

# **Samanburður á næmi bleikju systkinahópa fyrir kylaveikibróður**

## **Lokaskýrsla til AVS vegna smáverkefnis** Tilvísunarnúmer: S 004-08

Hólaskóli  
Tilraunastöð HÍ í meinafræði að Keldum

Verkefnisstjóri: Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

Apríl 2008

## Skýrsluágrip

Verkefnið S 004-08 er forverkefni vegna athugana á möguleikum þess að nota sjúkdómsspol sem valþátt við kynbætur á bleikju.

Markmiðið var að kanna hvort marktækur munur er á milli bleikju systkinahópa í næmi fyrir kylaveikibróður.

Náttúrulegt hreysti er ákjósanlegasta sjúkdómssvörn fyrir alla eldisfiska jafnt og aðrar lífverur. Hin ört vaxandi þekking á erfðaeiginleikum fiska og sýkla þeirra og samspili hýsils og sýkils í sýkingarferlinu hefur leitt til þess að rannsóknir á arfgengi sjúkdómsspols hafa fengið aukið vægi. Miklar vonir eru bundnar við þróun bleikjueldis á Íslandi og unnið hefur verið að kynbótum bleikju um árabil. Kylaveikibróðir er sá smitsjúkdómur sem mestum skaða veldur í íslensku bleikjueldi. Í rannsókninni var kannað næmi sjö mismunandi bleikjufjölskyldna fyrir smiti með kylaveikibróðurbakteríu. Niðurstöður sýndu að þrjár fjölskyldur höfðu marktækt meira þol gegn sjúkdómnum en aðrar fjórar fjölskyldur, sem prófaðar voru. Niðurstöðurnar gefa til kynna að vænlegt sé að velja fyrir næmi gegn kylaveikibróður í bleikjukynbótunum.

# Efnisyfirlit

1. Inngangur .....	4
2. Framkvæmd .....	5
3. Kostnaðaryfirlit .....	6
4. Niðurstöður .....	6
5. Lokaorð.....	8
6. Þakkir .....	8

## 1. Inngangur

Smitsjúkdómar eru tíðir í fiskeldi og enginn vafi er á mikilvægi þess að draga úr áhrifum þeirra með sem minnstum áhrifum á aðra þætti í umhverfinu og þannig að ekki dragi úr lífsgæðum fisksins. Algengustu sjúkdómavarnir hafa byggst á hreinlæti, lyfjanotkun og bólusetningum, sem hafa ýmsa ókosti s.s. umhverfismengun, þróun lyfjaónæmra bakteríustofna og samgróningum í innri líffærum fiska í kjölfar bólusetninga. Hinar ýmsu tegundir fiska og mismunandi stofnar fiska eru mismæmir fyrir sýkingu tegunda og stofna af örverum vegna mismunar í erfðamengi. Náttúrulegt hreysti er ákjósanlegasta sjúkdómsvörn fyrir alla eldisfiska jafnt og lífverur. Hin ört vaxandi þekking á erfðaeiginleikum fiska og sýkla þeirra og samspili hýsils og sýkils í sýkingarferlinu hefur leitt til þess að rannsóknir á arfgengi sjúkdómspols hafa fengið aukið vægi.

Bakterían *Aeromonas salmonicida* undirteg. *achromogenes* veldur sjúkdómi sem nefnist kýlaveikibróðir í ýmsum tegundum fiska og er sá sjúkdómur sem mestum skaða hefur valdið í íslensku fiskeldi (Gudmundsdóttir 1998). Bleikja (*Salvelinus alpinus*) er að mörgu leyti mjög álitleg eldistegund fyrir íslenskar aðstæður og miklar vonir eru bundnar við þróun bleikjueldis á Íslandi (<http://holar.is/~eldisbondi/node5.html>). Kýlaveikibróðir er sá smitsjúkdómur sem mestum skaða veldur í íslensku bleikjueldi. Erfðamengi *A. salmonicida* undirteg *salmonicida* hefur verið raðgreint og birt á veraldarvefnum (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> gene bank number: NC 006570). Erfðamengi lax (*Salmo salar*) hefur verið raðgreint og á grunni þess útbúnar örflögur með um 4000 genum sem tengjast ónæmiskerfi fisksins. Þessar örflögur (GRASP microarray) eru í eigu samstarfsaðila verkefnisstjóra, University of Victoria (UVic) í Kanada, og verkefnisstjóri hefur gert rannsókn sem sýnir að unnt er að nota þessar örflögur við rannsóknir á ónæmissvari íslenskrar bleikju (Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir *et al.* óbirtar niðurstöður). Þátttakendur eru sérfræðingur í bakteríusjúkdómum í fiskum sem hefur þróað aðferðir við að sýkja bleikju með kýlaveikibróðurbakteríunni og sérfræðingur í bleikjueldi og kynbótum á

bleikju. Í kynbótastöðinni á Hólum eru til systkinahópar af bleikju (frjóvgun haustið 2006) úr bleikjukynbótaverkefni, sem er hagstæður efniviður til að kanna í smitstilraun hvort munur sé á milli systkinahópa af bleikju í næmi þeirra fyrir kylaveikibróður.

### **Heimild**

Gudmundsdóttir B.K. (1998) Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. *Icelandic Agricultural Sciences* 61-72.

## **2. Framkvæmd**

Meðalþyngd á þeim 8 systkinahópum sem voru næmiprófaðir var um 20 g í september 2007, þeir voru aldir við 10°C. Þessir hópar urðu til við frjóvgun haustið 2006 og eru systkini hvers hóps einnig í bleikjukynbótaverkefni á Hólum. Hver hópur er alinn í 4 endurtekningum, 40 seiði í hverri endurtekningu, í 20 L eldiseiningum. Þessi þáttur var framkvæmdur í kynbótastöðinni á Hólum.

Í nóvember 2007 voru 70 fiskar af hverjum systkinahópi fluttir að Keldum. Hópum 1-6 var komið fyrir í 150 L kerum með sírennsli af fersku vatni (hitastig 10°C) en vegna aðstöðuleysis var hópum 7 og 8 komið fyrir í nýjum 60 L plastbölum. Eituráhrif virtust koma frá plastinu og töluverður dauði varð einkum í hópi 8. Niðurstöður fyrir hóp 8 eru því ekki teknar með.

Hóparnir voru merktir með Alcien blue lit. Staðsetning litamerkis aðgreinir systkinahópa. Að lokinni merkingu var ~10 fiskum af hverjum systkinahópi komið fyrir saman með 10 af hverjum hinna systkinahópanna. Fiskar voru lengdarmældir, vegnir við upphaf og lok tilraunar. Í næmiprófinu var viðmiðunarhópur í einu keru og smitaðir hópar í sex. Eftir 7 daga aðlögun að nýjum aðstæðum var smitað með þremur styrkleikum af bakteríulausn, sem sprautað var í kviðarhol (100 µL) og voru 2 endurtekningar af hverri þynningu. Í þetta voru notuð sex 150 L eldisker, hitastig 10°C. Bakterían

sem sýkt var með er *Aeromonas salmonicida* undirteg. *achromogenes*, stofn F265-87. Smitmagn var:  $2 \times 10^6$  bakteríumyndandi þyrpingar /fisk (ker 1 og 2);  $2 \times 10^7$  bakteríumyndandi þyrpingar /fisk (Ker 3 og 4);  $2 \times 10^3$  bakteríumyndandi þyrpingar/fisk (ker 5 og 6). Í ker 7 voru aldri 10 ómeðhöndlaðir fiska af hverri fjölskyldu til viðmiðunar.

Næstu 24 daga voru afföll skráð daglega. Öll hirðing og umhverfisstýring var stöðluð og þannig kappkostað að lágmarka umhverfisbreytileika vegna annara þátta en þeirra sem verið er að kanna viðbrögð við. Þessi verkþáttur var unnin á Keldum.

Við lok tilraunar var eftirlifandi fiskur talinn og skráður.

Marktækni á lifun mismunandi fjölskyldna var metin með Fishers' s exact prófi. Normaldreifing á lengd og þyngd var könnuð með Kolmogorov-Smirnov prófi. Munur á lengd og þyngd hópa var borin saman í t-prófi.

### 3. Kostnaðaryfirlit

Verkefnið var unnið á árinu 2007. Heildarkostnaður var 1.428.000 kr. Eigið framlag var 728.0000 kr og styrkur AVS 700.000 kr .

#### Sundurliðun kostnaðar í þús ISK

Þátt.	Laun	Tilr.- Aðst.	Hráefni	Bifr.- kostn.		Heildar- kostn.	Sótt um til AVS	Sótt um til annarra	Eigin fjárm.
Keldur	697	120				817	400		417
Hólar	435	120	20	36		611	300		311
Samtals	1132	240	20	36		1428	700		728

### 4. Niðurstöður

Niðurstöður eru skráðar í töflur 1-3. Allur fiskur drapst í þeim hópum sem fengu tvo hæstu skammta smits, en munur kom fram í fjölda daga til dauða

hjá þessum hópum. Marktækur munur kom fram á lifun bleikjufjölskyldna sem sýktar voru með minnsta smitmagninu. Lifun fjölskyldna 13, 128 og 129 var marktækt betri en fjölskyldna 350, 351, 360 og 368. Hvorki var marktækur munur á milli lifunnar fjölskyldna 13, 128 og 129 né á milli fjölskyldna 350, 351, 360 og 368.

Niðurstöður gefa til kynna að þol gegn kylaveikibróður sé marktækt meira hjá fjölskyldum númer 13, 128 og 129 heldur en hjá fjölskyldum númer 350, 351, 360 og 368.

**Tafla 1.** Prósent dauði og meðaldagafjöldi til dauða (MDD) bleikjuseiða 24 dögum eftir sýkingu í kviðarhol með *Aeromonas salmonicida* undirteg. *achromogenes*.

Fjölskylda #	Smitmagn					
	2 x10 <sup>6</sup> CFU/fisk		2 x10 <sup>7</sup> CFU/fisk		2 x10 <sup>3</sup> CFU/fisk	
	% dauði	MDD	% dauði	MDD	% dauði	MDD
350	100%	5,8	100%	4,0	94	12,4
360	100%	5,7	100%	3,6	69	13,5
351	100%	5,8	100%	4,0	85	12,1
368	100%	5,9	100%	3,7	84	12,3
129	100%	6,1	100%	3,9	29	14,2
13	100%	6,3	100%	4,9	33	14,3
128	100%	6,7	100%	3,5	25	11,3
Meðaltal		6,0		3,9		12,9

CFU, þyrpingarmyndandi bakteríufrumur

**Tafla 2.** Samanburður á lifun bleikja í sjö fjölskyldum 24 dögum eftir smitun með 2x10<sup>3</sup> þyrpingarmyndandi bakteríufrumum/fisk af *Aeromonas salmonicida* undirteg. *achromogenes*, stofni F265-87. Marktækur munur á lifun milli hópa er skráður með mismunandi stöfum.

Fjölskylda	Lifun %	Fjöldi dauðra	Fjöldi lifandi	Tölfræði samanburður
350	6	17	1	a
360	31	11	5	a
351	15	17	3	a
368	16	16	3	a
129	71	5	12	b
13	67	6	12	b
128	75	3	9	b

**Tafla 3.** Niðurstaða samanburður á prósent lifun mismunandi bleikjufjölskyldna með Fishers´ s exact prófi.

Fjölskyldur	P gildi	Fjölskyldur	P gildi
350/360	0.0498	351/368	0.9455
350/351	0.3435	351/129	0.0006
350/368	0.3163	351/13	0.0011
350/129	< 0.0001	351/128	0.0007
350/13	0.0001	368/129	0.0009
350/128	< 0.0001	368/13	0.0016
360/351	0.2439	368/128	0.001
360/368	0.2779	129/13	0.8028
360/129	0.0238	129/128	0.7935
360/13	0.0393	13/128	0.6256
360/128	0.0219		

Hvorki kom fram munur á þyngd né stærð í neinni fjölskyldu á seiðum sem drápust og þeim sem lifðu sýkingu.

## 5. Lokaorð

Niðurstöðurnar gefa til kynna að vænlegt sé að velja fyrir næmi gegn kýlaveikibróður í bleikjukynbótunum á grundvelli þeirrar aðferðar við næmiprófun sem notuð var í verkefninu. Stefnt er að því að nota fjölskyldur 13, 128 og 129 til undaneldis og ennfremur að undirbúa framhaldsrannsókn með það markmið að kanna eðli sjúkdómsnæmis og þols bleikju gegn kýlaveikibróður.

## 6. Þakkir

Þátttakendur þakka AVS rannsóknasjóðnum sem styrkti verkefnið.

Reykjavík 3. apríl 2008.

Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Tilraunastöð HÍ í meinafræði að Keldum

Einar Svavarsson, Hólaskóla, Hólum í Hjaltadal