleggets ansatte og prøver til histologi, dyrkning og qPCR for påvisning av atypisk *A. salmonicida* ble tatt i forbindelse med kliniske undersøkelser månedlig, fra 2 måneder før utsett til 3 måneder etter utsett. Det ble også tatt prøver fra leppefiskene.

### Prosjektorganisering

*Prosjekt gruppen besto av følgende personer:*

Duncan Colquhoun, UiB, prosjektleder

Henriette Nordstrand (Mastersstudent UiB)

Hlene Sæbjørnsen (Mastersstudent UiB)

Øyvind Vågnes, Vaxxinova AS

Henriette Glosvik, Marine Harvest AS

*Styringsgruppen besto av følgende personer:*

Claudia Wittwer, Arctic Cleaner-fish AS

Kristian Straume-Lie, Salmar AS

Lars Jørgen Ulvan, Nordland Rensefisk AS

*FHF observatør*

Eirik Sigstadstø

### 3. Problemstilling og formål

Formål med prosjektet var å dokumentere graden av beskyttelse oppnådd mot *A. salmonicida* infeksjon ved forskjellige vaksinereregimer i rognkjeks. Formålen med prosjektet ble oppnådd dvs effekten av vaksinasjon ble dokumentert, men dessverre dokumentert vi ingen beskyttelse mot atypisk *A. salmonicida* infeksjon. Hadde nåværende prosjekt kunne dokumentere velykket beskyttelse av rognkjeks mot atypisk furunkulose det vil ha vært av stor (men vanskelig å estimere) økonomisk betydning for næringen, siden overlevelse i merd vil ha sannsynligvis økte dramatisk. Resultatene er likevel viktig og de vill legge press på vaksineprodusentene til å fortsatt jobbe på vaksine utvikling. De også belyser behov for ytterligere forskning på grunnleggende biologi av rognkjeks og dens immunrespons ved forskjellige vanntemperaturer.

Alle faglig leveranser iflg tilsagnsbrev er levert.

### 4. Prosjektgjennomføring

Detaljert oversikt av materiale og metoder, resultater fra henholdsvis laboratorie og felt undersøkelser finnes i mastergradsoppgavene til Helene Sæbjørnsen og Henriette Nordstrand som er tilgjengelig på prosjektsiden på [www.fhf.no](http://www.fhf.no).

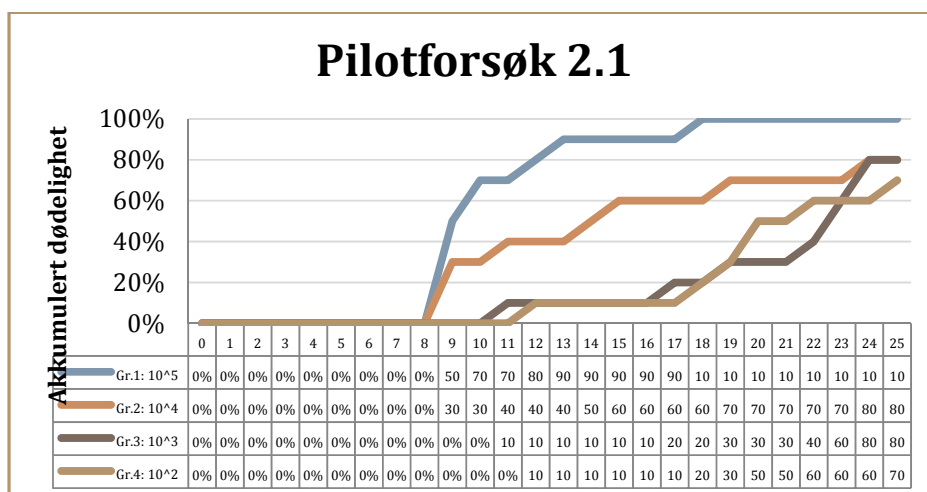
Helene Sæbjørnsen (Felt) og Henriette Nordstrand (laboratorie) var ansvarlig for hver sitt mastergrads prosjekt. Arbeidet ble utført under veiledning av Duncan Colquhoun og Øyvind Vågnes. Henriette Glosvik koordinert oppfølging av felt studiet (vaksinering av forsøksfisk til felt forsøket og praktisk kommunikasjon med anlegget).

### 5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Hovedresultatene oppgis her:

Resultater Laboratorie undersøkelser

Bestemmelse av smittedose (i.p. injeksjonsdose)



Oversikt over akkumulert dødelighet i pilotforsøk (bestemmelse av smittedose) Fisken ble i.p. smittet med fire ulike smittedoser for å kartlegge effekten og bestemme konsentrasjon til senere forsøk.

## Smittedoser brukt i forsøkene

Smittedose ble beregnet (Cfu) ved seriefortynning, utsæd og kolonitelling av smitteinokulum i alle smitteforsøk. I tillegg ble det tatt stryk fra smitteinokulum på CBB for å kontrollere A-lagstatus. Samtlige kolonier som vokste opp var A-lag positive (mørkeblå).

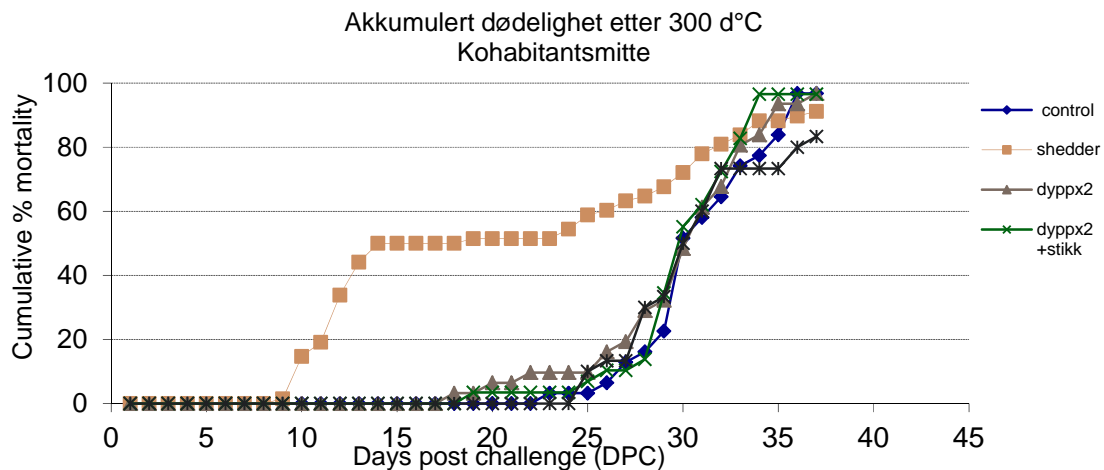
Oversikt over planlagt smittedoser og faktiske smittedoser basert på seriefortynning og telling (Cfu).

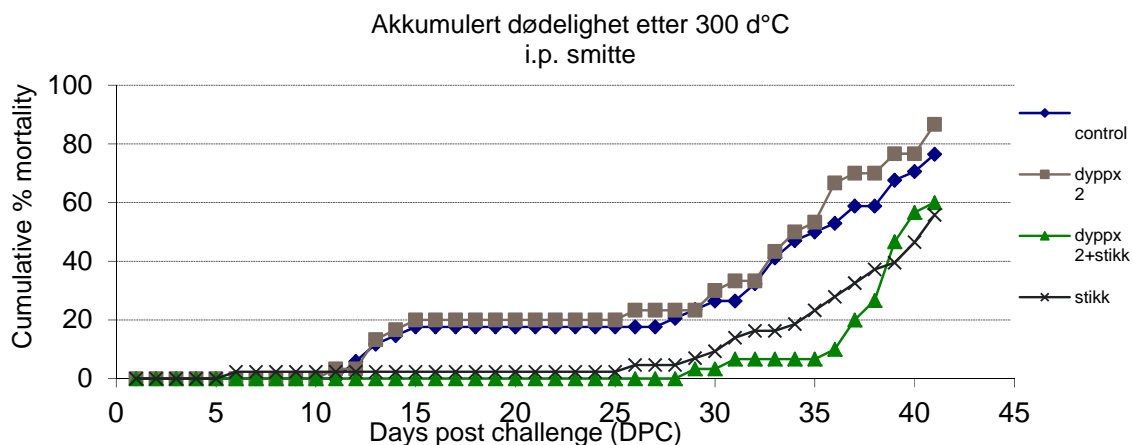
	Smittemetode	Ønsket smittedose	Faktisk smittedose (cfu)
<b>Smitteforsøk 300 d°C</b>	Kohab (sheddere)	$1 \times 10^4$ cfu/dose	$7,3 \times 10^3$ cfu/dose
		$1 \times 10^5$ cfu/dose	$7,3 \times 10^4$ cfu/dose
	IP	$1 \times 10^4$ cfu/dose	$7,3 \times 10^3$ cfu/dose
<b>Smitteforsøk 450 d°C</b>	Kohab (sheddere)	$1 \times 10^4$ cfu/dose	$8,4 \times 10^3$ cfu/dose
		$1 \times 10^5$ cfu/dose	$8,4 \times 10^4$ cfu/dose
	IP	$1 \times 10^4$ cfu/dose	$8,4 \times 10^3$ cfu/dose
<b>Smitteforsøk 780 d°C</b>	Kohab (sheddere)	$1 \times 10^5$ cfu/dose	$9,0 \times 10^4$ cfu/dose
	IP	$1 \times 10^4$ cfu/dose	$9,0 \times 10^3$ cfu/dose

## Testing av vaksinebeskyttelse

### Smitteforsøk 300 d°C etter stikkvaksinering

I forsøket med i.p. smitte var dødeligheten mer gradvis (Figur 10). Gruppe 2 (dypp+stikk) og 3 (stikk) viste noe bedre beskyttelse enn gruppe 1 (dypp) og 4 (kontroll) ved at dødeligheten startet opp senere og at den var lavere ved forsøksslutt.

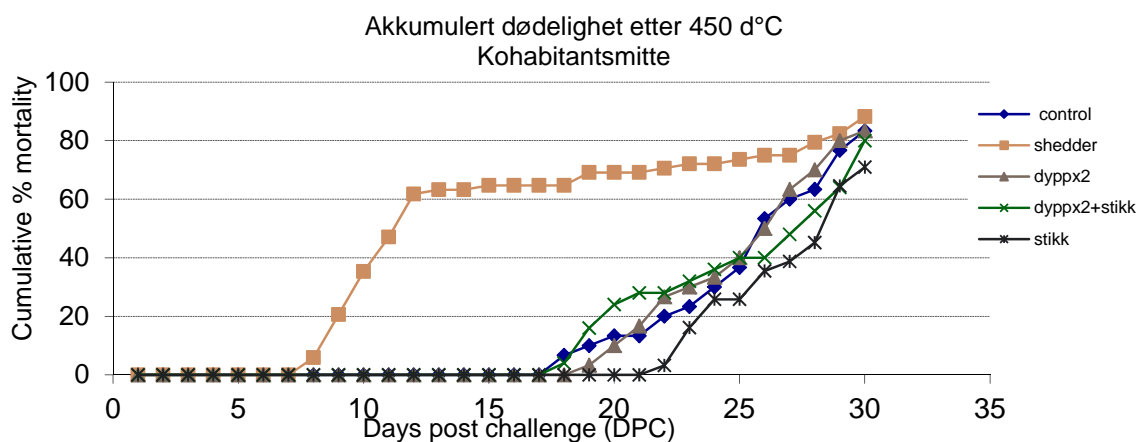




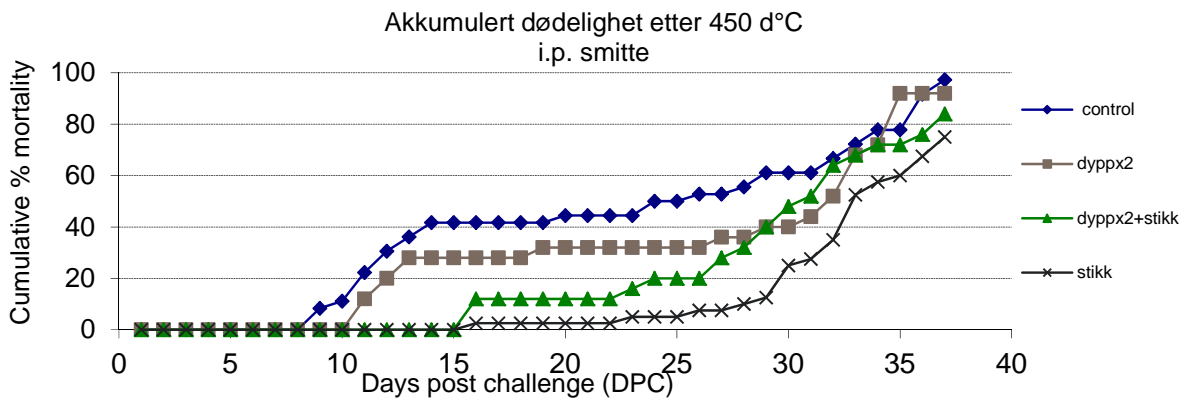
### Smitteforsøk 450 d°C etter stikkvaksinerings

Ved kohabitantforsøket 450 d°C endepunkt var det en registrert dødelighet over 70 % i samtlige gruppe, og det ble ikke observert noe forskjeller mellom gruppene med hensyn til vaksineindusert beskyttelse.

Ved i.p. smitte viste de stikkvaksinerte gruppene viste noe grad av beskyttelse ved at dødelighet startet opp senere. I forsøket var det registrert dødelighet i samtlige grupper 13 dager tidligere sammenlignet med i.p. smitteforsøk 300.



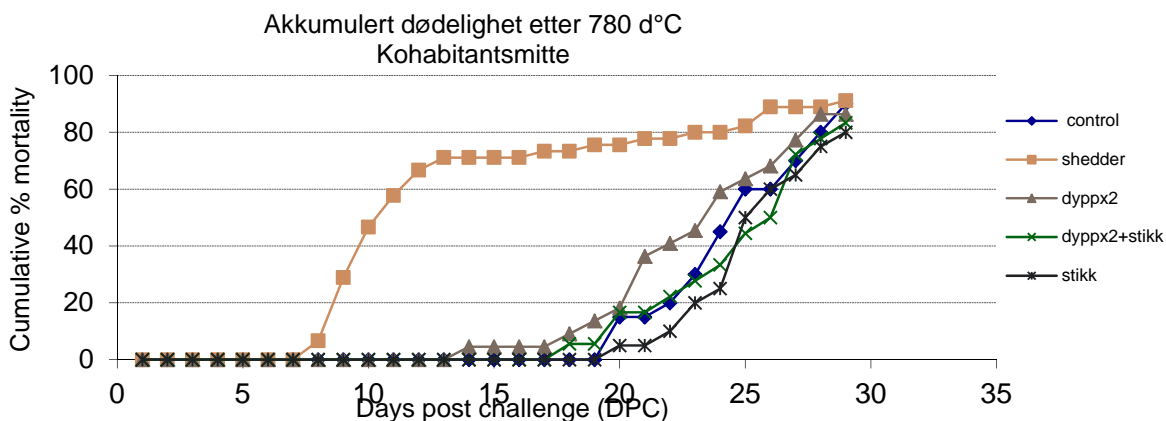
Akkumulert dødelighet hos rognkjeks som ble kohabitantsmittet 450 døgnger etter stikkvaksinerings.



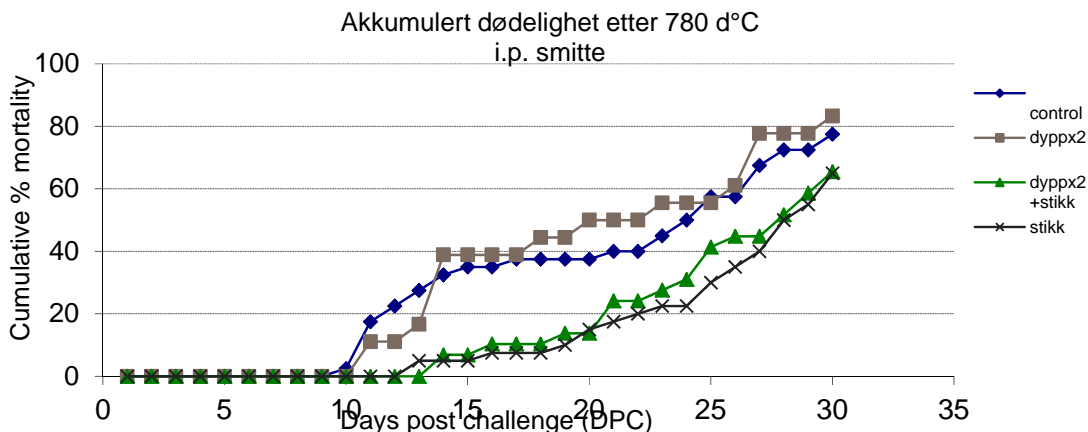
Akkumulerte dødeligheten hos rognkjeksene som ble i.p. smittet 450 døgngader etter stikkvaksinerings.

### Smitteforsøk 780 d°C etter stikkvaksinerings

I kohabitantforsøket opptrådte dødeligheten svært akutt. Ved avslutning var dødeligheten over 80 % i samtlige grupper og det ble ikke observert noe forskjeller mellom grupper med hensyn til vaksinerindusert beskyttelse. Ved i.p. smitte, som tidligere forsøk viste de stikkvaksinerte gruppene forsinket dødelighet. Det var registrert dødelighet i samtlige grupper innen dag 14, 15 dager tidligere enn IP smitteforsøk 300.



Akkumulert dødelighet hos rognkjeksene som ble kohabitantsmittet 780 døgngader etter stikkvaksinerings. Sheddere fikk i dette forsøket bare en smittedose ( høy dose).



Akkumulerte dødelighet hos rognkjeksene som ble i.p. smittet 780 døgngader etter stikkvaksinering.

## Overlevelsesanalyse – Kaplan Meier

RPSverdier, "Mean time to death" verdier, og statistisk sammenligning mellom grupper (p-verdier fra Cox proportional hazard model) for i.p. smitteforsøkene er oppsummert i tabell 13, 14 og 15. "Mean time to death" fra Kaplan Meier analysen viser, akkurat som dødelighetskurver, en forskyvning i tid for observert dødelighet.

Tabell: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p. smitteforsøk 300. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis  $p < 0.05$ .

300 d°C	mean	P verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort
<b>Kontroll</b>	32,6				76,5 %
<b>Dypp</b>	31,5	0.343	-18,1 %	-13,3 %	87 %
<b>Dypp + Stikk</b>	39,0	0.031	51,1 %	21,5 %	60 %
<b>Stikk</b>	37,5	0.018	37,5 %	27,0 %	55,8 %

Tabell: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p. smitteforsøk 450. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis  $p < 0.05$ .

450 d°C	mean	p verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort
<b>Kontroll</b>	23,3				97,2 %
<b>Dypp</b>	26,7	0.391	34,7 %	5,4 %	92 %
<b>Dypp + Stikk</b>	29,9	0.0909	36,0 %	13,6 %	84 %
<b>Stikk</b>	33,0	0.0005	80,0 %	22,9 %	75 %

Tabell: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p. smitteforsøk 780. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis  $p < 0.05$ .

780 d°C	mean	p-verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort.
<b>Kontroll</b>	22,0				85 %
<b>Dypp</b>	21,2	0.615	-8,8 %	-4,6 %	89 %
<b>Dypp + Stikk</b>	26,1	0.108	25,3	10,8 %	76 %
<b>Stikk</b>	26,8	0.057	39,6	8,8 %	77,5 %

## Histologi merknader

I majoriteten av individene både vaksinert og ikke vaksinert fisk ble det observert noe som minner om store ansamlinger av betennelsesceller i lever. Graden av hvor affisert leveren var varierte, i noen tilfeller få fokale ansamlinger av betennelsesceller omringet normale hepatocytter. I andre tilfeller kunne det nesten ikke observeres normalt vev, men fullstendig infiltrasjon av betennelsesceller, nekrotisk vev, blødninger og granulomdannelse.

## Bieffekter av vaksinering (histologisk vurdering)

Det ble observert peritonitt i 8 av totalt 19 individer, 6 av disse var stikkvaksinert. Det ble typisk observert betydelig infiltrasjon av betennelsesceller. I noen tilfeller ble det observert granulomatøs peritonitt med bindevevslesjoner, nekrotisert vev og vaksinerester. Det ble observert degenerasjon og nekrose i muskelfibre i noen individer og brunlige ansamlinger av ukjent årsak ble observert i milt hos noen individer.

## Bakteriologi

Det ble tatt nyreutstryk fra totalt 135 rognkjeks på BA og BAS for å påvise *A. salmonicida* og eventuelle andre bakterietyper i løpet av studiet.

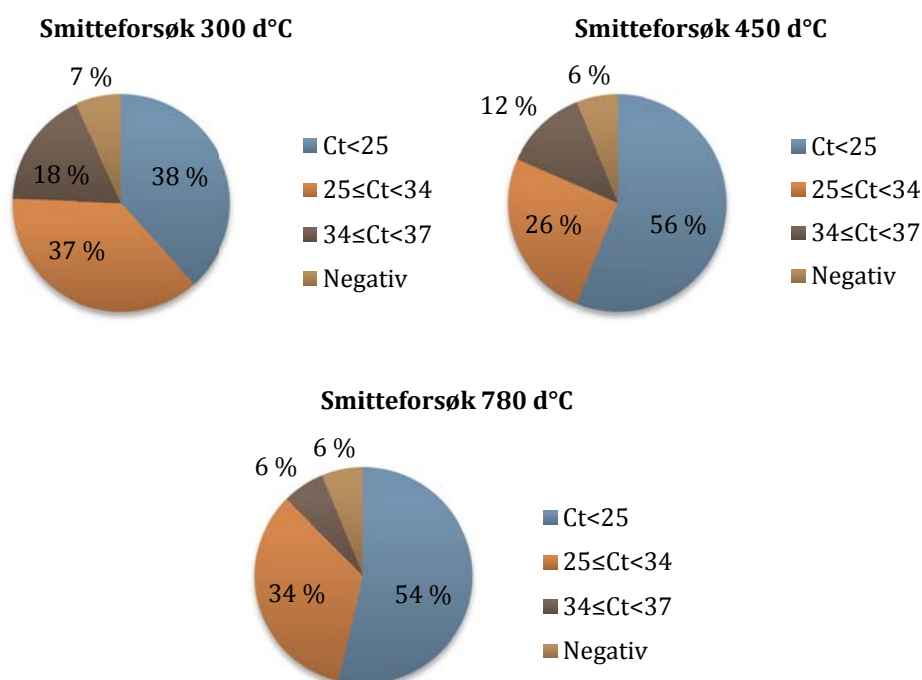
Andel individer som var positive for vekst av *A. salmonicida* ved nyreutstryk på BA og BAS.

Positive for vekst av <i>A. salmonicida</i>	
Smitteforsøk 300 d°C	50 %
Smitteforsøk 450 d°C	69 %
Smitteforsøk 780 d°C	68 %

## Sanntids RT-PCR

Det ble tatt nyreprøver fra totalt 342 rognkjeks for påvisning av *A. salmonicida* ved hjelp av Sanntids RT-PCR. Ct-verdiene ble kategorisert inn i høy ( $Ct < 25$ ), middels ( $25 \leq Ct < 34$ ) og lav ( $34 \leq Ct < 37$ ) bakteriemengde (Figur 28,29,30). I alle forsøk var 93-94 % av prøvene positive for *A. salmonicida*, med noe variasjoner i Ct-verdier.

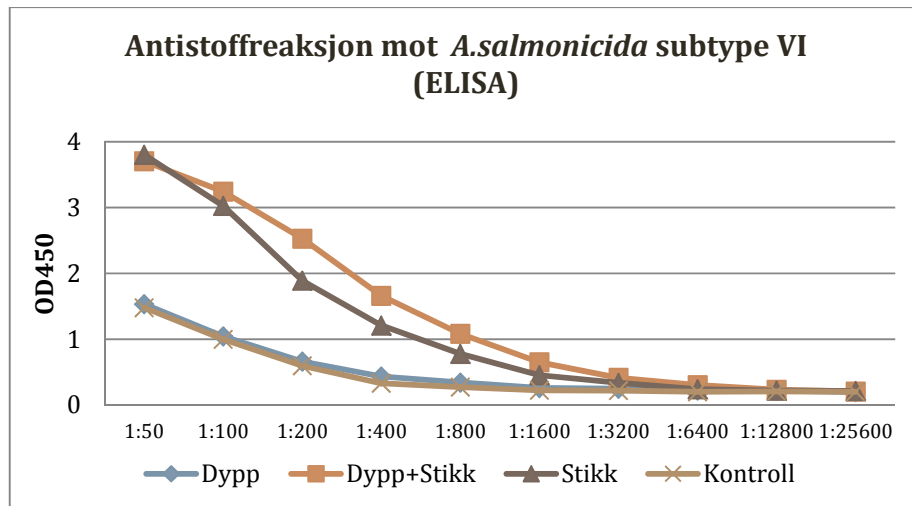
Elongeringsfaktor (påvisning av rognkjeksvev) fungerte som en kvalitetskontroll, og Ct-verdiene var relativt jevne ( $17 \pm 4$ ).





## ELISA

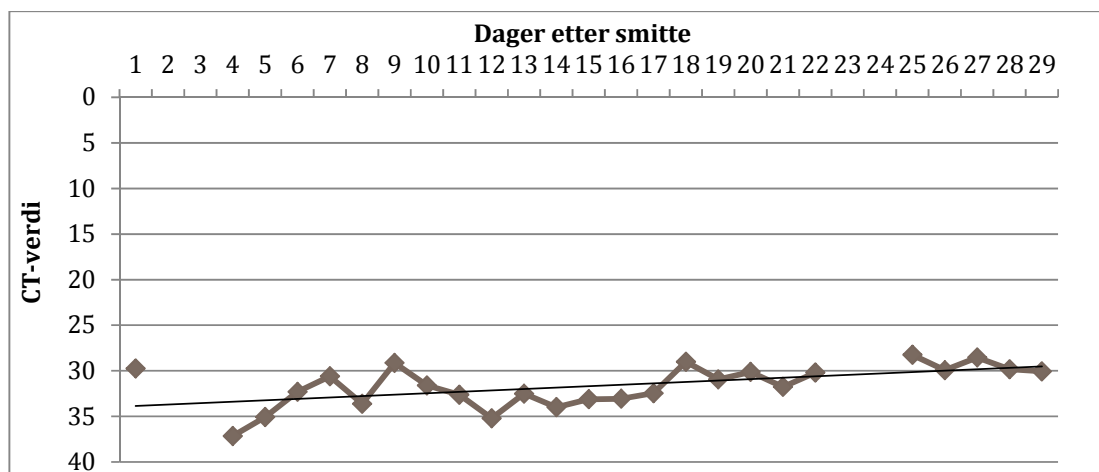
Resultater viser at vaksinert rognkjeks har dannet spesifikke antistoffer mot *A. salmonicida*. Resultatene for ELISA er presentert som en titeringskurve.



ELISA av en fortyningsserie av serum-pools (n=10) fra hver av rognkjeksgruppene. Blodprøvene ble tatt 780 døgngader etter stikkvaksinering.

### 3.11 Sanntids RT-PCR av vannprøver

Vannprøver ble tatt hver dag i hele forsøksperioden fra kar 1 (kohabitantsmitte 780). Vannprøvene ble testet ved hjelp av sanntid RT-PCR for *A. salmonicida*. Alle vannprøvene var positive med unntak av dag 2 og 3. Dag 23 og 24 etter smitte foreligger det ingen resultater grunnet ødelagte vannprøver. Resultatet viser at det er en generell økende mengde av *A. salmonicida* med nedgående Ct-verdier i vannet.



Ct-verdier fra vannprøver tatt fra kar 1 (kohabitantsmitte 780) for *A. salmonicida* ved hjelp av sanntids RT-PCR (merk: Y-akse har synkende verdier) viser en gradvis økning i smittepress med tid som infeksjonen utvikler seg i kohabitant fisk og etter hvert i vaksinert fisk.

## Resultater Felt undersøkelser

### Miljø- og driftsobservasjoner

Ved sjøutsett var vanntemperaturen i anlegget 16°C og saliniteten varierte fra 11-29‰ (0,5-10 meter dybde). Lokaliteten var strømsterk, og oppdrettere rapporterte at død og levende rognkjeks ble presset mot notveggen i perioder med sterk strøm. Fôring var utfordrende, hovedsakelig grunnet overflatefôring i kombinasjon med sterk strøm.

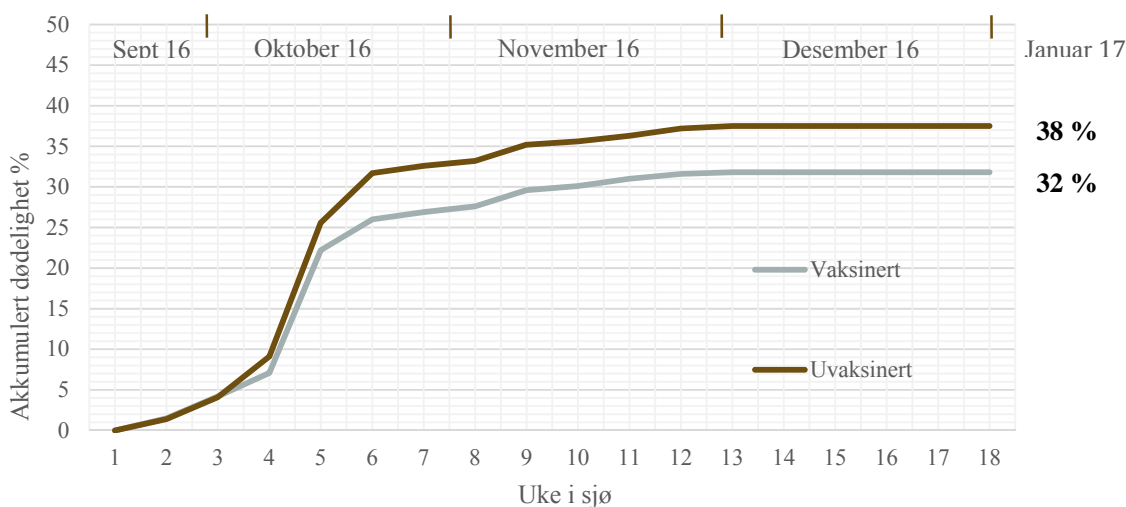
### *Aeromonas salmonicida* infisert villfanget leppefisk

Villfanget leppefisk i anlegget ble diagnostisert med atypisk furunkulose (histologi) en måned før rognkjeks ble sjøsatt.

### Overlevelse hos rognkjeks etter sjøsetting

Dokumentert dødelighet fra vaksineringsstidspunkt til utsett i sjø var <0,05% i begge rognkjeksgruppene.

Dødelighet i sjø inntraff få uker etter utsett (figur 3.1). Rognkjeks ble ikke observert ved dødfiskopptak fra uke 14, eller ved avlusning og i fangstteiner fra uke 16-18 i sjø. Feltoppfølgning ble avsluttet etter 18 uker i sjø, grunnet tom beholdning av rognkjeks i anlegget. Ved studiets avslutning var den dokumenterte dødeligheten 32% for vaksinert og 38% for uvaksinert rognkjeks, og den udokumenterte dødeligheten (svinnet) utgjorde dermed 68% (V) og 62% (UV). Dokumentert dødelighet på merdnivå var 23-52%, og svinnet 48-77 % (tabell 3.1).

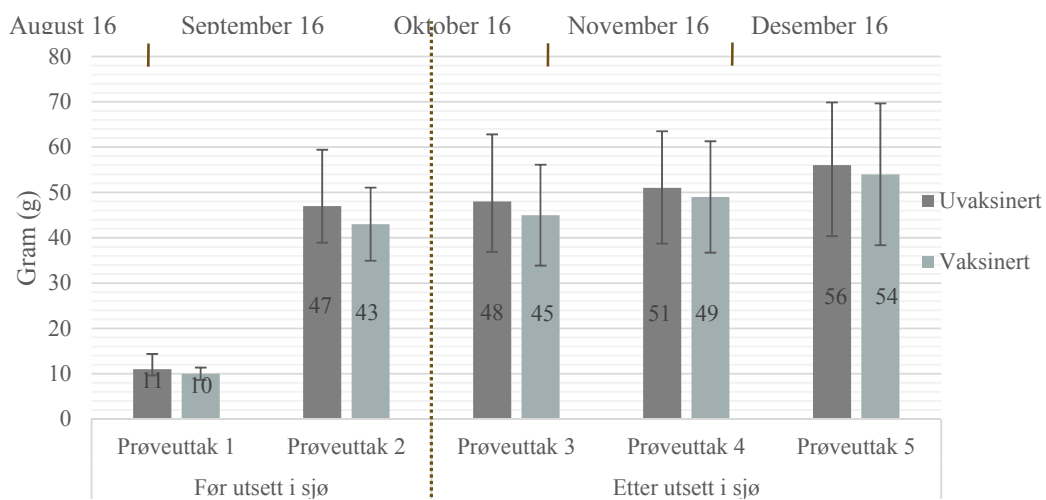


Akkumulert dokumentert dødelighet (%) for vaksinert (V) og uvaksinert rognkjeks (UV) fra utsett i sjø til avslutning av feltoppfølgning.

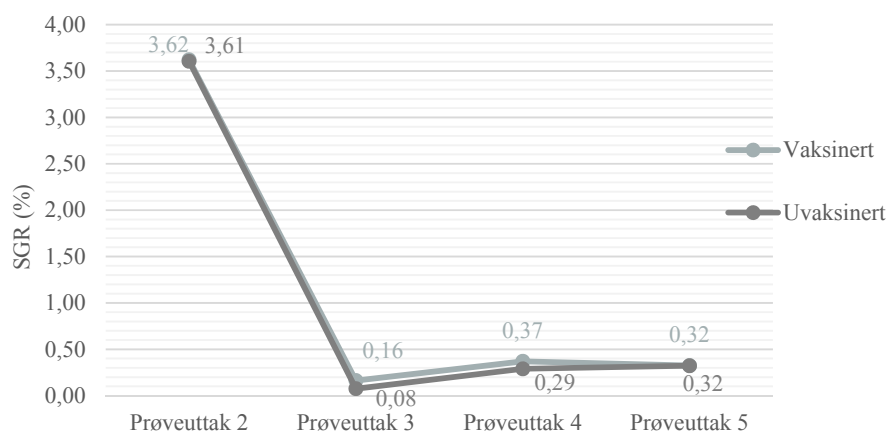
Akkumulert dokumentert og udokumentert dødelighet av vaksinert (V) og uvaksinert (UV) rognkjeks på merdnivå i sjø.

	Merd 1 (UV)	Merd 2 (V)	Merd 3 (UV)	Merd 4 (V)	Merd 6 (V)	Merd 7 (UV)	Merd 8 (V)
<b>Akkumulert dokumentert dødelighet (%)</b>	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
<b>Akkumulert udokumentert dødelighet (svinn) (%)</b>	48,2	58,2	66,6	70,6	66,4	72,1	77,0

## Vekst



Vektutvikling (g) hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks ved fem vektregistreringer. Stiplet linje = sjøsetting.



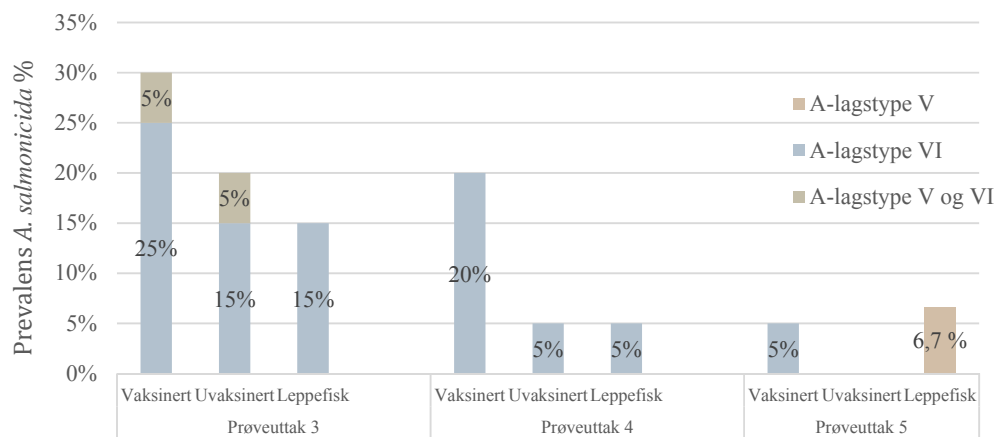
Daglig tilvekst % (SGR) hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks.

## Klinisk undersøkelse

Det ble ikke observert ytre sår, skader eller indre tegn til patologi før utsett i sjø. Det var tilsynelatende ingen klinisk forskjell mellom gruppene i studiet, annet enn vaksinebivirkninger. Ved samtlige prøveuttak etter utsett i sjø hadde et fåtall individ sår på siden, rygg eller halerot. En rekke individ hadde ascites og væske i mage og tarm ved første prøveuttak i sjø. Bare et fåtall individ ble observert med fôr i tarm. Andelen individ med ascites minsket, og mageinnhold økte, ved prøveuttak 4 og 5. Lever- og nyrefarge varierte i mørkhetsgrad.

## Fenotypisk typing og genotypisk A-lagstyping av *A. salmonicida* isolert fra felt fisk

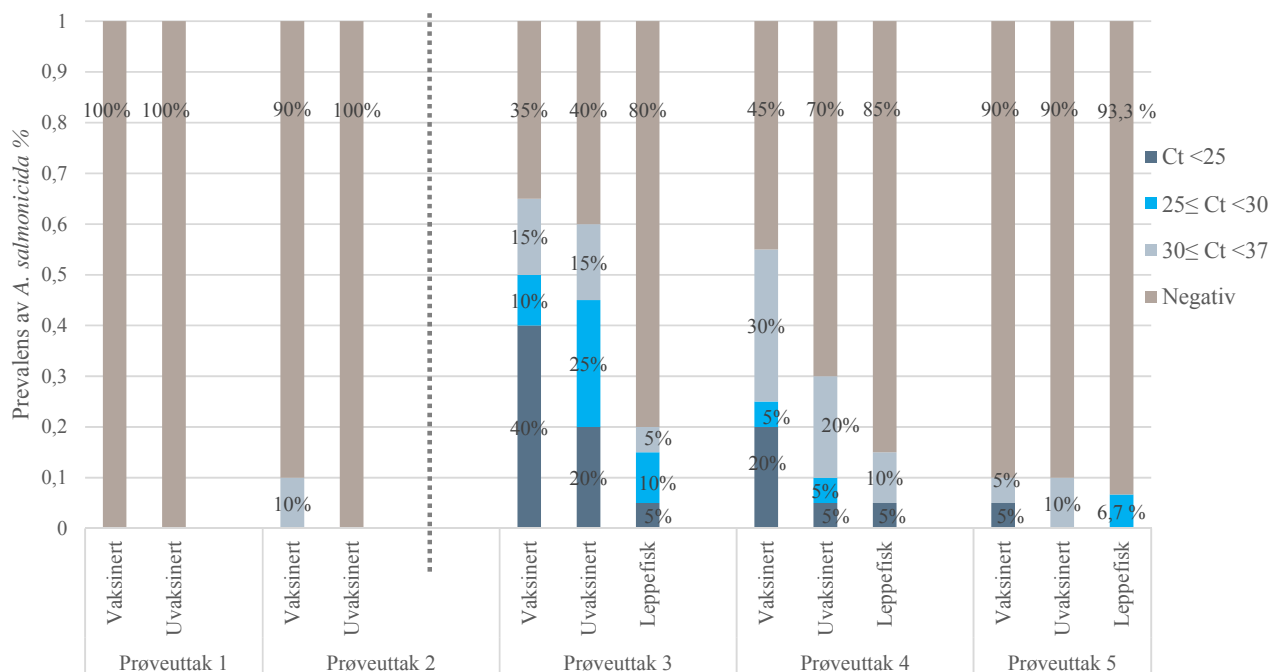
*A. salmonicida* ble ikke dyrket fra forsøksfisk før utsett i sjø. Etter utsett i sjø ble bakterien dyrket fra både vaksinert og uvaksinert rognkjeks, og leppefisk. A-lagstyping av *A. salmonicida* isolatene viste at 85% tilhørte A-lagstype VI, 5% A-lagstype V og 10 % blandingsinfeksjoner med A-lagstype V og VI. Infeksjoner bestående av A-lagstype V alene ble kun påvist i leppefisk. Etter to til tre dager inkubering på BA og BAS opptrådte *A. salmonicida* som tørre, konvekse, skyvbare, og gråhvite pinpoint-kolonier. Samtlige *A. salmonicida* isolat var oksydase-positive og negativ for 0/129. A-lagstype VI fremviste pigmentproduksjon, som ikke ble observert hos A-lagstype V (figur 3.9). Noen enkeltkolonier hos A-lagstype VI var større, mer hvitaktig, og ikke skyvbare. Fenotypisk typing viste biokjemiske forskjeller mellom A-lagstype V og VI for NO<sub>3</sub> (nitratreduksjon), GEL (gelatin hydrolysering) og PNPG (β-galaktosidase) i API 20 NE testen. For API 20 E var det forskjeller i VP (acetoin produksjon), GEL (gelatin hydrolysering) og AMY (amygdalin fermentering).



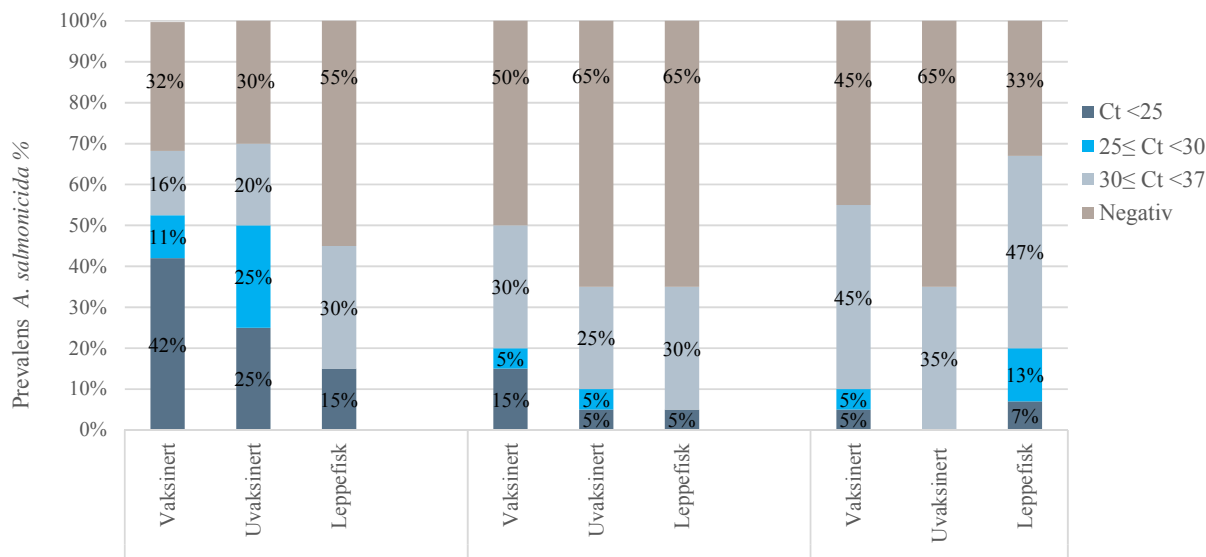
Prevalens av *A. salmonicida* og A-lagstype V og VI påvist ved dyrkning fra sjøsatt vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppefisk.

## Sanntids RT- PCR av hodenyre- og gjellelev

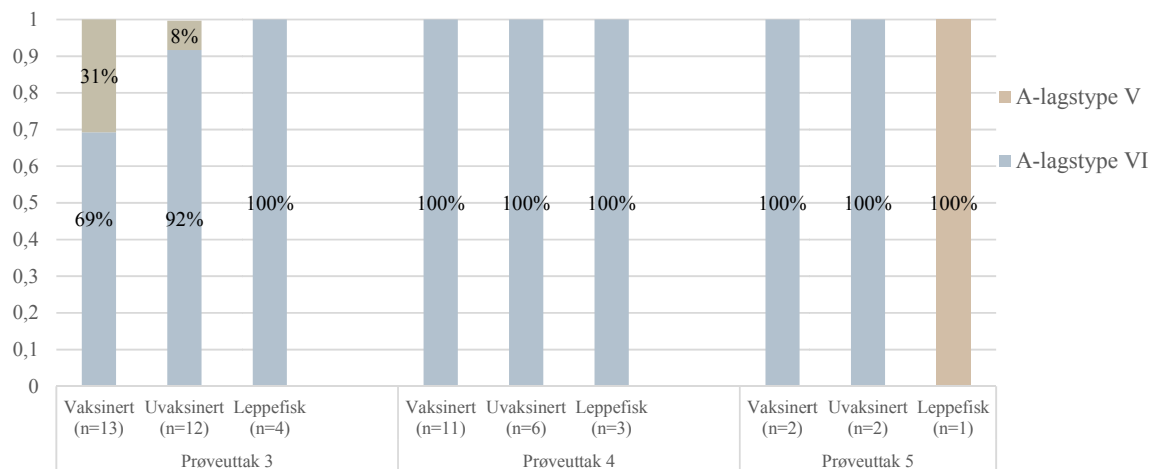
Før utsett i sjø var undersøkt rognkjeks negativ for *A. salmonicida* ved sanntids RT-PCR, med unntak av to vaksinerte rognkjeks med Ct 36,3 og 36,7 ved prøveuttak 2 (antagelig relatert til vaksine komponent). Retesting av hodenyrevevet ga negativt resultat. PCR analyser viste at *A. salmonicida* var tilstede i hodenyre- og gjellelev hos rognkjeks og leppefisk ved samtlige prøveuttak etter utsett i sjø.



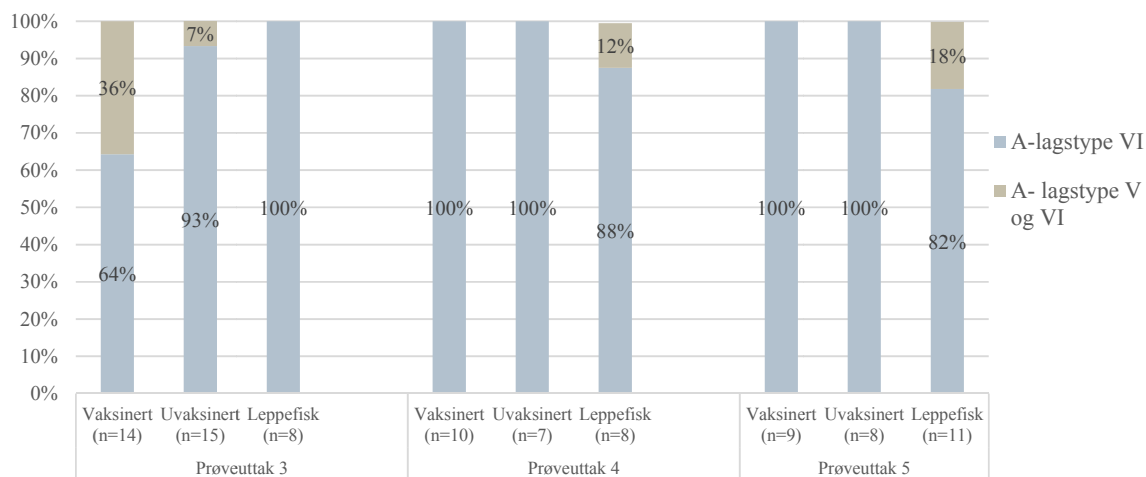
Prevalens av *A. salmonicida* fra hodenyrevev hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppesfisk ved samtlige uttak i studiet. Stiplet linje = sjøsetting.



Prevalens av *A. salmonicida* fra gjellevev hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppesfisk etter utsett i sjø.



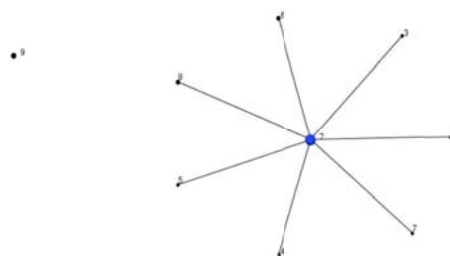
Prevalens av *A. salmonicida* A-lagstype V og VI fra hodenyrevev, påvist ved spesifikk PCR



Prevalens av *A. salmonicida* A-lagstype V og VI fra gjellevev, påvist ved spesifikk PCR

### MultiLocus Variable number of tandem repeats Assay (MLVA)

Det ble identifisert kun en MLVA-profil for A-lagstype V og åtte type VI fra rognkjeks og leppefisk i studiet.



eBURST diagram for MLVA-profiler av A-lagstype V (variant 9) og VI (variant 1-8) i studiet. Antallet isolat tilhørende de ulike profilene er illustrert ved størrelsen på sirkelen.

## Histologi

Det ble observert histopatologiske mikrokolonier forenelig med atypisk furunkulose i både vaksinerte og ikke vaksinerte rognkjeksgruppene. Mikrokolonier ble ikke observert før utsett i sjø, men hos 40% av de undersøkte rognkjeksene (n=22) etter utsett i sjø. Mikrokolonier var synlig i hjerte, gjeller, nyre, lever og milt, men varierte i antall organ. Omtrent halvparten av de positive individene hadde mikrokolonier kun i gjellelev. Leverforandringer ble observert i begge rognkjeksgrupper. Forandringene kunne ikke knyttes til infeksjon med *A. salmonicida* (PCR) eller vaksinerings. Leverforandringene opptrådte som mørke celleansamlinger lokalisert i multifokale "øyer", med betennelsesceller, eosinofile granulære celler, og tidvis blødning og nekrose. Leverforandringer var synlig både før og etter utsett av rognkjeks. Lumpfish Flavivirus infeksjon ble avkreftet etter PCR undersøkelse av rognkjeks (n=20) og leppefisk (n=10) hos Pharmaq Analytic (Thormøhlens Gate 55, Bergen). Det ble observert muskelforandringer i rognkjeks fra prøveuttak 4 og 5, med degenerert skjelettmuskulatur og sentralisering av cellekjerne i muskelfibrene. Både positiv og negativ *A. salmonicida* (PCR) individene var affisert. En berggyllt ble observert med lignende strukturer i muskel.

## Vaksinebivirkninger

Med unntak av et individ fremviste alle de undersøkte rognkjeksene vaksinerester (grad 1-2), som lå hovedsakelig i bakre del av bukhulen. Adheranser var tilstede i samtlige individ, grad 1-3. Den mest fremtredende adheransen ble observert i ventral del av bukhulen (region 3). Kranial del av bukhulen (region 1) fremviste ingen adheranse. Det var ingen tegn til melanindeponering, verken i bukorgan eller muskelatur. Ved histologisk undersøkelse ble det observert individ med vaksinit (vaksineindusert betennelse) og vaksinedråper.



Adheranse hos undersøkte vaksinert rognkjeks ved prøveuttak 3, 4 og 5, henholdsvis 11, 14 og 18 uker etter stikkvaksinering.

## Andre funn

### Bakteriologi

Utover *A. salmonicida* ble det identifisert *Vibrio* spp., *V. anguillarum* O1, *Pasteurella* sp., *Carnobacterium* sp. og *Photobacterium* sp. i noen få fisk i studiet.

## Diskusjon/Konklusjoner

### Laboratorieforsøkene

Overordnet konklusjon fra laboratoriestudiet er at vaksinen mot *A. salmonicida* subtype VI ikke har gitt en tilfredsstillende beskyttelse, og man vet per dags dato ikke hva som er årsaken. Det er flere mulige faktorer som kan ha hatt innvirkning på resultatet:

- Sammensetning av vaksine: Fravær av essensielle antigen eller feil antigen mengde. Har vaksinstammer beholdt A-lag gjennom hele vaksineproduksjonsperioden?
- For høyt smittepress i smittemodell? De fleste vaksiner vil gi etter dersom smittepresset blir for høyt. (Vi vurderer dette som usansynlig gitt resultatene fra feltforsøket).
- Vanntemperatur var for høy? Selv om rognkjeks vokser godt ved temperaturene brukt i nåværende forsøk, det eksisterer publisert data som kan indikere at rognkjeks kan ha en nedsatt evne til å forsvare seg mot bakterielle infeksjoner ved høye temperaturer (15-16°C).
- Svekket rognkjeks? De fleste rognkjeks, både vaksinert og uvaksinert viste tegn til patologiske forandringer i leveren, som ikke kunne kobles til kjente patogen agens. Det er mulig at denne tilstand har svekket fisken og gjort den mer mottakelig til infeksjon.

Forslag til videre arbeid er å videreutvikle kohabitant smitte modellen for rognkjeks og vaksineforsøk ved lavere temperaturer. I tillegg vil det være fornuftig å teste vaksinebeskyttelse i førsteomgang ved lavere temperaturer for eksempel 12°C for å så å gradvis øke temperatur i smittemodell. Det bør også utføres regelmessig kontroll av A-laget tilstedeværelse i vaksineisolater, samt nærmere undersøkelser relatert til antigen mengde i vaksinen. Det bør forskes videre på grunnleggende fysiologiske og immunologiske parametre i rognkjeks ved forskjellige vanntemperaturer.

### Feltforsøk

Vaksinebeskyttelse ble testet grundig i feltforsøket. Rognkjeks ble sjøsatt sammen med villfanget leppefisk med en aktiv *A. salmonicida* infeksjon og i forholdsvis høy vanntemperaturer, sterk strøm og lav førtilgang. Basert på resultatene i studiet konkluderer vi at den vaksinerte rognkjeks prestert ikke bedre enn den uvaksinerte og at begge grupper 'forsvant' fra merdene ca. 3 måned etter sjøsetting. Alle fisken som kunne redegjøres for i forsøket hadde aktiv *A. salmonicida* infeksjon. MLVA analyser indikerte at *A. salmonicida* infeksjonen hadde flere opphav.

Selv om *Pasteurella* sp. ble diagnostisert fra et individ, det var ingen andre bakterielle funn av betydning som kan forklare svinn observert. Feltstudiet i sin helhet viser at bruk og hold av rognkjeks i laksemerder er utfordrende, og at det er behov for mer kunnskap om artens biologi, og om røkting i sjø. Basert på resultat og observasjoner fra studiet kan det indikeres at lokaliteter med sterk strøm kan være uegnet for bruk av rognkjeks, og at utsett av rognkjeks ikke bør skje i perioder med høy vanntemperatur eller pågående sykdomsutbrudd. Ettersom utbrudd med atypisk furunkulose hyppig opptrer hos villfanget leppefisk i laksemerder, utsett av rognkjeks i tillegg med villfanget leppefisk bør unngås.

### Fremtidsperspektiver

Basert på resultat og observasjoner fra studiet, er det fremdeles et stort behov for kunnskap om bruk og hold av rognkjeks i laksemerder. Kartlegging av rognkjeksens toleranseområder for temperatur og strømforhold i felt er aktuelle forskningsområder. I tillegg kan utarbeiding av fôringsstrategier for lokaliteter med ulik utforming og miljøforhold trolig bedre rognkjeksens liv i laksemerden. Det er behov for ytterligere utvikling og uttesting av vaksiner til rognkjeks, og A-lagsstabilitet og titermengde er relevante aspekt for stimulering av immunitet mot *A. salmonicida*.



## 6. Leveranser

Mastersoppgave Helene Sæbjørnsen

Feltoppfølging av rognkjeks vaksinert mot *Aeromonas salmonicida* A-lagstype V og VI

Levert UiB 1. juni 2017

Mastersoppgave Henriette Nordstrand

Testing av vaksinasjonsregimer for rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, mot *Aeromonas salmonicida*

Levert UiB 1.juni 2017

Populærvitenskapelig manuskript med tittel 'Fortsatt store utfordringer knyttet til vaksinering av rognkjeks mot atypisk *Aeromonas salmonicida*' levert Norskfiskeoppdrett 25.10.17 (og vedlagt)