

**KUNNSKAP OM FISKEHELSE**

I denne spalten vil Veterinærinstituttet i hvert nummer bidra med oppdatert kunnskap om fiskehelse. Ansvarlig for spalten er fiskehelseansvarlig Anne-Gerd Gjevre [anne-gerd.gjevre@vetinst.no](mailto:anne-gerd.gjevre@vetinst.no)



**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute

Av plasshensyn har vi valgt å utelate kildehenvisninger. Ta kontakt med spalteansvarlig dersom du ønsker opplysninger om dette.

# Utfordrende å vaksinere rognkjeks mot atypisk *Aeromonas salmonicida*

## Om forfatterne og prosjektet

Henriette Nordstrand og Helene Sæbjørnsen har nylig avlagt sin mastergrad i fiskehelse ved Universitet i Bergen  
Øyvind Vaagnes er diagnostikkansvarlig i Vaxxinova AS  
Henriette Glosvik er helseansvarlig for rensefisk i Marine Harvest  
Duncan Colquhoun er seniorforsker ved Veterinærinstituttet og professor II ved Universitet i Bergen  
Prosjekt nr.901264 Forsøk med dypp- og stikkvaksinering av rognkjeks i smittecelle og feltforsøk med oppfølging av vaksinert fisk i sjø ble finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond i perioden 2016-2017

Oppdrett av rognkjeks til biologisk avlusning har blitt 'big business' i Norge, med over 48 settefiskkonsesjoner og en estimert total produksjon på snaut 16 millioner fisk i 2016. Fisken er imidlertid utsatt for ulike bakterieinfeksjoner i sjøfasen. Atypisk furunkulose er en av dem. Her beskriver vi noen utfordringer med forsøk på vaksineutvikling mot denne sykdommen.

Henriette Nordstrand, Helene Sæbjørnsen, Øyvind Vaagnes, Henriette Glosvik og Duncan Colquhoun

På settefiskstadiet ser rognkjeks ut til å være en rimelig robust fisk mot alvorlige sykdommer. Under mindre kontrollerte forhold og spesielt etter sjøsetting i merd, blir derimot problemene med sykdom og dødelighet merkbare. Til tross for at næringen har et økende fokus på rognkjeksens velferd, er forventet levetid hos sjøsatt rognkjeks kort. Dødeligheten kan være akutt og betydelig, og det er ikke uvanlig at ny rognkjeks må settes ut flere ganger i løpet av laksens oppdrettsyklus. Veterinærinstituttet skrev 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 reduserte overlevelsen. Rapporten påpekte også at tilgjengelige vaksiner viste liten eller ingen beskyttende effekt.

Mesteparten av fisken som inngikk i rapporten ble mest sannsynlig vaksinert med vaksiner laget for bruk på torsk. Torsk infiseres vanligvis med *A. salmonicida*, A-lag type 3. I senere tid har derimot forskning utført ved Veterinærinstituttet vist at rognkjeksens hovedsakelig blir infisert med en atypisk *A. salmonicida* subtype kjent som A-lag type 6, og noen 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 kan gi muligheter for bedre beskyttelse enn tidligere vaksiner. Dette er imidlertid ennå ikke vitenskapelig dokumentert. FHF finansierte derfor et prosjekt for å dokumentere effekten av å vaksinere rognkjeks mot atypisk furunkulose. Den utprøvde vaksinen var basert på atypisk *A. salmonicida* type 5 og 6.

De fleste vaksineselskaper anbefaler ca. 500 døgngader (d°C) mellom vaksiner og sjøsetting for å oppnå størst mulig beskyttelse. Rognkjeks vokser fort, og hurtig vekst mellom vaksiner og sjøsetting betyr at fisken raskt blir større enn det som er ønskelig ved sjøsetting. I prosjektet ønsket vi derfor å undersøke om dyppvaksiner før stikkvaksiner kunne gi kortere immuniseringsperiode og bedre effekt av vaksinen.

Prosjektet besto av et forsøk i laboratoriet og et i felt. I laboratorieforsøket ble fire grupper rognkjeks vaksinert på ulike måter (se **Tabell 1**). To av gruppene ble dyppvaksinert før stikkvaksiner. Alle gruppene ble så smittet med atypisk *A. salmonicida* type 6 i en stikksmittmodell og en kohabitant-smittmodell. I stikksmittmodellen ble alle vaksinerte fisk injisert med bakterier i bukchulen. I kohabitant-smittmodellen ble vaksinert fisk plassert sammen med uvaksinert fisk ('sheddere') med en pågående, aktiv bakterieinfeksjon.



Rognkjeks får lett bakterieinfeksjoner som atypisk furunkulose. Å utvikle vaksine mot denne sykdommen byr på en rekke utfordringer. Foto: Vaxxinoa.



## Neste generasjon not-impregnering

Unike produkter med høy ytelse, godkjent for oppdrett - vårt bidrag til god fiskevelferd.



**Steen-Hansen**  
steen-hansen.no

Artgarder | photo © Steen-Hansen

Tabell 1. Vaksineringsregimer benyttet i laborieforsøket

	Vaksine protokoll (vekt)
1	Dypp x 2 (1,3g og 5,8g)
2	Dypp x 2 (1,3g og 5,8g) og stikk (7,8g)
3	Stikk (7,8g)
4	Kontroll (uvaksinert)

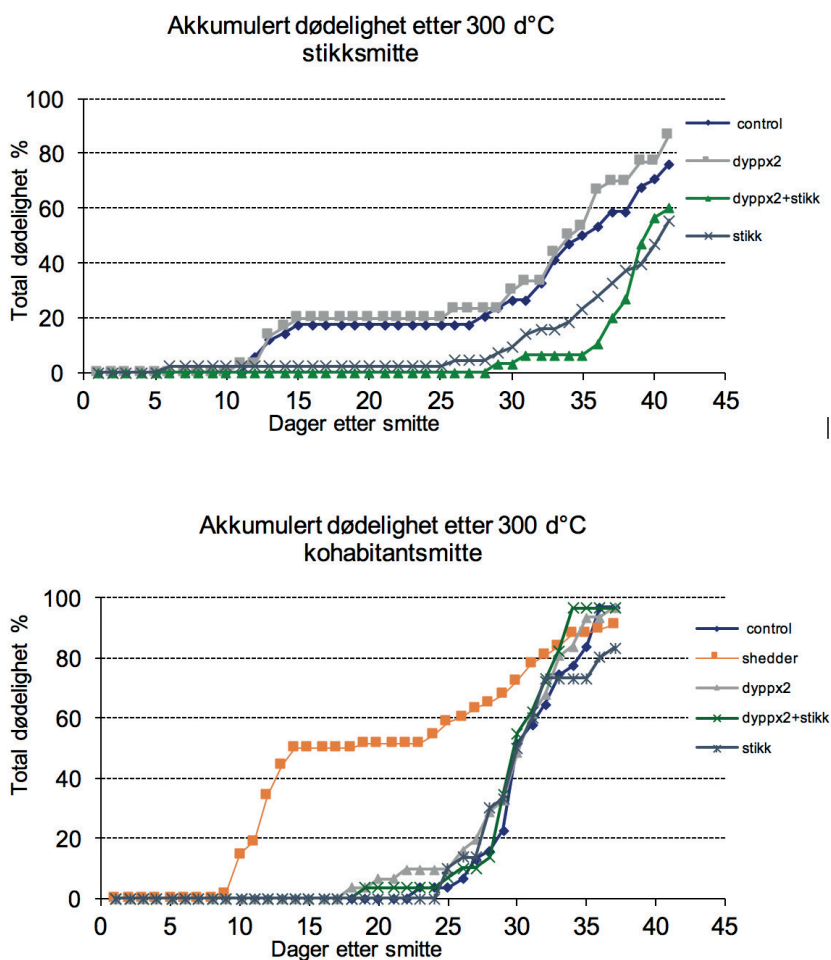
Ca. 30 fisk fra alle vaksinerte grupper ble testet i begge smitte modeller ved 300, 450 og 780 d°C etter stikkvaksinering. Dødelighet og oppførsel ble registrert og det ble tatt daglige prøver i 35-45 dager. Smitteforsøkene ble gjennomført ved 15°C som er en høy, men realistisk, sommertemperatur i et lakseanlegg. *A. salmonicida* trives godt og vokser raskere med økende temperatur inntil over 20°C. Ved en temperatur på 15°C vil infeksjonen i shedder-fiskene utvikle seg raskt og medføre et kraftig infeksjonspress på de vaksinerte fiskene.

I feltforsøket fulgte vi 26 500 vaksinerte og 20 500 uvaksinerte rognkjeks på ca. 40-50 g. Fisken ble fordelt på sju merder i et lakseanlegg på Vestlandet; fire

merder med vaksinert- og tre merder med uvaksinert fisk. Laksen i merdene var ca. 2,8 kg og alle merdene inneholdt i tillegg villfanget leppfisk hvor det hadde blitt påvist infeksjon med atypisk *A. salmonicida* kort tid før utsett av rognkjeks. Rognkjeksdødelighet ble registrert daglig av anleggets ansatte og prøver til histologi, dyrkning og qPCR for påvisning av atypisk *A. salmonicida* ble tatt i forbindelse med månedlige kliniske undersøkelser fra to måneder før utsett til tre måneder etter utsett. Det ble også tatt prøver fra leppfiskene.

Resultatene fra laborieforsøkene er oppsummert i **Figur 1** som viser akkumulert dødelighet etter stikkmitte og kohabitantsmitte 300 d°C etter vaksinering. Smitte etter 450 og 780 d°C ga nesten identiske resultater som ved 300 d°C. Ved kohabitantsmitte begynte infiserte fisk (sheddere) å dø 7-8 dager etter oppstart, mens fisk i alle de vaksinerte gruppene begynte å dø fra 13-20 dager etter oppstart. Dødeligheten fulgte samme mønster og hastighet i både vaksinerte og uvaksinerte grupper. Ved stikkmitte inntraff dødeligheten til forskjellig tid hos hhv. stikkvaksinert, kun dyppvaksinert og uvaksinert fisk. Dødeligheten var imidlertid like høy i alle gruppene ved forsøkslutt.

Vi hadde håpet at den høye dødeligheten og manglende vaksinebeskyttelsen hos vaksinert fisk i laborieforsøket var et resultat av et kunstig høyt infeksjonspress, og at vaksinen allikevel ville gi tilstrekkelig beskyttelse mot et naturlig, og forhåpentligvis lavere, infeksjonspress i sjø. Forsøksfiskens helsestatus før sjøutsett var god. Den hadde vokst godt med veldig lav dødelighet i settefiskfasen, og tolererte transport til sjøanlegget og sjøsetting tilsynelatende godt. Ved første prøveuttak en måned etter sjøsetting ble atypisk *A. salmonicida* infeksjon påvist i alle de prøvetatte rognkjeksene, både vaksinerte og uvaksinerte. Det ble også påvist infeksjon med atypisk *A. salmonicida* i alle prøvetatte fisk fram til avslutning av forsøket. Ifølge opprinnelig plan hadde vi planlagt å ta månedlig prøver i fem måneder etter utsett, men etter melding fra anlegget om at rognkjeks ikke lenger var å finne i merdene etter tredje prøvetaking ble forsøket avsluttet.



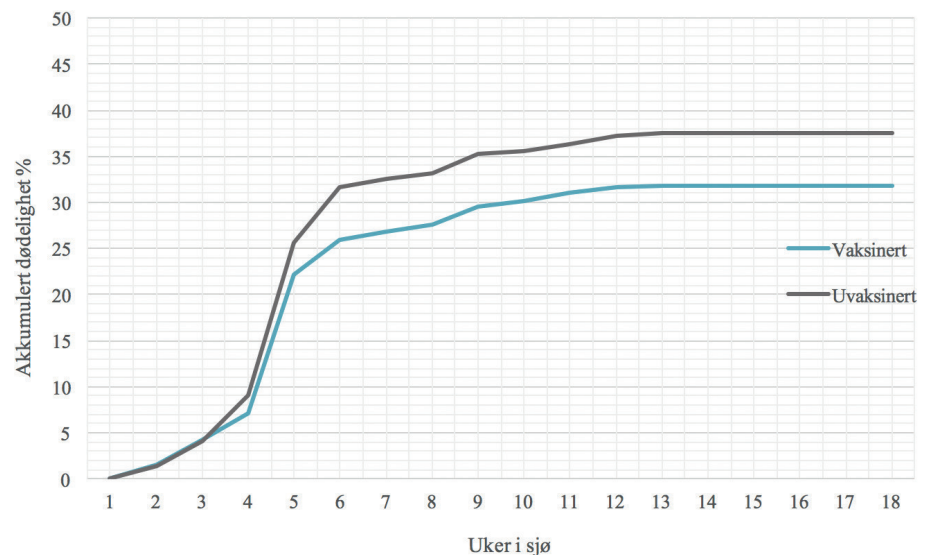
Figur 1. Akkumulert dødelighet etter stikkmitte (øverst) og kohabitantsmitte (nederst) 300 d°C etter vaksinering. Smitte ved 450 d°C og 780 d°C ga nesten identiske resultater.



**Figur 2** viser at bare 32% av den vaksinerte og 38% av den uvaksinerte fisken ble gjort rede for ved dødfisktelling. Dette betyr at skjebnen til over 60% av alle sjøsatte rognkjeks i dette forsøket er ukjent. Selv om det er fristende å skylde på atypisk *A. salmonicida* infeksjon alene som årsak til dødeligheten, bør vi også være åpne for at andre faktorer kan ha spilt en direkte eller indirekte rolle. Anlegget var strømuttsatt, og rognkjeks som hadde vokst jevnt og godt i settefiskfasen vokste lite eller ingenting i sjø og ved prøvetaking ble det ikke funnet mageinnhold i fisken.

I denne undersøkelsen ga vaksinen liten grad av beskyttelse mot atypisk furunkulose både under kontrollerte forhold i laboratoriet og i felt. Det kan være flere årsaker til dette. Suboptimal vaksineformulering kan være en forklaring. Det kontrollerte smitteforsøket ble kjørt ved 15°C, og forsøksfisken i felt ble sjøsatt ved 16°C, som er en høy men realistisk temperatur som oppdrettsrognkjeks utsettes for fra tid til annen i lakseanlegg. Det er vist at rognkjeks vokser godt ved slike temperaturer, men det kan også være grunn til å spekulere i om den samtidig har en nedsatt evne til å forsvare seg mot *A. salmonicida* infeksjon. Tilbakemeldinger fra næringen knytter økt dødelighet til høy sjøvannstemperatur. Det er nylig publisert en undersøkelse som viste at vaksine mot en virulent stamme av *A. salmonicida* ga rognkjeks beskyttelse mot infeksjon ved 12°C. Denne undersøkelsen viste også at en lav-virulent stamme som ikke ga vesentlig dødelighet ved 8 eller 12°C, ga dødelighet opp mot 90% når vanntemperaturen ble hevet til 16°C. Sett i lys av dette burde lab-forsøkene i vår undersøkelse først ha blitt kjørt ved lavere temperatur med etterfølgende testing ved høyere temperaturer.

I feltforsøket ble nesten 90% av fisken kun infisert med *A. salmonicida* A-lag type 6, mens en blandingsinfeksjon med type 5 og 6 ble påvist i de resterende fiskene. *A. salmonicida* type 5 er mer vanlig i leppefisk enn i rognkjeks, og det er sannsynlig at rognkjeks har blitt infisert av den smittede villfangede leppefisken som var tilstede i anlegget. Ved genetisk typing av isolatene av *A. salmonicida* type 6 fant vi at det sannsynligvis er flere forskjellige smitekilder.



**Figur 2.** Akkumulert dokumentert dødelighet for vaksinert og uvaksinert rognkjeks etter sjøsetting

Disse kan inkludere både villfanget leppefisk og vill rognkjeks. Villfanget leppefisk kan være bærer av *A. salmonicida* før fangst og infeksjonen kan utvikle seg raskt med påfølgende høy dødelighet etter utsetting i merd. Vi konkluderer derfor med at utsett av oppdrettsrognkjeks i samme merd eller anlegg som villfanget leppefisk utgjør en stor smitterisiko for rognkjeks. Gitt at vi ikke fant fôr i magen på de prøvetatte rognkjeksene fra anlegget, konkluderer vi med at det fortsatt mangler en del kunnskap om behovene til oppdrettsrognkjeks i sjøanlegg i forhold til fôr og trolig også andre faktorer.

I dette prosjektet kunne vi ikke dokumentere at stikkvaksinering med en oljebasert vaksine beskyttet rognkjeks mot infeksjon med *A. salmonicida* ved temperaturer på 15-16°C. Dyppvaksinering før stikkvaksinering ga ikke bedre immunrespons. Det er behov for både mer kunnskap om hvordan vanntemperatur påvirker rognkjeksens immunologiske og fysiologiske egenskaper, og om hvordan man skal lage gode modeller for å teste vaksiner til rognkjeks. Vi fraråder sjøsetting av rognkjeks i samme merd som villfanget leppefisk.

## Referanser

- Bornø m. fl. (2016) Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015 (2016) Veterinærinstituttet rapportserie 2/2016.
- Dahl, E. L. Strategisk bruk av rensefisk Rensefiskkonferansen, 2017.
- Gulla, m.fl (2015). vapA (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. Journal of Fish Diseases. DOI: 10.1111/jfd.12367
- Nytrø A.V, Vikingstad E., Foss A., Hangstad T.A, Reynolds P., Eliassen G., Elvegård T.A., Falk-Petersen I.B., Imsland A.K (2014) The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). 434: 296-302
- Rønneseth, A., Haugland, G. T., Colquhoun, D. J., Brudal, E., & Wergeland, H. I. (2017). Protection and antibody reactivity following vaccination of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) against atypical *Aeromonas salmonicida*. Fish & Shellfish Immunology. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.040>