

Forebygging av korsstingsvirvler hos laks i oppdrett

Faglig sluttrapport

Grete Bæverfjord, Alf Seljenes Dalum, Vibeke Høst, Aleksei Krasnov, Randi Grøntvedt, Renate Johansen, Anne-Katrine Reed, Anne Aas-Eng, Agnar Kvellestad, Håvard Bjørgen, Cathrine Trangerud, Nina Ottesen, Hege Kippenes Skogmo, Erling Olaf Koppang, Elisabeth Ytteborg





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 370 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> Forebygging av korsstingsvirvler hos laks i oppdrett	ISBN 978-82-8296-698-6 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Prevention of the cross-stitch vertebrae syndrome in farmed Atlantic salmon	<i>Rapportnr.:</i> 35/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Grete Bæverfjord ¹ , Alf Seljenes Dalum ¹ , Vibeke Høst ¹ , Aleksei Krasnov ¹ , Randi Grøntvedt ² , Renate Johansen ³ , Anne-Katrine Reed ³ , Anne Aas-Eng ⁴ , Agnar Kvellestad ⁵ , Håvard Bjørngen ⁵ , Cathrine Trangerud ⁵ , Nina Ottesen ⁵ , Hege Klippenes Skogmo ⁵ , Erling Olaf Koppang ⁵ , Elisabeth Ytteborg ¹ ¹ Nofima, ² Inaq, ³ Pharmaq Analytiq, ⁴ Pharmaq, ⁵ NMBU Veterinærhøgskolen	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi	<i>Dato:</i> 22.10.2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 38 sider
<i>Stikkord:</i>	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901430
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Prosjektet tok utgangspunkt i en ny type skjelettdeformiteter hos laks som ble observert vinteren 2016-2017, og som ble kalt korsstingsdeformiteter. Ved oppstart ble det gjennomført en studie av produksjonsdata. Den viste at type vaksine var en risikofaktor, og at høstsmolt var mer utsatt enn vårsbolt. Histologisk undersøkelse av ryggvirvler som var tatt ut i slakterier viste et entydig bilde, med ringformede defekter i virvlenes endeplater, symmetrisk om virvlenes midtpunkt nært sentrum av virvlene. I et langtidsforsøk med ulike vaksinegrupper ble det funnet korsstingsvirvler på røntgen ved avslutning (3,8 kg) i grupper som var vaksinert med oljebaserte vaksiner som inneholdt PD-komponent, og ikke i andre vaksinegrupper. Resultatene indikerte at vaksinene forårsaket en forbigående feil i virvlenes vekstsoner i perioden etter vaksinerings, og at det ble dannet en ringformet svakhet på det stedet der vekstsonen var lokalisert ved vaksinerings, ytterst på virvlenes endeplater. Når virvelen gjenvant normal vekst, ble denne svakheten liggende på samme sted. Videre vekst og utvikling av virvlene kunne avgjøre om virvlene blir sterke nok til å utvikle seg normalt, eller om denne skjulte feilen i endeplatene resulterte i en ustabilitet som til slutt ga den karakteristiske patologien. Innledende forsøk med beinceller i kultur indikerte at dette kan være et nyttig verktøy for å studere denne problemstillingen i framtida.	<i>Prosjektnr.:</i> 12117
<i>English summary/recommendation:</i> The project addressed a new type of vertebral deformities in Atlantic salmon, called "cross-stitch" vertebrae. Analysis of production data showed that vaccine was a major risk factor, and that 0+ smolts were more affected than 1+. On histology, a ring-formed defect in vertebral endplates was found in vertebrae with typical lesions, located close to vertebral centra. The link to vaccination was confirmed in a long-term fish experiment, and typical lesions were found in fish groups vaccinated with oil-adjuvanted vaccines which included a PD-component. Initial <i>in vitro</i> studies indicated that cell culture may be a useful future approach to this problem.	

Forord

Prosjektet ble initiert etter observasjoner av en ny type ryggdeformiteter hos oppdrettslaks sein høst og vinter 2016-2017. Deformitetene ble registrert på slaktefisk hos flere store selskaper, og ble gjenkjent som noe annerledes og mer alvorlig enn de vanlige ryggdeformitetene. Tilstanden førte også til betydelige kvalitetsproblemer på filet.

Søknaden om dette prosjektet (901430) ble utarbeidet som respons på en utlysning fra FHF.

FHFs standardvilkår har ligget til grunn for prosjektet, med noen endringer som angikk krav om åpenhet omkring resultater underveis i prosjektperioden.

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	4
2.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt.....	4
2.2	Prosjektets omfang.....	4
2.3	Prosjektorganisering.....	4
3	Problemstilling og formål	6
3.1	Prosjektets effektmål (betydning for næringen, nytteverdi)	6
3.2	Prosjektets resultatmål	6
4	Prosjektgjennomføring	7
4.1	Oversikt over prosjektet	7
4.2	Beskrivelse av metodikk	7
4.2.1	Innhenting av produksjonsdata (AP1)	7
4.2.2	Innhenting og analyse av fiskemateriale fra slakterier (AP1).....	8
4.2.3	Fiskeforsøk (AP2)	8
4.2.4	<i>In vitro</i> -forsøk (AP4)	13
4.2.5	Laboratorieanalyser (AP3).....	13
4.3	Gjennomføring av prosjektet	15
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	17
5.1	Analyse av produksjonsdata.....	17
5.2	Patologi, materiale fra slakterier	17
5.2.1	Videre arbeid ved NMBU med materiale fra slakterier:	18
5.3	Langtidsforsøk – effekt av vaksiner	20
5.3.1	Vekst og overlevelse.....	20
5.3.2	Røntgenfunn.....	22
5.3.3	Histologi og morfologiske metoder	28
5.4	<i>In vitro</i> -forsøk	32
5.5	Samlet vurdering av resultatene og diskusjon	33
6	Hovedfunn	36
7	Leveranser	37

1 Sammendrag

Prosjektet ble initiert på bakgrunn av observasjoner av omfattende problemer med deformiteter på slaktegrupper av laks vinteren 2016-2017. Deformitetene skilte seg fra andre typer deformiteter og ble gjenkjent i slakteriene først og fremst på bakgrunn av store kvalitetsforandringer i muskel: Innvekst av bindevev i filet og avblekning og skjolding av filetfarge. Det var omfattende forandringer i ryggvirvlene, og på røntgen hadde de unormale virvlene et karakteristisk preg. Navnet «korsstingsvirvler» ble tatt i bruk for å skille disse patologiske forandringer fra andre typer ryggmisdannelser.

Produsentene knyttet raskt mistanke til et nytt vaksineprodukt som ble tatt i bruk i 2015, en oljebasert 7-komponentvaksine som inkluderte PD-komponent. I tillegg var det feltobservasjoner som indikerte at bruk av helsefôr i sjø forsterket problemet. Korsstingsvirvler var tidligere funnet i et industriprosjekt (Nofima/Pharmaq), og kunnskapen herfra ble tatt med inn i et nytt prosjekt som ble finansiert av FHF.

En omfattende innsamling av data fra slakterier og produksjonsselskaper bekreftet at vaksineprodukt var en viktig risikofaktor for korsstingsvirvler. Analysen omfattet totalt 152 slaktegrupper som var vaksinert enten med den nye 7-komponentvaksinen eller en eldre produktkombinasjon. Resultatene viste en sterk overvekt av problemer med den nye vaksinen, men det var likevel stor variasjon i korsstingsproblemer blant fisk som hadde fått samme vaksine, og det var åpenbart at andre faktorer også påvirker utviklingen. Analysene viste også en stor overvekt av høstmolt blant problemgrupper, sammenliknet med vårmolt.

Det ble gjort omfattende analyser av fisk og ryggradsprøver som var innhentet fra til sammen sju slakterier. Analysene viste at det som var karakterisert som korsstingspatologi var likt fra fisk til fisk, og i fisk fra ulike produsenter og slakterier, og bekreftet at denne patologien var ulik andre typer ryggmisdannelser som er beskrevet. Histologiske analyser, gjort uavhengig ved to laboratorier, viste at virvler med det karakteristiske preget på røntgen hadde ringformede bruddsoner i virvlene. Bruddsonene var sirkulære og hadde omtrent lik avstand fra virvelsentrum. Disse bruddsonene antas å være underliggende årsak til det sammenbruddet av virvelstrukturen som observeres i korsstingspatologi.

Det ble satt opp et forsøk under kontrollerte betingelser der effekten av vaksine ble undersøkt. Målet med dette forsøket var å framkalle korsstingspatologi og å følge utviklingen av tilstanden over tid. Forsøket hadde fire vaksinegrupper: Uvaksinert fisk, fisk vaksinert med en standard 6-komponentvaksine uten PD-komponent og fisk vaksinert med de to oljebaserte 7-komponentvaksinene med PD-komponent som var på markedet på dette tidspunktet. Fisken fikk to ulike forsøksfôr i ferskvann, med eller uten tilsetning av betaglukan. Ved utsett i sjø ble hoveddelen av fiskegruppa overført til merder, og fikk ett av to ulike fôrregimer, en produktserie uten aktive ingredienser eller en produktserie med helsefôrprodukter, begge fra samme produsent. Fisken gikk i merd til en gjennomsnittsstørrelse på 3,8 kg, 15 måneder etter utsett i sjø. En mindre andel av fisk ble holdt tilbake ved smoltutsett og overført til kar med sjøvann og fordelt på to ulike temperaturer (6 °C og 12 °C). Fisken i dette delforsøket ble avlivet for prøveuttak 3 mnd. etter overføring til sjø.

Fisken i merdforsøket viste normal utvikling av ryggrad på røntgen fram til de første tegnene til utvikling av korsstingspatologi ble funnet 9 mnd. etter utsett i sjø. Ved avslutning av forsøket var det et lavt, men tydelig innslag av fisk med korsstingsvirvler hos fisk som var vaksinert med de to

PD-vaksinene. Forandringene var milde, men entydige. I de to andre vaksinegruppene, dvs. uvaksinert fisk og fisk vaksinert med 6-komponent standardvaksine, var det ingen fisk med korsstingspatologi på røntgen.

I virvelprøver tatt ved avslutning av forsøket ble det funnet histologiske og morfologiske forandringer som samsvarte med det vi tidligere fant i prøver fra slakterier. I prøver som var tatt i ukene etter vaksinerings fant vi forstyrrelser i vekstsonen på virvlene hos vaksinert fisk, og disse avvikene var sporbare framover gjennom uttak i ferskvann og i karforsøk de første tre månedene i sjø. Ved avslutning fant vi den typiske ringformede svakheten symmetrisk om virvelsentrum, i en avstand fra midten av virvelen som tilsvarte lokalisering av vekstsonen ved vaksinerings. På histologi fant vi samme type forandringer i vekstsonene i tidlige uttak i alle vaksinegruppene, også i gruppa som var vaksinert med standardvaksine, om enn i noe svakere grad. Denne gruppa hadde ingen spor av korsstingsvirvler på røntgen. Resultatene kan gi grunn til å tro at reaksjonen i virvlene kan være en generisk reaksjon på oljebaserte vaksiner, men at det er en gradforskjell som gjør at reaksjonen slår så sterkt ut på noen vaksiner.

In vitro-forsøk med beinceller i kultur viste en klar effekt av tilsetning av vannfase fra to vaksiner, tilsynelatende uten forskjell mellom vaksine med og uten PD-komponent, men med en klar forskjell i effekt mellom høy og lav dose av tilsetning. Genekspresjonsanalyser viste økt stress etter tilsetning, og indikerte lavere nivå av gener involvert i beindannelse. Resultatene fra dette forsøket tyder på at cellekulturstudier kan være et nyttig verktøy i framtidige studier av korsstingspatologi. Resultatene styrker også oppfatningen av en dose-respons-mekanisme i korsstingsreaksjonen. Vanlig dose for de to PD-vaksinen i studien er 0,1 ml, mens standardvaksinen uten PD-komponent har dose på 0,05 ml. En eventuell dose-avhengig reaksjon vil kanskje også påvirkes av fiskestørrelse ved vaksinerings.

Resultatene fra det 3 måneder lange karforsøket i sjøvann indikerte at temperatur etter utsett i sjø kan være en faktor som bidrar til å avgjøre videre utvikling av korsstingspatologi i ei fiskegruppe. Det var en tydelig reduksjon i vekst i perioden etter utsett for PD-vaksinert fisk på 12 °C, men ingen forskjell i tilvekst mellom vaksinegrupper på 6 °C. På histologi var det tydelige tegn til utvikling av en bruddsone i virvler etter 3 mnd. på 12 °C, mens avvikene i beinkvalitet var mindre på 6 °C. Med tanke på forskjellen i grad av korsstingsdeformiteter mellom høst- og vårsmolt er temperatur etter utsett i sjø en faktor som bør undersøkes nærmere.

I dette forsøket kunne vi ikke påvise effekter av glukaner i fôret på utvikling av korsstingspatologi, verken tilsatt betaglukan i forsøksfôr i ferskvann, eller kommersielle helsefôr i sjø. Vi regner dette spørsmålet som uavklart, fordi det var for få individer og for milde forandringer til å kunne ta ut en slik effekt av fôr i analysen. Vi gjorde likevel noen observasjoner på histologi i perioden etter vaksinerings som indikerte en effekt av betaglukan på celler og vev i virvlernes vekstsoner, og vi mener at dette bør undersøkes nærmere.

Langtidseffekter av nedsatt mineralisering i tidlige livsstadier: Ved oppstart av forsøket ble det ved røntgenundersøkelse funnet et lavt, men tydelig innslag av fisk med høytetthetsvirvler. Disse virvlene knyttes til nedsatt mineralisering, og skyldes som hovedregel mangel på fosfor i fôret, i vårt tilfelle før forsøksstart. Vi fulgte utvikling av disse virvlene, og kunne vise at omtrent 2/3 av høytetthetsvirvlene ble omdannet til fusjoner i løpet av sjøperioden, mens 1/3 ble tilbakedannet. Disse funnene knytter en moderat mangel på fosfor i en begrenset periode på liten fisk til et tydelig innslag av fusjoner på slaktefisk. Dette er ny kunnskap som vil bidra til en mer presis diagnostikk av ryggdeformiteter i

framtida, og resultatene forsterker også anbefalingene om å sørge for god nok dekning med fosfor i fôret i alle livsfaser.

English summary

The project addressed a new type of vertebral deformities in Atlantic salmon, called “cross-stitch” vertebrae. Analysis of production data showed that vaccine was a major risk factor, and that 0+ smolts were more affected than 1+. On histology, a ring-formed defect in vertebral endplates was found in vertebrae with typical lesions, located close to vertebral centra. The link to vaccination was confirmed in a long-term fish experiment, and typical lesions were found in fish groups vaccinated with oil-adjuvanted vaccines which included a PD-component. Initial *in vitro* studies indicated that cell culture may be a useful future approach to this problem.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Prosjektet omhandler en ny type misdannelser i ryggvirvler hos laks som ble kalt korsstingsvirvler. Dette navnet ble tatt i bruk for å skille dem fra andre, kjente typer av ryggmisdannelser, fordi de likner på korssting på røntgenbilder. Målet med prosjektet er å finne ut hvorfor og hvordan disse misdannelsene oppstår, og å finne fram til strategier for å forebygge dem.

Utvikling av korsstingsvirvler hos fisken medfører deformasjon i ryggraden og kan gi bruskdannelse og innvekst av bindevev i filet. Dette gir redusert kvalitet på fisken, samt at det påvirker vekst og fiskevelferd. Tidligere gjennomførte industrifinansierte prosjekter har vist sammenhenger mellom bruk av ulike vaksiner og -kombinasjoner og funksjonelle fôr og utvikling av korsstingsvirvler, og en nylig avsluttet pilotstudie ved bruk av felldata, ga indikasjoner på sammenheng mellom bruk av PD-vaksine og utvikling av ryggradsdeformasjon.

Prosjektet er forankret i FHF sin handlingsplan for 2017 som har som mål å bidra til kunnskap som kan tas i bruk av lakseprodusenter, FoU-miljøer og leverandører som fôr- og vaksineselskaper, for å sikre god fiskevelferd og redusere tap i sjøfasen. Forskning for å avdekke årsaker til deformiteter er et prioritert område.

2.2 Prosjektets omfang

2.3 Prosjektorganisering

Nofima har vært ansvarlig organisasjon for prosjektet. Prosjektet har vært gjennomført i samarbeid med INAQ, Pharmaq, Pharmaq Analytiq, og NMBU Veterinærhøgskolen.

Prosjektet har gjennomført fiskeforsøk ved Nofima Sunndalsøra (ferskvann) og Gildeskål Forskningsstasjon GIFAS (sjøvann).

I løpet av prosjektet har det vært kontakt og/eller samarbeid med andre vaksineprodusenter og fiskeprodusenter. Vi har fått tilgang til fiskemateriale og/eller produksjonsdata fra bl.a. Bremnes Seashore, SalmoNor, Tombe Fiskeanlegg, Langøylaks, Steinvik Fiskefarm, Marø Havbruk, Fremskridt Laks, K. Strømmen Lakseoppdrett, Sulefisk og Lerøy Vest. Vi har vært på besøk og tatt ut fiskemateriale i til sammen sju slakterier: Nils Williksen, Sekkingstad, Firda Seafood, Innovamar, Vikenco, HAFI og Kråkøy slakteri.

Nøkkelpetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen:

Nofima: Prosjektleder var Grete Bæverfjord (veterinær, Dr.scient) som har hatt overordnet ansvar for prosjektet, og ansvar for røntgendiagnostikk og gjennomføring av fiskeforsøk. Elisabeth Ytteborg har hatt ansvar for histologi og gjennomføring av cellekulturforsøk. Aleksei Krasnov har gjort microarray-analyser.

INAQ: Randi Grøntvedt har hatt ansvar for innhenting og analyser av felldata, i samarbeid med Peder Jansen og Torstein Kristensen.

Pharmaq: Anne Aas-Eng har representert Pharmaq i prosjektgruppa. Pharmaq har bidratt med kompetanse på vaksiner.

Pharmaq Analytiq: Renate Johansen har vært ansvarlig for aktiviteten hos Pharmaq Analytiq. Anne-Katrine Reed, Helle Holm (nå Patogen) og Alf Seljenes Dalum (nå Nofima). Histologi.

NMBU Veterinærhøgskolen: Erling Olaf Koppang og Agnar Kvellestad. Undersøkelse vha. røntgen og CT (computertomografi). Patologi og histologi.

Styringsgruppe:

Styringsgruppa har bestått av

Grete Bæverfjord, Nofima (prosjektleder)

Erik Dahl-Paulsen, Lerøy Vest

Arne Guttvik, Salmar

Geir Magne Knutsen, Bremnes Seashore

Gro Vee, Mowi

Ingebjørg Sævareid, Salmon Group

Tor Erik Homme, Grieg seafood

Olai Einen, Cermaq

3 Problemstilling og formål

3.1 Prosjektets effektmål (betydning for næringen, nytteverdi)

Deformiteter har vært et problem i lakseproduksjonen siden 1990-tallet, og omfanget har variert både mellom produsenter og over tid. I lange perioder har innslaget av deformiteter vært moderat, og i andre perioder høyt nok til å skape bekymring og gi økonomiske tap. Forskning har tidligere avdekket noen viktige årsaksfaktorer knyttet til oppdrettsmiljø og -strategier. Når tilsynelatende nye problemer oppstår har næringa et ansvar for å avdekke om årsaken(e) ligger i menneskeskapte endringer i fiskens livsbetingelser.

Korsstingsdeformitetene kom til syne som problem hos mange uavhengige produsenter i løpet av en relativt kort periode vinteren 2016-2017, og det er ikke grunn til å tro at problemet har vært til stede i noe vesentlig omfang før dette. Deformitetsproblemene var alvorligere enn det vi har sett før, og ga grunn til bekymring på fiskens vegne, dvs. fiskevelferd. Fisk med korsstingsdeformiteter hadde også store kvalitetsfeil, dvs. at de økonomiske tapene var store. Dette var åpenbart et problem av en slik karakter at næringen ikke kunne leve med det over tid.

Før prosjektet startet forelå det tilgjengelig informasjon som indikerte en sammenheng med nye vaksineprodukter, nærmere bestemt oljebaserte multivalente vaksiner der det var lagt til PD-komponent. PD er en av de viktigste infeksjøse sjukdommene i lakseproduksjonen, og utvikling av effektive vaksiner er høyt prioritert. Samtidig var det indikasjoner i tilgjengelig materiale på at bruk av immunostimulanter/helsefôr kunne bidra til å forsterke problemet. Det vil si at to av de viktigste innsatsfaktorene for å forebygge PD tilsynelatende var involvert i årsakskjeden for korsstingsvirlver.

3.2 Prosjektets resultatmål

Hovedmål:

- Å identifisere årsak(er) til den patologiske tilstanden korsstingsvirlver, og om mulig foreslå forebyggende tiltak

Delmål:

- Å gi en patologisk beskrivelse av tilstanden korsstingsvirlver
- Å identifisere risikofaktorer og sammenhenger mellom produksjonsfaktorer og utvikling av korsstingsvirlver
- Å identifisere primære og sekundære årsaker som har betydning for utvikling av korsstingsvirlver
- Å bidra til utvikling av verktøy for tidlig å kunne identifisere utvikling av korsstingsvirlver med tanke på framtidig forebygging av tilstanden

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Oversikt over prosjektet

Prosjektet ble gjennomført som en kombinasjon av feltstudier, fiskeforsøk og laboratoriestudier. Arbeidet var organisert i fire delprosjekt:

AP1 Feltundersøkelser av korsstingsvirkler hos lakseprodusenter

AP2 Eksperimentelle studier for screening og evaluering av risikofaktorer

AP3 Patogenese og identifisering av tidlige markører

AP4 In vitro testing av tidlige markører

4.2 Beskrivelse av metodikk

4.2.1 Innhenting av produksjonsdata (AP1)

Prosjektet samlet inn datamateriale fra fisk satt ut i sjø i 2015, 2016 og 2017. Ansvarlig for dette arbeidet var INAQ, med bidrag fra Nofima. Formålet var å finne eventuelle sammenhenger mellom tilgjengelige produksjonsdata og forekomst av korsstingsdeformiteter. En slik datainnsamling var igangsatt av Salmon Group før prosjektet startet, og ble forlenget og utvidet som del av prosjektet.

Diagnostikken var utfordrende, og det var nødvendig å kombinere data fra flere ulike kilder mht. diagnostikk.

1. Røntgen

Den eneste sikre diagnostikken for korsstingsdeformiteter er røntgen, men tilgangen på røntgen er begrenset. Til sammen 27 fiskegrupper ble sendt inn til røntgen.

2. Screening

Det ble laget et registreringsopplegg for målrettet screening på slaktelinja. Dette opplegget bestod av skjema med illustrasjoner som viste typiske funn ved korsstingspatologi. Skjemaet ble brukt av kvalitetspersonell på slakteri. Vi har screeningdata fra 20 fiskegrupper.

3. Kvalitetsrapporter

Data fra ordinære kvalitetsrapporter fra slakterier ble analysert, og kategorien «brusk i filet» ble brukt til å bedømme sannsynligheten for korsstingsdeformitet. Data fra 105 kvalitetsrapporter er inkludert.

For hver fiskegruppe ble informasjon fra diagnostikken satt sammen med produksjonsdata for fiskegruppa, først og fremst fra fiskens CV, men også tilleggsinformasjon som ble innhentet og lagt til. De tre ulike kildene for diagnostikk hadde ulik grad av presisjon og sikkerhet, der spesielt data fra kvalitetsrapportene var mindre presise enn de to andre. Det ble derfor generert tre datasett, som ble analysert hver for seg. Logistisk regresjonsanalyse ble gjennomført på alle tre datasett, der responsvariablene (affisert eller ikke affisert) ble modellert som en funksjon av faste og tilfeldige effekter i en mixed logistisk regresjonsmodell.

Oversikt over materialet er vist i Tabell 1.

Tabell 1 Oversikt over materialet som ble brukt i analyse av sammenheng mellom korsstingspatologi og produksjonsdata

Datasett	Antall fisk	Antall merder	Lokaliteter	Høst	Vår
Kvalitetsrapporter	122357	105	34	60	45
Screening	360	20	14	17	3
Røntgen	707	27	20	24	3

Det var krevende å innhente dette materialet, og resultatet ble et materiale som var skeivfordelt på to måter. Det var langt flere grupper med høstutsett enn vårutsett, og vi fikk bare data fra fisk som var vaksinert mot PD, dog med to ulike produkter. Det viste seg også vanskelig å innhente tilleggsinformasjon om fiskegruppene på et ønskelig presisjonsnivå. Disse to forholdene la noen begrensninger på analysene av materialet.

4.2.2 Innhenting og analyse av fiskemateriale fra slakterier (AP1)

Prosjektet gjennomførte innsamling av fiskemateriale fra slakterier, med formål å beskrive de patologiske forandringene i fisk med korsstingsvirvler. Det ble gjennomført til sammen sju slakteribesøk i perioden januar 2018 til mars 2019. Nofima var ansvarlig for innhenting av materiale, og INAQ bidro med utvalg av fiskegrupper og slakterier. Fiskematerialet ble fordelt på NMBU Veterinærhøgskolen og Nofima for videre analyser.

Resultatene fra denne delen av prosjektet er publisert i to artikler, Holm m.fl. 2020 og Trangerud m.fl. 2020, som beskriver innhenting av materiale og analyser i detalj.

4.2.3 Fiskeforsøk (AP2)

Det ble gjennomført en eksperimentell studie under kontrollerte betingelser med tanke på å følge et eventuelt utviklingsforløp av korsstingspatologi fra begynnelse til slutt.

Forsøket ble gjennomført ved Nofima Sunndalsøra, med utsett i sjø ved GIFAS (Gildeskål forskningsstasjon). Forsøket var godkjent etter forsøksdyrregelverket (FOTS ID 16890).

Forsøket bestod av tre deler (Tabell 2):

Tabell 2 Oversikt over de tre delene av forsøket

A	Ferskvann	70 dager	4 ulike vaksinebehandlinger 4* ulike fôr i ferskvann
Ved overgang til sjø ble fisken fordelt på			
B	Karforsøk, sjø	90 dager	2 ulike temperaturer
C	Merder i sjø	455 dager	2 ulike fôr i sjø

* Analyser av fiskeprøver er begrenset til 2 av ferskvannsfôrene gjennom hele forsøket

A. Ferskvann

Gjennomføring:

- En gruppe på 3150 fisk (gjennomsnittsvekt 46 g) ble individmerket med pittag og fordelt på 21 kar
- Fisken fikk ett av fire fôr gjennom ferskvannsperioden. Fôrtildeling kontinuerlig og i overskudd
- Fisken ble satt på lysstyring 12D:12L i 38 dager, f.o.m. dag 4 etter forsøksstart
- Fisken ble vaksinert de to siste dagene med 12D:12L, før overgang til 24L
- På dag 19 og 20 etter vaksinerings og overføring til 24L ble 2096 fisk røntgenfotografert levende, med registrering av pittag i bildet for sammenlikning med seinere røntgenbilder
- Etter røntgenfotografering ble fisken fordelt på seks samlekar (ferskvann) i påvente av transport til sjø. Fisken ble behandlet med Slice i denne perioden (etter ønske fra GIFAS), øvrig fôring i denne perioden var med et kommersielt overgangsfôr uten aktive komponenter.
- Resten av fisken gikk i opprinnelige kar og fortsatte med forsøksfôr.
- Gjennomsnittstemperatur i ferskvann var 12,3 °C

Etter 32 dager på fullt lys ble fisken overført til sjøvann:

- Fisk til merdforsøk ble lastet på bil og transportert til GIFAS (2043 fisk). Av hensyn til fisken ble det ikke gjort registreringer på fisken på dette tidspunktet.
- Restfisk i ferskvann (442 fisk) ble fordelt på 4 kar (sjøvann), med to ulike temperaturer, to kar 6,5 °C og to kar 12,2 °C.

Prioriteringer i forsøksoppsett og gjennomføring av analyser:

Det ble gjort risikovurderinger basert på tilgjengelig kunnskap ved oppsett av forsøket. På bakgrunn av dette gjorde vi følgende skeivfordelinger ved oppsett av forsøket:

- Det ble vaksinert relativt flere fisk med V3 og V4 enn med V1 og V2.
- I ferskvann var det relativt flere fisk som fikk kontrollfôr med normalt innhold av fosfor og tilsvarende fôr tilsatt glukose, enn fôr med redusert nivå av fosfor uten og med tilsatt glukose.

Målet med denne skeivfordelingen var å sikre høye nok antall av de fiskegruppene/kombinasjonene med mest relevant bakgrunn og der det var begrunnet mistanke om risiko, og samtidig unngå å sette urealistisk høye antall fisk inn i forsøket.

Underveis er det gjort prioriteringer som gjelder analyser:

Det er ikke gjort videre analyser av prøvemateriale fra fisk som fikk fôr med redusert fosfornivå i ferskvann.

- Inklusjon av fôr med redusert fosfornivå ble i første omgang gjort basert på tilgjengelige resultater fra (Bæverfjord et al. 2015), som tydet på at mangelfull beinutvikling på grunn av fosformangel i ferskvann virket hemmende på utvikling av korsstingsvirvler. Redusert nivå av fosfor i fôr ga andre utslag, som tydelig viste at redusert fosfor ikke var en aktuell strategi for å begrense korsstingsvirvler.
- Reduksjonen i fosfornivå i fôr i ferskvann i dette forsøket var for liten og/eller kortvarig til å gi synlige utslag på røntgen gjennom ferskvannsperioden, og det var usikkert om vi hadde klart å oppnå en følgeeffekt på utvikling av korsstingsvirvler

På bakgrunn av dette ble det gjort et valg om å prioritere analyser av fisk fra de to ferskvannsfôrene med adekvat innhold av fosfor. Det ble gjort fortløpende registreringer og prøveuttak også av fisk fra de to nedprioriterte fôrgruppene, slik at prioriteringene kunne endres dersom utviklingen i forsøket ga grunn til det. Ved vitenskapelig publisering av resultatene er fisk fra lavfosforgruppene utelatt.

B. Karforsøk, sjøvann

Et balansert utvalg av fisk med ulike vaksine-ferskvannsfôr-kombinasjoner ble fordelt på 4 kar, med 109-112 fisk per kar.

- Fisken fikk kommersielt fôr av samme type som fisken som ble sendt til merdforsøk
- To kar fikk vann uten oppvarming, gjennomsnitt 6,5 °C, mens to kar fikk vann med regulert temperatur 12,3 °C
- Fisken gikk i disse enhetene i 90 dager før dette delforsøket ble avsluttet

C. Merder i sjø

Hoveddelen av fiskegruppa ble transportert med bil til GIFAS, og ble satt i merder.

- Utplassering i merd ble gjort med minst mulig håndtering, ved at ferdigsorterte grupper fra ferskvann ble transportert separat på bil og satt direkte i separate merder.
- Fisken gikk i disse merdene i 455 dager
- Fisken fikk et kommersielt fôr (samme som ble brukt i karforsøk på Sunndalsøra) til fôrintaket tok seg opp, og ble deretter fordelt på to ulike fôrregimer:
 - Tre merder fikk en serie med kommersielle fôr uten aktive ingredienser
 - Tre merder fikk en serie med tilsvarende fôr med aktive ingredienser
- Fisken fikk standard oppfølging og stell, og ble behandlet mot lakselus når nødvendig

4.2.3.1 Prøveuttak

Det ble gjennomført til sammen 11 prøveuttak i løpet av forsøksperioden (tabell 3), startuttak pluss 10 uttak.

Vi la vekt på hyppige prøveuttak, med tanke på å fange opp tidlige reaksjoner som kunne bidra til å forstå patogenesen.

Ved hvert uttak ble det gjort et kontrollert utvalg, med en skeivfordeling til fordel for de behandlingene der risiko ble vurdert som høyest. Det vil si at det gjennomgående ble samlet flere fisk fra vaksinegrupper V3 og V4 enn V1 og V2, og flere fisk fra de to ferskvannsdiettene med tilstrekkelig fosfor enn de to med lav fosfor.

I ferskvann ble det tatt prøver i forkant av vaksinerings, 2 uker etter vaksinerings, og 5 uker etter vaksinerings (ved overføring til sjø).

I merdforsøket var anbefalingen fra anlegget å unngå håndtering av fisken gjennom de kaldeste vintermånedene. Første uttak fra merd ble derfor gjort 20 uker etter utsett, i april på stigende temperatur. Hyppige uttak fra karforsøket på land ble brukt til å kompensere for det lange tidsrommet før første uttak i merd, siden fisken i karforsøket hadde samme bakgrunn fram til overføring til sjøvann.

Ved uttakene ble det gjort røntgenundersøkelser (se under), registrering av vekt og lengde, uttak til kjemiske analyser (ferskvann), samt uttak av vevsprøver, først og fremst ryggvirvler.

Til sammen ble det tatt vevsprøver av 1246 fisk i løpet av forsøket, og i tillegg kommer fisk tatt ut til kjemiske analyser og kontroll av smoltifisering. 895 av disse prøvefiskene kom fra de gruppene som fikk ferskvannsdiett med tilstrekkelig fosfor, og det var disse prøvene som analysene senere ble konsentrert om.

4.2.3.2 Røntgenanalyser

Ved oppstart ble det tatt et tilfeldig utvalg på 70 fisk fra utgangspopulasjonen. Fisken ble avlivet med overdose av bedøvelse og røntgenfotografert.

Ved hvert prøvetakingstidspunkt fra uttak 1 til og med uttak 9 (Tabell 3) ble det tatt røntgenbilder av prøvefisken. Pittagmerkene ble registrert på en slik måte at hver enkelt prøve kunne spores tilbake til røntgenbildet.

I uke 9 av forsøket, på dag 62-63, 3 uker etter vaksinerings og to uker før overføring til sjø, ble 2096 fisk røntgenfotografert levende. Dette ble gjort ved at fisken ble satt gruppevis i transporttanker og kjørt til røntgenlaboratoriet, der de ble bedøvd i små grupper og røntgenfotografert med så lite tid i luft som mulig, før overføring til friskt vann for oppvåkning. Pittagmerkene ble lest inn i bildeinformasjonen, slik at disse bildene kunne brukes som referanse for bilder tatt av samme individer seinere i forsøket. Røntgenfotograferingen ble (basert på tidligere erfaringer) gjort så vidt tidlig for å unngå å forstyrre fisken i direkte tilknytning til smoltifisering og overføring til sjø. De

røntgenfotograferte individene ble sortert over i seks ventekar, der de ble gående uforstyrret fram til transport til merd.

Øvrig fisk fra ferskvannsforsøket, som ble satt inn i karforsøk i sjøvann på forskningsstasjonen, ble ikke røntgenfotografert levende på dette tidspunktet.

Ved avslutning av merdforsøket ble samtlige gjenværende fisk (881 fisk) avlivet og røntgenfotografert.

Røntgenbildene ble lagret elektronisk og ble avlest på skjerm.

Tabell 3 Oversikt over gangen i forsøket og prøveuttak i de ulike delene av forsøket

Ferskvann

Dag nr.	Prøveuttak	Hendelse	Uker e.vaks.	Snittvekt (g)	Antall
0	Uttak 0	Start		46	70
4		Start 12D:12L			
40	Uttak 1		0	83	40
42-43		Vaksinering			
56	Uttak 2		2	90	40
62-63		Levende røntgen	3		(2096)
76-77	Uttak 3	Overføring sjø	5	104	139

Sjøvann

Dag nr.	Prøveuttak	Uker e.vaks.	Uker i sjø	Snittvekt (g)	Antall
Karforsøk, sjøvann, ulike temperaturer					
96-97	Uttak 4	8	3	116 (6)-128 (12)	80
132-134	Uttak 5	13	8	184 (6)-276 (12)	79
173-174	Uttak 6	20	15	297 (6)-582 (12)	112
Merdforsøk, sjøvann, ulike fôrtyper					
215-216	Uttak 7	25	20	340	112
349-350	Uttak 8	44	39	1210	112
439-440	Uttak 9	57	52	2870	112
529-533	Uttak 10	70	65	3810	136 (881)

4.2.4 In vitro-forsøk (AP4)

Det ble dyrket frem benceller (osteobaster) fra laks som tidligere beskrevet i Ytteborg et al., 2015. Stamceller isolert fra laks ble dyrket i kultur. Etter at cellene hadde laget konfluente lag i skålene ble de tilsatt differensieringsmedie som får dem til å utvikle seg til benceller. Cellene fikk dette mediet i 8 dager før vi tilsatte to ulike doser av vaksinekomponentene:

1. ALPHA JECT micro 1 PD – (V1) - vannfase ekstrahert fra vaksine og fortynnet i PBS til normal dosekonsentrasjon. 50 ul løsning tilsvarer en vaksinedose.
2. ALPHA JECT micro 6 – (V6) - vannfase ekstrahert fra vaksine og fortynnet i PBS til normal dosekonsentrasjon. 50 ul løsning tilsvarer en vaksinedose.

En dose (50 ul) settes vanligvis i fisk av str. 20-60 g. Ut fra dette beregnet vi hva en fisk på 20 g og en på 60 g ville få og tilsatte dette som µl/ml cellekultur, der 20 g fisken representerte høy dose (50 ul/20) og 60 g fisken en lav dose (50 ul/60). Kontrollceller ble ikke tilsatt vaksinekomponent. Mediet med vaksinekomponent ble fjernet og erstattet med vanlig cellemedium etter 24 timer. Cellene ble fulgt i mikroskopi for å observere eventuelle celleforandringer og prøver ble tatt etter 24 timer, 3 dager og 6 dager til genuttryksanalyser. RNA fra disse prøvene ble isolert, omdannet til cDNA og brukt i kvantitative real time analyser (qPCR) med kjente gener for stress og bendannelse.

4.2.5 Laboratorieanalyser (AP3)

4.2.5.1 Laboratorieanalyser gjennomført ved NMBU

Veterinærhøgskolen mottok fem forsendelser med til sammen 70 fisk, fra fire anlegg i sjø i 2018 - 2019. Alle fiskene ble røntgenfotografert i sideleie, og videre undersøkt vha. computer tomografi (CT). Deretter ble individene obdusert og prøver tatt ut. Rygggradene (eller deler av disse) fra de fleste fiskene, og ulike organer fra de fleste, ble lagt på formalin for fiksering. Under denne disseksjonen ble bilder fra CT og røntgenanalyse brukt for å identifisere særlig interessante områder som ble spesielt godt merket i uttaket. Makroskopiske funn ble beskrevet. Ved første innsendelsen ble ferske rygggrader delt i medianplanet, dvs. på langs i høyre og venstre halvdel, før formalinfiksering. Senere ble det brukt en bedre løsning: formalinfiksering av hele rygggrader og deretter dekalisering.

Funn av avvikende forandringer identifisert ved røntgen, CT og obduksjon ble brukt som kriterier for videre undersøkelser. Utvalgte hele rygggrader ble da dekalisert i syre (4 innsendelser) eller EDTA (1 innsendelse), delt og makrofotografert. Deretter ble hele disse støpt i paraffin ved at de ble delt i mindre enheter, og det ble lagd histologiske snitt i median-, horisontal- eller transversalplan. De to første planene omfattet snitt gjennom to og to virvler, og det tredje planet en virvel. Alle snittene ble farget med haemalum-eosin ('hemotoksylin'-eosin), som er rutinefarge-metode i histologi. Fra selekterte blokker ble snitt også farget med PAS, Giemsa, Gram, Ziehl-Nelsen, Grocott og toluidin-blått, spesielt for å se etter eventuelle mikroorganismer.

Et mindre antall ferske rygggrader ble ikke fiksert, men behandlet med trypsin for fjerning av bløtvev fra virvlene. Disse ble deretter undersøkt i lupe og makrofotografert, ev. etter farging med alizarin-rødt.

Utvalgte virvler ble under lupe dissekert ut fra formalinfikserte ryggrader fra fisk fra fire av innsendelsene og prosessert for transmisjons-elektronmikroskopi ved elektronmikroskopi-laboratoriet på NMBU på Ås.

4.2.5.2 Laboratorieanalyser gjennomført ved Pharmaq Analytiq og Nofima

Histologiske og immunohistokjemiske (IHC) undersøkelser:

Grunnlaget for utvalg av individer for histologisk undersøkelse ble gjort ved hjelp av røntgenanalyse av ryggvirvler. For AP1 ble et utvalg på 30 fisk med synlige tegn på korsstingspatologi ut fra røntgenanalyse valgt ut til histologisk undersøkelse. Videre ble ryggvirvler fra tilsvarende område fra 28 fisk klassifisert som uten avvik fra røntgenanalyse inkludert som negativ kontroll. Samtlige fisk ble selektert fra slakteri. For fiskene med korsstingspatologi ble et område på 2-4 virvler med påvist patologi fridissekert, og mest mulig skjelettmuskulatur og omliggende bindevev ble dissekert vekk. Tilsvarende område av ryggrad ble fridissekert fra fisk uten korsstingspatologi. For AP3 ble det foretatt flere prøvetak som inkluderte fisk rett etter vaksinerings, til 70 uker etter vaksinerings fordelt på totalt 11 uttak (se Tabell 3). Prøvene ble overføring til 4 % fosfat-bufret formaldehydløsning. Hvirvlene ble dekalsinert i 2-3 dager i 10 % EDTA pH 7 ved romtemperatur før videre prosessering ved hjelp av standard histologiske metoder (Wolfe, 2019). Etter innstøping i parafinblokker ble hvirvlene snittet i så nær medialplan som mulig. Som fargemetoder ble hematoksylin og eosin- (HE; AP1 og AP3), Movat's- (AP1), Picro Sirius- (AP1), Van Gieson- (AP3), PTAH (AP3) og Masson's trichrome- (AP3) farging benyttet. I tillegg ble immunohistokjemi med antistoffer mot myeloperoksidase (mpx, et heme-holdig enzym som typisk finner i immuncelletypene nøytrofile granulocytter, makrofager og monocytter; AP1), collagen 1a1 (ProCol1, en komponent av ekstracellulær matriks, AP1 og AP3), caspase 3 (en cystein-protease som aktiveres i tidlig fase av programmert celledød/ apoptose; AP1), heat-shock proein 70 (hsp70, protein involvert i protein-folding, chaperon-aktivitet og beskyttelse av celle mot fysiologisk stress). Detaljer rundt prosessering, fargestoffer og antistoffer kan finnes i publikasjonen til (Holm et al., 2020).

Computer tomography (CT)-undersøkelser:

På samme måte som for histologiske undersøkelser ble et utvalg av ryggvirvler med korsstingspatologi vurdert ut fra røntgenanalyser undersøkt ved hjelp av CT i AP1, og totalt ble ryggrader fra seks fisk (5-8 virvler med bekreftet korsstingspatologi fra hver fisk) undersøkt. Videre ble ryggvirvler fra tilsvarende område fra fire fisk klassifisert som uten avvik fra røntgenanalyse inkludert som negativ kontroll. Analysene ble gjennomført på formalinfiksert materiale skylt i fosfatbuffer, og undersøkt ved ex vivo CT skann med en kombinert PET-CT skanner (Nanoscan PC, Mediso, Hungary), med innstillingene 70 kVp. 300 ms eksponeringstid og 720 projeksjoner. Bildene ble rekonstruert til voxel-størrelse 40 x 40 x 121 µm ved hjelp av RamLak-filter, og videre analysert ved hjelp av InterView Fusion software (Version 3.01.021.0000, Mediso, Hungary).

Skanning elektron mikroskopi (SEM)-undersøkelser:

På samme måte som for histologiske undersøkelser ble et utvalg av ryggvirvler med korsstingspatologi vurdert ut fra røntgenanalyser undersøkt ved hjelp av SEM, og totalt ble ryggrader fra åtte fisk fra AP1 og 6 fisk fra AP3 (5-8 virvler med bekreftet korsstingspatologi fra hver fisk) undersøkt. Videre ble

rygghvirvler fra tilsvarende område fra åtte fisk (AP1) og 6 fisk (AP3) klassifisert som uten avvik fra røntgenanalyse inkludert som negativ kontroll. Analysene ble gjennomført på formalinfiksert materiale. Bløtvev ble kjemisk fjernet i en 10 % KOH løsning ved 37 °C i 24 timer, etterfulgt av skylling i springvann. For AP1 ble hvirvlene dekalsinert i en 4,0M formolsyreløsning med 3,4 % w/V natriumformat i 24 timer etter fulgt av skylling med springvann. Samtlige prøver ble dehydrert til 100 % etanol og tørket ved hjelp av Critical Point Dryer (CPD 030, Bal-tec AG, Schalksmühle, Germany; karbondioksid ble benyttet som transisjonsmedium). Virvlene ble så montert på prøveholdere med karbontape og belagt med gull-palladium (Polaron Emitech SC7640 Sputter Coater, Quorum technologies, East Sussex, United Kingdom) før undersøkelse i SEM (EVO® 50 Series, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany for AP1, Zeiss EVO-50-EP, Carl Zeiss SMT Ltd, 511 Coldhams Lane, Cambridge CB1 3JS, UK for AP3).

Morfometriske undersøkelser:

I AP3 ble det gjort en rekke morfometriske målinger på røntgenbilder og histologiske bilder for å vurdere eventuell sammenfallende lengde i endeplate ved ulike typer manipuleringer og observerte avvik. Av viktige målinger ble lengden på endeplate to til tre dager før vaksinerings målt på røntgenbilder (N = 68), og lengden på endeplate fra sentrum til aksial deformitet ble målt på histologiske snitt (N = 6). Det lave antall målinger i sistnevnte gruppe har sin sammenheng med at det var relativt begrenset innslag av korsstingspatologi og derfor få individer med forandringer, sammen med krav om at snittflaten måtte ligge helt medialt i virvel med patologi for å bli inkludert.

Microarray

RNA ble isolert fra virvler fra N = 6 fisk per gruppe, for gruppene: V1 og V4, på to tidspunkt (S3 og S6) og for to temperaturer (8 °C og 12 °C). Totalt 56 arrays. Virvlene ble knust vha en morter og flytende nitrogen, pulveret overført til 1 ml TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), homogenisert og RNA isolert vha PureLink™ Pro 96 well purification kit (Thermo Fisher Scientific) og on-column-DNase digestion (Qiagen, Hilden, Germany). RNA konsentrasjon ble målt på NanoDrop 1000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) og RNA integritet med Agilent 2100 Bioanalyzer m/RNA Nano kits (Agilent Technologies, CA, USA). Transkriptomanalyser ble gjort med Nofima's microarray platform, med arrays fra Agilent Technologies. RNA amplifisering og marking ble gjort med One-Color Quick Amp Labelling Kit, og Gene Expression Hybridization kit. Dataanalyser ble utført vhs Nofima's bioinformatikk pakke STARS [14].

4.3 Gjennomføring av prosjektet

Prosjektet har i store trekk fulgt opprinnelig prosjektplan, men det har vært noen justeringer. De viktigste var:

Småskalaforsøk med testing av immunoaktive komponenter utgikk, og ble erstattet av et delforsøk (knyttet til hovedforsøk) med test av ulike temperaturer i perioden etter overføring til sjø. Denne endringen kom etter diskusjon i prosjektgruppen.

I langtidsforsøket ble fisk fra grupper med redusert innhold av fosfor utelatt fra laboratorieanalysene. Dette ble gjort fordi røntgenanalysene viste at effekten av redusert fosfor i forsøksfôr i ferskvann ikke var påvisbar. Disse forsøksgruppene ble tatt med videre i forsøket, og ble røntgenfotografert samtidig

med de øvrige for å sikre at vi ikke gikk glipp av informasjon, men så var ikke tilfelle. Prøver tatt av denne fisken ble ikke analysert, og disse forsøksgruppene er utelatt fra publisering.

Tidsplan: Prosjektet er forlenget med til sammen 12 måneder i forhold til opprinnelig prosjektplan. Hovedårsaken til dette er Covid-19. Pandemien skapte store problemer, spesielt for laboratorieaktivitetene.

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Analyse av produksjonsdata

Resultatene fra denne studien er skrevet sammen til et manuskript som skal sendes inn til publisering i november 2021:

Grøntvedt, R., Jansen, P., Bæverfjord, G. Risk factors for cross-stitch vertebral deformities in farmed Atlantic salmon. Manuskript.

Resultatene viser klar effekt av to faktorer:

- Utvikling av korsstingsvirvler påvirkes av vaksineprodukt. Fisken i denne studien var vaksinert med ett av to ulike produkt/produktkombinasjoner som begge inneholdt PD-komponent. Det ene produktet, en ett-stikks 7-komponentvaksine, ga betydelig økt risiko i forhold til alternativet, som i dette materialet var vaksinasjon med multivalent vaksine pluss PD-komponent i separat stikk.
- Høstsmolt har betydelig større risiko for utvikling av korsstingsvirvler enn vårsbolt.

Denne studien er spesielt nyttig fordi den bekrefter og tallfester to viktige feltobservasjoner som har vært mye omdiskutert, for det første at utvikling av korsstingsvirvler påvirkes av vaksine, og for det andre at høstsmolt er mer utsatt enn vårsbolt. Det var ikke mulig å hente ut sikre svar på effekt av andre produksjonsfaktorer fra materialet.

Det var stor variasjon i forekomst av korsstingsvirvler mellom ellers sammenliknbare grupper som var vaksinert med samme produkt.

5.2 Patologi, materiale fra slakterier

Dette delprosjektet bygde på prøvemateriale fra 7 slakterier. Materialet ble bearbeidet og rapportert separat fra NMBU Veterinærhøgskolen, og en gruppe med forskere fra Nofima, Pharmaq og Pharmaq Analytiq. Underveis er resultatene diskutert mellom gruppene.

Det var stor grad av samsvar mellom funnene til de to forskergruppene og resultatene kompletterer hverandre.

Nøkkelfunnet i begge studiene var funn av en sirkulær svakhet i endeplatene i virvler som viste typiske tegn på røntgen. Den ringformede svakheten, der det også ble funnet perforasjon av endeplatene, var symmetrisk om den horisontale aksen og hadde en tilnærmet lik avstand fra virvelsentrum fra virvel til virvel og fisk til fisk.

Funnene er beskrevet i detalj i to publikasjoner:

Holm H, Ytteborg E, Høst V, Reed AK, Dalum AS, Bæverfjord G. (2020) A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2020, 526, 735382.

Trangerud C, Bjørgen H, Koppang EO, Grøntvedt RN, Skogmo HK, Ottesen N, et al. (2020) Vertebral column deformity with curved cross-stitch vertebrae in Norwegian seawater-farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis. 2020;43(3):379-89.

5.2.1 Videre arbeid ved NMBU med materiale fra slakterier:

Analyser utført ved laboratoriet hos NMBU Veterinærhøgskolen er beskrevet i detalj i Trangerud et al. (2020). Videre arbeid har vært konsentrert om forståelse av patogenesen, spesielt utvikling fra den svakheten i endeplatene som dannes tidlig til de omfattende forandringene som påvises i seinere stadier. To sidefunn er viet spesiell oppmerksomhet:

5.2.1.1 Gassdannelse i ryggvirvlene (rapportert i Trangerud et al. 2020).

Ved CT-undersøkelse av fisk som var innhentet fra slakterier ble det påvist gassdannelse i ryggradens notochord (tilsvarer mellomvirvelskivene hos mennesker) hos fisk med korsstingspatologi, men ikke hos fisk uten slike forandringer. En mulig årsak til gassdannelse kan være bakterier. Man kan heller ikke utelukke infeksjon med andre typer organismer. Derfor ble det utført flere spesialfarginger i tillegg til HE, men uten man sikkert har kunne identifisere mikroorganismer. *In situ* hybridisering (ISH) ble utført på utvalgte snitt fra en av innsendelsene, hvorfra ryggradene ble korttidsfiksert med formalin og dekalsinert vha. EDTA. Det ble brukt probe for påvisning av bakterielt 16 S RNA. Denne proben skal kunne identifisere alle bakterier. En stor utfordring her var at behandlingen i forbindelse med fiksering og dekalsinering kan medføre at signaler kan gå tapt. Vi la mye arbeid ned i dekalsineringsmetoder og påfølgende *in situ* hybridisering, men resultatene var inkonklusive, og dekalsinering medførte nok større problemer enn dem vi i utgangspunktet så for oss. Vi var i utgangspunktet interesserte i å kunne påvise bakterier som kunne ha forklart funnene av gass. Det har vi ikke gjort, men vi kan heller ikke utelukke at slike bakterier har vært til stede. Dette burde være et tema for oppfølgingsstudier.

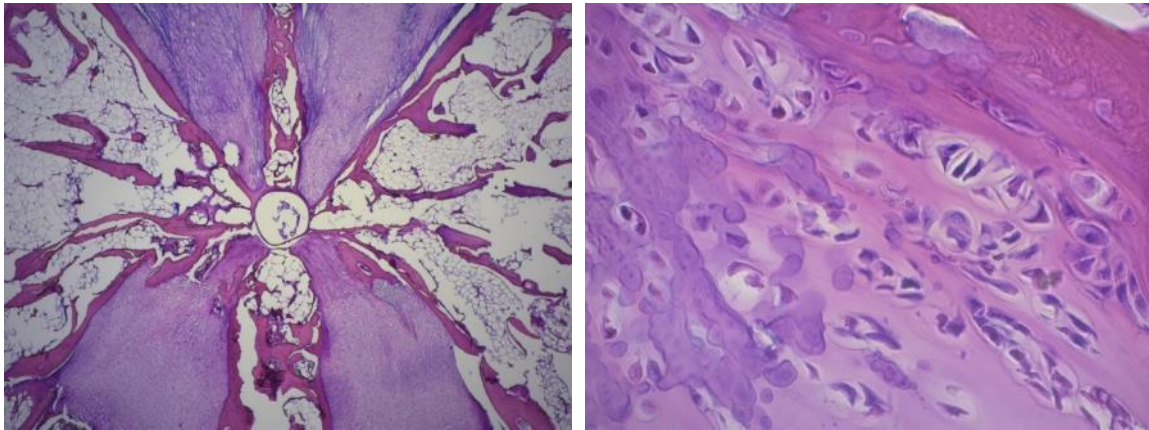
5.2.1.2 Funn av uidentifiserte strukturer i bruskev

Arbeidet har tatt utgangspunkt i virvlens indre anatomi (Figur 1). Tidlig i fiskens liv dannes det, der hvor virvlene senere kommer, fire brusker (arcualia). Disse er litt avlange. To øvre brusker (basi-dorsalia) peker opp- og til sidene, og to nedre (basi-ventralia) peker nedover og til sidene. I tverrsnitt fremstår disse fire som en X uten selve kryssingspunktet. Virvelen sitt benvev dannes så omkring disse bruskene, med det svampaktive benvevet nærmest bruskene og endeplatene (hvor den ringformede defekten oppstår) litt ifra.

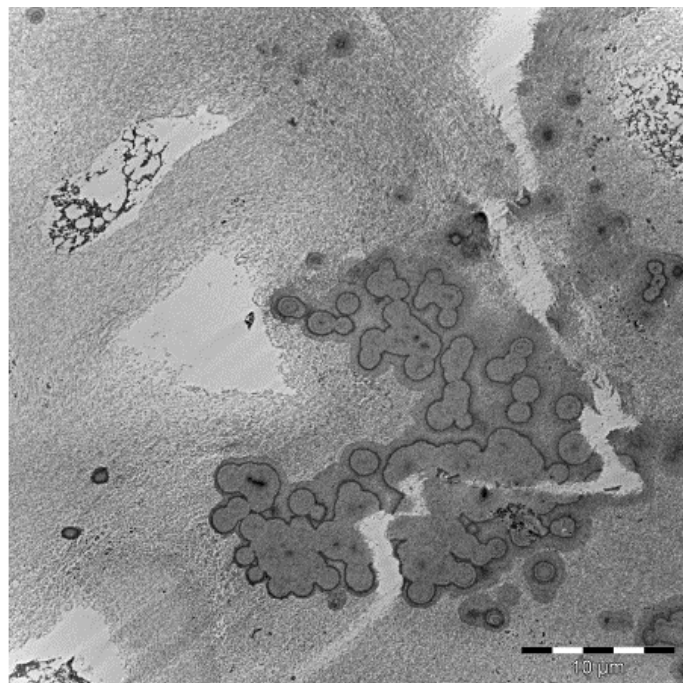
Ved histologisk undersøkelse av ryggvirvelprøver innhentet fra slakterier ble det i de nedre bruskenes øvre del (nærmest sentralaksen) funnet strukturer som vi har prøvd å karakterisere videre (Figur1 og 2). Strukturene er farget med ulike metoder og undersøkt med elektronmikroskopi. Det har ikke så langt vært mulig å konkludere hva disse strukturene representerer. I dette arbeidet ble det inkludert materiale fra de fem innsendelsene i prosjektet, samt referansemateriale av villaks fra Drammenselva og materiale fra 1990- og 2000-tallet fra Veterinærinstituttet. At de hos laksen fra de fem anleggene fra 2018 – 2019 forekommer nesten utelukkende i de nedre bruskene (basi-ventralia), mens perforasjonene (defektene i endeplatene) er sirkulære, dvs. også er i nærheten av basi-dorsalia, tilsier at det ikke uten videre er sammenheng mellom disse ukjente strukturene og perforasjonene.

Funn av tilsvarende strukturer ble gjort også på det historiske materialet som ble inkludert, dvs. villaks og arkivert materiale fra Veterinærinstituttet.

Ut fra foretatte undersøkelser kan vi så langt ikke konkludere om disse strukturene representerer mikroorganismer eller degenerative forandringer, og det er uklart om de har noen betydning for utvikling av korsstingspatologi. Funnene er likevel svært interessante, og bør følges opp med videre studier.



Figur 1 Første bilde: Tverrsnitt gjennom virvel. HE-farging. To øvre og to nedre brusker (arcualia). Andre bilde: Detalj. Sterkere blåfargede strukturer i brusken av ukjent natur



Figur 2 Elektronmikroskopi (TEM) av strukturer i brusken (de blå strukturene i Figur 5). Målestokken er 10 mikrometer. Fotografert av Lene Cecilie Hermansen, EM-labben, NMBU

5.3 Langtidsforsøk – effekt av vaksiner

Resultatene fra dette forsøket er under publisering. Publikasjonen nærmer seg ferdigstilling, og det er forventet at den sendes inn i løpet av oktober 2021.

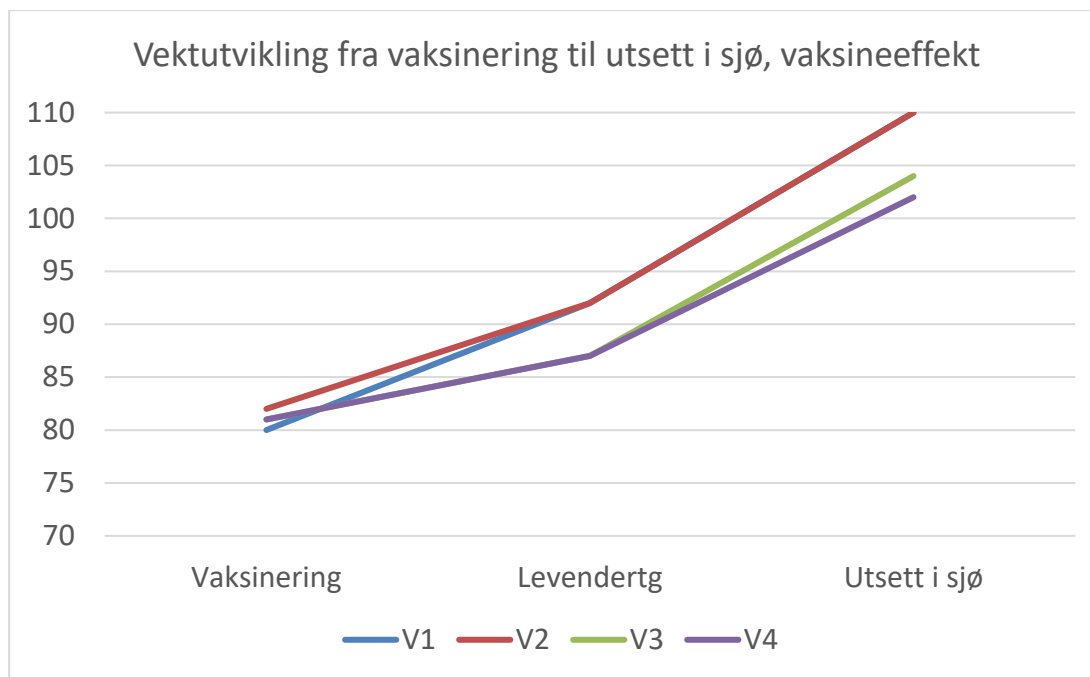
5.3.1 Vekst og overlevelse

Sett under ett utviklet fiskegrupper seg som forventet for ei gruppe uten sjukdomsproblemer og uten andre spesielle utfordringer.

Det var små forskjeller i tilvekst gjennom forsøket. Ved avslutning skilte det 200 g i snittvekt mellom de fire vaksinebehandlingene, der V3 hadde lavest snittvekt (3760 g) og V2 høyest (3980 g). Det var 100g i forskjell i sluttvekt mellom fisk med og uten tilsetning av betaglukan i ferskvannsfôret, i favør av fôr med betaglukan (3770 g versus 3840 g). Det skilte også knapt 100 g på slutt mellom fisk som fikk standardfôr i sjø (3850 g) sammenliknet med fisk som fikk helsefôr i sjø (3760 g). Ingen av disse forskjellene var signifikante.

De interessante forskjellene i tilvekst i forsøket kom i perioden rundt vaksinerings og smoltifisering, og i karforsøket med ulike temperaturer etter utsett.

- I perioden mellom vaksinerings og levenderøntgen (3 uker) var tilveksten (SGR, % daglig tilvekst) tilnærmet halvert hos fisk i vaksinegruppe V3 og V4 (oljebaserte PD-vaksiner) sammenliknet med V1 (uvaksinert) og V2 (oljebasert vaksine uten PD-komponent) (Figur 3).
- Etter levenderøntgen ble gruppa delt i to, der hoveddelen ble sortert og satt på vent før utsett i merd, og denne fisken ble ikke veid igjen før 5 måneder seinere. På det tidspunktet (uttak 7) var forskjellene i vekt utjevnet.
- Restfisk ble overført til sjøvann i kar, og ble satt på enten 6 °C eller 12 °C. Ved avslutning av dette delforsøket 3 måneder seinere så vi følgende:
 - Fisk som gikk på 12 °C var tilnærmet dobbelt så stor som fisk på 6 °C (som forventet)
 - På 6 °C var det ingen forskjell i sluttvekt mellom de fire vaksinegruppene
 - På 12 °C var det en tydelig forskjell i sluttvekt mellom V1 - V2 og V3 – V4 (Tabell 3). Noe av forskjellen i sluttvekt kan forklares med at denne fisken var mindre ved overføring til sjø, men det var også lavere SGR og TGC for disse gruppene i perioden. Ved statistisk analyse var det signifikant samspill mellom vaksine og temperatur i sjø, dvs. at fisken reagerte forskjellig på vaksine avhengig av temperatur i denne perioden.



Figur 3 Vektutvikling i de fire vaksinegruppene fra vaksinerings og fram til utsett i sjø. V1: Uvaksinert fisk. V2: Fisk vaksinert med 6-komponentvaksine uten PD-komponent. V3 og V4: De to 7-komponentvaksinene som var kommersielt tilgjengelig i 2018

Tabell 4 Sluttvekt (g) ved avslutning av karforsøk i sjø, 90 dager etter overføring til sjøvann på hhv. 6°C og 12 °C. Vaksinegruppe V1-V4: Se forklaring under Figur 3.

	6 °C	12 °C
V1	295	589
V2	298	580
V3	294	543
V4	292	527

Dødelighet, ferskvann og karforsøk i sjø

Det var gjennomgående lav dødelighet i ferskvannsperioden og i karforsøket i sjøvann. Det døde noen enkeltfisk, uten at dette kunne knyttes til forsøksbehandling eller spesielle hendelser i forsøket.

Dødelighet, merdforsøk

Den kumulative dødeligheten av fisk som ble satt i merd var 9 % av utsatt fisk, og det var ingen forskjeller som kunne knyttes til forsøksfaktorene (vaksine, fôr i ferskvann, fôrtype i sjø). Det meste av denne dødeligheten skjedde tidlig i merdperioden, etter utsett og i løpet av den første vinteren som følge av problemer med predatorer (oter). Etter at disse problemene var løst, var det lav dødelighet gjennom resten av sjøperioden. Det var ingen sjukeproblemer i forsøket. Fisken ble behandlet med Slice i april, 5 måneder etter utsett, og gjennomgikk småskala mekanisk avlusning 3 ganger i august, oktober og desember, hhv. 9, 11 og 13 måneder etter utsett i merd.

5.3.2 Røntgenfunn

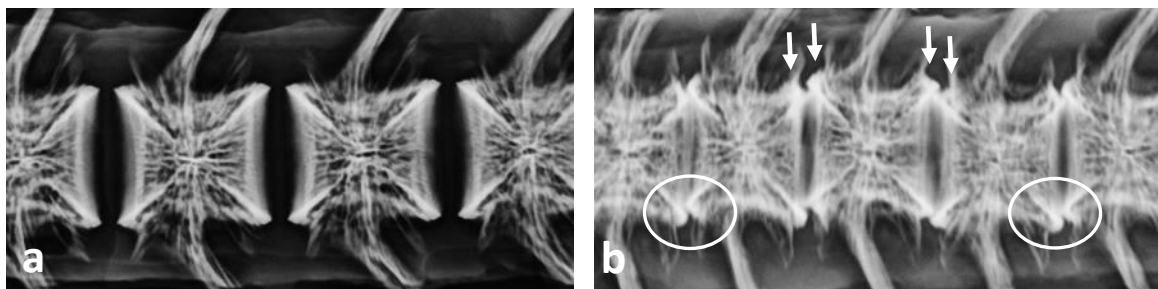
Ved røntgenundersøkelse av fisk gjennom ferskvannsperioden, karforsøket i sjøvann og merdforsøk ble det funnet gjennomgående normal vekst og utvikling av beinstrukturene. Det var ingen tidlige tegn til noe avvik som kunne knyttes til vaksinebehandling, forsøksfôr eller temperatur i karforsøket. Det var likevel et moderat, men tydelig innslag av misdannelser i ryggvirvlene gjennom hele forsøket.

I ferskvann var det to typer misdannelser, fusjoner (sammenvoksninger) og det som er kalt høytetthetsvirvler (HD-virvler). Etter overgang til sjø dominerte fusjonene. De første tegnene til korsstingspatologi ble observert i uttak 8 (1,3 kg), men de typiske forandringene ble ikke sett før ved avslutning (3,8 kg). Det ble ikke funnet platyspondyli/komprimerte virvler i dette forsøket.

5.3.2.1 Utvikling av korsstingspatologi, røntgen

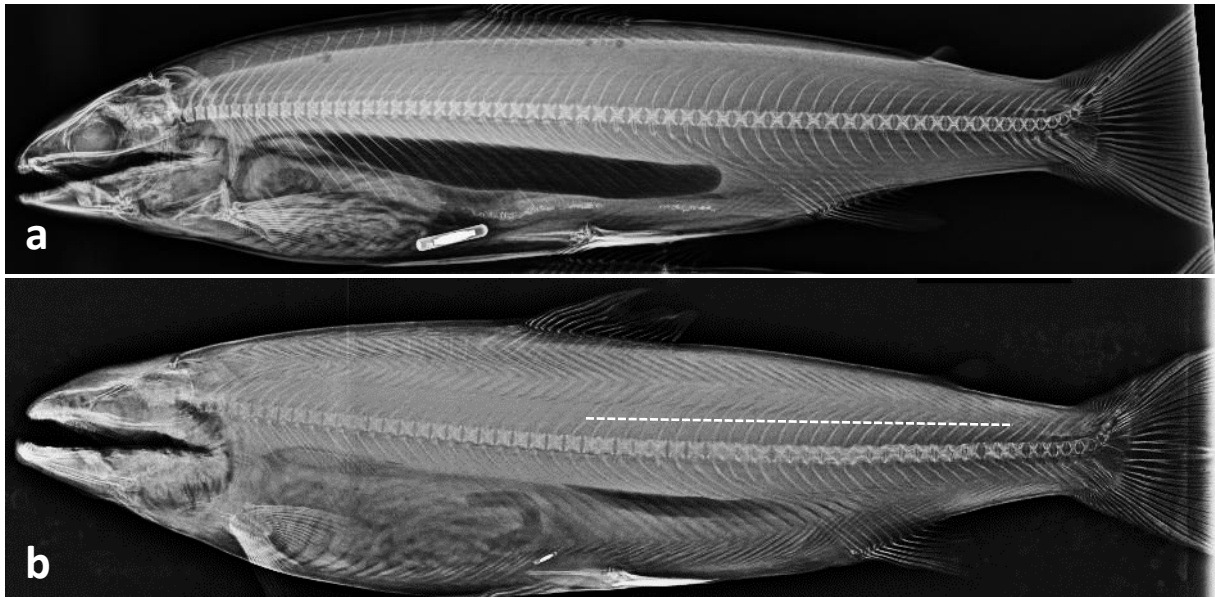
Første tegn til korsstingspatologi ble funnet på røntgen ved uttak 8 (snittvekt 1,2 kg). Da var det en fisk (av 112) som hadde en liten lesjon som var typisk for de aller tidligste forandringene ved korsstingspatologi. Ved påfølgende uttak (uttak 9, snittvekt 2,8 kg) var det tilsvarende små lesjoner hos to fisk (av 112).

Ved avslutning av forsøket (uttak 10, 3,8 kg) ble det funnet korsstingspatologi i 29 fisk (2,4 % av fisken), og alle tilhørte vaksinegruppe V3 eller V4, dvs. oljebaserte vaksiner med PD-komponent. Hver lesjon ble scoret etter en skala fra 0 til 4. De fleste lesjonene var milde (score 1 og 2) og det var ingen fisk med score 4. Knappt noen av fiskene med påvist korsstingspatologi på røntgen viste utvendige tegn til deformitet som samsvarte med det typiske bildet, men røntgenforandringene var entydige (Figur 4).



Figur 4 Detaljbilde av virvler, prøver tatt ved avslutning av forsøket og seinere brukt til histologi. a) normale virvler, b) virvler med typisk korsstingspatologi (samme målestokk). Virvlene i b står tett sammen uten synlig intervertebrallrom, og er delvis forskjøvet vertikalt i forhold til hverandre (piler). I ytterkanten av endeplatene har virvlene formet seg etter hverandre («leppedannelse»)

Ved sammenlikning med røntgenbilder av de samme individene tatt i ferskvann var det ikke mulig å påvise tidlige tegn til korsstingspatologi (Figur 5). Alle individene var normale på levenderøntgen før utsett. Dette samsvarer med tidligere observasjoner og erfaringer fra felt.



Figur 5 Fisk med omfattende korsstingspatologi ved avslutning. a) bilde tatt ved levenderøntgen før utsett i sjø, normal ryggrad

Vår vurdering av disse resultatene er at vi har fått en utvikling som tilsvarer slaktegrupper som er vaksinert med risikovaksiner, men der det ikke registreres korsstingsdeformiteter på slakt. Dette er et svært relevant materiale (jmfør resultatene fra feltundersøkelsen, avsnitt 5.1) selv om resultatene hadde vært lettere å tolke hvis vi hadde hatt et tydeligere innslag av korsstingspatologi.

Gjennom forsøket ble det tatt prøver systematiske av alle grupper med tanke på å undersøke eventuelle tidlige tegn til korsstingspatologi. Ved avslutning ble det i tillegg tatt prøver av ryggvirvler basert på røntgenfunn, og dette materialet er brukt i videre undersøkelser, se under.

5.3.2.2 Effekter av nedsatt mineralisering ved start av forsøket

Ved røntgenundersøkelse av startuttaket ble det funnet et lavt, men tydelig innslag av høytetthetsvirvler (Figure 6). Disse virvlene er indikatorer på nedsatt mineralisering, vanligvis som følge av mangel på fosfor i fôret (Helland et al. 2005). Fram til forsøksstart ved 46 g størrelse fikk fiskegruppa kommersielt fôr, og forekomsten av høytetthetsvirvler ved oppstart må knyttes til dette fôret. I vår fiskegruppe var det høytetthetsvirvler hos 3 % av fisken i startuttaket. I forsøk med styrt mangel av P mye høyere, dette var en moderat mangeltilstand.

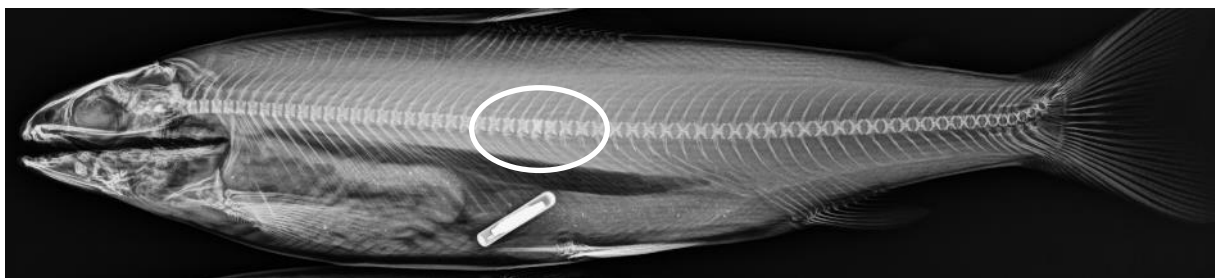


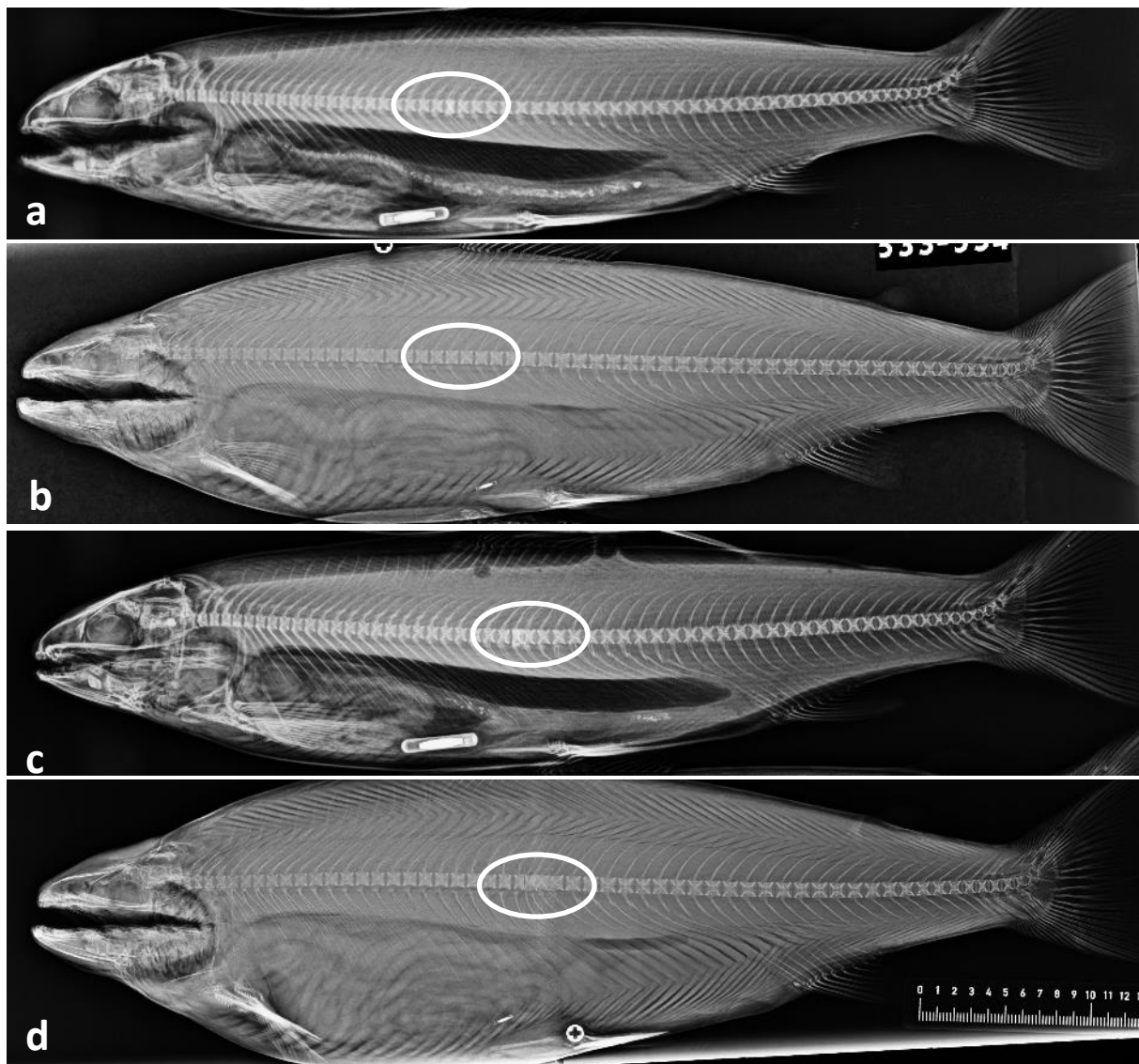
Figure 6 Startuttak, fisk med høytetthetsvirvel. Denne fisken har en enkeltstående virvel med høyere røntgentetthet en de øvrige, lokalisert under ryggfinnen

Høytetthetsvirvler er enkeltvirvler eller grupper på to-tre virvler som framstår som unormalt hvite/røntgentette på røntgen. På histologi er det vist at det er endringer i det trabekulære nettverket av bein i disse virvlene, og at fettvev i hulrommet i virvlene er erstattet av brusk. Tidligere observasjoner har vist at forekomsten av HD-virvler avtar gjennom smoltifisering og utsett i sjø, og HD-virvler observeres bare unntaksvis etter overgang til sjø. Det er altså tydelig at disse forandringene er reversible, og HD-virvler i ferskvann brukes først og fremst som en indikator på økt risiko for langtidseffekter av nedsatt mineralisering på fiskegruppenivå (platyspondyli/komprimerte virvler som utvikles hos stor fisk fram mot slakting), og de har ikke vært tillagt vekt på individnivå. Tidligere observasjoner har likevel indikert at kanskje ikke alle HD-virvler tilbakedannes til normale virvler, men at noen av dem vil danne kjernen i fusjoner som utvikles i sjø. I dette forsøket tok vi røntgenbilde av et stort antall individer to ganger, før utsett i sjø og seinere enten ved mellomuttak eller avslutning i sjø, og materialet var derfor godt egnet til å undersøke videreutvikling av HD-virvler.

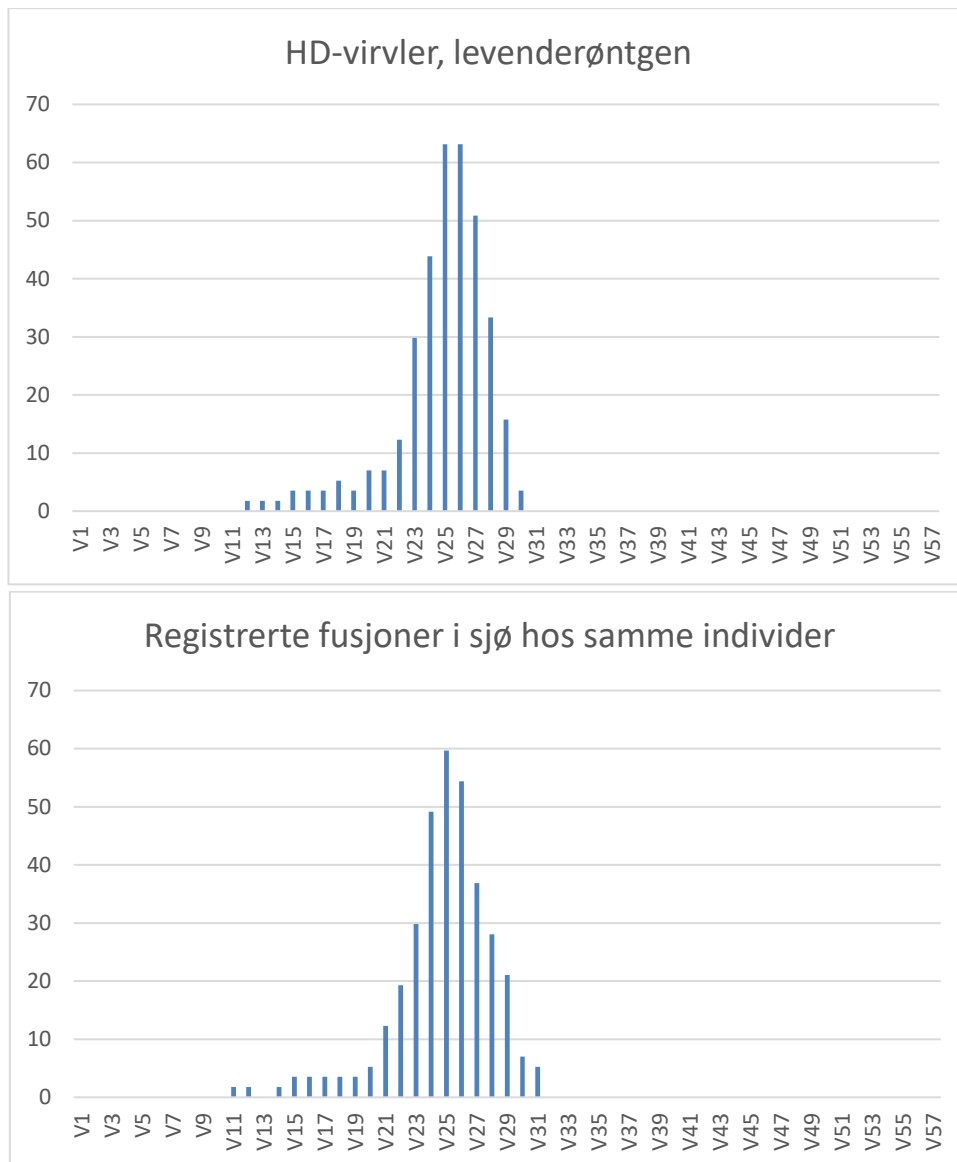
I dette materialet var det 57 individer som hadde HD-virvler ved levenderøntgen på dag 62-63 (3 uker etter vaksinerings og to uker før utsett i sjø), og som også ble røntgenfotografert seinere i løpet av sjøperioden (Figure 7). HD-virvlene var konsentrert i området under ryggfinnen. Av disse 57 var det ingen seinere spor av HD-virvler hos 19 fisk (33 %) (Figure 7 a-b), men hos 38 fisk (67 %) var det dannet fusjoner på samme sted ved seinere røntgen (Figure 7 c-d). Gjennomsnittlig antall unormale virvler hos HD-fisken ved levenderøntgen i ferskvann var 3,6. Ved registreringene i sjø var gjennomsnittlig størrelse på fusjonene 5,3 unormale virvler. Det var ingen variasjon i forekomst av HD-virvler eller seinere utvikling til fusjoner som kunne knyttes til forsøksfaktorene (vaksine, fôr).

Undersøkelsen viste en klar tråd fra de første registreringene av høytetthetsvirvler ved oppstart av forsøket, gjennom ferskvannsperioden og til utvikling av fusjoner ved avslutning. Lokalisering av disse lesjonene styrker antagelsen om at dette er samme lesjoner i ny form. I Figur 8 er lokalisering av høytetthetsvirvler hos de 57 individene med slike virvler før utsett i sjø plottet, og sammenliknet med lokalisering av fusjoner hos samme individer.

I vårt materiale utgjorde de 37 fiskene med fusjoner som kunne spores tilbake til høytetthetsvirvler 3 % av fiskegruppa. Noen av disse lesjonene var små, men 30 av de 37 hadde sammenvoksning av 4 virvler eller mer, dvs. de var store nok til å gi utslag i ytre deformitet eller til å gi problemer ved filetering.



Figur 7 Utvikling av ryggvirvler hos fisk med påviste høytetthetsvirvler i ferskvann. a-b) samme individ før utsett i ferskvann og ved avslutning. En tydelig høytetthetsvirvel i ferskvann er ikke sporbar ved avslutning av forsøket. c-d) Tilsvarende, der høytetthetsvirvel i ferskvann er utviklet videre til en fusjon i sjø

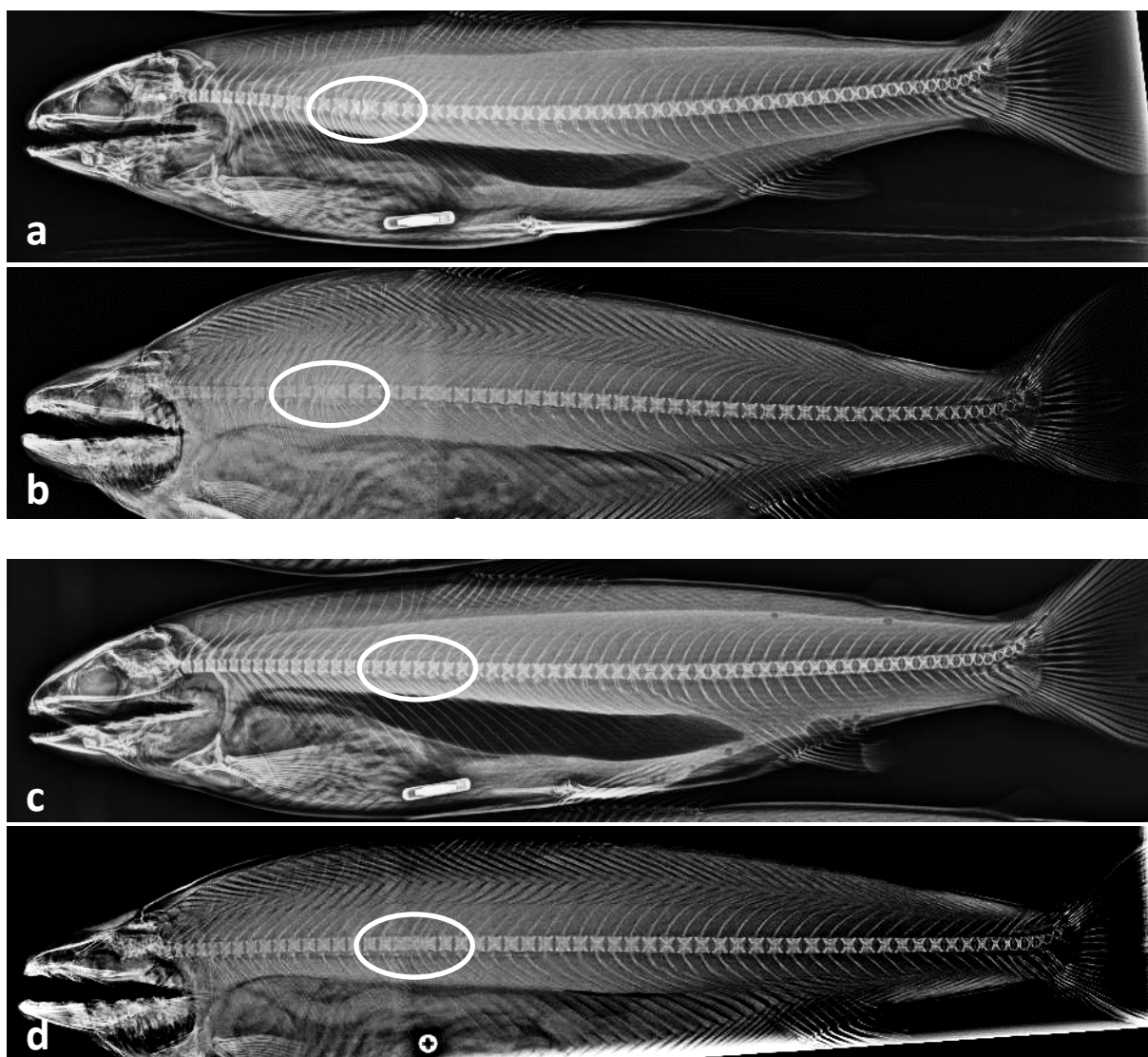


Figur 8 Utvikling fra HD-virvler i ferskvann til fusjoner i sjø. 57 individer ble registrert med HD-virvler under levenderøntgen før utsett i sjø, og seinere røntgenfotografert under uttak i sjøvann (uttak 7-10). Øverst er vist fordeling av HD-virvler hos disse 57 individene langs ryggraden (V1 er fremste nakkevirvel, V57 er bakerste vanlige virvel i halerota). Under er registrerte virvlefeil hos de samme 57 individene ved seinere registreringer i sjø, men nå klassifisert (blindt) som fusjoner. 19 av de 57 hadde ikke påvisbare virvlefeil i sjø, dvs. at HD-virvlene var tilbakedannet uten spor

Fusjoner

Ved oppstart ble det registrert fusjoner hos 3 % av fisken, og dette innslaget holdt seg tilnærmet uforandret gjennom ferskvannsperioden. Gjennom merdforsøket var det en gradvis økning av andel fisk med fusjoner, fram til 7 % i sluttuttaket. Som diskutert i avsnittet over kunne 3 % av fusjonene ved avslutning spores tilbake til HD-virvler i ferskvann, og således knyttet til nedsatt mineralisering tidlig i ferskvann. De resterende fusjonene som ble påvist ved avslutning (4 % av fisken) (Figur 9) fordelte seg i to grupper: Hos omtrent halvparten var det tegn til avvik allerede ved levenderøntgen i ferskvann (Figur 9 a-b), og hos den andre halvparten var det ingen sikre tegn ved levenderøntgen (Figur 9 c-d).

Mange av fusjonene var små, men anslagsvis 1-2 % av fisken hadde fusjoner av en størrelse som kunne gi synlig deformitet eller kvalitetsproblemer på slakt (4 eller flere virvler sammenvokst).



Figur 9 Fisk med fusjoner ved avslutning av forsøket, der det ikke var sammenheng med høytetthetsvirvler i ferskvann, samme fisk. a-b) Fisk med tydelig fusjon i ferskvann i a), med en større og mer organisert fusjon ved avslutning. c-d) Fisk uten tegn til feil i virvler før utsett i sjø, med en tydelig utviklet fusjon ved avslutning

Samlet vurdering av beinstatus i fiskegruppa

Denne fiskegruppa representerer et bilde som er vanlig for fisk som produseres kommersielt. Det var ingen store deformitetsproblemer i gruppa, men et moderat og tydelig innslag av fisk med feil i ryggraden.

Korsstingsvirvlene i dette materialet var av et såpass moderat omfang at de sannsynligvis ikke ville ha blitt registrert som problem, men ved bruk av røntgen kunne vi se at de likevel var til stede, og seinere histologiske analyser bekreftet at den typiske patologien lå til grunn for de forandringene vi så på røntgen. Vi bedømte fiskegruppa sett under ett som relevant for problemstillingene knyttet til korsstingsvirvler, selv om problemene var moderate.

Gruppa hadde et lavt, men tydelig tilstedeværende innslag av fusjoner med seg inn i forsøket. Disse fusjonene utviklet seg videre, og det ble også dannet nye i sjø. Fusjoner er den vanligste feilen i ryggrad hos oppdrettslaks, og i denne sammenhengen bedømmes disse som «bakgrunnsstøy» og er ikke viet spesiell oppmerksomhet som sådan.

Utviklingen fra et lavt innslag av høytetthetsvirvler til relativt store og tydelige fusjoner er et nytt funn. I vårt materiale ville disse individene ha representert flertallet av synlige deformiteter, vurdert etter omfang av lesjoner. Vi fikk også bekreftet at høytetthetsvirvler kan tilbakedannes. I vårt materiale var det omtrent en tredel av fisk med høytetthetsvirvler før utsett som hadde normal ryggrad ved slakt. Dette er ny kunnskap, som bidrar til en forsterket anbefaling om at laksen må få tilstrekkelig fosfor i føret i tidlige livsstadier. Det er tidligere kjent at en periode med underdekning med fosfor hos liten fisk gir risiko for utvikling av platyspondyli/komprimerte virvler hos stor fisk (Fjellidal m.fl.2012). Høytetthetsvirvlene har ikke vært vurdert som et problem i seg selv, bare som en indikator på framtidig risiko for platyspondyli. I dette tilfellet ble det ikke utviklet platyspondyli, men vi fikk en direkte utvikling av fusjoner med utgangspunkt i høytetthetsvirvlene. Selv en moderat mangel på fosfor i tidlige livsstadier har tilsynelatende potensiale til å gi deformitetsproblemer på slaktefisk.

5.3.3 Histologi og morfologiske metoder

Korsstingsvirvler ble identifisert som en ny type patologi, og histopatologiske funn er beskrevet i detalj i Holm et al., 2020. Kort oppsummert involverer klassisk korstingspatologi følgende histopatologiske funn:

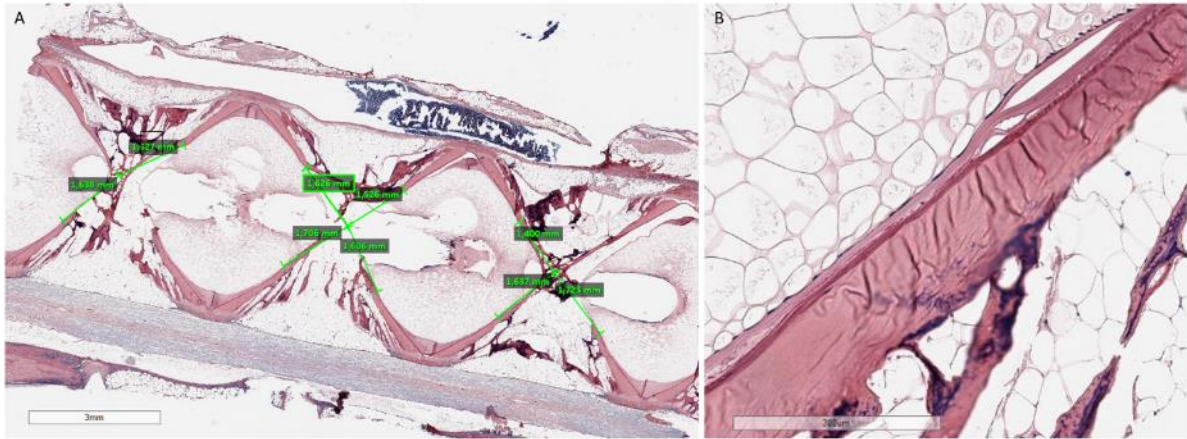
- Aksial, ringformede defekter i virvlens endeplater, symmetrisk om virvlens midtpunkt
- Erstatning av fettvev med fibrøst vev og immunlignende celler i trabekulært beinvev i virvelen
- Abaksial lesjon i distale endeplate, samsvarende med vekstsonen til endeplaten
- Dislokasjon av rygghvirvler, med redusert eller tap av intervertebralt rom og med sekundære forandringer som metaplasi av bruskvev og, i uttalte tilfeller, cranio-caudal kompresjon av virvler

Nedenfor er en kort beskrivelse av hovedfunnene i forsøket som ble kjørt på Sunndalsøra.

Histologiske undersøkelser av virvler fra de ulike vaksine-, temperatur- og fôrgruppene ble undersøkt på flere stadier etter vaksinerings. Det viktigste funnet tolkes som fibrinavleiringer i vaksinegruppene i en avstand som tilsvarte tidspunktet for vaksinerings (Figur 10). Fordelt på ulike uttak:

- Ved uttak 2 (to uker etter vaksinerings) ble det observert få avvik på snitt farget med HE. Fra disse virvlene ble det likevel ved hjelp av PTAH-farginger vist forøkt forekomst av fibrin i osteoblaster og nylig produsert beinmatriks i ryggvirvelens vekstsoner hos vaksinert fisk (V2-V4) sammenlignet med kontrollgruppe med uvaksinert fisk (V1). Immunohistokjemisk farging med hsp70 viste mer intens farging av osteoblastene i vekstsonen i ryggvirvler fra V2-V4, noe som indikerer økt stress i vekstsonen hos disse fiskene. Hos enkelte fisk fra vaksinegruppe V4 ble det også observert avvik på HE-snitt i form av avvikende symmetri i kompakt beinvev i endeplatene. Fibrinfarginger viste forøkt fibrin-avleiringer i disse områdene, samt avvikende bruskdannelse.
- Ved uttak 3 (fem uker etter vaksinerings, overføring til sjø) framsto den cellulære organiseringen av osteoblaster i vekstsonen av endeplatene som mer uorganiserte hos vaksinert fisk (V2-V4) sammenlignet med uvaksinert fisk (V1) vurdert ut fra HE-snitt. Dette involverte blant annet vakuolisering av cytoplasma, mer uorganisert kjernemorfologi og kavernedannelser mellom osteoblastene. Fra immunohistokjemisk farging med hsp70 ble det påvist mer intens farging av osteoblaster i vekstsonen hos fisk fra gruppe V4 sammenlignet med V1. Immunofluorescens viste lavere intensitet for pro-kollagen i vekstsonen i virvler fra V4 sammenlignet med V1.
- Ved uttak 6 (20 uker etter vaksinerings, fem uker etter overføring til sjø) var det få avvik vurdert ut fra HE-fargede snitt. Fibrinfarginger i prøver fra V2-V4 viste et fibrinmerke i endeplaten. Avstanden fra sentrum av virvel til dette fibrinmerket samsvarte med avstand fra sentrum til vekstsoner i endeplate ved vaksinerings (vurdert ut fra røntgen-bilder), samt avstanden fra sentrum av virvel til aksial deformitet hos fisk med korsstingspatologi fra uttak 10 (vurdert ut fra histologiske snitt). Det ble ikke gjort funn av tilsvarende fibrinmerke hos uvaksinert fisk (V1)
- Ved uttak 10 (70 uker etter vaksinerings, 65 uker etter overføring til sjø) ble det påvist klassisk korsstingspatologi med tilsvarende histopatologiske forandringer som beskrevet av Holm et. al. 2020, hos enkelte fisk fra gruppe V3 og V4 (Figur 11)

Vi fant sterkere farging av fibrin i prøver med fôr tilsatt glukaner og fra fisk som hadde gått på høy temperatur, men antall prøver som ble analysert og det statistiske grunnlaget på slutten av forsøket, var for svakt til å konkludere på om disse faktorene faktisk forverrer effekten av vaksinene. Nye forsøk er nødvendig for å evaluere effekten av risikofaktorer forbundet med vaksinerings og utvikling av alvorlighetsgraden av korsstingspatologi.



Figur 10 A) Fibrinfarging viste fibrin i en avstand på rundt 1,6 mm fra sentrum av virvelen. B) Fibrinfargingen satte et lite spor som vist i det kompakte benvevet

SEM-analyser viste ringformede defekter i det kompakte benvevet i virvlens endeplater, symmetrisk om virvlens midtpunkt rundt notochorden, som er beskrevet i Holm et al., 2020. Tilsvarende sirkulær distribusjon av den aksiale deformiteten ble bekreftet av CT-undersøkelser.

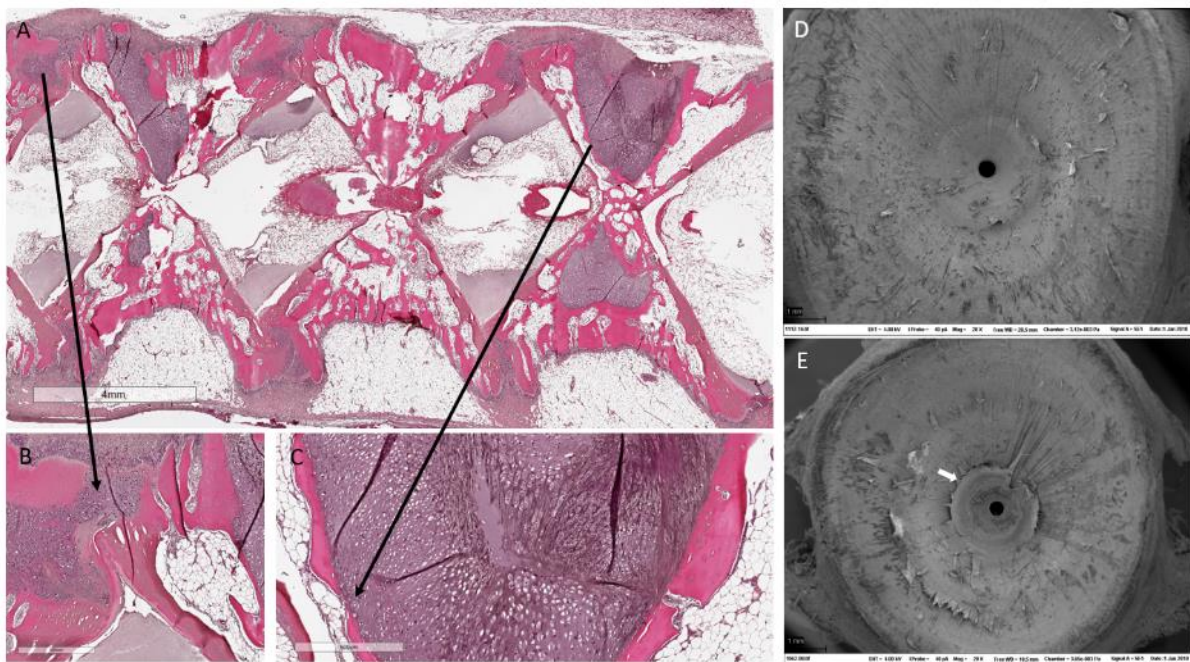
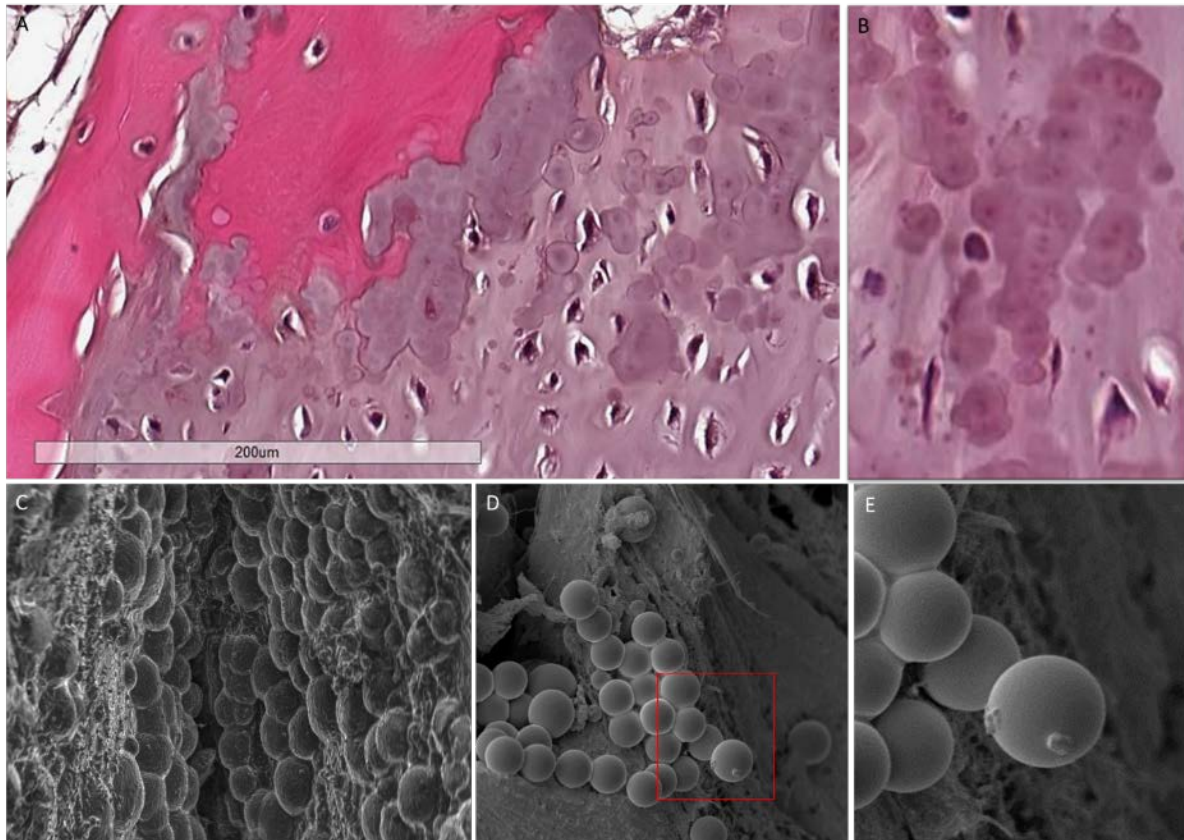


Figure 11 A) Histologi av fisk identifisert med korssting ved sluttuttak. Med høyere forstørrelse av B) Ektopisk bruskdannelse i vekstsonene og C) brudd i det kompakte benet. SEM analyser viste at D) normale virvler hadde kompakt benvev uten anmerkninger mens E) Korssting hadde brudd som gikk i sirkel rundt hele notochorden

I prøver fra sluttuttaket med utviklet korssting fant vi tilsvarende strukturer i bruskevvet som beskrevet av Veterinærhøyskolen (Figur 12, jfr. Figur 1 og 2). Da vi undersøkte virvlene med SEM så disse strukturerne ut som mikroorganismer, f.eks. gjærsopp. Det ble gjort et forsøk på å identifisere disse strukturerne der vi isolerte DNA fra virvlene og analyserte DNAet med primere for sopp, men vi lyktes ikke å komme videre med denne metoden.

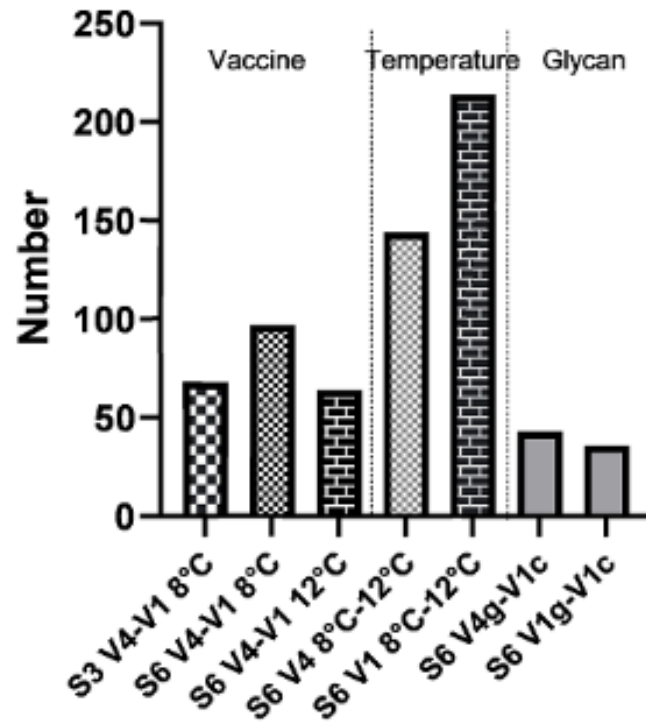


Figur 12 A) Korsstingsvirvel farget med HE viste strukturelle forandringer i bruskevevet, forstørret i B). SEM analyser viste flere sirkulære strukturer i C) notochord og i D) bruskevev, nen av strukturene lignet på knoppkytende gjærceller, forstørret i E)

Morfometriske målinger

Kort oppsummert viste morfometriske målinger av røntgenbilder ved vaksinerings av fisk, og histologiske snitt på fisk med korsstingspatologi, at lengden på endeplaten ved vaksinerings samsvarer med lengden fra sentrum av virvel til aksial deformitet i ryggvirvler med korsstingspatologi. Dette indikerer at grunnlaget for korsstingspatologi oppstår allerede under vaksinerings.

Microarray



Microarraydataene ga ikke noen konkluderende resultater, men viste ulikt genuttrykk i vaksinegruppene, mellom temperaturene og mellom gruppene med og uten glukaner i fôret. Temperatur hadde den største effekten på genregulering.

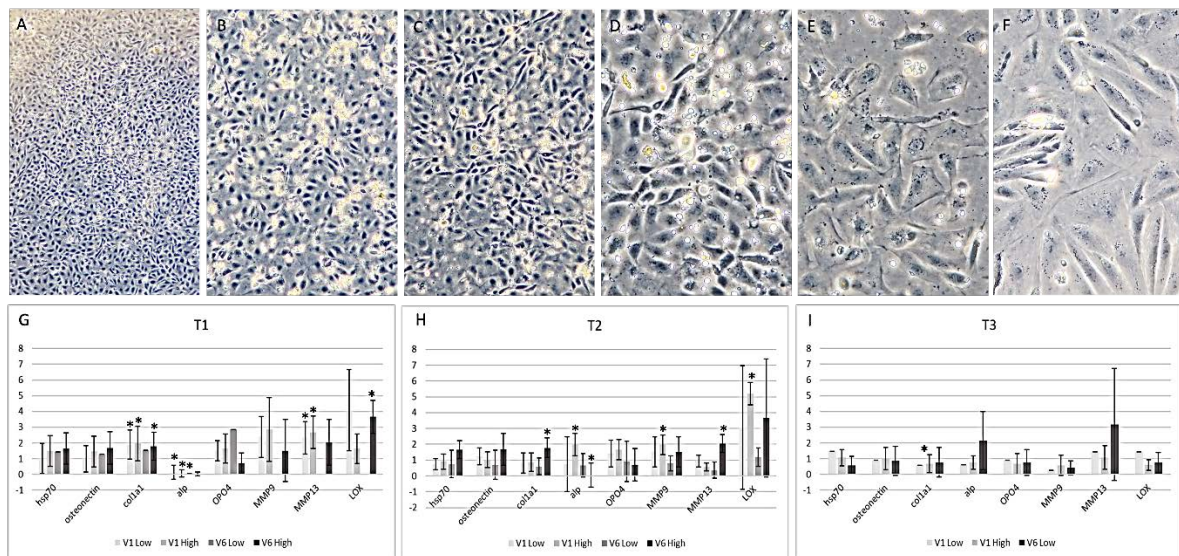
På S3 viste virvler fra vaksinert fisk lavere transkripsjon av en rekke gener, bl.a. for gener involvert i stressrespons i laks. Gener som viste høyere transkripsjon inkluderte akutt inflammasjon. Gener involvert i benutvikling og utskillelse av ekstracellulær matriks var få.

På S6 sammenlignet vi vaksinegruppene på ulike temperaturregimer, men ingen korrelasjon mellom 6 °C og 12 °C ble funnet. Høyere uttrykk av *ig* transkripter indikerer økt antall B-celler i virvlene fra vaksinert fisk. Flere detaljer fra microarrayet vil fremgå i publikasjonen.

5.4 In vitro-forsøk

Cellene som ble isolert og gitt mediet som stimulerte til utvikling av benceller så ut som tidligere observert for denne celletypen (Ytteborg et al, 2015). Før tilsetting av vaksinekomponenter hadde cellene en morfologi som osteoblaster i tidlig fase, tette og med «cubble -stone»-form (Figur 13). 3 dager etter tilsetting av komponentene hadde cellene som hadde fått høy dose av vaksinekomponentene forandret form til en mer langstrakt struktur og de var ikke lenger like tette. Etter 6 dager så de samme cellene ut til å skranke og resten av cellene ble derfor isolert for genekspressjons-analyser og forsøket avsluttet. Cellene som hadde fått lave doser hadde også fått endret morfologi mot den de i høy dose viste.

Genekspresjons-analysene viste økt forandringer i nivåer av gener involvert i både osteoblastutvikling og sekresjon av benmatriks de påfølgende dagene. På grunn av lave celletall i flere brønner ble det få paralleller til qPCR og derfor lite signifikante data. Det er verdt å merke seg at hsp70 hadde tendens til økt uttrykk med høyere dose og fra V1 til V6 24 timer (T1) og 3 dager (T2) etter tilsetning, og at MMP9 og MMP13 (også stress-relaterte) var signifikant forhøyet etter 3 dager i høy dose av henholdsvis V1 og V6. Collagen 1a1 (hovedkomponenten i ben) var signifikant høyere uttrykt i alle gruppene 24 timer etter tilsetning, og økt uttrykk vedvarte i V6 Høy etter 3 dager. ALP var signifikant nedregulert etter 24 timer i alle gruppene, og forble også lav i V6 høy etter 3 dager. I V1 Høy var ALP derimot oppregulert etter 3 dager. Dette kan vise en kompensatorisk effekt i denne gruppen og en muligens forskjell fra V6 høy. ALP og collagen er to komponenter som er svært viktige i bendannelse. Lignende uttrykk ble ikke funnet i lav dose fra de to vaksinekomponentene. Etter 5 dager var genuttrykket generelt lavere for alle genene i alle gruppene, noe som kan reflektere vitaliteten til cellene observert i mikroskop. Vi fikk ikke kjørt analyser på V6 høy dose etter 5 dager pga. for lite celler/RNA, noe som tyder på størst effekt på disse cellene fra denne vaksinekomponenten i høy dose.



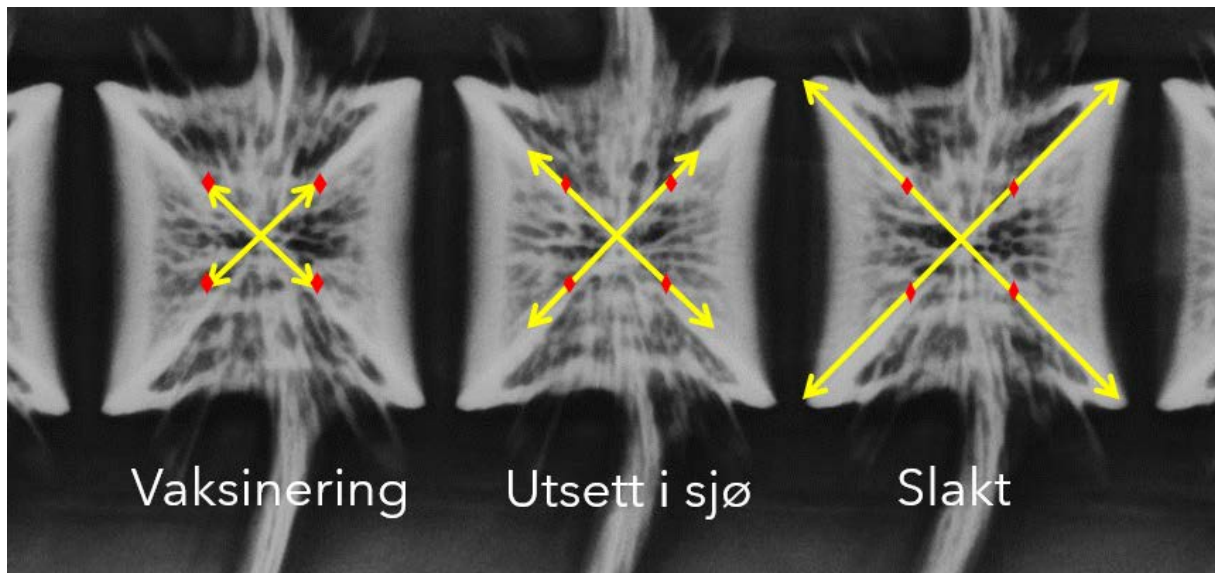
Figur 13 *In vitro* cellekulturer A) Konfluente celler før tilsetning av vaksinekomponenter, B) Høyere forstørrelse, C) Kontrollceller, D) Høyere forstørrelse av kontroll, E) V1 høy, F) V6 Høy. G-I) qPCR analyser av celler fra de ulike vaksinene og dosene etter 24t (T1), 3 dager (T2) og 6 dager (T3), kontroll (uten vaksinekomponent = 1

Totalt sett ser bencellekulturer ut til å være et godt verktøy for videre testing av vaksiners effekt på osteoblaster og har flere bruksområder og muligheter for funksjonelle studier enn det vi fikk testet i dette prosjektet. Det hadde vært interessant å gå inn på et senere tidspunkt i utviklingen av disse cellene slik at vi kunne studert mineraliseringsprosessen og fibrindannelse bedre.

5.5 Samlet vurdering av resultatene og diskusjon

Resultatene fra dette prosjektet, sett under ett, viser med stor grad av sannsynlighet at den underliggende årsaken til korsstingsvirvelproblemene er vaksiner med oljebaserte vaksiner som inneholder PD-komponent. Vi har ikke funnet noe i løpet av prosjektets gang som tyder på at dette er feil, vi har brukt et bredt spekter av metoder og har flere funn som hver for seg underbygger denne teorien.

Resultatene indikerer at vaksinene forårsaker en forbigående feil i virvlens vekstzone i perioden etter vaksinerings. Det dannes en ringformet svakhet på det stedet der vekstsonen var lokalisert ved vaksinerings, ytterst på virvlens endeplater. Når virvelen gjenvinner normal vekst, blir denne svakheten liggende på samme sted (Figur 14). Da laks kan remodelere og reparere ødelagt benvev, vil videre vekst og utvikling av virvlene kunne avgjøre om virvlene blir sterke nok til å utvikle seg normalt, eller om denne skjulte feilen i endeplatene resulterer i en ustabilitet som til slutt gir den karakteristiske patologien.



Figur 14 Skjematisert framstilling av virvelvekst. Vekstsonen er lokalisert ytterst på endeplatene (pilspisser) og veksten skjer i den retningen som pilen indikerer. En svakhet (markert med rødt) som dannes på et gitt tidspunkt, f.eks. ved vaksinerings, vil bli liggende i samme avstand fra virvelsentrum når virvelen øker i størrelse

Resultatene fra forsøket indikerer at temperatur og vekst i perioden etter overføring til sjø er en kritisk faktor for utvikling av korsstingsvirvler. Dette er ikke et sikkert funn, men ulike observasjoner peker i samme retning, og det er et svar som gir mening i forhold til forskjellen mellom høst- og vårmolt både i våre analyser av produksjonsdata og i rapporter fra felt. Vi så forskjell i respons mellom høy og lav temperatur (12 °C og 6 °C) etter overføring til sjø (karforsøk), der de to PD-vaksinene skilte seg negativt ut på den høye temperaturen, men ikke på den lave. Det var ikke store utslag, men vi fant samme forskjell i respons både på tilvekst, histologi og microarray. Sett i sammenheng med merdforsøket i prosjektet, så tilsvarte temperaturforholdene her den laveste temperaturen som ble testet i karforsøket. Fisken ble satt i sjø som sein høstsmolt 15. november på 7 °C og synkende temperatur. Her fikk vi også utvikling av korsstingspatologi, men forandringene var så små at de neppe ville blitt oppdaget uten bruk av røntgen.

Spørsmålet om hvilke komponenter i vaksinene som gir den uønskede effekten står ubesvart. I cellekulturforsøket så vi en tydelig dose-respons-effekt, der lav dose tilsetning av vaksinekomponenter ga effekter, men i langt lavere grad enn høy dose. I praktisk bruk er det en tilsvarende forskjell i dose mellom V2 (0,05 ml per fisk) og V3-V4 (0,05+0,05 ml eller 1 ml per fisk). Her vil vi også i tillegg se variasjon i effektiv dose avhengig av fiskestørrelse ved vaksinerings. På histologi så vi tegn til samme reaksjoner i endeplatene etter vaksinerings i V2-gruppen som i V3 og V4, men i mildere grad og uten

utvikling av den typiske patologien på røntgen. Vi har observasjoner fra andre kontrollerte forsøk i Nofima, der vi har fått utvikling av korsstingsvirvler også i grupper som var vaksinert med samme vaksine som V2 (uten PD-komponent). I disse tilfellene har det vært et lavt, men tydelig innslag av fisk med korsstingsvirvler. Vi har funnet dem når et stort antall fisk er røntgenfotografert, og uten registrerte deformitetsproblemer. Vi tolker dette som at korsstingsreaksjonen kan være en generisk reaksjon på denne typen vaksiner, og at de store utslagene av de oljebaserte PD-vaksinene like gjerne kan skyldes at dosen er dobbelt så stor som tidligere generasjoner av oljebaserte vaksiner, som at det er noe spesielt med sammensetningen av vaksinene. Variasjon i dose i forhold til kroppsvekt kan kanskje også være et relevant moment i forhold til forskjellene mellom høst- og vårmolt.

I vårt prosjekt var tilslaget av korsstingsvirvler så lavt at det ikke var mulig å hente ut en eventuell tilleggseffekt av glukaner i fôr, og vi regner dette spørsmålet som ubesvart.

Vi anbefaler å gå videre med cellekulturstudier for å belyse korsstingsvirvelproblematikken. Vi lyktes ikke med å finne tidlige tegn på korsstingsreaksjonen som kan brukes i lab eller i felt for å stille en tidlig diagnose, og vi har lært at reaksjonen sannsynligvis også avhenger av det som skjer i postsmoltstadiet. Konsekvensen er at vi er fremdeles avhengige av å holde fisk i forsøk over 1 ½-2 år for å kunne lese effekter på en sikker måte. Våre innledende forsøk med cellekulturer viste at det er mulig å ta ut effekter av vaksinetilsetning i *in vitro*-modeller. I vårt (relativt enkle) forsøk fant vi klare dose-respons-effekter. Slike modeller kan bygges ut og brukes til f.eks. temperaturstudier, studier av enkeltkomponenter, fôrtilsetninger, målrettede funksjonelle studier av ulike stadier i benutviklingen osv. På den måten kan innledende tester ideelt sett gjøres *in vitro*, og behovet for fiskeforsøk kan begrenses til det som er nødvendig.

6 Hovedfunn

Tre til fem kulepunkt som oppsummerer hovedfunnene i oppnådde resultater.

- Patologien ved korssting utgjør en helt ny type vertebral deformitet
- Utvikling av korsstingsvirvler knyttes til vaksinerings mot PD med oljebaserte vaksiner
- Ved vaksinerings kan det dannes svakheter i virvlens endeplater, og seinere vekst og utvikling avgjør om virvlene har styrke nok til å opprettholde strukturen fram mot slaktestørrelse
- Svakheten i virvelen ser ut til å skyldes økt stress og redusert og/eller forandret matriksproduksjon fra osteoblastene i vekstsonene i etterkant av vaksinerings. Disse resultatene støttes av funn *in vitro*.

7 Leveranser

Rapporter

Grøntvedt, R.N., Jansen, P., Kristensen, T., Bæverfjord, G. (2020) Feltundersøkelser av rygggradsdeformasjon i kommersiell lakseproduksjon. Delrapport, 20 sider.

Publikasjoner

Holm H, Ytteborg E, Høst V, Reed AK, Dalum AS, Bæverfjord G. (2020) A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2020, 526, 735382.

Trangerud C, Bjørgen H, Koppang EO, Grøntvedt RN, Skogmo HK, Ottesen N, et al. (2020) Vertebral column deformity with curved cross-stitch vertebrae in Norwegian seawater-farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis.* 2020;43(3):379-89.

Manuskripter

Grøntvedt, R.N., Jansen, P.A., Bæverfjord, G. Risk factors for cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Manuskript.

Ytteborg, E., Høst, V., Dalum, A.S., Krasnov, A, Holm, H., Lund, H., Bæverfjord, G. Experimentally induced vertebral cross stitch pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): risk factors and timing of pathomorphological development. Manuskript.

Foredrag på konferanser og fagmøter

Grøntvedt, R., Kristensen, T., Bæverfjord, G. (2019) Sammenheng mellom produksjonsfaktorer og utvikling av korsstingsvirvler i lakseproduksjonen. *Frisk Fisk* 2019.

Trangerud, C., Bjørgen, H., Skogmo, H.K., Ottesen, N., Grøntvedt, R., Bæverfjord, G., Koppang, E.O., Kvellestad, A. (2019) Nye forandringer i ryggraden hos oppdrettslaks med nedsatt tilvekst. *Frisk Fisk* 2019.

Bæverfjord, G., Grøntvedt, R.N., Holm, H., Ytteborg, E., Koppang, E.O., Kvellestad, A., Aas-Eng, A. (2019) «Cross-stitch» vertebrae in A. salmon. Pathology and the possible link to vaccines. TriNation PD workshop, Dublin juni 2019.

Bæverfjord, G., Grøntvedt, R.N., Holm, H., Ytteborg, E., Koppang, E.O., Kvellestad, A., Aas-Eng, A. (2019) «Korsstingsvirvler hos laks». *Pharmaqademy*, Trondheim 22. august 2019.

Ytteborg, E., Holm, H., Dalum, A.S., Høst, V., Reed, A.K., Bæverfjord, G. (2020). Karakterisering av korsstingsdeformiteter hos Atlantisk laks (*Salmo salar*). *Havbruk* 2020, Bergen (Digitalt foredrag).

Bæverfjord, G. (2020) PD-vaksine – risiko for utvikling av korsstingsvirvler? AVF høstkurs, Gardermoen oktober 2020.

Bæverfjord, G. (2021) “Cross-stitch” vertebral deformities – a new side effect of vaccination. *AquaNor*, Nofima seminar “Fish biology challenges new technology”. *AquaNor*, Trondheim august 2021

Foredrag for industri og studenter der prosjektet har vært presentert

Bæverfjord, G. (2018) Critical Factors for Skeletal Deformities in Salmonids. Internseminar, MSD Animal health, Bergen februar 2018

Bæverfjord, G. (2018). Deformiteter hos laks. AVFs høstkurs, Gardermoen oktober 2018

Bæverfjord G. (2019) Deformiteter hos laks – Oppsummering av gammel og ny kunnskap. Internseminar, Mowi Breeding Trondheim august 2019

Bæverfjord, G. (2018) Deformiteter hos laks. Presentasjon for veterinærstudenter/akvakultur NMBU, Sunndalsøra september 2019

Bæverfjord, G. Deformiteter hos laks – Oppsummering av gammel og ny kunnskap. Interseminar, Lerøy Vest Stord oktober 2019

Bæverfjord G. (2019) Deformiteter hos laks – Oppsummering av gammel og ny kunnskap. Internseminar, Lerøy Midt, Orkanger oktober 2019

Bæverfjord, G. (2019) Skeletal deformities in A. salmon - lessons learned and some new issues. Internseminar, Elanco, Bergen desember 2019

Bæverfjord, G. (2020) Produksjonsforhold i endring – hva tåler laksen? Internseminar, Nova Sea, september (2020)

Bæverfjord, G. (2020). Produksjonsforhold i endring – hva tåler laksen? Internseminar AquaGen, Teams november 2020.

Bæverfjord, G. (2021) Non-infectious diseases: Deformities in farmed salmon. Forelesning, fiskehelsestudenter Nord Universitet. Teams, mars 2021

