



---

DATO: 07.08.07

## Slutrapport

### for forsknings- og udviklingsprojekter med tilskud fra Innovationsloven

---

1. **Projekttitle:** Feltafprøvning af en DNA-vaccine til dambrugsfisk

---

2. **Direktoratets j.nr.:** 93s-24F4-Å02-00042 FØTEK4

---

3. **Ansøger** (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail): Seniorforsker Niels Lorenzen, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, telefon: 72346829, fax: 72346901, email: [nl@dfvf.dk](mailto:nl@dfvf.dk) eller [nl@vet.dtu.dk](mailto:nl@vet.dtu.dk)

---

4. **Deltagende samarbejdsparter** (navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

*Deltager 1:* Dansk Akvakultur v. Niels Henrik Henriksen, Vejlsøvej 51, 8600 Silkeborg, tlf: 89212260, fax: 89212261, email: [niels@danskakvakultur.dk](mailto:niels@danskakvakultur.dk)

*Deltager 2:* Esben Ingerselv, GeneCare ApS, c/o DTU, Biocentrum, Bygning 223, 2800 Lyngby, tlf: 40450077, fax: 45884148, email: [ei@biocentrum.dtu.dk](mailto:ei@biocentrum.dtu.dk)

---

5. **Kontaktpersoner** (titel, navn, adresse, tlf., fax. og e-mail. For hver deltagende institution er der udpeget én kontaktperson):

Veterinærinstituttet, DTU: seniorforsker Niels Lorenzen, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, tlf: 72346829, fax: 72346901, email: [nl@dfvf.dk](mailto:nl@dfvf.dk) eller [nl@vet.dtu.dk](mailto:nl@vet.dtu.dk)

Alle relevante oplysninger skal fremgå af selve slutrapporten.

**Slutrapport samt publikationer og artikler mm. fra hele projektperioden sendes i ét eksemplar til:**

Direktoratet for FødevareErhverv  
Udviklingskontoret  
Kampmannsgade 3  
1780 København V

juli 2001

Dansk Akvakultur: dyrlæge Niels Henrik Henriksen, Vejlsøvej 51, 8600 Silkeborg, tlf: 89212260, Mobil tlf: 22775570, fax: 89212260, email: [niels@danskakvakultur.dk](mailto:niels@danskakvakultur.dk).

GeneCare: ingeniør Esben Ingerslev, GeneCare ApS, c/o DTU, Biocentrum, Bygning 223, 2800 Lyngby, tlf: 40450077, fax: 45884148, email: [ei@biocentrum.dtu.dk](mailto:ei@biocentrum.dtu.dk)

---

## 6. Øvrige projektmedarbejdere (titel, navn, adresse, tlf., fax., og e-mail):

Biolog Torben Eigil Kjær, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, tlf: 72346857, fax: 72346901, email: [tek@dfvf.dk](mailto:tek@dfvf.dk) eller [tek@vet.dtu.dk](mailto:tek@vet.dtu.dk)

Biolog Katja Einer-Jensen, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, tlf: 72346874, fax: 72346901, email: [kej@dfvf.dk](mailto:kej@dfvf.dk) eller [kej@vet.dtu.dk](mailto:kej@vet.dtu.dk)

Biokemiker Jesper Skou Rasmussen, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, tlf: 72346884, fax: 72346901, email: [jra@dfvf.dk](mailto:jra@dfvf.dk) eller [jra@vet.dtu.dk](mailto:jra@vet.dtu.dk)

Biolog Ellen Lorenzen, Veterinærinstituttet, DTU, Sektion for Fiskesygdomme, Hangøvej 2, 8200 Århus N, tlf: 72346828, fax: 72346901, email: [el@dfvf.dk](mailto:el@dfvf.dk) eller [el@vet.dtu.dk](mailto:el@vet.dtu.dk)

Desuden deltager:

- Laboranter og dyrepassere på Veterinærinstituttet, DTU, i Århus
  - Udvalgte dambrugere under Dansk Akvakultur
- 

## 7. Projektets start- og slutdato: 01.01.03-31.12.06

(Oprindeligt 01.01.03-30.05.05, men pga forsinkelser mht ansøgning og opnåelse af tilladelser til forsøget fra relevante offentlige myndigheder, blev der søgt om og bevilliget projektforlængelse, jfr. brev af 30 juni 2004 (DFFE J.nr.3401-FF04-1205))

## 8. Slutrapport: (maks. 4-6 sider)

### A. Sammendrag af projektets formål:

Projektets formål:

Undersøge anvendeligheden af en DNA-baseret vaccine mod sygdommen virusseptikæmi (VHS) hos regnbueørred under dambrugsforhold. Herunder:

- Etablere en samarbejdsplatform mellem forskningsinstitution og erhverv.
- Afprøve to forskellige prototyper af DNA vacciner mod VHS.
- Sammenligne tilvækst og trivsel af vaccinerede fisk med ikke-vaccinerede fisk.
- Klarlægge persistens af vaccinen i fiskene og spredning af vaccinen til det omgivende miljø.
- Udvikle og afprøve en metode til at skelne mellem vaccinerede og ikke-vaccinerede fisk.
- Lave en samlet vurdering af mulighederne for kommerciel anvendelse af DNA vacciner til dambrugsfisk.

- Offentliggøre resultaterne i almene og videnskabelige tidsskrifter.

Projektets indhold:

Projektet indeholder følgende elementer (faser /milestones):

1. Opnå godkendelse af forsøgsplan hos myndighederne (Lægemiddelstyrelsen, Fødevaredirektoratet, Skov- og Naturstyrelsen, Arbejdstilsynet, Dyreetisk Råd).
2. Fremstilling af plasmid DNA til vaccinationsforsøg.
3. Afprøve DNA vacciner mod VHS under feltforhold og sammenligne beskyttelsen under hhv. felt- og laboratoriebetingelser.
  - a. Vaccinationsforsøg med yngel.
  - b. Vaccinationsforsøg med sættefisk.
  - c. Sammenligne tilvækst og velfærd af vaccinerede fisk med ikke-vaccinerede fisk.
4. Afklaring af sikkerhedsmæssige aspekter.
  - a. Klarlægge persistens af vaccinen i fiskene og spredning af vaccinen til det omgivende miljø.
  - b. Udvikle og afprøve en metode til at skelne mellem vaccinerede og ikke-vaccinerede fisk.
5. Resultatanalyse og -formidling.
  - a. Lave en samlet vurdering af mulighederne for kommerciel anvendelse af DNA vacciner til dambrugsfisk.

Offentliggøre resultaterne i almene og videnskabelige tidsskrifter.

## B. Projektets resultater og konklusion:

Kort sammendrag af projektets hovedresultater og konklusioner med henvisning til publikationer.

Projektet har drejet sig om at teste en DNA-vaccine mod virussygdommen VHS hos regnbueørred under feltforhold. Første fase var at opnå tilladelse til at gennemføre forsøget, hos myndighederne ( Lægemiddelstyrelsen, Fødevarestyrelsen, Skov-og Naturstyrelsen, Arbejdstilsynet, Dyreetisk Råd og Forsøgsdyrstilsynet).

Derefter fulgte to sæsoner med feltafprøvning (2004-5 og 2005-6) med fisk i forskellige størrelser. I første sæson var der felteksponeringer på 3 dambrug med VHS, i anden sæson på 4 dambrug med VHS. På alle dambrug var der problemer med andre samtidige infektioner som hudsnyltere (*Costia*) og bakteriesygdomme (vibriose, rødmundsyge, furunkulose) samt i nogle tilfælde dårlig vandkvalitet, hvilket har gjort det noget vanskeligt at finde ud af, hvor stor en del af dødeligheden, der skyldtes VHS. I første sæson var der stor variation imellem burene (blandede gruppe), men der var en del bure, hvor vaccinen virkede tilfredsstillende. I anden sæson var vandtemperaturen i hele perioden relativt høj, hvilket gav lav dødelighed idét fiskenes immunsystem da fungerer bedre og VHSVirus trives dårligere ( $> 19^{\circ}\text{C}$ ), men generelt klarede de vaccinerede fisk sig bedst, alle forhold taget i betragtning. Perioden på yngeldambrugene efter vaccination og indtil udsætning viste, at de vaccinerede fisk trivedes og voksede lige så godt i kummehusene som kontrol-vaccinerede fisk.

I første sæson blev der inkluderet to forskellige DNA-vacciner, pBA-vax-vhsG og pVax-vhsG, hvor førstnævnte har et (teoretisk) sikkerhedsmæssigt fortrin ved at den regulatoriske komponent (promotoren) stammer fra fisk og ikke fra et pattedyrvirus (CMV). Imidlertid viste førstnævnte sig at fungere mindre effektivt, hvorfor der i anden sæson kun blev brugt pVax-vhsG.

Vedr. persistens af vaccinen i fiskene har projektet vist, at vaccinen kan påvises i godt 3 måneder i injektionsstedet og at den tilsyneladende ikke persisterer i miljøet, idet der ikke kunne påvises vaccine hverken i slamprøver fra kummehusene eller fra store fisk, der gik i et vandbassin ved udløbet fra kummehusene. Et forsøg med fodring af mink med vaccinerede fisk (høj dosis) viste, at vaccinen ikke kunne påvises i minkenes organer (tarm, lever, milt, nyrer, gonader) og således tilsyneladende ikke overføres til konsument.

Blodprøver udtaget på forskellige tidspunkter efter vaccination af alle grupper fisk viste, at efter 1-2 måneder var frekvensen af seropositive fisk markant større blandt vaccinerede fisk, og at prøvestørrelsen skal være mindst 10 fisk, hvis metoden skal bruges til at skelne vaccinerede fra ikke-vaccinerede fisk.

Konklusionen er således, at DNA-vaccinen har en god effekt under feltforhold, men jo ikke beskytter mod andre infektioner. En mere optimal afprøvning ville være, at vaccinere alle fiskene på et dambrug / fiskene i en del af dammene på dambrug, der har tilbagevendende problemer med VHS, eller i bedste fald alle fisk på dambrugene ved et åløb med risiko for VHS. Endvidere er der ikke påvist overførsel af vaccineplasmid fra fisk, der har fået en unaturlig høj dosis, til mink der er blevet fodret med fiskene 0-5 dage efter vaccination. Dette resultat kan forhåbentlig gøre brug af DNA-vacciner til konsum-dyr acceptabel.

Foreløbige publikationer er anført i afsnit I.

### C. Projektets faglige forløb:

Gennemgang af projektets forløb og opnåede resultater samt en vurdering af resultaterne i forhold til de oprindeligt opstillede projektplan og milepæle. Der bør tillige være en vurdering af opfyldelse af budget.

Skematisk oversigt over resultaterne for hver fase/milepæl.

Fase	Milepæl	Forventet tidspunkt*	Reelt tidspunkt
1	1. Godkendelse af projektplan	1	16 <sup>#</sup>
2	2. Plasmid DNA klar til vaccinationsforsøg	3, 6	8-9, 20
2	3. Processteknologi for DNA fremstilling optimeret	18	Igangværende <sup>□</sup>
3	4. Demonstration af effekt af DNA vaccine i yngel under feltforhold	8-22	28
3	5. Evaluering af effektivitet af optimeret plasmid	8-22	22
1-3	6. Projektrapport for 1. projektår	13	17
3	7. Demonstration af effekt af DNA vaccine i sættefisk under feltforhold	15-22	28
3	8. Vurdering af DNA vaccins effekt på tilvækst	8-24	29
4	9. Tidsgrænse for persistens af vaccine i fisk	22	39
4	10. Forekomst af DNA vaccine i gonadevæv belyst	24	Igangværende <sup>□</sup>
4	11. Spredning af DNA til fiskens mikroflora og det omgivne miljø klarlagt	20-26	Igangværende <sup>□</sup>
4	12. Metode til serologisk identifikation af vaccinerede fisk etableret	22	Igangværende <sup>□</sup>
1-5	13. Projektrapport for 2. projektår	25	29
1-5	14. Projektrapport for 3. projektår	36	40
5	15. Vurdering af mulighederne for kommerciel anvendelse af DNAvacciner til dambrugsfisk	36	40

5	16. Offentliggørelse i almene og videnskabelige tidskrifter	36	Igangværende <sup>α</sup>
---	---	----	---------------------------

\*Angivet som måned nummer i projektførløbet. Angivelse af en periode indikerer at der løbende vil komme delresultater ind. Måned nr. 1 er april 2004, hvor det praktiske forsøgsarbejde kunne gå gang (med ca 16 måneders forsinkelse i forhold til den oprindelige plan)

<sup>#</sup>Se pkt. 1 nedenfor.

<sup>α</sup>Disse milepæle er ikke fuldt opnåede ved projektets afslutning.

#### Vurdering af resultaterne i forhold til de opstillede milepæle (MP).

MP1 (Fase 1): Godkendelse af projektplan.

Milepælen blev opnået 16 måneder senere end planlagt (se ovenfor). I konsekvens heraf har det været nødvendigt at forlænge projektperioden tilsvarende.

MP2 (Fase 2): Plasmid DNA klar til vaccinationsforsøg.

Denne milepæl er opnået, første fremstilling af plasmid DNA blev dog noget forsinket, idét nogle af vaccinepræparationerne måtte kasseres pga. kontamination i sidste led af færdiggørelsesprocessen.

MP3 (Fase 2): Procesteknologi for DNA fremstilling optimeret. Som følge af Lægemiddelstyrelsens krav om færdiggørelse og udlevering af vaccinen fra en af styrelsen godkendt §8-facilitet har strategien hos GeneCare Aps været at anvende certificerede kits til DNA-oprensning efterfulgt af færdiggørelse og udlevering fra Veterinærinstituttets certificerede vaccine facilitet i København. Parallelt hermed har GeneCare arbejdet med optimering af procesteknologien med det formål at etablere en certificerbar sammenhængende fremstillingsprocedure for plasmid DNA til medicinsk brug. Dette arbejder er endnu ikke afsluttet..

MP4+7 (Fase 3): Demonstration af effekt af DNA vaccinen i yngel (5g) og sættefisk (25 g) under feltforhold og i laboratoriet.

Første og anden sæson er afsluttet med 4 eksponeringer af vaccinerede fisk i netbure på dambrug med VHS både i sæsonen 2004-5 og sæsonen 2005-6. I første sæson forløb smittesæsonen normalt på den måde at de aktuelle VHS-udbrud startede i det tidlige forår og strakte sig over 4-6 uger. I en del af burene har vaccinen virket tilfredsstillende, dvs. de vaccinerede fisk har klaret sig markant bedre end kontrollerne. Resultaterne varierede dog en del fra bur til bur, bl.a. pga. diverse samtidige andre infektioner (parasitter, bakteriesygdomme) samt periodisk dårlig vandkvalitet. Begge dele kan antagelig primært tilskrives at forsøgsopsætningen, hvor forsøgsfiskene monomentalt udsættes for en række stressfaktorer, når de flyttes fra vaccine-dambrugets kummehus med vand af høj kvalitet og lavt smittetryk til netbure med begrænset bevægelsesfrihed i damme med å-vand af varierende kvalitet og højt smittetryk fra flere patogener samtidig, ikke har været optimal for fiskenes trivsel. I 2. sæson (2005-6) var der kun få udbrud af VHS og de kom så sent på foråret, at sygdomsforløbet som følge af stigende vandtemperaturer blev kortvarigt. Formodentlig af denne grund blev dødeligheden som følge af VHS blandt forsøgsfiskene lav, og effekten af vaccinen mindre markant. Samlet set er det dog klart, at de vaccinerede fisk klarede sig bedre end kontrollerne. Ved smitteforsøg under laboratorieforhold viste DNA-vaccinen generelt god effekt.

MP5 (Fase 3): Evaluering af effektivitet af optimeret plasmid (pBA-Vax-vhsG).

Det optimerede plasmid med promoter fra karpens beta-actin gen i gennemsnit viste sig at give lidt mindre effektiv beskyttelse og færre seropositive fisk sammenlignet med pVax-vhsG, hvor der anvendes en promoter fra CMV-virus. Også under laboratorieforhold viste dosis-respons forsøg, at

der krævedes en større dosis med karpe beta-actin konstruktionen for at opnå effektiv beskyttelse. Uanset at det teoretisk set kunne være en fordel i fødevaremæssig sammenhæng at anvende karpe beta-actin promotoren for at undgå gensekvenser fra et virus, der kan inficere pattedyr, vurderes denne fordel at modvirkes af behovet for en større vaccinedosis, idét man generelt foretrækker så lave vaccinedoser som muligt for at mindske eventuelle bivirkninger. Emnet er dog fortsat relevant for videregående studier, idet det antagelig vil være muligt at indbygge en adjuvant-effekt i DNA vaccinen, således at effekten kan forstærkes. Ligeledes vil det være relevant at afprøve regulerbare promotorer og promotorer, som evt. ikke fungerer i pattedyrceller.

MP6 (Fase 1-3): Projektrapporten for 1. projektår (1. april 2004-30. marts 2005, måned 1-12) er indleveret.

MP8 (Fase 3): Vurdering af DNA vaccins effekt på tilvækst.

Der har i begge sæsoner ikke været nogen synlig/målelig effekt af DNA- vaccination på fiskenes trivsel og tilvækst, vurderet ud fra dødelighed i perioden i kummehusene hhv jævnlige vejninger i forbindelse med overførsel af fisk til challenge på Veterinærinstituttet.

MP9 (Fase 4). Tidsgrænse for persistens af vaccine i fisk.

Bortset fra en kort periode efter vaccination, kan DNA vacciner i reglen kun genfindes på injektionsstedet. I dette tilfælde kunne vaccinen påvises op til godt 3 måneder i fiskenes muskulatur målt ved PCR, hvorefter værdierne var tæt på eller under detektionsgrænsen.

MP10 (Fase 4). Forekomst af DNA vaccine i gonadevæv belyst.

De relevante vævsprøver er udtaget, men på grund af stort ressourceforbrug til selve vaccinationsforsøgene, lykkedes det ikke at færdiganalysere samtlige prøver udtaget til PCR inden for rammerne af dette projekt. Arbejdet søges færdiggjort i andet projektregi.

MP11 (Fase 4). Spredning af DNA til fiskens mikroflora og det omgivende miljø.

Indledende undersøgelser viste mange kanamycin-resistente bakterier i vand og slam fra såvel kummer med kontrol-fisk som kummer med vaccinerede fisk, og i udvalgte bakterie kolonier påvises ikke vaccineplasmid. Ved undersøgelse af tarmfloraen fra vaccinerede fisk (268 dpv) påvises ingen vaccineplasmider. Undersøgelser af fækalier fra vaccinerede fisk i dagene efter vaccination er igangværende.

Der kunne heller ikke påvises vaccineplasmider i "skraldemænd", der er store fisk, som æder fisk der slipper ud fra kummehusene.

I et forsøg med fodring af mink med vaccinerede fisk, kunne der ikke påvises overførsel af vaccineplasmidet til minkenes organer (tarm, milt, nyre, lever, gonader). Fækalier fra minkene efter fodring med vaccinerede fisk er indsamlet. Som ved MP10 resterer PCR analyser heraf og vil blive søgt færdiggjort i andet projektregi.

MP12 (Fase 4). Metode til serologisk identifikation af vaccinerede fisk etableret.

Blod (serum og plasma)- prøverne fra ikke-smittede fisk viste, at frekvensen af seropositive fisk var markant større 1-2 måneder efter vaccination blandt de vaccinerede fisk sammenlignet med kontrolfiskene, og at pVax-vhsG vaccinen gave flere positive fisk sammenlignet med pBA-Vax-vhsG vaccinen. Blandt overlevende fisk var frekvensen af seropositive ligeledes højest blandt vaccinerede fisk. Det ser således ud til at være muligt at skelne mellem vaccinerede og ikke-vaccinerede fisk ved en tilpas stor prøvestørrelse (min. 10 fisk).

MP13 (Fase 1-5): Projektrapport for 2. projektår (måned 13-24 incl., april 2005-31. marts 2006) er indleveret.

MP14 (Fase 1-5): Projektrapport for 3. projektår (måned 25-33 incl, april 2006-31.december 2006) er indeholdt i nærværende slutrapport.

MP15 (Fase 5): Vurdering af mulighederne for kommerciel anvendelse af DNA vacciner til dambrugsfisk.

Det gennemførte projekt indikerer, at DNA vaccination vil kunne give en god beskyttelse mod VHS under kommercielle produktionsbetingelser. De noget varierende resultater kan primært tilskrives, at forsøgsbetingelserne ikke har været optimale, idet forsøgsfiskene ikke har udgjort en del af dambrugenes egentlige besætninger og har måttet holdes indespærret i små netbure. Det faktum at de vaccinerede fisk i nogle netbure klarede sig markant bedre end kontrollerne og at der ikke har kunnet påvises nogen form for negativ effekt på fiskenes trivsel eller tilvækst overhovedet, peger således på at DNA vaccination mod VHS med fordel vil kunne anvendes på dambrug, hvor der er stor risiko for udbrud af virussygdommen. Det vil dog i første omgang være nødvendigt at gennemføre en egentlig klinisk afprøvning, hvor hele eller væsentlige dele af besætningen på dambrug i udsatte områder vaccineres, optimalt alle dambrug ved et udsat åløb. Dette indebærer, at vaccinerede fisk må kunne anvendes til konsum og kræver således at DNA vacciner accepteres på lige fod med andre vacciner til veterinært brug. Endnu anvendes DNA vacciner ikke kommercielt indenfor EU, men i Canada og USA har man godkendt DNA vacciner til hhv. fisk og heste. Det burde således også være realistisk at anvende denne type vacciner i EU.

MP16 (Fase 5): Offentliggørelse af resultaterne i almene og videnskabelige tidsskrifter.

Denne milepæl er igangværende. Resultaterne vil blive offentliggjort i et internationalt og et dansk tidsskrift, når alle prøver er under søgt og resultater er gjort op. Det er også planen at afholde et orienteringsmøde for akvakultur-erhvervet.

Samlet vurdering: Trods den indledningsvise forsinkelse og praktiske problemer omkring krav til procedure for fremstilling af de anvendte vaccinepræparationer, mærkningsmetoder til forsøgsfiskene og uforudset dødelighed som følge af andre sygdomme end VHS i de udsatte forsøgsbure og lavere dødelighed pga. høj temperatur i anden sæson vurderes projektet som helhed at opfylde en stor del af de oprindelige målsætninger.

#### Vurdering af opfyldelse af budget.

Bortset fra en tidsmæssig forlængelse af projektet på 16 måneder er budgettet overordnet set opfyldt, dvs. det givne tilskud er brugt til at opnå de satte mål på bedst mulig vis og efter den oprindeligt planlagte strategi. Dog har DFVF (nu VET-DTU) haft et merforbrug svarende til et tilskud på 342.692 kr, primært som følge af de meget arbejdskrævende vaccinations- og smitteforsøg, der har krævet flere ressourcer end oprindeligt antaget. Derudover var selve proceduren med at få forsøget godkendt af myndighederne, specielt Lægemiddelstyrelsen, væsentlig mere tidskrævende end forventet. Til gengæld har Gene-Care ikke kunnet færdiggøre processen/procesteknologien til fremstilling af plasmid DNA til medicinsk brug i større skala i projektets regi. Dette betyder at Gene-Care mangler at forbruge et tilskud på 129.206 kr. Budgettet for Dansk Akvakultur svarer godt til det faktiske forbrug. *Der anmodes venligst om, at Gene-Care's ikke forbrugte tilskud (129.206) overføres til DFVF (Veterinærinstituttet, DTU), for at dække en del af det her opståede underskud.*

#### **D. For samarbejdsprojekter med flere projektparter redegøres yderligere for:**

- samarbejdsrelationer mellem projektparterne nationalt og eventuelt internationalt, herunder koordinering til andre projekter.

Projektlederen var DFVF (Veterinærinstituttet, DTU). DFVFs samarbejdsrelation til de to andre projektpartnere er følgende:

1. Koordination af projektaktiviteterne, herunder afholdelse af projektmøder, resultatindsamling og rapportskrivning.
2. Løbende underretning af Fødevarerstyrelsens sektion for Akvakultur i Vejle om forsøgsplaner og -aktiviteter.
3. Udføre vaccination af fisk, løbende tilsyn og prøveudtagning.
4. Deltage i smitteforsøg under feltforhold.
5. Lave smitteforsøg med vaccinerede fisk (som transporteres fra dambrug til laboratorium) under laboratoriebetlinger.

Dansk Akvakulturs opgave i projektet var, i samarbejde med veterinærmyndighederne (Fødevarerstyrelsen i Vejle) og at udvælge de dambrug, der på det givne tidspunkt var mest velegnede til at indgå i projektet. Dansk Akvakultur og deres medlemmer varetog følgende opgaver i projektet:

1. Leverer fisk og foder.
2. Stille dambrugsfaciliteter til rådighed
3. Pasning af forsøgsfisk på dambrug.
4. Dyrlægetilsyn med forsøgsfisk (Dansk Akvakulturs dyrlæge)
5. Medvirke ved smitteforsøg under feltforhold (vaccinerede fisk nedsænkes i lukkede netbure på dambrug med VHS).
6. Sende forsøgsfisk til destruktions.

GeneCares (GC) opgaver i projektet var som følger:

1. Produktion af DNA til vaccinationsforsøg
2. Optimering af procesteknologi for fremstilling af plasmid DNA til vaccine.

Foruden nærværende projekt, samarbejder Dansk Akvakultur og DFVF i nationale projekter omkring sygdomsdiagnostik, pt. med fokus på bakteriel nyresyge, også kaldet BKD. DFVF samarbejder internationalt med Istituto Zooprofilattico della Venezia (Padova afdeling) i Italien og Clear Springs Foods Inc. i Idaho, USA, i et projekt støttet af den Italienske regering omkring afprøvning af en DNA vaccine mod virussygdommen IHN. Der er stor interesse for nærværende DFFE-støttede projekt blandt dambrugere i Norditalien og det italienske projekt giver gode muligheder for gensidig udnyttelse af erfaringer med hhv. vaccination mod VHS og mod IHN.

I foråret 2005 er et stort EU-støttet forskningsprojekt med 22 deltagende institutioner fordelt på 9 lande og med fokus på forbedret sygdomsimmunitet hos akvakulturdyr (Improved Immunity of Aquacultured Animals, "IMAQUANIM") blevet iværksat med DFVF som koordinator. Dette projekt inkluderer ikke vaccineafprøvning under feltforhold, men supplerer nærværende projekt ved bl.a. at fokusere på klarlægning af hvilke forsvars-mekanismer DNA-vaccination virker gennem.

- om alle parter har opfyldt deres økonomiske tilsagn. Eventuelt underforbrug hos en eller flere projektparter forklares.



Alle deltagerne har opfyldt deres økonomiske tilsagn om procent-vis medfinansiering. Dog har Gene-Care, jvf. ovenfor, brugt færre midler end oprindeligt budgetteret, fordi det af tekniske årsager ikke har været muligt at færdigetablere procesteknologien til fremstilling af plasmid DNA til medicinsk anvendelse (anskaffelse af nødvendigt apparatur/udstyr til etablering af produktionsfacilitet forsinket). For Dansk Akvakultur er der balance mellem budget og forbrug, mens der hos DFVF (VET-DTU) har været et merforbrug som følge af større ressourceforbrug end planlagt i projektets essentielle faser (godkendelsesproces og specielt det praktiske arbejde i forbindelse med vaccine-afprøvning under feltforhold), jvf. ovenfor.

### **E: Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:**

Der kan på nuværende tidspunkt ikke direkte udledes en erhvervs- og samfundsmæssig betydning af projektets resultater. Men projektet har skabt et godt grundlag for, at en ny vaccine teknologi som DNA-vaccination kan finde anvendelse indenfor akvakultur i Danmark. Såvel dambrugere som andre involverede har haft en positiv indstilling til og interesse for projektet. Samme forhold har gjort sig gældende ved orienteringsmøde og pressemeddelelser og andre offentliggørelser. Kombineret med at resultaterne samlet set er faldet rimeligt positivt ud, er der basis for at gennemføre en egentlig klinisk afprøvning i fuld skala, dvs. hvor hele eller dele af besætninger på udsatte dambrug vaccineres, optimalt alle dambrug ved et åløb med risiko for VHS. Dette vil dog i første omgang kræve godkendelse fra sundheds- og fødevarermyndighederne til, at DNA-vaccinerede fisk kan anvendes til konsum på lige fod med fisk, der er vaccineret med traditionelle vacciner.

I Danmark forsøger man pt. at få udryddet VHS gennem tørlægning af inficerede dambrug. Det er imidlertid klart, at en effektiv vaccine vil være et meget nyttigt værktøj dels til i en periode at nedsætte risikoen for tilbagefald i udsatte områder, og dels til at nedsætte risikoen for at eventuelle tilbagefald ødelægger muligheden for de ramte dambrugere til at oppebære en rentabel produktion. Ud fra et dyreetisk og -vældfærdsmæssigt synspunkt, vil anvendelse af vaccination frem for nedslagning og tørlægning ligeledes være at foretrække, ligesom vaccination vil kunne reducere den miljøbelastning, som opstår i forbindelse med tabt produktion.

I forhold til at komme videre med en egentlig klinisk afprøvning, er det relevant, at Den Europæiske Fiskerifond nu har åbnet op for at fondens midler kan anvendes til tiltag omkring forbedret sygdomsbeskyttelse, herunder implementering af ny vaccineteknologi. Der er derfor mulighed for, at søge en afprøvning i klinisk skala finansieret ad denne vej.

### **F: For forskningsprojekter suppleres med:**

- Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer til offentlige og private forskningsmiljøer, erhverv m.m.

Udover hvad der er nævnt under pkt.D, er der samarbejde med KVL (KU Life Science), DFU i Hirtshals og København, samt akvakulturerhvervet og Statens Husdyrbrugsforsøg i Foulum (nu under Århus Universitet), bl.a. i et projekt finansieret af DFFE vedr. fishwelfare ("Strategies to improve health and fishwellfare in rainbow trout farming", projektnr: 3304-FFS-06-0461-03 ). Med Foulum er der endvidere samarbejde omkring et post-doc projekt vedr. genetiske forskelle i forskellige familier af dambrugsørreder i relation til smitte og / eller vaccination med VHSV.

- Redegørelse for forskeruddannelse herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering.

Der har ikke været nogen forskeruddannelse eller lign i forbindelse med dette projekt, da det har krævet en solid erfaring inden for smitteforsøg med VHSV.

- Et resume på engelsk (maks. 1 A4-side).

The project includes field-testing of a DNA-vaccine against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout. First, the relevant Danish authorities have been asked for permission to perform the field-testing. Then field-testing was performed in two consecutive seasons, including 2x4 field-exposures in 7 VHS-infected farms. The vaccinated and control-vaccinated fish were transferred to 6 net-cages at each VHS-farm. In some farms the groups were mixed, in others they were kept separately. In some of the net-cages a typical outbreak of VHS occurred, and in these cages a clear-cut protective effect of the vaccine was observed. However, at all farms, other infections like parasites (*Costia necator*) or bacteria (vibriosis (*Vibrio anguillarum*), enteric red mouth disease (ERM, *Yersinia ruckeri*) or furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) or poor water conditions occurred in several cages during the exposure period, which complicated establishment of the part of the total mortality caused by VHSV in these cages. In the second season the water temperatures were rather high. This resulted in lower mortality due to VHSV and hereby limited the beneficial effect of the vaccine. However, all things considered, the vaccinated fish performed better compared to the control-vaccinated fish. During the period from vaccination until VHS-exposure the vaccinated and control-vaccinated fish performed equally well concerning mortality and weight gain.

Studies on the persistence of the vaccine-plasmid at the injection site showed that the plasmid could be demonstrated about 3 months following injection. The plasmid could not be found in faeces from vaccinated fish 268 days post vaccination or in faecal casts in the bottom of the trays where the fish were kept following vaccination and until VHS-exposure, neither in tissues in large fish eating escaped fish from the trays. An experiment including feeding of mink with fish vaccinated with a high dose DNA-vaccine showed no transfer of the plasmid to the organs of the fish (gut, kidney, spleen, liver and gonads).

Blood samples taken at different timepoints following vaccination from all groups of fish showed that 1-2 months post vaccination the frequency of seropositive fish was significantly higher among vaccinated fish compared to control fish, and that the sample must include at least 10 fish, if the method is to be used to differentiate vaccinated from non-vaccinated fish.

The conclusion is that the DNA-vaccine against VHS seems to work well under field conditions, even if it does not protect against other infections. A testing including a whole fish farm or several ponds at a farm with recurrent outbreaks of VHS would be optimal for further testing (and the fish may also be vaccinated against the bacterial diseases with commercial vaccines). The fact that the vaccineplasmid could not be demonstrated in mink fed vaccinated fish may make use of DNA-vaccination more acceptable in farmed animals.

## **G. Redegørelse for projektets perspektiver:**

Som anført under pkt. E, forventes projektets resultat at kunne danne platform for en egentlig klinisk afprøvning af DNA-vaccination mod VHS. Dette vil sandsynligvis blive søgt finansieret helt eller delvist gennem midler fra Den Europæiske Fiskerifond. På sigt vil muligheden for at kunne vaccinere mod VHS være et væsentligt aktiv for mulighederne for at drive kommerciel akvakultur i områder, hvor der opstår tilbagefald af sygdommen.

## H. Projektets økonomiske forløb:

Er der afvigelser i forhold til de opstillede budgetter?

I forhold til budgettet har det været nødvendigt at ændre noget på de anvendte medarbejder kategorier, således at der både hos DFVF og Dansk Akvakultur er blevet brugt medarbejdere med højere kvalifikationer end planlagt i budgettet. Dette skyldes at kravene til udførelsen af arbejdsopgaverne i projekt har været nødvendiggjort anvendelse af medarbejdere med mere uddannelse. For GeneCare's vedkommende anmodes af administrative årsager om tilladelse til at postere lønudgiften som ekstern bistand (timer m.m. er specificeret) i stedet for som direkte lønomkostninger.

Vedrørende sammenhæng mellem budget og regnskab (også angivet under pkt. C) :

Bortset fra en tidsmæssig forlængelse af projektet på 16 måneder er budgettet er overordnet set opfyldt, dvs. det givne tilskud er brugt til at opnå de satte mål på bedst mulig vis og efter den oprindeligt planlagte strategi. Dog har DFVF (nu VET-DTU) haft et merforbrug svarende til et tilskud på 342.692 kr, primært som følge af de meget arbejdskrævende vaccinations- og smitteforsøg, der har krævet flere ressourcer end oprindeligt antaget. Derudover var selve proceduren med at få forsøget godkendt af myndighederne, specielt Lægemiddelstyrelsen, væsentlig mere tidskrævende end forventet. Til gengæld har Gene-Care ikke kunnet færdiggøre processen/procesteknologien til fremstilling af plasmid DNA til medicinsk brug i større skala i projektets regi. Dette betyder at Gene-Care mangler at forbruge et tilskud på 129.206 kr. Budgettet for Dansk Akvakultur svarer godt til det faktiske forbrug. *Der anmodes venligst om at Gene-Care's ikke forbrugte tilskud (129.206) overføres til DFVF (Veterinærinstituttet, DTU), for at dække en del af det her opståede underskud.*

## I. Liste over publikationer mm., der er et direkte resultat af projektet:

Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter, indlæg ved kongresser, symposier o.lign., faglige artikler eller anden formidling, f.eks. mødeindlæg, åbent hus m.m. eller eventuelle planlagte publikationer og artikler, som indsendes løbende, når de er accepteret.

Eventuelle afhandlinger vedlægges i ét eksemplar eller eftersendes, når de foreligger.

- 1) Der blev 30/9-04 udsendt en pressemeddelelse om projektet.
- 2) Der blev holdt informationsmøde / åbent hus om projektet for dambrugere, amterne, sportsfiskerne og andre interesserede på Hotel Bredehus i Bredsten den 6/10-04.
- 3) Projektet blev præsenteret af Niels Lorenzen på et SCOFDA-møde i København i november 2004 (SCOFDA er et forskernetværk og en forskerskole, en forkortelse af "Sustainable Control of Fish Diseases in Aquaculture").
- 4) Projektet og resultaterne blev præsenteret af Niels Lorenzen på to seminarer og workshops for forskere, veterinærstuderende, dyrlæger og dambrugere i Italien i 2005 og 2006 (Abano University), i forbindelse med et Italiensk støttet samarbejdsprojekt. ("Vaccination against VHS in rainbow trout: Experiments and perspectives related to practical fish farming")

- 5) En alment rettet artikel, der beskriver forskningsarbejdet med DNA-vaccination af fisk, herunder også nærværende projekt, er publiceret i Dansk Kemi, 85, nr. 10, 2004 ("Nucleinsyre-baseret vaccine til dambrugsfisk").
- 6) Projektet samt resultaterne fra de første smitteforsøg på dambrugene og parallel-forsøg i laboratoriet blev præsenteret af Niels Lorenzen på EAFP-konferencen i september 2005 i København ("DNA vaccination against VHS in rainbow trout: does it work under field conditions?" N. Lorenzen, E. Lorenzen, J. S. Rasmussen, K. Einer-Jensen, T. E. Kjær, E. Ingerslev, H. Korsholm and N. H. Henriksen). EAFP er en forkortelse af "European Association of Fish Pathologists").
- 7) Projektet samt resultaterne fra de første smitteforsøg på dambrugene og parallel-forsøg i laboratoriet blev præsenteret af Katja Einer-Jensen på SCOFDA-mødet i november 2005 i København (DNA vaccination against VHS in rainbow trout: does it work under field conditions? N. Lorenzen, E. Lorenzen, J. S. Rasmussen, K. Einer-Jensen, T. E. Kjær, E. Ingerslev, H. Korsholm and N. H. Henriksen).
- 8) N. Lorenzen, Dansk Virologisk Selskab. Foredrag d. 7/11 2006: "A DNA vaccine against a fish rhabdovirus"
- 9) Projektet har medvirket til følgende publikation i et internationalt tidsskrift: Lorenzen N & LaPatra S E (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24:201-210
- 10) Projektet samt resultaterne fra laboratorie smitteforsøg og felteksponeringer mv. blev præsenteret af Niels Lorenzen på Noffi-møde (Nordisk Forening For Fiskeimmunologi) i Stirling 18-22. maj 2007 ("DNA vaccination against VHS in rainbow trout: does it work under field conditions?" N. Lorenzen<sup>1</sup>, E. Lorenzen<sup>1</sup>, J. S. Rasmussen<sup>1</sup>, K. Einer-Jensen<sup>1</sup>, T. E. Kjær<sup>1</sup>, E. Ingerslev<sup>2</sup>, H. Korsholm<sup>3</sup> and N. H. Henriksen<sup>4</sup>)

## **J. Uddybende beskrivelse af projektets forløb og opnåede resultater (maks. 5 A4-sider):**

**Felteksponeringer af vaccinerede fisk i 2005:** Der indgik 4 grupper af vaccinerede / kontrol fisk i første sæson (2004-5) af feltforsøget: pVax-vhsG, pVax (tom vektor), pBA-Vax-vhsG (optimeret vaccineplasmid) og unhandled. Resultaterne har generelt været præget af stor variation mellem parallelle bure hvad angår beskyttelsen af de vaccinerede fisk, og en del af dette skyldes at andre årsager end VHSV har bidraget til dødeligheden. Således har dårlig vandkvalitet og parasitangreb flere gange spillet ind. Ved alle 4 eksponeringer har der imidlertid været bure, hvor vaccinen har virket tilfredsstillende, alle forhold taget i betragtning.

Figurmaterialet (Fig 1-5) illustrerer en del af de opnåede resultater i form af nedsat dødelighed blandt de vaccinerede fisk. Angivelserne øverst på hver figur henviser til feltforsøgs nr ("Field x"), bur nr ("Cage x"), oprindelsesdambruget for de vaccinerede fisk (R eller K) og antal dage efter vaccination, hvor fiskene blev udsat på dambrug med VHS i udbrud. Eksponering af vaccinerede fisk for VHS under dambrugsforhold blev foretaget i alt 4 gange (Field 1-4) i projektperioden, og inkluderede 3 forskellige dambrug med udbrud af

VHS. Det generelle billede er, at de vaccinerede fisk klarede sig bedre eller lige så godt som kontrollerne. Der var således ved alle 4 feltforsøg bure, hvor de vaccinerede fisk overlevede markant bedre end kontrollerne. Selvom de anvendte netbure, som følge af deres begrænsede størrelse i en del tilfælde har skabt et for fiskene uheldigt nærmiljø, således at div. andre sygdomme end VHS (bakterier eller parasitter (især *Costia*) og/eller fysisk-kemiske parametre har påvirket sundheden, er det gennemsnitlige billede for første sæson en positiv effekt af vaccinen. Fig. 5 illustrerer de anvendte vacciners effekt ved afprøvning under laboratorieforhold.

Fig.1, VHS-dambrug B (25dage efter udsætning påvistes massiv infektion med parasitten *Costia*)

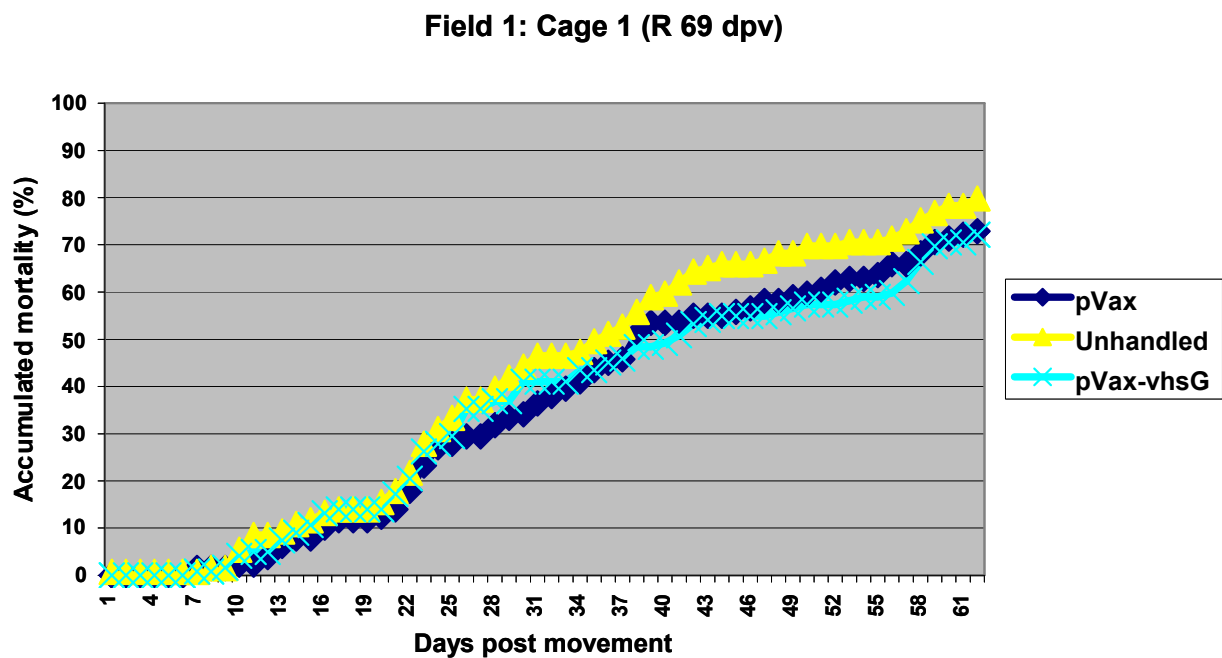


Fig. 2, VHS-dambrug B (25dage efter udsætning påvistes massiv infektion med parasitten *Costia*).

Field 1: Cage 5 (K 56 dpv)

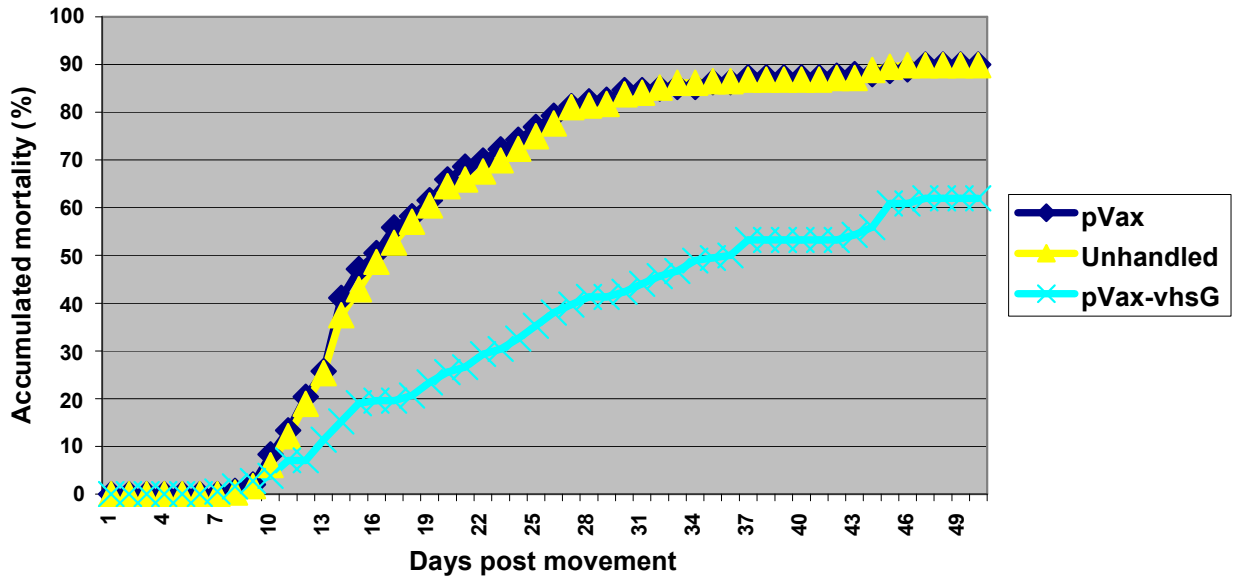


Fig. 3. VHS-dambrug F2 (13 dage efter udsætning påvistes infektion med parasitten Costia).

Fig. 4. VHS-dambrug F2 (13 dage efter udsætning påvistes infektion med parasitten Costia).  
Field 3: Cage 6 (K 104 dpv)

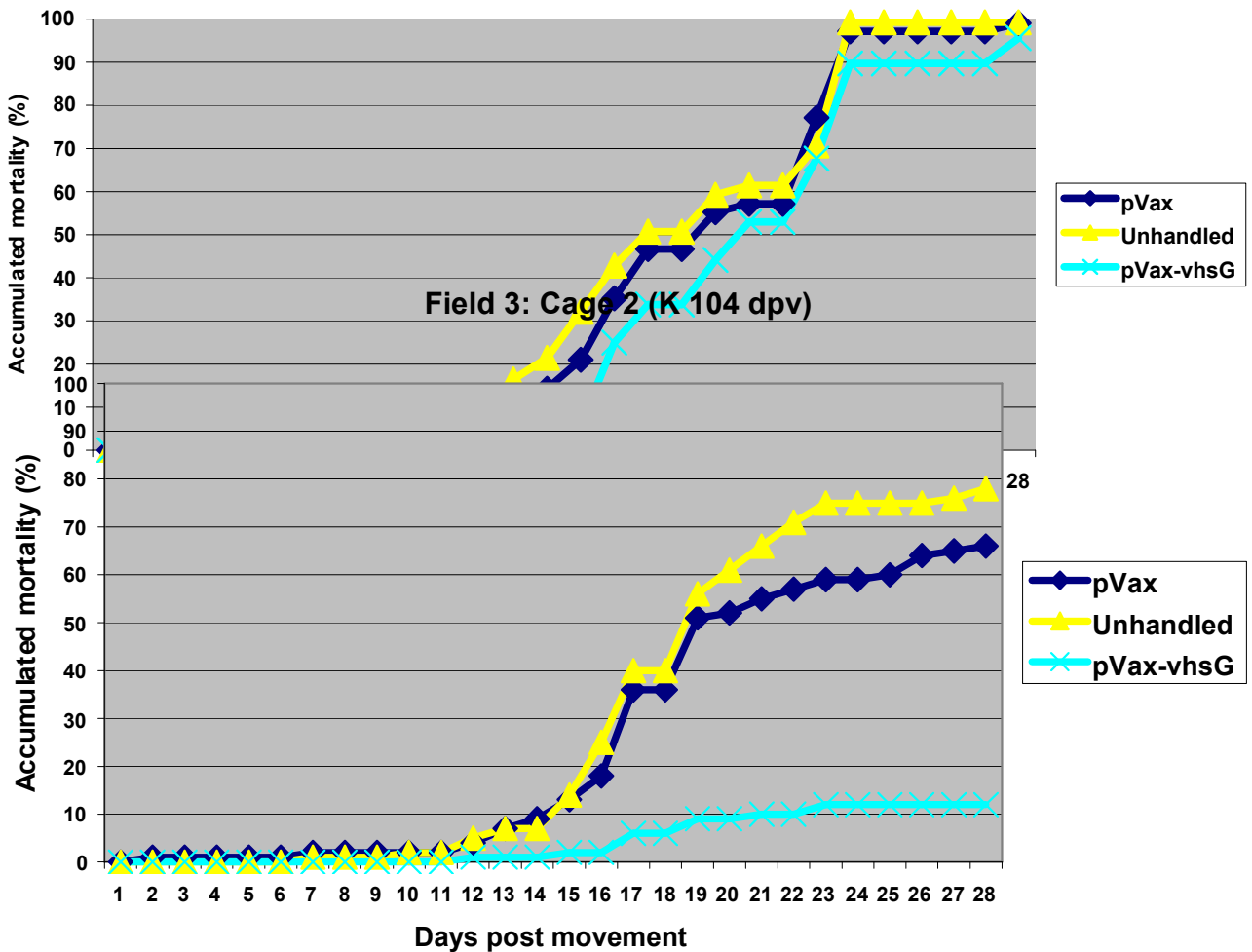
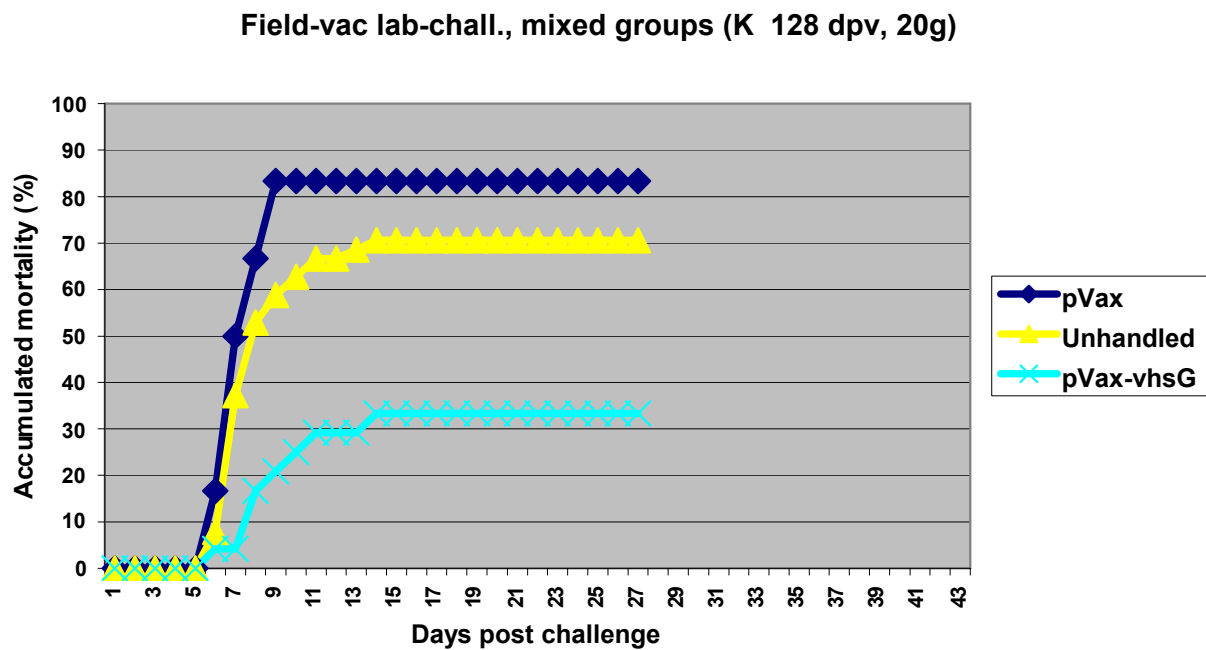


Fig. 5. VHS-challenge af feltforsøgsfisk, på Veterinærinstituttet.



**Felteksponeringer af vaccinerede fisk i 2006.** Forsøgsopstillingen blev forenklet ifht første sæson, idét der kun indgik 2 grupper fisk: pVax-vhsG (vaccinerede) og NaCl (kontrol), da det sikkerhedsmæssigt optimerede vaccineplasmid pBA-Vax-vhsG i første sæson viste sig mindre effektivt under såvel felt- som laboratorieforhold. De vaccinerede fisk fik afklippet fedtfinnen (-ff), mens fiskene der blot havde fået NaCl ikke blev mærket (+ff).

Sæsonen 2006 var som udgangspunkt noget anderledes end normalt mht VHS, idét der kun kom ganske få nye VHS-udbrud, og disse udbrud kom relativt sent på foråret eller først på sommeren. Forsøgsfiskene blev derfor først udsat på VHS-inficerede anlæg meget sent i forløbet, da vandtemperaturen allerede var forholdsvis høj. Fiskene blev udsat på 2 indpumpningsanlæg (brakvand) og på to ferskvandsdambrug. Fiskene, der blev udsat på brakvandsdambrugene, var forinden blevet dypvaccineret mod vibriose (Gram-negativ fiskepatogen bakterie, findes i brakvand og saltvand), som var et tilbagevendende problem på disse anlæg.

*Generel konklusion for sæsonen 2006:* Ved alle 4 felt-eksponeringer (tabel 1 + fig.6) og de 4 laboratorie-smitteforsøg (fig. 7) klarede de vaccinerede fisk sig bedre end kontrol-fiskene, uanset at der på alle dambrug var tilstedende bakterieinfektioner (vibriose, rødmundsyge) og på brakvandsdambrugene desuden meget høje temperaturer (23-25°C = letal temperatur) som også bidrog til dødeligheden. Dog var dødeligheden i alle tilfælde lav, netop pga generelt høje vandtemperaturer (13-20 °C) hele foråret.

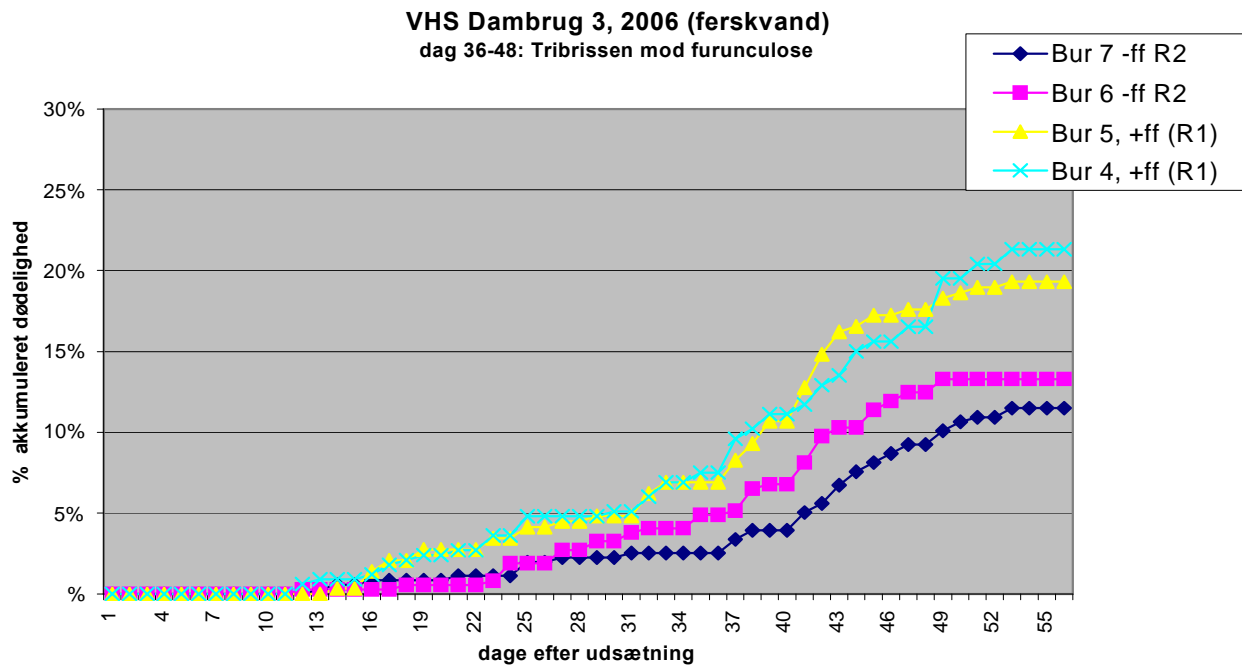
**Tabel 1. VHS dambrug 2, 2006 (LS, brakvandsdambrug, 165 dpv)**

Fiskegruppe	08.05-03.06.06	03.06-02.07.06
R1 (NaCl)	31.1 %	
R2 (pVax-vhsG)	19.9 %	
K1 (NaCl)		(2.8 %)
K2 (pVax-vhsG)		(2.5 %)

(dødelighed angivet i % af totalt antal vaccinerede/ikke-vaccinerede fisk i hver gruppe).

**Fig. 6. VHS dambrug 3, 2006 (B, ferskvand, 175 dpv)**

(dag 33 efter udsætning påvist bakterieinfektion furunculose)







<b>Days post vaccination (dpv)</b>	<b>11</b>	<b>25</b>	<b>68</b>	<b>102</b>	<b>151</b>	<b>217</b>	<b>223</b>
Slam <sup>2)</sup>	< 40	< 40	< 40	< 40	< 40	< 40	< 40
Skraldemænd <sup>3)</sup> :			<b>68 dpv</b>				
Muskel			8				
Gonade			0				
Lever			5				
Nyre			0				

1) Antal vaccineplasmid / 1000 kopier bata-actin (2006)

2) Antal vaccineplasmid / 5 µg slam (2006)

3) Antal vaccineplasmid / 1000 kopier bata-actin (2005)

*Udtagning af fækalie-prøver fra vaccinerede fisk:* For at undersøge evt. overførsel af antibiotika-resistens (kanamycin) fra de vaccinerede fisk til bakterier i miljøet, blev der udtaget fækalieprøver fra vaccinerede og kontrol fisk fra dambrug K 268 dpv. Prøverne blev sået ud på agar-plader med kanamycin og de fremvoksede kanamycin resistente kolonier blev undersøgt vha PCR. Der blev ikke påvist vaccineplasmid i kolonierne. Undersøgelse af fækalier fra vaccinerede fisk kortere tid efter vaccination er ved at blive undersøgt i forbindelse med mink-forsøget.

*Overførsel af vaccineplasmid fra fisk til konsument (mink):* For at undersøge om vaccineplasmidet kunne overføres fra vaccinerede fisk til en konsument blev 4 mink fodret med fisk, der forinden (dag 1) havde fået høj dosis vaccineplasmid (10 µg) og 2 mink blev fodret med naive fisk, i 5 dage. I fodrings-dagene samt 10 og 17 dage efter sidste fodringsdag blev fækalier opsamlet fra minkene opsamlet mhp undersøgelse for kanamycin-resistente bakterier (der igen skal undersøges for tilstedeværelse af vaccineplasmid). Disse prøver er under undersøgelse. Halvdelen af minkene blev aflivet 5 dage efter sidste fodringsdag, halvdelen 18 dage efter sidste fodringsdag. Organer (tarm, milt, nyre, lever og gonader) blev udtaget til undersøgelse for vaccineplasmid. Der blev ikke påvist vaccineplasmid i nogle af prøverne.

*Udtagning af serum-prøver (Tabel 3+4):* Med henblik på at undersøge, om det er muligt serologisk at skelne vaccinerede fisk fra ikke-vaccinerede fisk, blev der udtaget blodprøver (samtidigt med prøverne til PCR, 6 fisk fra hver gruppe i 2005-6, 10 i 2005). Ikke alle prøver er helt færdigundersøgt endnu. Tendensen er klart, at der er flere sero-positive fisk blandt de vaccinerede fisk og også flere positive fisk blandt fisk vaccineret med pVax-vhsG sammenlignet med fisk vaccineret med pBA-Vax-vhsG. Andelen af positive kontrolfisk i nogle grupper indikerer dog, at prøvestørrelsen skal være minimum 10 fisk og at årstiden og, hvis muligt, tidspunkt efter vaccination skal tages i betragtning (positive kontroller har generelt lave titre og skyldes muligvis en krydsreaktion). Blodprøver udtaget fra overlevende fisk på de 4 VHS-dambrug viste, at der generelt var mere end dobbelt så mange positive vaccinerede fisk som positive kontrol fisk.

**Tabel 3. Serumprøver. Feltforsøg, 1. sæson, 2005** (vaccination 9+10 februar (K))

farm	Timepoint pv	0	19dpv	34 dpv	58dpv	77dpv	119dpv
K	K1:pVax		<b>0%+</b>		<b>0%+</b>	<b>10%+</b>	
	K2:pBA-vax-vhsG		<b>0%+</b>		<b>0%+</b>	<b>30%+</b>	<b>0%+</b>
	K3:unhandled		<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>10%+</b>
	K4: pVax-vhsG		<b>0%+</b>	<b>14%+</b>	<b>20%+</b>	<b>10%+</b>	<b>40%+</b>

**Tabel 4. Serumprøver. Feltforsøg, 1. sæson, 2005** (vaccination 11+12 januar (R))

farm	Timepoint pv	0	43dpv	56 dpv	71dpv	105dpv	147dpv	272 dpv
R	K1:pVax	<b>0%+</b>	<b>10%+</b>	<b>10%+</b>	<b>0%+</b>	<b>10%+</b>	<b>10%+</b>	
	K2:pBA-vax-vhsG	<b>0%+</b>	<b>20%+</b>	<b>30%+</b>	<b>11%+</b>	<b>20%+</b>	<b>10%+</b>	
	K3:unhandled	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>10%+</b>	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	
	K4: pVax-vhsG	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>0%+</b>	<b>20%+</b>	<b>40%+</b>	<b>40%+</b>	

I tabellen angives procent positive serum prøver ud af udtagne prøver (normalt 10 fisk).

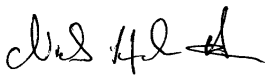
---

**9. Underskrifter og dato** (suppleret med navn, titel og institution/virksomhed i blokbogstaver):

Niels Lorenzen, seniorforsker, VETERINÆRINSTITUTTET, DTU

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_

Niels Henrik Henriksen, dyrlæge, DANSK AKVAKULTUR



\_\_\_\_\_ den 9. august 2007

Esben Ingerslev, direktør, GENE CARE Aps

\_\_\_\_\_ den \_\_\_\_\_