

Bilag til slutrapport for DSF bevilling 09-063102 (Improved Vaccination Strategies in Marine Aquaculture)

Pkt. 5: Kvalitativ afrapportering ved bevilling fra Det Strategiske Forskningsråd.

Baggrund:

Danmarks produktion af regnbueørred i havet foregår primært ved at fisk, der har været opdrættet 2 år på ferskvandsdambrug, om foråret (marts-april) sættes ud i havet i netbure. Ved udsætning vejer fiskene 0.5-1 kg og i løbet af de efterfølgende ca. 8 måneder frem til slagtetidspunktet i november-december samme år vokser de til 3-4 kg. Ved slagtingen udtages rognen (fiskene er alle hunner), som primært eksporteres til Japan, Rusland og Finland, mens de primære markeder for fisken (kødet) er Rusland, Baltikum og Finland. Kødet afsættes dog i øjeblikket også til en lang række andre lande, herunder Europa incl. hjemmemarkedet i Danmark. I havet er optræder specielt fiskesygdommene vibriose og furunkulose, som er forårsaget af Gram negative bakterier, og fiskene vaccineres derfor normalt mod disse sygdomme, inden de sættes ud i havet. Trods profylaktisk brug af vacciner, har der gennem flere år været tilbagevendende problemer med sygdomsudbrud med efterfølgende produktionstab og relativt stort forbrug af antibiotika, som dog har været faldende i undersøgelsesperioden. Projektets hovedformål er at afklare disse problemer og forsøge at finde en løsning ved udvikling af mere effektive vaccinationsstrategier.

Projektdeltagere:

Partner	Name
P1	National Veterinary Institute, Fish Disease Section, Technical University of Denmark
P2	National Veterinary Institute, Bacteriology Section, Technical University of Denmark
P3	Department of Veterinary Patobiology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen
P4	Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen
P5	Danish Aquaculture Association
P6	Aller Aqua (initially), BioMar (later) (fish feed producers)
P7	Simon B.Madsen, Veterinary Service
P8	Schering Plough (initially), Vaxxinova (later) (vaccine companies)

Udover hovedprojektet blev der efter projektstart opnået 2 mindre tillægsbevillinger, som begge har haft til formål at øge deltagelsen af små og mellemstore virksomheder (SMV'er) i projektet:

SMV-1: Sondemålinger (ilt, temperatur, pH, salinitet) på de to havbrug, der var inkluderet i projektet (DSF sags nr. 09-066095, er tidligere afrapporteret).

SMV-2: Belysning af den toksiske effekt af algen *Pseudochattonella farcimen* på fisk. (DSF sags nr. 09-072686 , afrapporteres i September 2012)

Projekttaktiviteterne var opdelt i arbejdsplaner, som indeholdt følgende aktiviteter:

Title	
WP1.	Project management • Coordination of project activities, establish and maintain consortium agreement
WP2.	Diagnostics • Analysis of clinical samples from farms and trials.
WP3	Experimental vaccination and challenge of rainbow trout • Develop challenge model for <i>Aeromonas salmonicida</i>. • Testing of <i>Aeromonas salmonicida</i> vaccines using the developed challenge model • Analyse effect of toxic algae on fish. • Analyse effect of toxic algae on disease susceptibility of rainbow trout.
WP4.	Field vaccination trials • Identification of freshwater and marine aquaculture entities for participation in the project • Detailed planning and monitoring of trials • Compare early and late vaccination for oil adjuvanted vaccines
WP5.	Immune response analysis • Develop assay for monitoring antibody responses to <i>Aeromonas salmonicida</i> and <i>Vibrio anguillarum</i>. • Measure antibody responses in fish vaccinated under experimental - and field conditions respectively.
WP6.	Project synthesis, dissemination and training • Integrated interpretation of results • Publication of results • Workshops and training

1.Nedenfor gennemgås resultaterne af ovenstående arbejdsplaner, herunder de forskningsmæssige og erhvervs/samfundsmæssige perspektiver.

WP 2. Diagnostiske og kliniske undersøgelser.

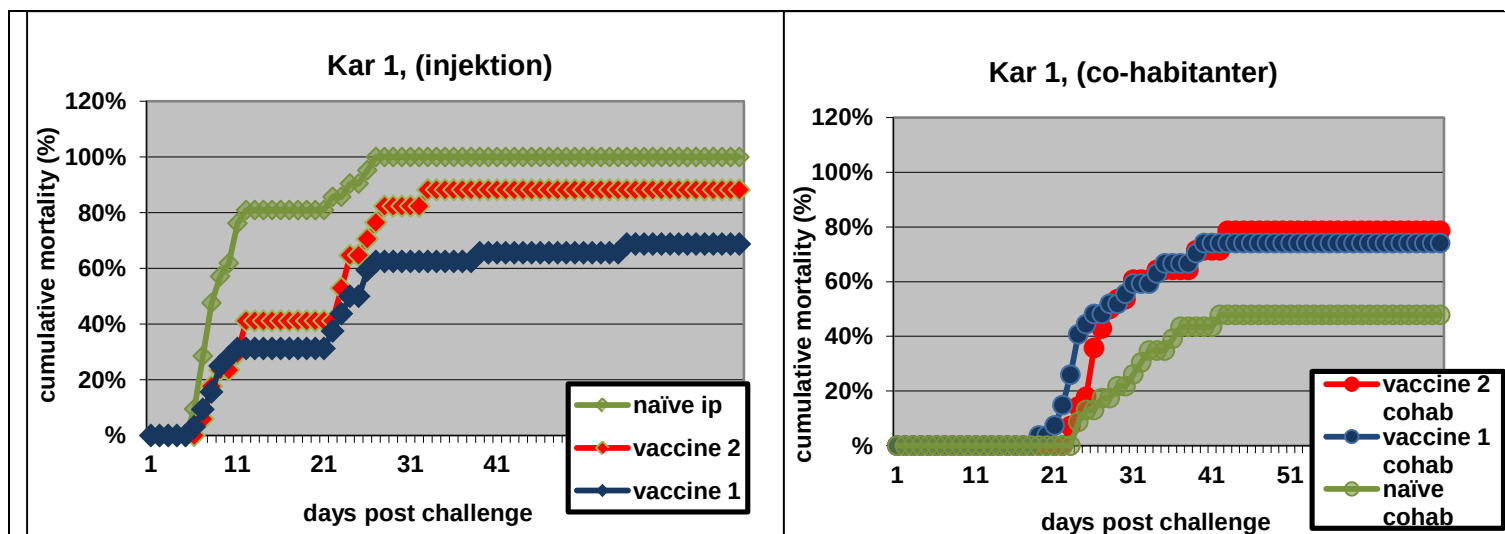
P2, P3, P5, P7 og P8 har jævnligt besøgt de deltagende havbrug og dambrug og kontrolleret vaccination samt indsamlet prøver til diagnostik. Sygdom på dambrug ser ud til primært at skyldes rødmundssyge (bakterien *Yersinia ruckeri*, 58 isolater i projektperioden), mens sygdom på havbrug især skyldes furunkulose, som forårsages af bakterien *Aeromonas salmonicida* (95 isolater i projektperioden) og vibriose, som forårsages af *Vibrio anguillarum*. Uanset at fiskene er vaccineret mod vibriose og furunkulose, kan de være modtagelige under særlige forhold som fx høje vandtemperaturer, som stresser fiskene. Serologiske og kliniske undersøgelser viste dog, at en del af fiskene ikke var vaccineret i bughulen som tilsigtet (se WP 5 herunder). Dog blev der også isoleret bakterier fra døde, vaccinerede fisk, hvilket nødvendiggjorde opfølgende forsøg med vaccinerede fisk under laboratorieforhold. Resultaterne har både erhvervsmæssig og forskningsmæssig relevans, idet de dels viser at fiskeopdrætterne ikke kan forvente at

de anvendte vacciner beskytter fiskene 100 % mod infektion med furunkulose og dels peger på at der er behov for optimering af såvel vacciner som vaccinationsstrategier.

WP 3. Eksperimentel vaccination og smitte af regnbueørred.

Indledningsvis blev forskellige smitteveje for bakterien *Aeromonas salmonicida* afprøvet i regnbueørreder. Det var vanskeligt at smitte fiskene alene ved bad i fortyndet bakteriekultur, men ved injektion af bakterier i bughulen (ip injektion) opnåedes et typisk forløb for sygdommen furunkulose. Da denne smittevej imidlertid ikke er naturlig, blev der udviklet en model, hvor halvdelen af fiskene blev smittet ved injektion og den anden halvdel blev smittet indirekte, ved at bakterierne spredtes fra de injicerede fisk (smitte ved co-habitation). Med henblik på at undersøge den beskyttende effekt af to kommercielle vacciner under laboratorieforhold, blev der opstillet et forsøg med 3 grupper fisk: Fisk vaccineret med vaccine 1, fisk vaccineret med vaccine 2, og ikke-vaccinerede kontroller. Efterfølgende blev fiskene udsat for smitte med et furunkulose-isolat, der stammer fra sygdomsudbrud på et af de danske havbrug (Fig 1). Forsøget viste, at vaccinerne beskyttede i nogen grad mod ip-injektion, den ene vaccine (1) lidt bedre end den anden (2). Ved co-habitations smitte ses derimod manglende eller endog negativ effekt af vaccinerne. Forskningsmæssigt er resultatet meget interessant fordi det viser at den beskyttende effekt af vaccinerne afhænger af hvordan fiskene smittes. Dette betyder at det i fremadrettet vaccineudviklingsarbejde er vigtigt bruge en optimal smitte model (co-habitation) til at evaluere effekten af en vaccine. For vaccineindustrien er resultatet vigtigt, fordi det viser at den traditionelt anvendte ip injektions smitte model, som bruges til at teste at de fremstillede vacciner fungerer korrekt, ikke altid er hensigtsmæssig. Resultatet er også af stor erhvervsmæssig/industriel relevans, fordi det peger på at de anvendte kommercielle vacciner ikke altid beskytter fiskene tilstrækkeligt mod furunkulose. Det er vigtigt at være opmærksom på, at der indtil videre er tale om enkeltstående forsøg, som ikke direkte kan sammenlignes med forholdene under kommerciel akvakultur. Fiskeopdrætternes generelle erfaring er, at de kommercielle vacciner virker med hensyn til vibriose, hvorimod effekten kunne være bedre angående furunkulose. Der er således behov for opfølgende forsøg og forskning, for at fastlægge, hvordan der kan designes en skræddersyet vaccinationsstrategi til danske forhold. Dette adresseres i et nyt projekt (se pkt.4. nedenfor).

Fig. 1.



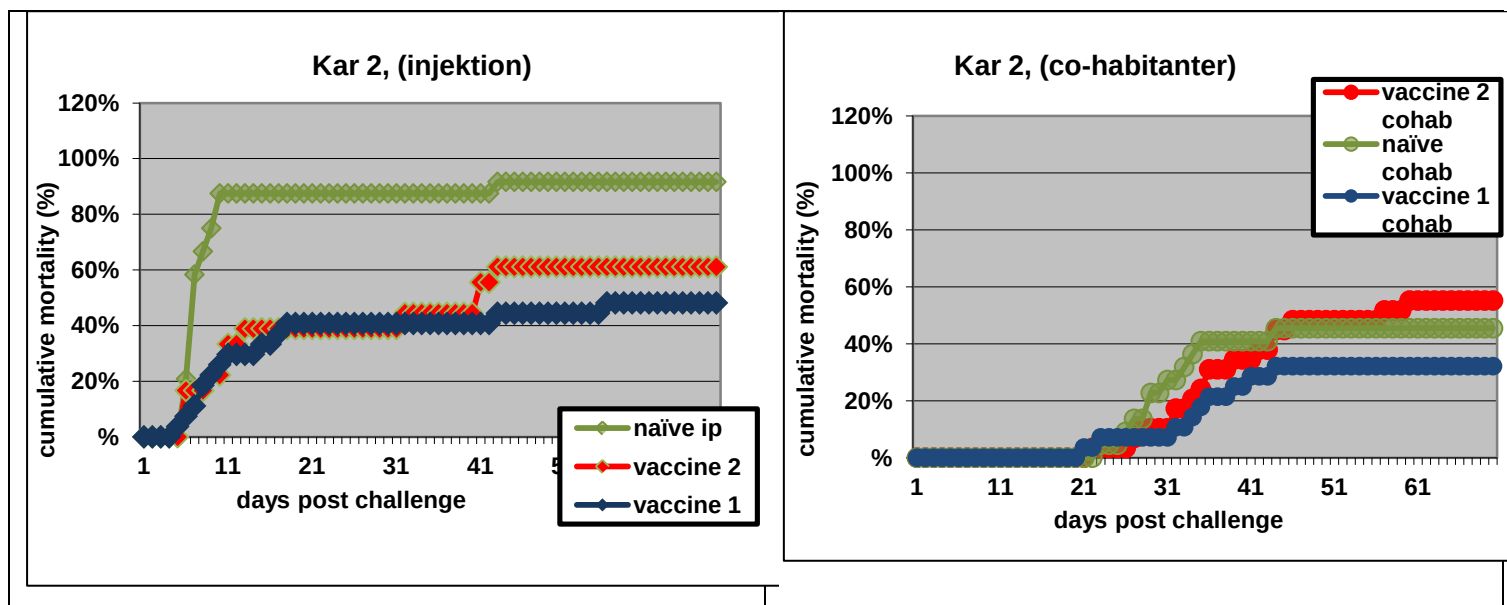


Fig. 1. Vaccinationsforsøg under eksperimentelle forhold. (Figurer: Ellen Lorenzen)

Med henblik på at undersøge den beskyttende effekt af to kommercielle vacciner under laboratorieforhold, blev der opstillet et forsøg med 3 grupper á 200 fisk med en størrelse på ca. 100g: 200 ikke vaccinerede fisk (grøn), 200 fisk vaccineret med vaccine 1 (blå), og 200 fisk vaccineret med vaccine 2 (rød). Efter 26 uger (ved 10 ° C ?) blev halvdelen af fiskene smittet ved injektion i bughulen (+ff?, ip) af ca. 10^5 bakterier (donor-fisk) mens den anden halvdel i hver gruppe var co-habitanter, dvs. de smittes naturligt ved at bakterien spredes fra de ip injicerede fisk. Illustrationen viser den akkumulerede dødelighed som funktion af tid (dage efter smitte) for de to kar, hvori fiske blev smittet. Graferne til venstre viser dødelighed blandt de fisk, som blev smittet ved injektion, mens graferne til højre viser dødelighed blandt co-habitanterne i samme kar. Bemærk at dødeligheden startede senere i sidstnævnte, og at der er forskel på vaccinerne effekt i forhold til de naive (grønne) kontroller i graferne til højre og til venstre.

WP 3: Analysere effekt af toksiske alger på fisk.

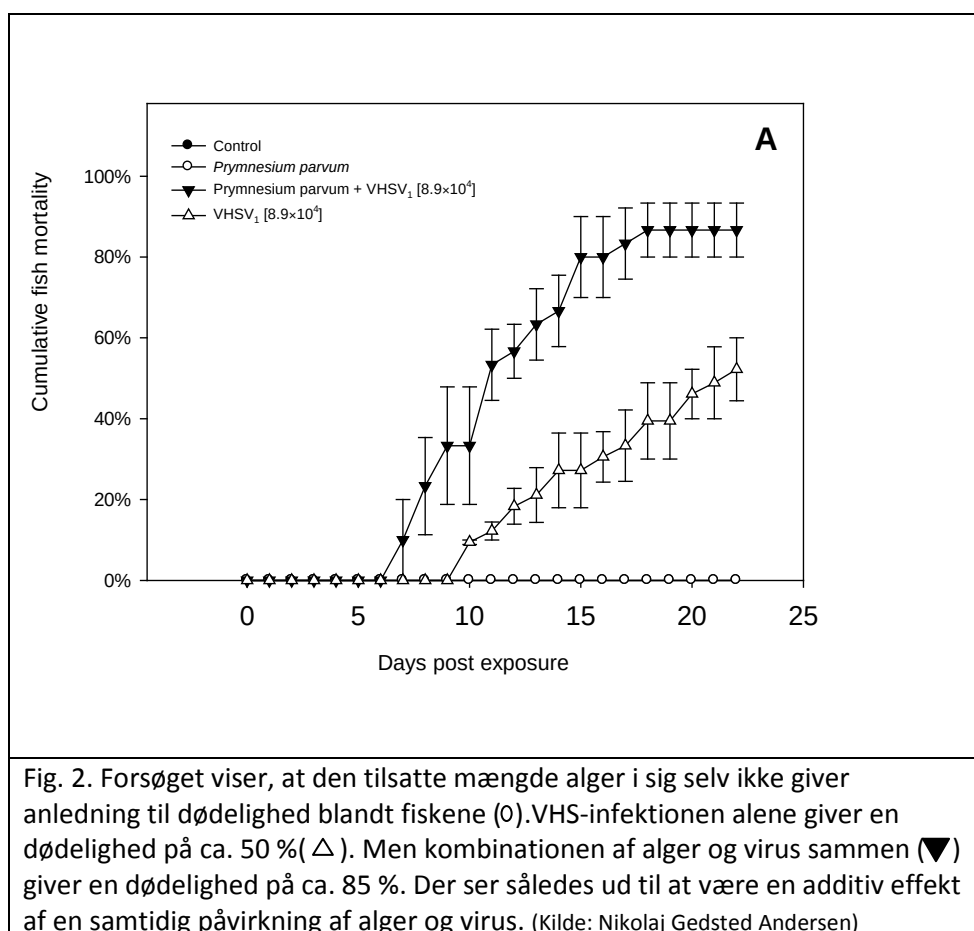
Aktualiteten af projektets fokus på opblomstring af giftige alger blev understreget af 2 opblomstringer af mikroalgen *Pseudochattonella farcimen* i projekt perioden. Første gang var i foråret 2009, hvor der opstod dødelighed blandt opdrætsfisk, specielt i Horsens fjord. I foråret 2011, var der endnu ikke udsat fisk på opblomstringstidspunktet, men der blev registreret dødelighed blandt fritlevende fisk. Der blev arbejdet med karakterisering af *P. farcimen* og algens effekt på fisk i det i projektet inkluderede phd-projekt. Der er opnået meget ny viden om denne alges biologi under laboratorieforhold og eksponeringsforsøg med fisk blev også gennemført under feltforhold. Her blev det vist at sandfiltrering kunne fjerne algens giftige effekt, som derfor med stor sandsynlighed er associeret med selve algecellerne og ikke et udskilt toxin. Der blev givet ekstra støtte til disse forsøg i form af mindre tillægsprojekt (DSF sag. Nr 09-072686), som rapporteres separat.

Foruden *P. farcimen* blev der også arbejdet med den hyppigt forekomne og mere velkendte mikroalge *Prymnesium parvum*. Her er der opnået ny viden omkring algernes toksiske effekt på fisk, hvor et interessant resultat bl.a. er at fiskene kan tilpasse sig den toksiske påvirkning fra algerne, forudsat at den initiale akutte påvirkning ikke er så stor, at den slår fisk ihjel. Dette har dels stor videnskabelig interesse i

forhold til at belyse de involverede mekanismer og dels stor praktisk relevans i forhold til fremtidige muligheder for at udvikle forebyggende tiltag mod effekten af giftige alger på opdrætsfisk.

Med henblik på at undersøge effekten af toksiske alger på sygdomsmotagelighed, blev der lavet en række forsøg under eksperimentelle forhold, hvor fiskene blev udsat for virus og alger på én gang: Algen, *Prymnesium parvum*, er kendt for i høje koncentrationer at kunne forårsage massedød blandt fisk i havet. Forsøgene viste at lavere algekoncentrationer, som i sig selv ikke giver anledning til dødelighed, kan øge fiskenes modtagelighed overfor infektionssygdomme (Fig. 2). Resultatet er nyt i videnskabelig sammenhæng, og er samtidig vigtigt for fiskeopdrætterne, som skal være særlig på vagt overfor udbrud af smitsomme sygdomme i forbindelse med algeopblomstringer.

Fig. 2.



WP 4. Vaccinationsforsøg under feltforhold.

I de første to år af projektet blev der gennemført to større vaccinationsforsøg på havbrug med henblik på at sammenligne tidlig versus sen vaccination, idét det var usikkert hvornår i fiskenes vækstperiode, det er mest hensigtsmæssigt at stikvaccinere mod vibriose og furunculose, dvs. tidlig (svarende til 1 år før udsætning i havet) eller sen vaccination (nogle måneder før udsætning). Vaccinen blev indkøbt hos P8, og der blev indsendt forsøgsprotokol til Lægemiddelstyrelsen for at få tilladelse til klinisk vaccineforsøg. Forsøgsopsætningen inkluderede i alt 280.000 fisk. Forsøgsfiskene blev i kontrollerede vaccinerede grupper

opdrættet på fire dambrug i ferskvandsperioden og efterfølgende sat ud på to forskellige havbrug i marts-april 2009 og slagtet i november-december 2009. Der blev indsamlet produktionsdata (udbytte), data vedr. sygdomsdiagnoser, behandlinger, tab pga dødelighed samt fysisk/kemiske vandparametre (Fig. 3). Derudover blev der løbende udtaget blodprøver mhp monitoring af fiskenes immunrespons og vaccinebivirkninger (pigmentering og sammenvoksninger i bughulen). Resultatet peger på, at der ikke er væsentlig forskel i dødelighed, antallet af sygdomsudbrud, antibiotikaforbrug og udbytte (tilvækst og foderkonvertering) i produktionsperioden i havbrug ved hhv tidlig og sen vaccination af fiskene (Tabel 1). Dette er et vigtigt resultat for opdrætterne, som således inden for visse rammer individuelt kan lægge vaccination af fiskene ind i produktionsperioden som det passer dem bedst (erhvervsmæssigt resultat).

	Start antal	% døde	Golde %	FQ (foderkvotient)	Tilvækst g/stk
Tidlig vacc	58.453	9,3	17,7	1,4	1593
Sen vacc	53.447	10,3	14,3	1,4	1565

Tabel 1. Samlet opgørelse over forsøgsfiskene på et af de involverede havbrug. Andelen af golde angiver, hvor stor en del af fiskene, der ikke var med rogn. Denne andel var noget højere end normalt i begge grupper. Rognen er som nævnt (side 1) et vigtigt del-produkt. FQ angiver foderkvotient (kg foder brugt til produktion af ét kg fisk). Kilde: Niels Henrik Henriksen

Fig.3: Eksempel på data fra havbrug sæsonen 2009 (Kilde: Niels Henrik Henriksen)

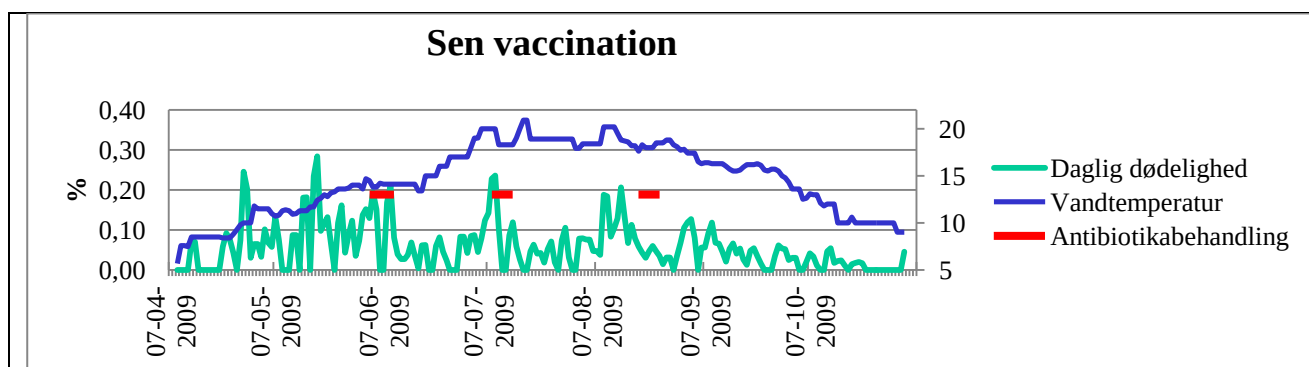


Fig 4. Injektionsvaccination på dambrug udføres ofte maskinelt, idét det er hurtigere end håndvaccination. Men projektet har vist, at det er helt afgørende, at maskinel vaccination kontrolleres og optimeres undervejs, da der ellers kan optræde en uønsket høj frekvens af ikke-vaccinerede fisk. Serologiske og kliniske undersøgelser viste, at en del af fiskene *ikke*, som tilsigtet, var blevet vaccineret i bughulen, og en del af dødeligheden kan formentlig skyldes dette forhold. Dog blev der også isoleret bakterier fra vaccinerede, døde fisk, hvilket var årsagen til, at der blev igangsat kontrollerede forsøg i

WP 5. Immun respons analyser.

Der er udviklet en ELISA-test til detektion af immunrespons i regnbueørreder mod *Aeromonas salmonicida*, og *Vibrio anguillarum* (O1) hhv. Begge assays har høj sensitivitet og specificitet, og kan bruges til at vurdere andelen af vaccinerede fisk i en given population (Fig. 5a).

Undersøgelserne viste, at der var behov for optimering af flere forhold i forbindelse med selve vaccinationen, hvilket der bl.a. var fokus på ved et kursus i Billund for opdrættere og andre interesserede 6-7. oktober 2008 med eksterne undervisere fra Norge arrangeret af P8 (se WP 6).

Fig. 5a. Sammenligning af antistofreaktion i serum fra tidligt og sent vaccinerede fisk.

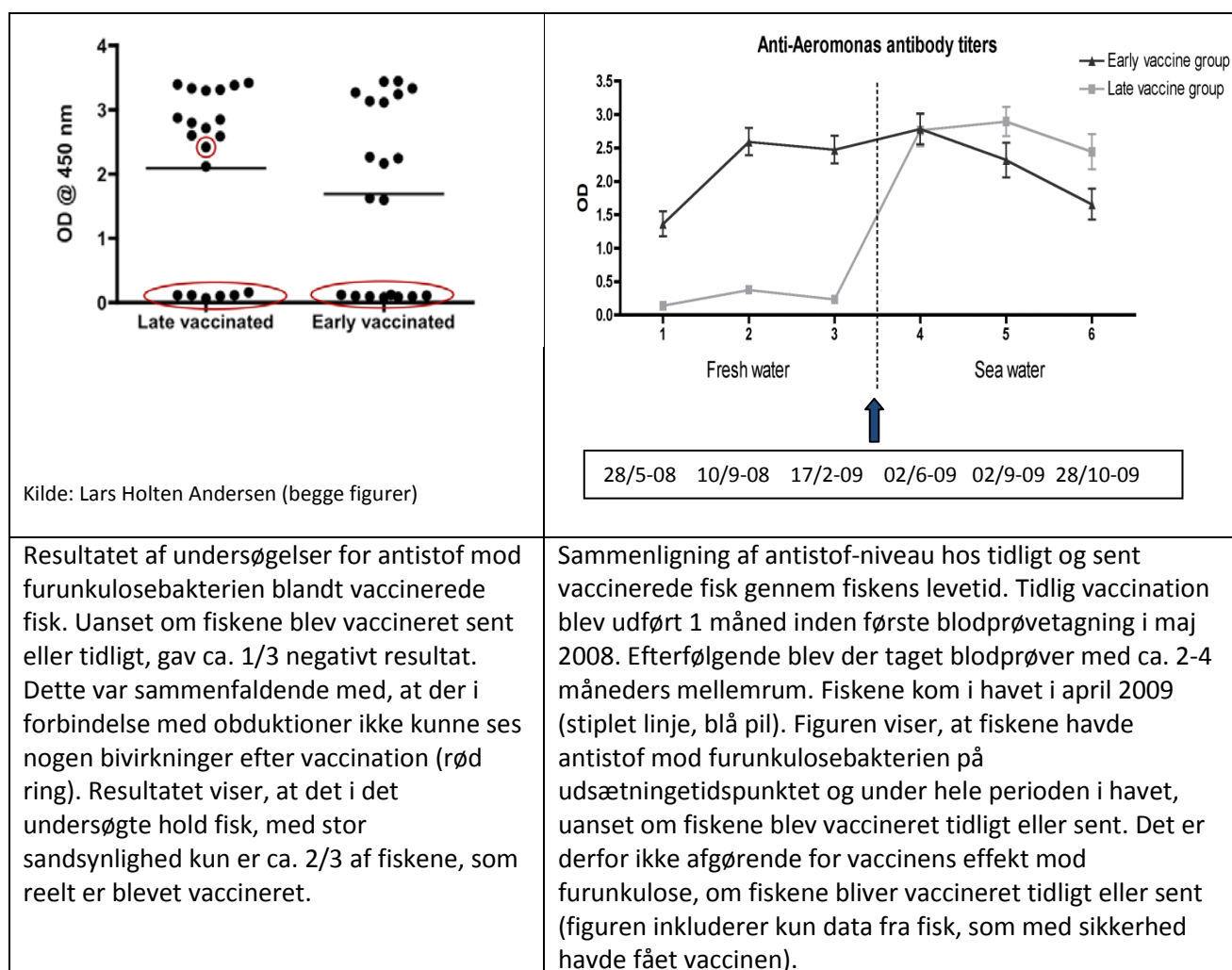
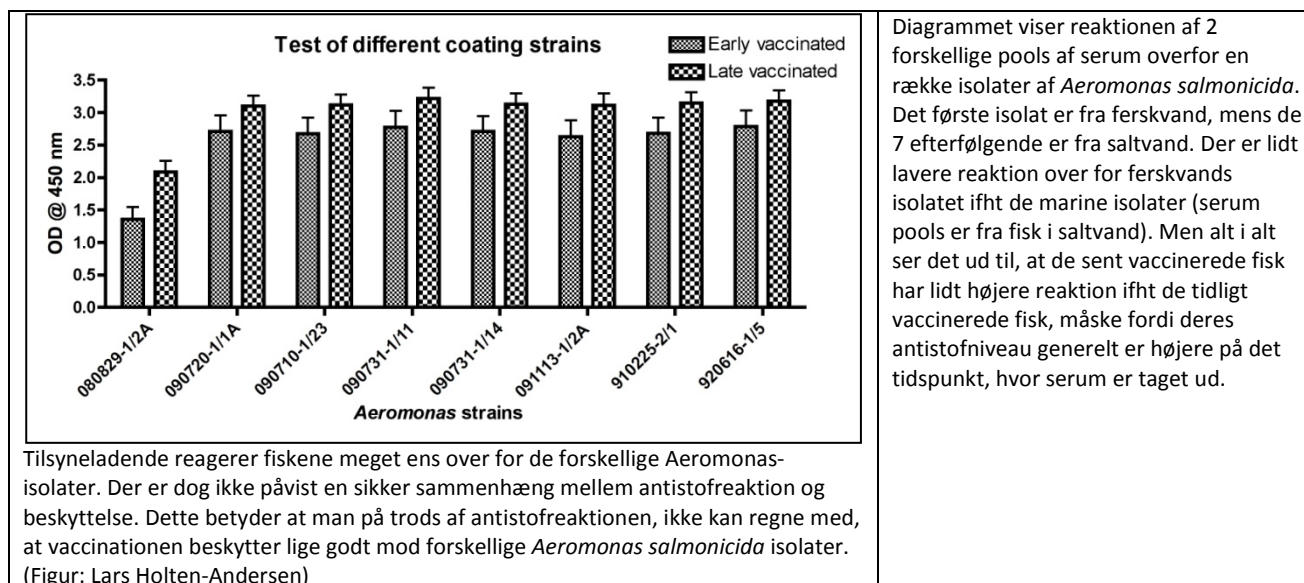


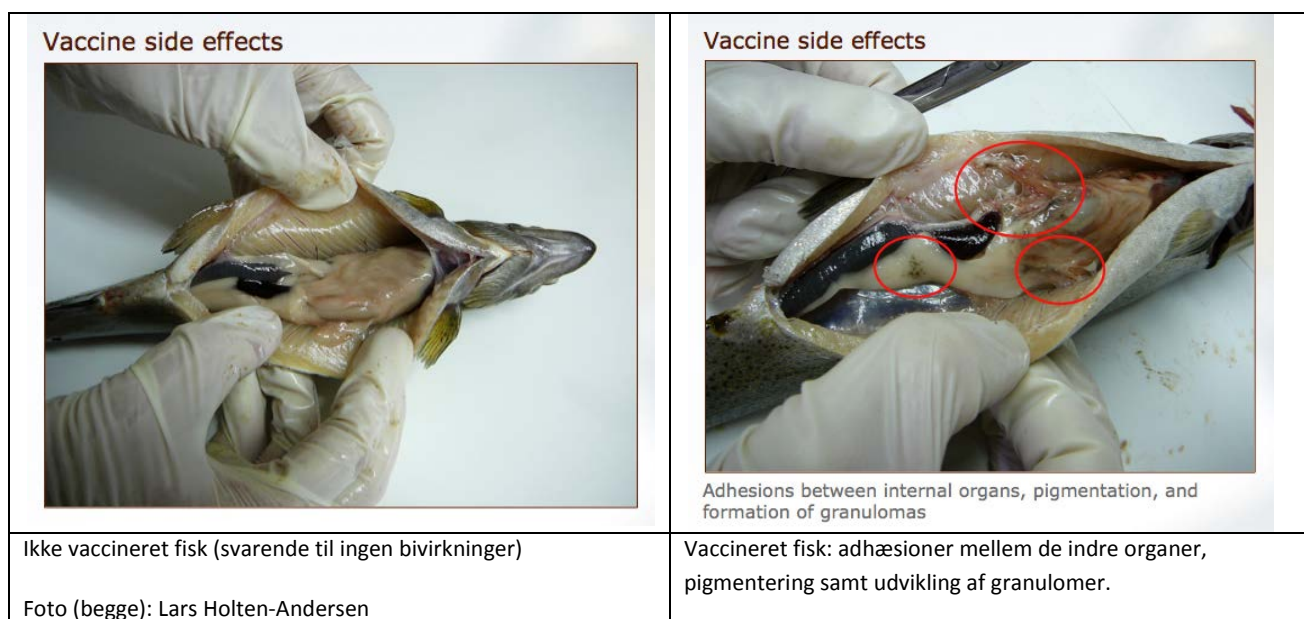
Fig.5b. Undersøgelse af pools af sera fra tidligt og sent vaccinerede fisk for antistoffer over for forskellige isolater af *Aeromonas salmonicida*



Vaccinations bivirkninger.

Vaccinen, som fiskene blev vaccineret med indeholder olje-adjuvant, som medvirker til at stimulere immunsystemet uspecifikt og dermed også fremme reaktionen på bakteriekomponenterne i vaccinen. Vacciner med olje-adjuvant giver dog visse bivirkninger, bl.a. i form af pigmentering på de indre organer, sammenvoksninger af organerne pga adhæsioner til bughulen samt udvikling af granulomer. Dette kan påvirke kødets kvalitet negativt. På en skala ("Speilberg score") fra 0-6 blev bivirkningerne vurderet til 1.5 - 2 (svarende til mindre grad af adhæsion til bugvæggen). I projektet blev registrering af bivirkninger (Fig. 6) brugt til at skelne mellem formodet vaccinerede og formodet ikke vaccinerede fisk. Derved kunne ELISA-testen evne til at skelne mellem vaccinerede og ikke vaccinerede fisk evalueres (Fig. 5a)

Fig. 6. Bivirkning ved vaccination: Vævs-sammenvoksninger i bughulen



WP 6. Møder

Der blev afholdt en række orienteringsmøder for havbrugere og andre interesserede:

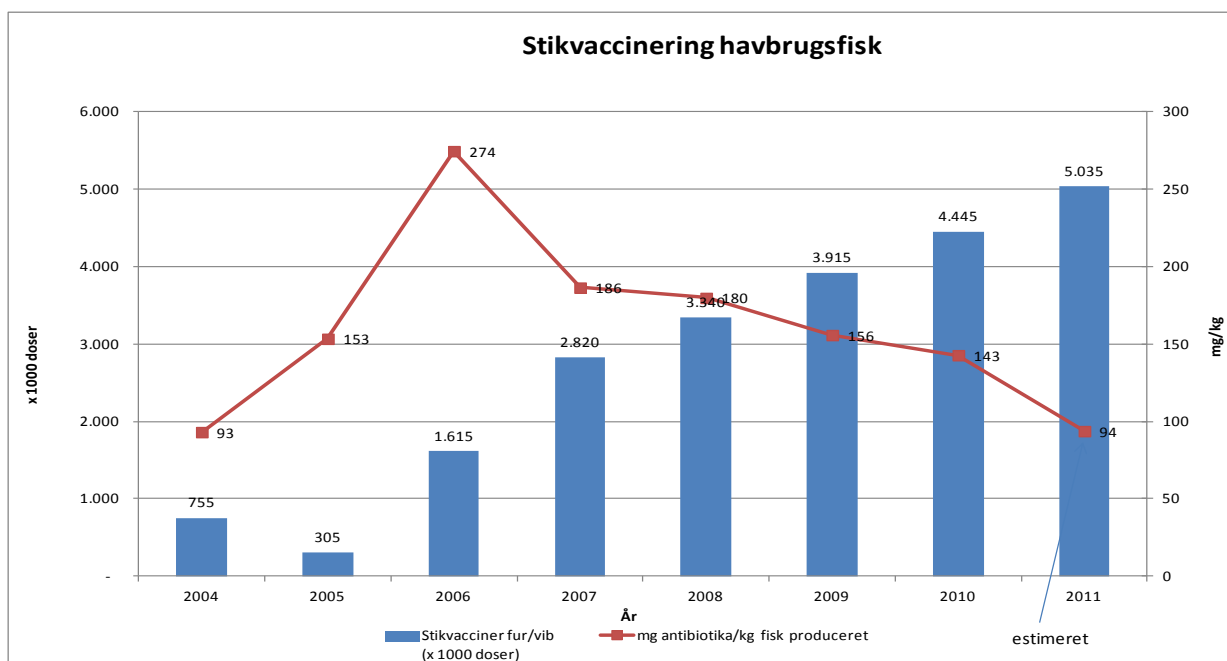
- 7. oktober 2008. Vaccinationsseminar om stikvaccinering. Alle danske havbrugere og andre med tilknytning til projektet blev indbudt.
- 17. marts 2010. Møde med de danske havbrugere om projektets forløb og præsentation af midlertidige konklusioner i forbindelse med et seminar afholdt af BioMar.
- 5. marts 2012. Seminar for de danske havbrugere. På mødet blev projektets resultater fremlagt og deres anvendelse i praksis blev diskuteret.
- Desuden er forsøgsresultaterne blevet fremlagt for og diskuteret med de involverede dam- og havbrugere på individuelle møder med forskergrupperne.

2. Erhvervsmæssige / samfundsmæssige resultater:

(Kilde: Niels Henrik Henriksen)

- Der er kommet øget fokus på vaccination. Resultatet fremgår tydeligt af den stigning, som der har været i antallet af stikvaccinerede havbrugsfisk (Fig.7, herunder, blå barrer). Der udsættes ca 6 mio fisk om året.

Fig.7



- Mængden af anvendt antibiotika på havbrug er reduceret gennem de år, som projektet har forløbet (Fig.7 herover, rød kurve).
- Der er kommet mere fokus på, at det er vigtigt, at vaccinen deponeres korrekt i fiskens bughule. Havbrugerne har som konsekvens af projektet optimeret og øget kontrollen med vaccinationsprocedurerne.

- Projektet har vist, at de i Danmark brugte vacciner ikke virker optimalt overfor sygdommen furunkulose. Der ses således stadig udbrud i vaccinerede fisk og selv under kontrollerede laboratorieforsøg viser vaccinerne heller ikke optimal beskyttelse mod furunkulose.

3. Forskeruddannelse

Projektet har inkluderet uddannelse af en phd og en postdoc:

PhD defense: Nikolaj Gedsted Andersen, September 07, 2012: Ichthyotoxic algae and their effects on fish . Nikolaj Gedsted Andersen (M) blev finansieret af bevillingen i 36 måneder. Arbejdsplads: Marinbiologisk Laboratorium i Helsingør (KU-BIO) og Veterinærinstituttet i Århus (DTU).

Supervisors:

Associate Professor Per Juel Hansen, KU-BIO

Senior Researcher Niels Lorenzen, Veterinærinstituttet i Århus (DTU).

Lars Holten-Andersen phd, (M), blev finansieret af bevillingen som postdoc i 36 måneder. Arbejdsplads: Laboratorium for fiskepatologi, KU-Life, København, og Sektion for Bakteriologi, Veterinærinstituttet i København (DTU)

4. Samarbejde (tværinstitutionelt, tværdisciplinært, internationalt)

Projektet har inkluderet såvel universitetsinstitutter, vaccineindustrien, praktiserende dyrlæger og primærproducenter i form af fiskeopdrættere. I kraft af to tillægsprojekter er det tværdisciplinære samarbejde yderligere udvidet til at inkludere en leverandør af teknisk udstyr og to private rådgivningsfirmaer. Der har, som det fremgår af ovenstående, været et gensidigt udbytte af projektet for alle deltagere. Dertil kommer at der gennem en ny kombination af videnskabelige discipliner (forskning i hhv. fiskesygdomme og giftige alger) er genereret meget ny viden, som har givet grundlag for 3 videregående forskningsprojekter, herunder 2 støttet af Det Strategiske Forskningsråd. Alle 3 projekter omfatter igen et tæt samarbejde mellem forskningsinstitutioner og industri, og inkluderer desuden samarbejde med internationale eksperter. Projektets resultater vil fortsætte med at blive publiceret igennem det kommende år i såvel videnskabelige som brancheorienterede medier.