

# Jakten på krepsepesten!



David A. Strand & Trude Vrålstad



**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute

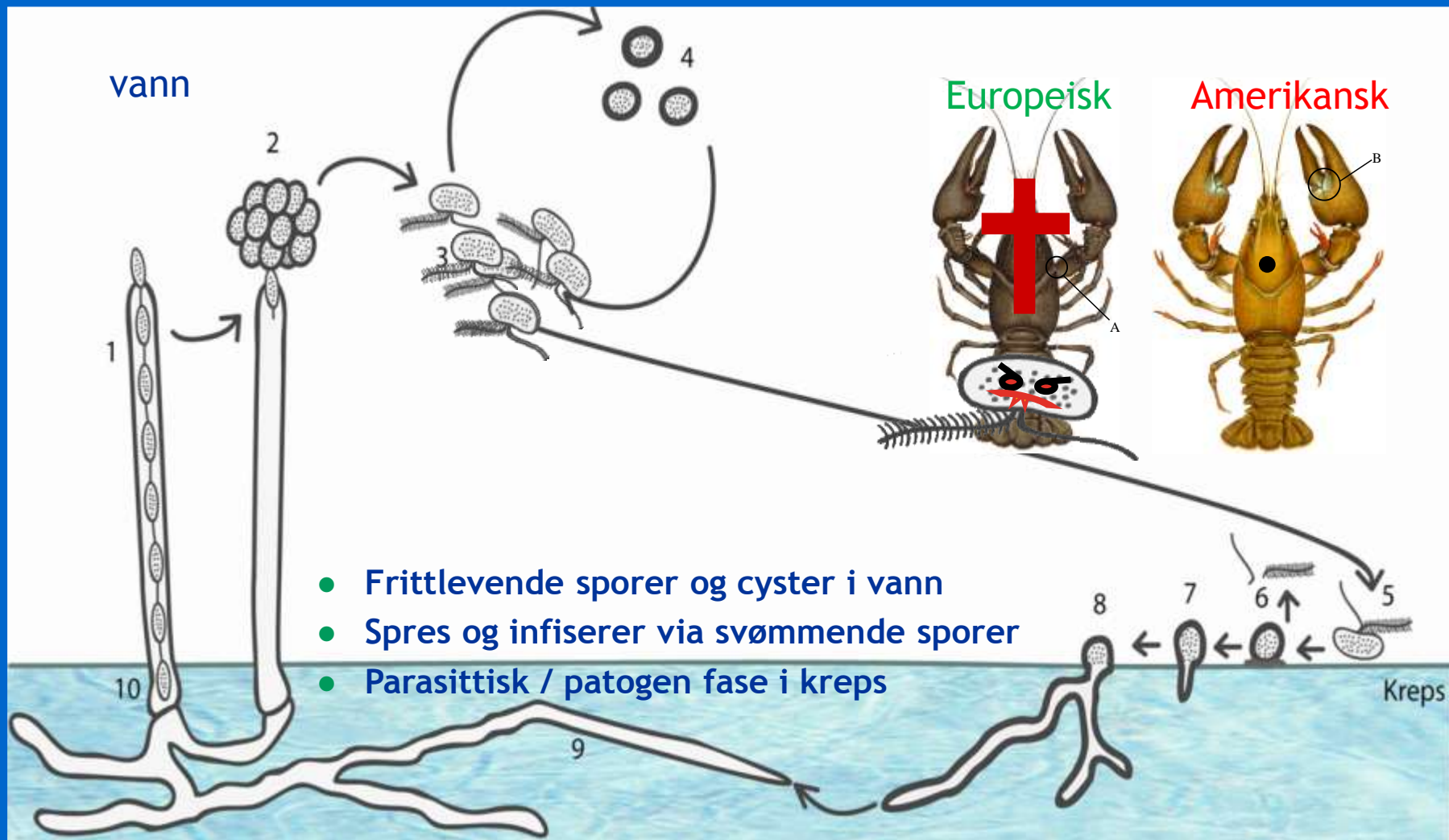
Nasjonell Kräftkonferens,  
Jönköping,  
27-28 november 2013

# Oversikt

- **Innledning**
  - Krepsepest
    - Hva er krepsepest
    - Molekylære verktøy
- ***A. astaci* på Krep**
  - Prevalens og agensnivå
- ***A. astaci* sporer i vann**
  - På lab og i akvariet
    - Deteksjon av sporer
    - Sporer fra bærerkreps (Signalkreps)
    - Sporer fra infisert edelkreps
  - I felt
    - Vann med bærer kreps
    - Krepsepest utbrudd
- **Andre resultater**
  - Alternative verter
  - Historiske utbrudd

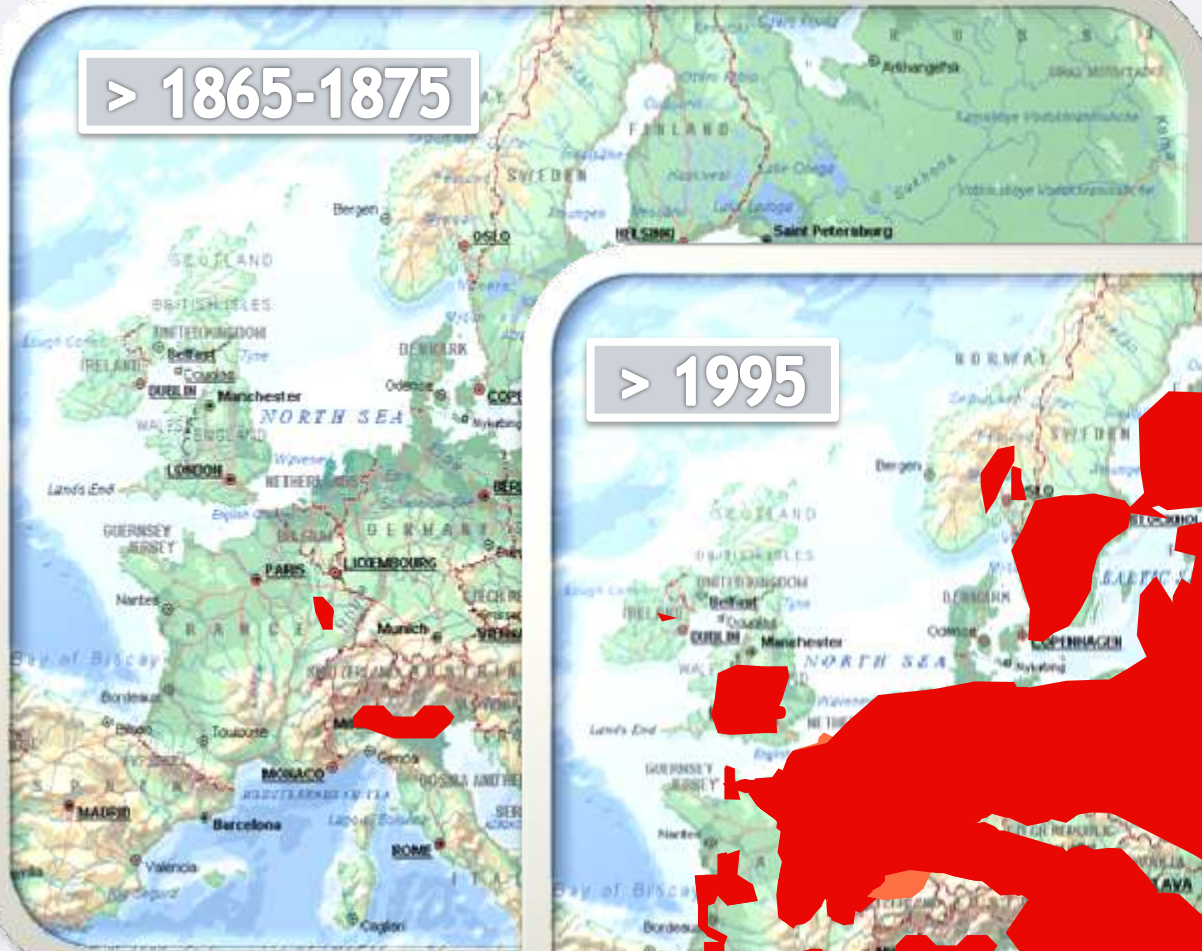


# *Aphanomyces astaci* - krepsepest

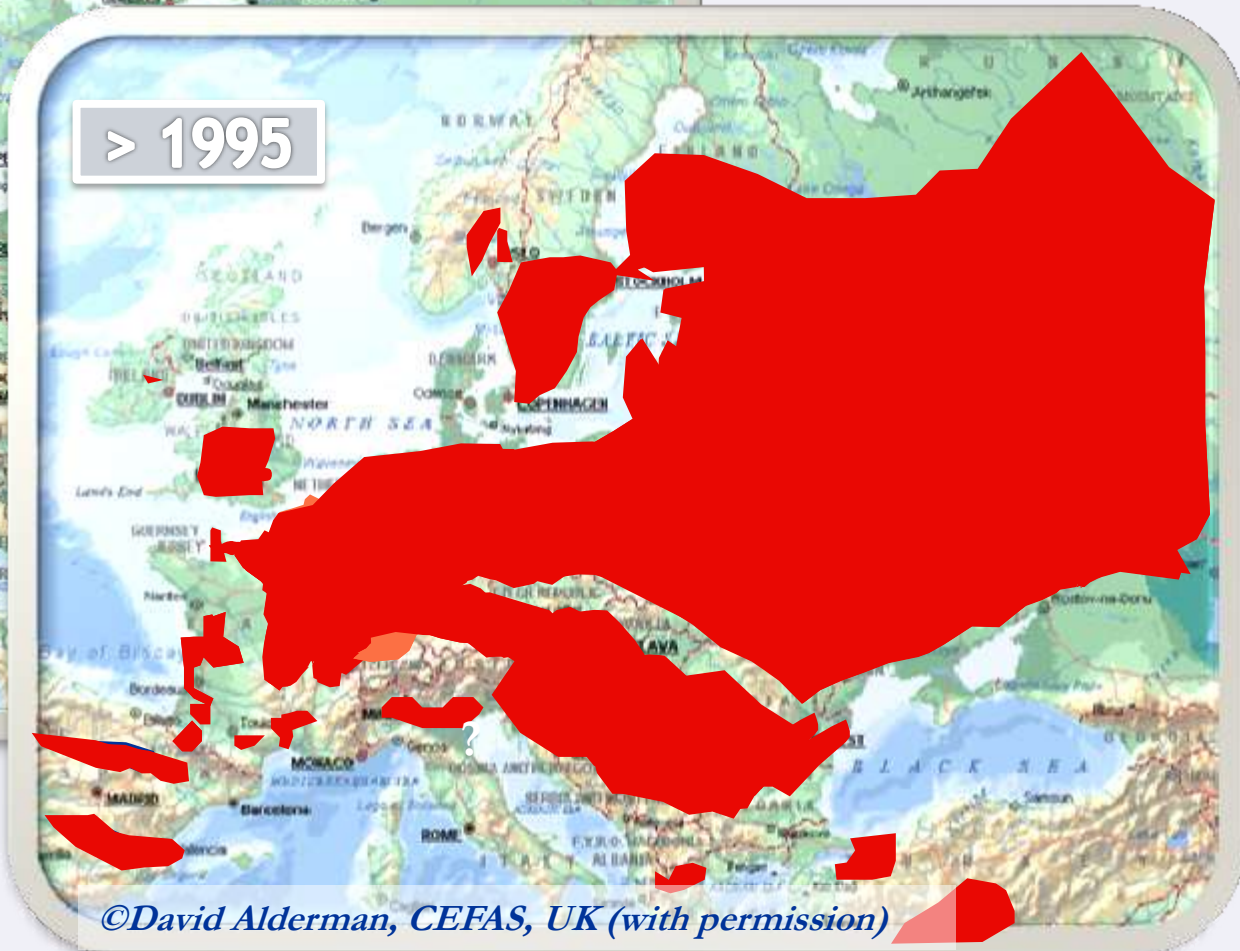


# Spredning av krepsepest i Europa

> 1865-1875



> 1995

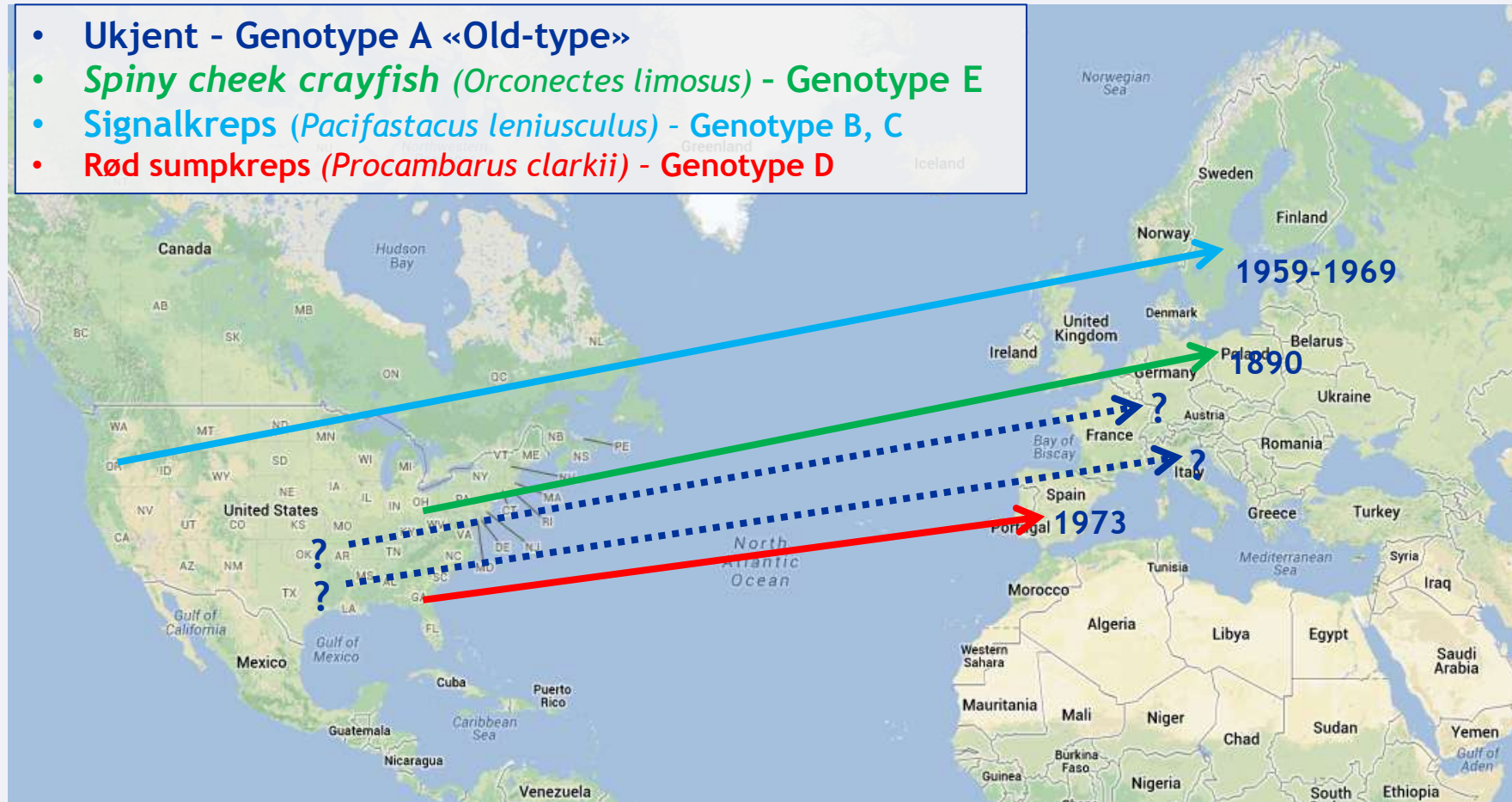


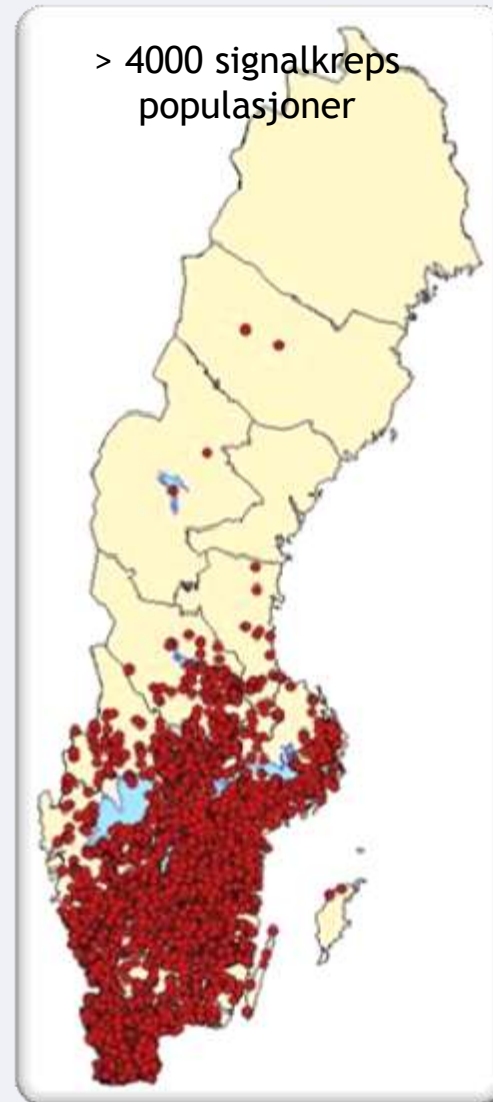
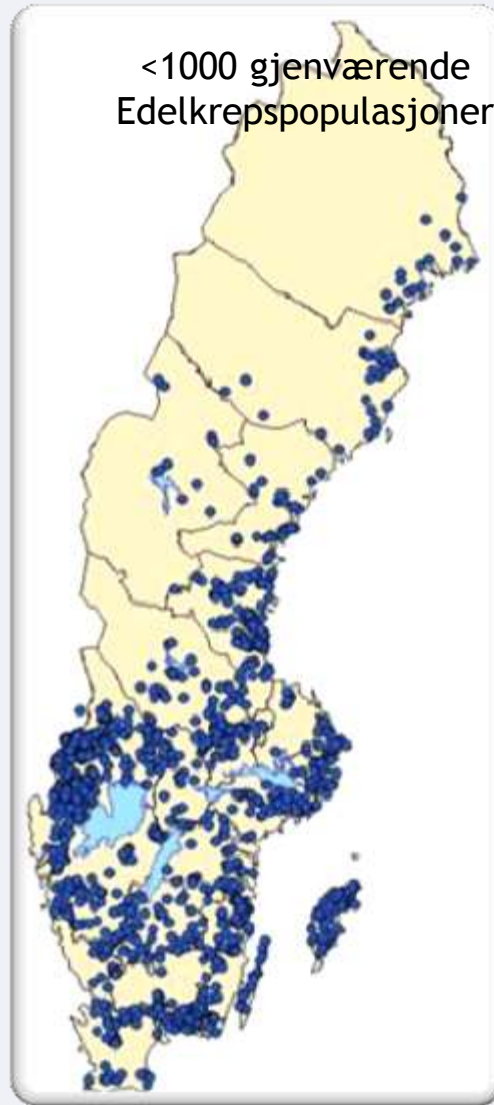
©David Alderman, CEFAS, UK (with permission)



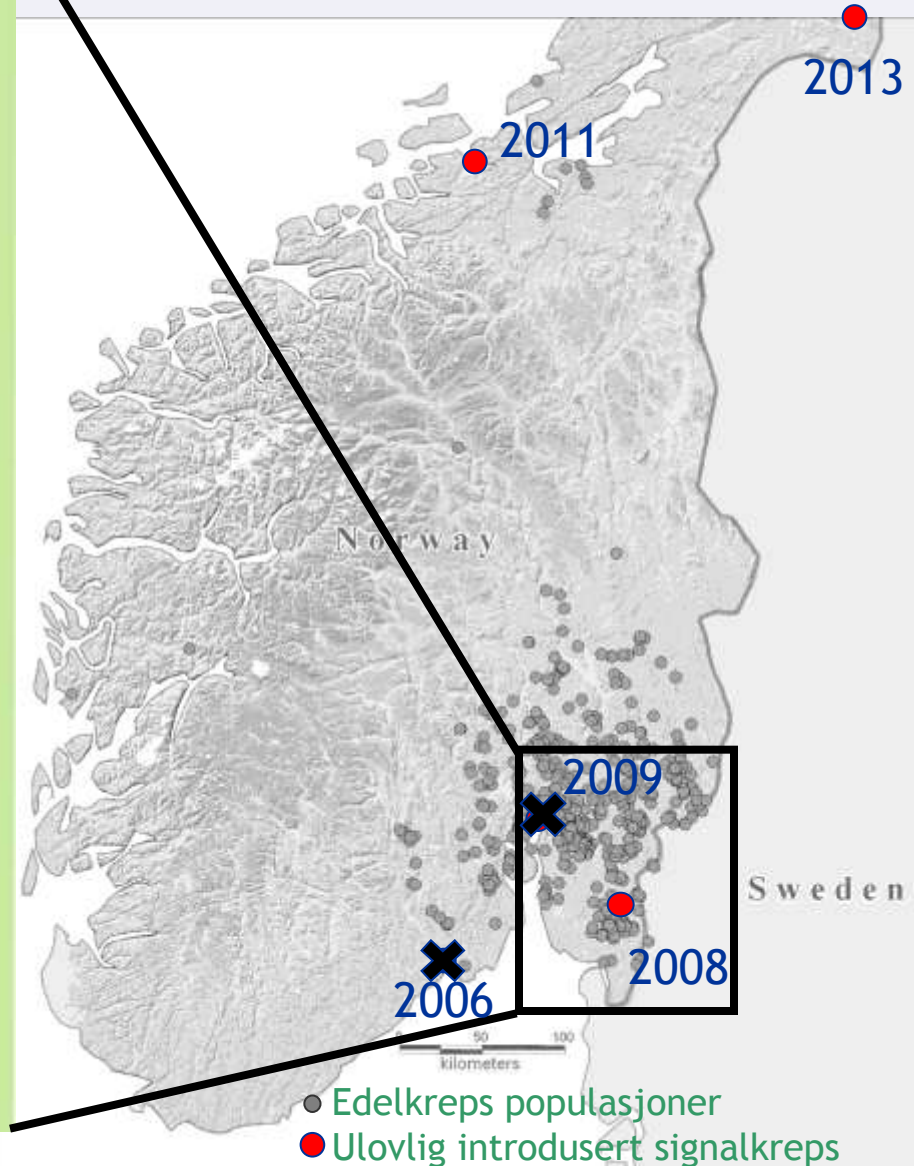
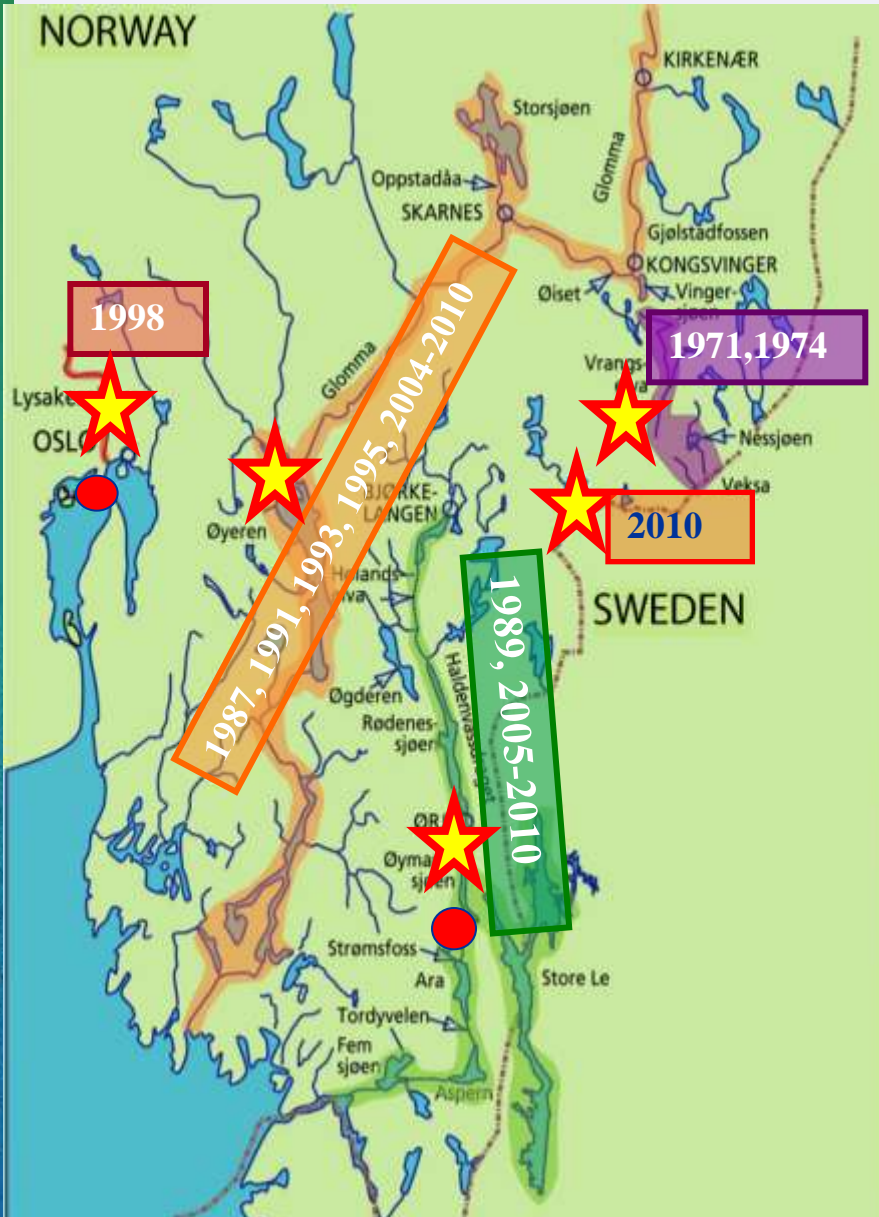
# Krepsepestens opprinnelse

- Ukjent - Genotype A «Old-type»
- *Spiny cheek crayfish* (*Orconectes limosus*) - Genotype E
- Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*) - Genotype B, C
- Rød sumpkrepes (*Procambarus clarkii*) - Genotype D





# Krepsepest i Norge



# Den gamle verktøykassen for Krepsepest diagnostikk



Indikasjon

Field diagnosis



Disease observations

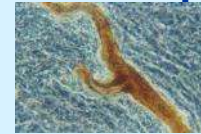


Gross



pathology

Microscopic



pathology

Microscopic presumptive



identification

Isolation in pure culture

Verification of identity

and/or virulence



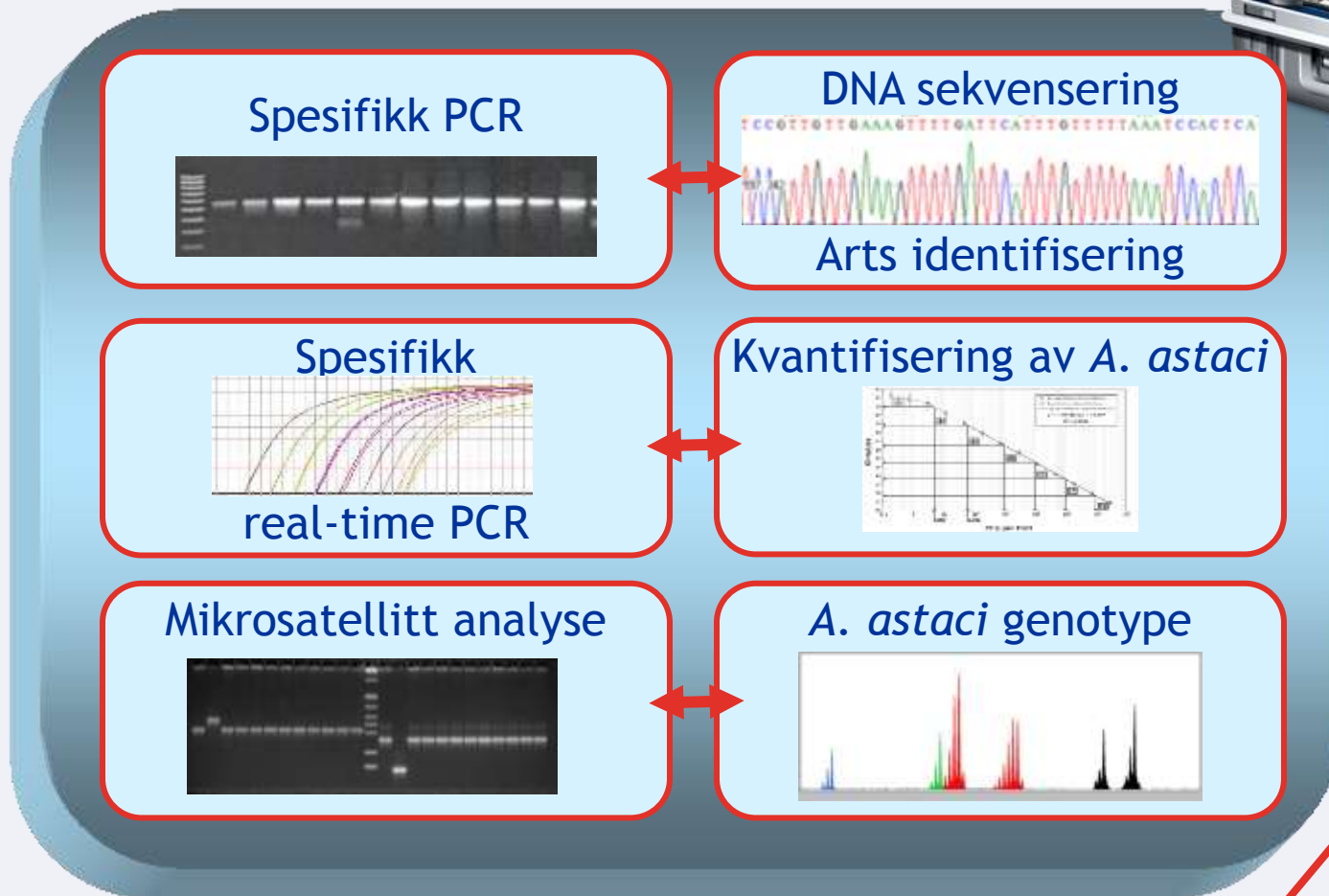
Sikker påvisning

Veldig lav suksessrate i de fleste diagnostikk laboratorier...





# Den nye verktøykassen for krepsepest diagnostikk

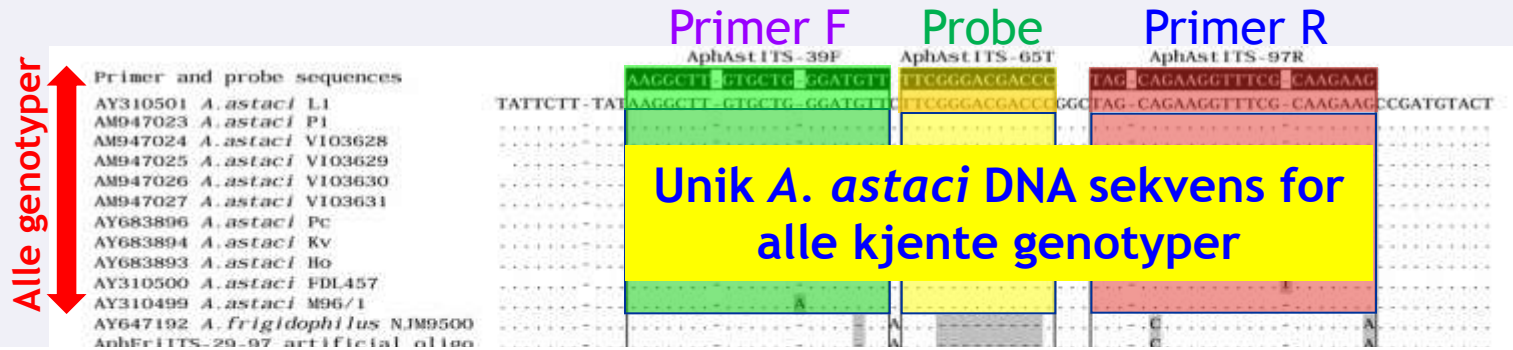


Høy suksessrate i de fleste diagnostikk laboratorier...

**Sikker påvisning**



# TaqMan® MGB Real-time PCR for spesifikk påvisning og kvantifisering av *A. astaci*



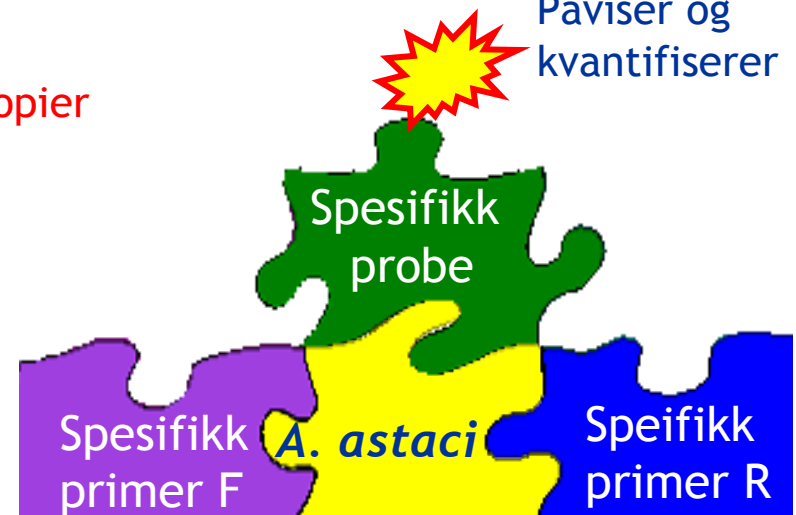
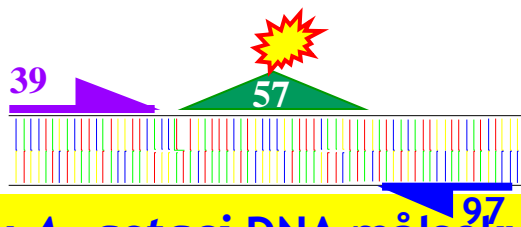
Svært spesifikk, ingen kryssreaksjoner med kjente nære slektninger/agens

Svært sensitiv

Deteksjonsgrense (LOD) = 5 DNA kopier

Kvantifiseringsgrense (LOQ) = 50 DNA kopier

Påviser og kvantifiserer

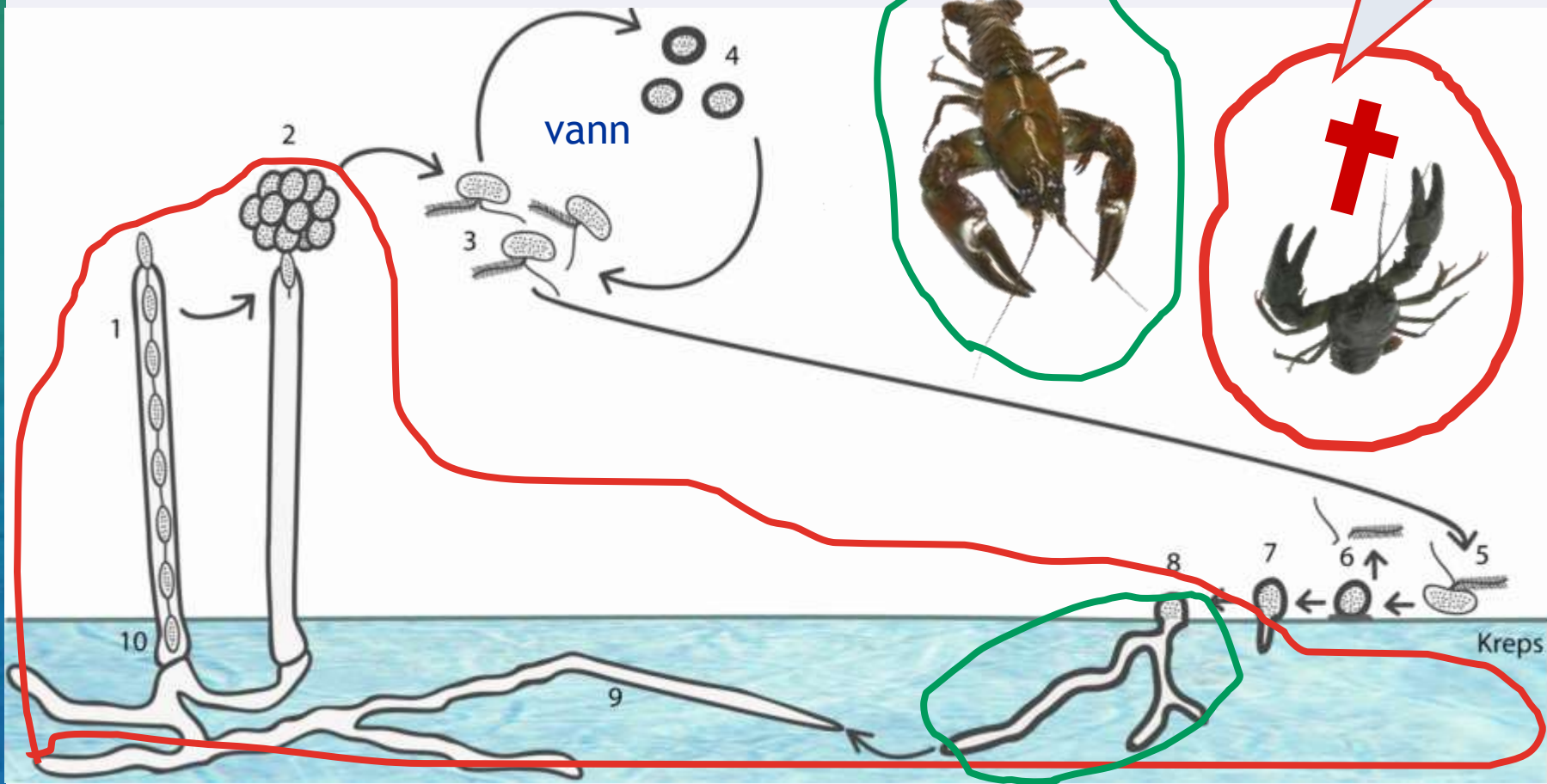


# Molekylær diagnostikk:

-påvisning av sykdomsagens i infisert vev

Bærerstatus/  
Prevalens

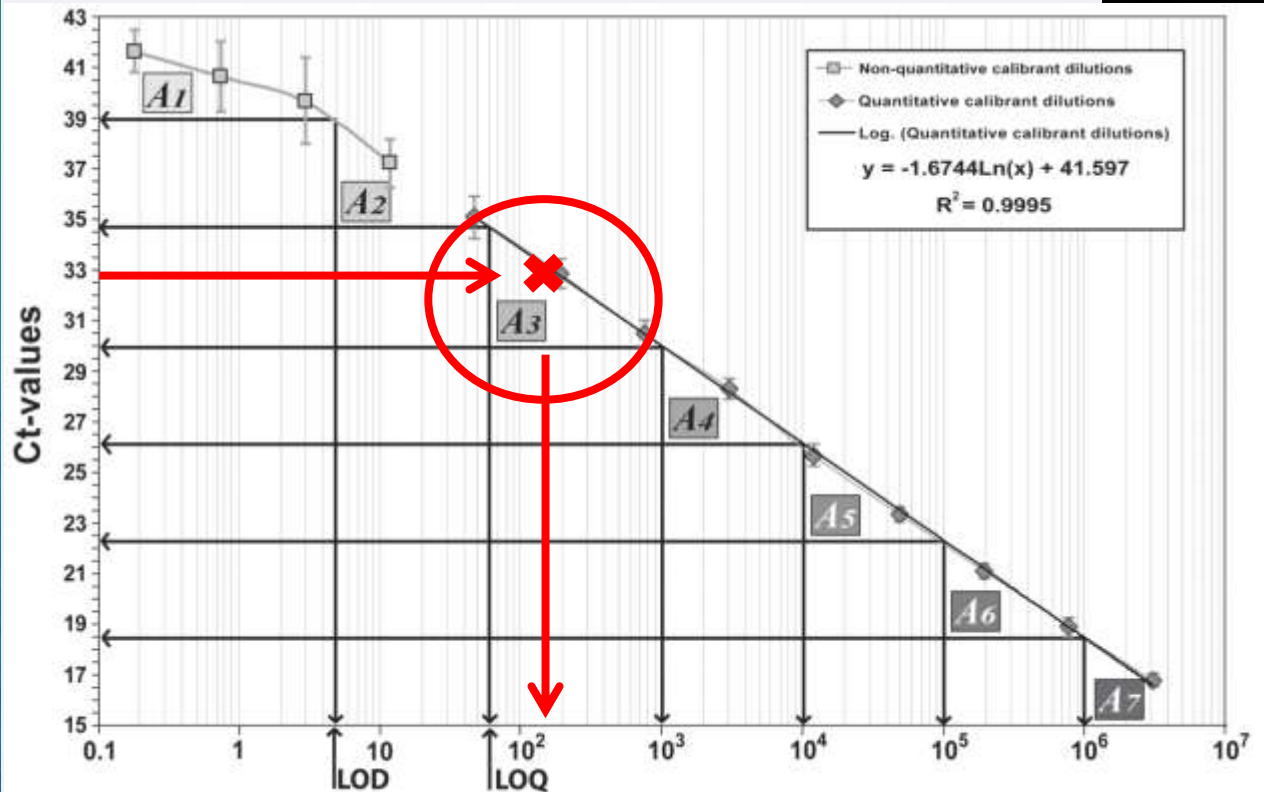
Krepsepest  
diagnostikk



# Deteksjon i Kreps

Rask analyse (1 - 2 dager)

- Antall smittede individer (Prevalens)
- Infeksjonsnivå på kreps (Agensnivå)



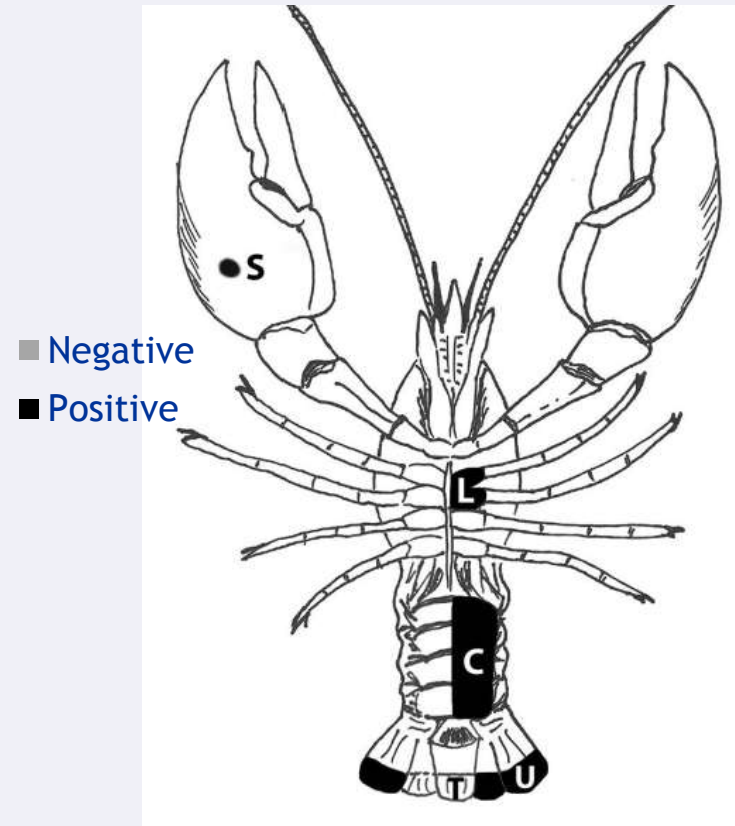
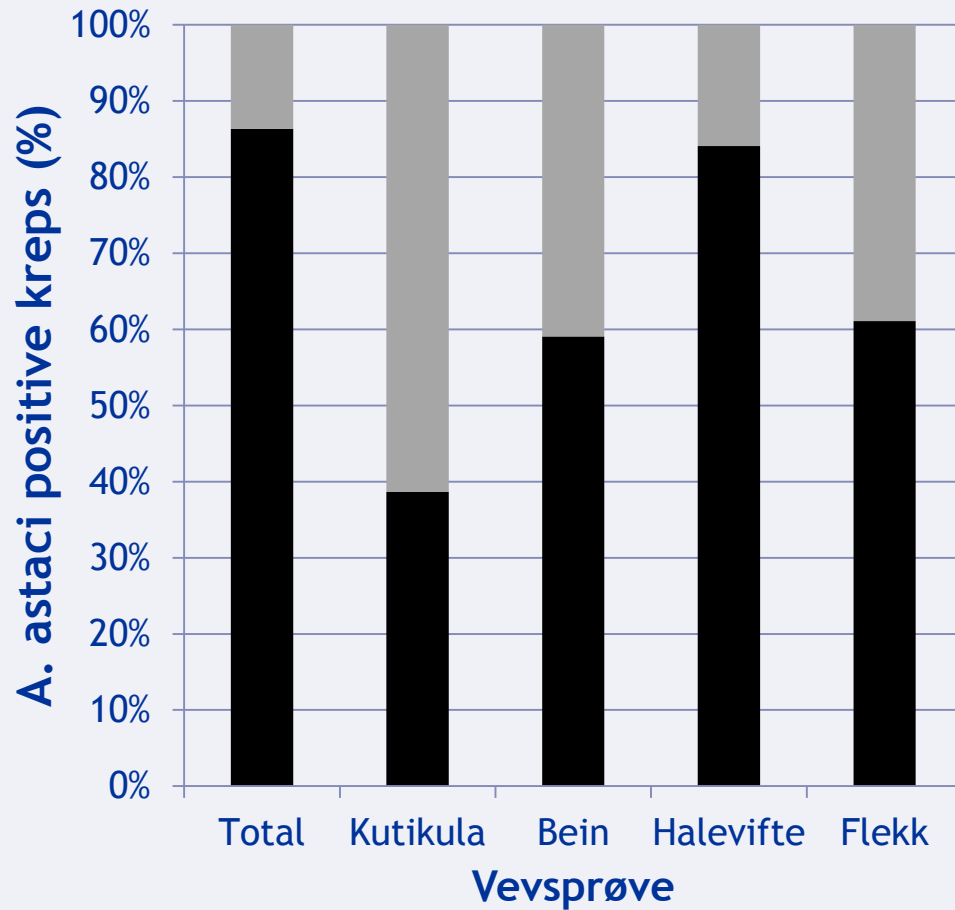
LOD = Deteksjonsgrense

LOQ = Kvantifiseringsgrense

Antall DNA kopier



# Prevalens av *A. astaci* i signalkreps



Antall kreps: 44, Antall kreps med flekker 13 (29.5 %)



# Prevalens av *A. astaci* i signalkreps

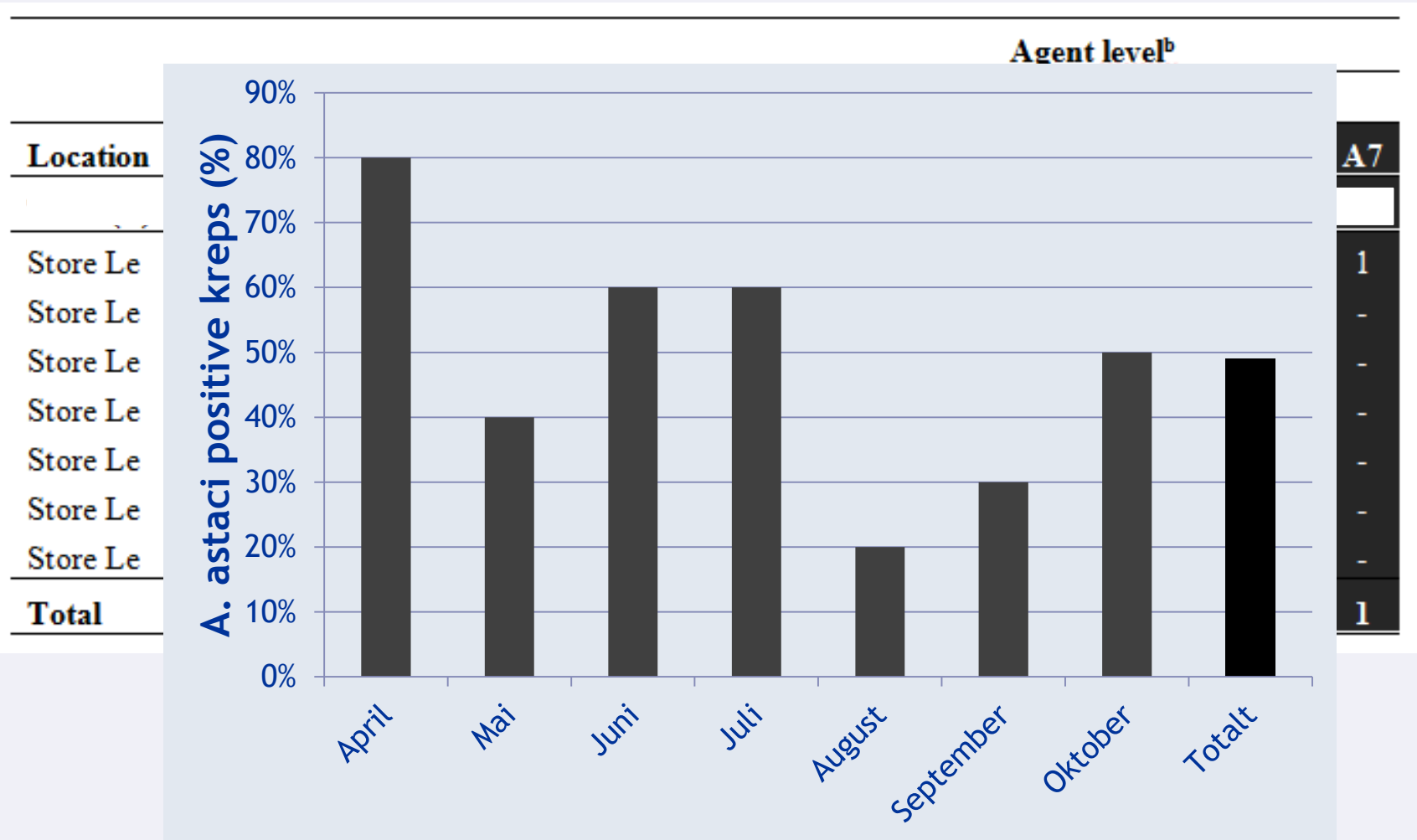
## Forskjellige vann i Sverige

Lokalitet/merking	# kreps	Negative	Positive	Observert prevalens (%pos)*	Estimert prevalens [CI <sub>nedre/øvre</sub> ]**
<u>Båven</u>	10	2	8	80%	1.00 [CI= 0.66/1.31]
<u>Halmsjön</u>	8	3	5	63%	0.78 [CI= 0.35/1.20]
<u>Hjälmeren</u>	10	6	4	40%	0.49 [CI= 0.11/0.88]
<u>Hovern, utveckling</u>	10	7	3	30%	0.37 [CI= 0.01/0.73]
<u>Immeln</u>	10	4	6	60%	0.75 [CI= 0.36/1.13]
<u>Stora Le (Harsnäs, tät)</u>	10	2	8	80%	1.00 [CI= 0.66/1.31]
<u>Stora Le (tätt söderut)</u>	10	8	2	20%	0.24 [CI= -0.07/0.55]
<u>Stora Le, Udden</u>	10	8	2	20%	0.24 [CI= -0.07/0.55]
<u>Store Le, Glest Norrut</u>	10	3	7	70%	0.87 [CI= 0.51/1.23]
<u>Trehörningen</u>	10	4	6	60%	0.75 [CI= 0.36/1.13]
<u>Trekanten</u>	10	3	7	70%	0.87 [CI= 0.51/1.23]
<u>Träsksjön</u>	10	7	3	30%	0.37 [CI= 0.01/0.73]
<u>Vättern</u>	10	5	5	50%	0.62 [CI= 0.23/1.01]



# Prevalens av *A. astaci* i signalkreps

Stora Le, Sverige 2011

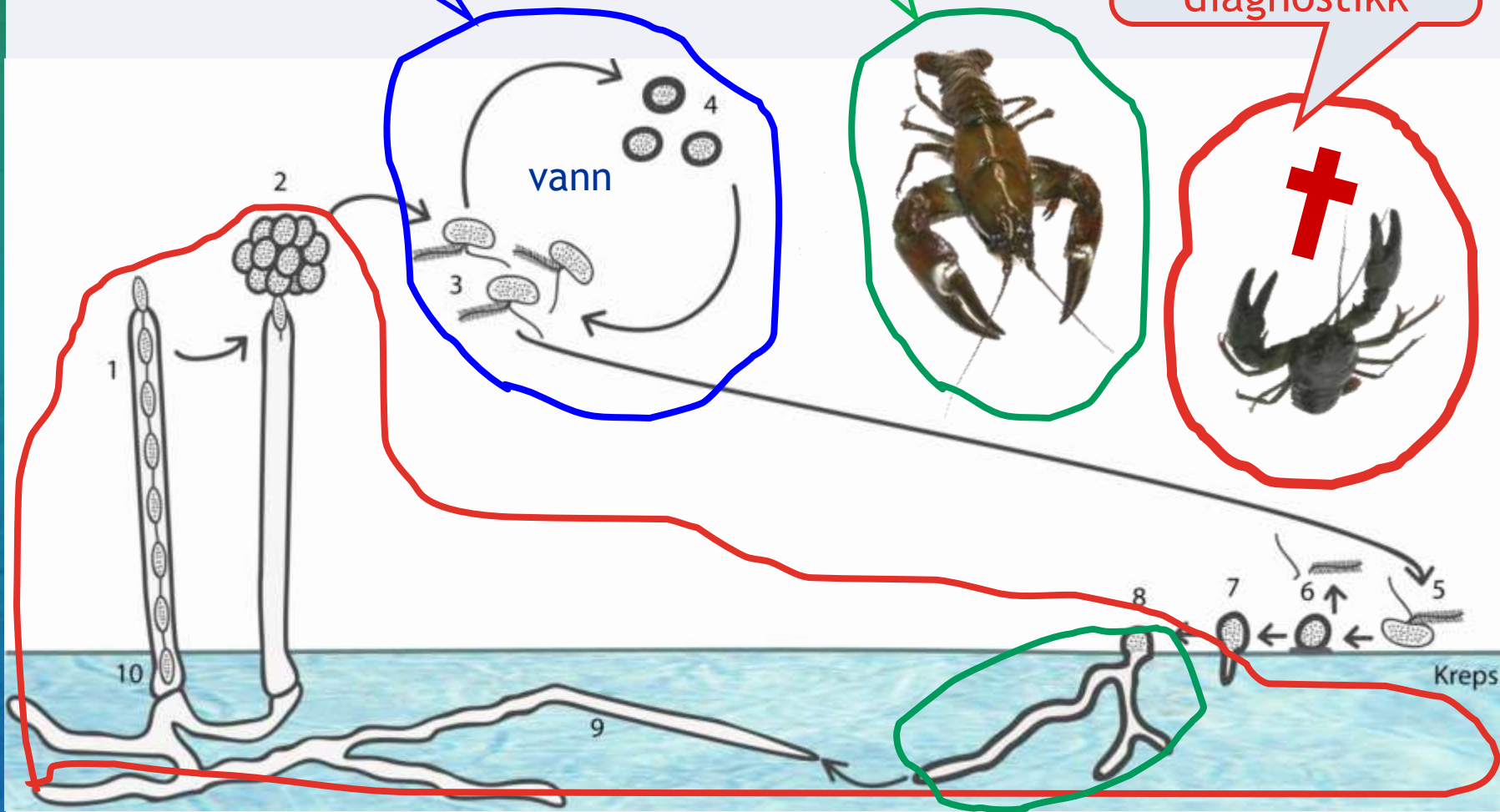


# Molekylær overvåking: -påvisning av sporer i vann

Smittesporing i vann

Bærerstatus/  
Prevalens

Krepsepest  
diagnostikk





# Hvor mange *A. astaci* sporer trenger vi for å påvise og kvantisere dem?

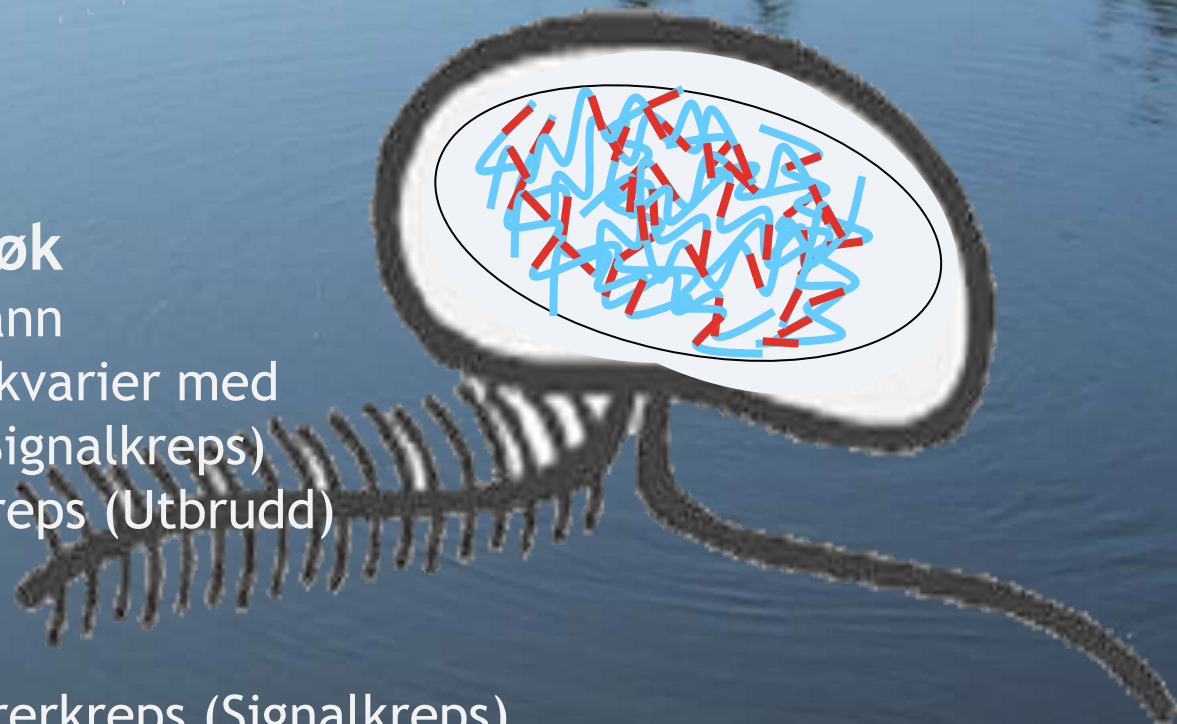
*Krepsepestspore < 10 μm*

## Laboratorie forsøk

- Test av sporer i vann
- Test av vann fra akvarier med
  - Bærerkreps (Signalkreps)
  - Infisert edelkreps (Utbrudd)

## Feltstudier

- Innsjøer med bærerkreps (Signalkreps)
- Utbrudd i edelkreps populasjon

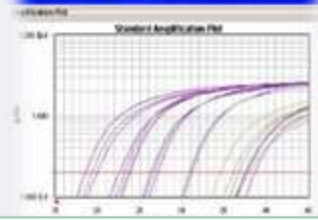
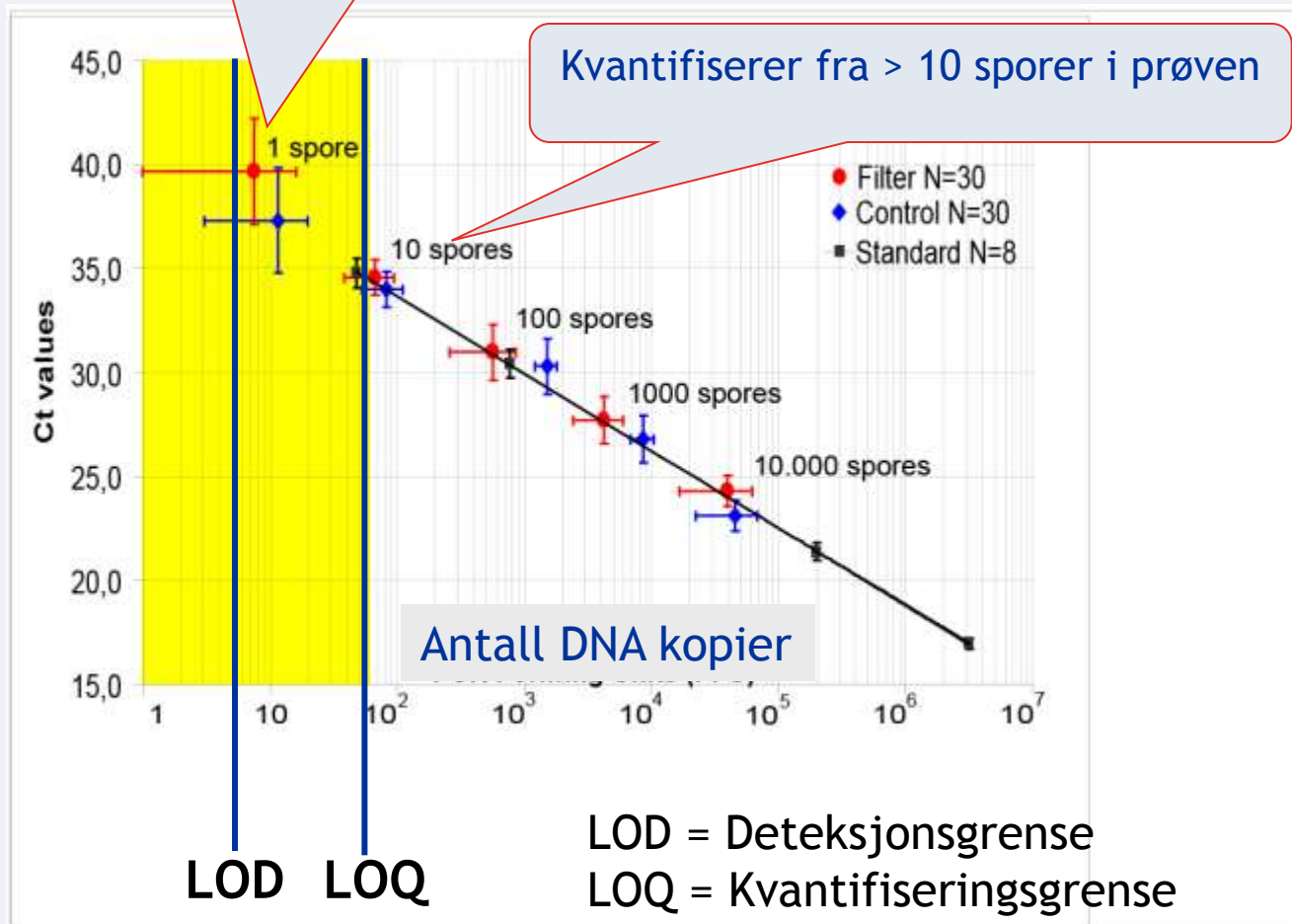


# Deteksjon av Sporer i Vann



Påviser ned til én spore i prøven

Kvantifiserer fra > 10 sporer i prøven



➤ **Hvor mye** sporer avgis fra amerikansk bærerkreps?

➤ **Når?** Hele tiden eller kun ved død og skallskifte? Sesong (temperatur)?



# Signalkrebs med positiv bærerstatus

## Singelkrebs

2L vann  
1 kreps  
4 °C  
(x10 rep)

2L vann  
1 kreps  
18 °C  
(x10 rep)

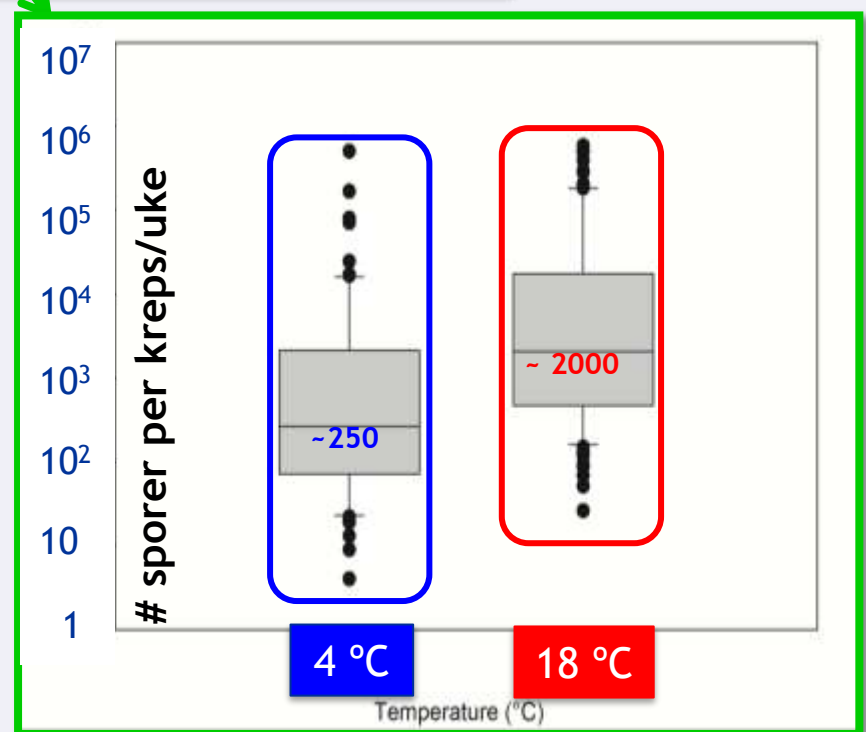
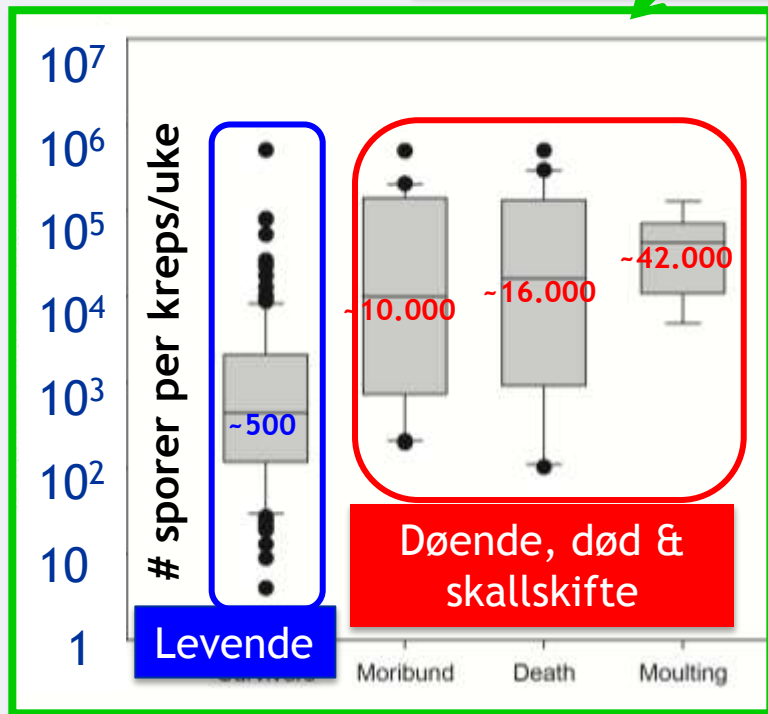
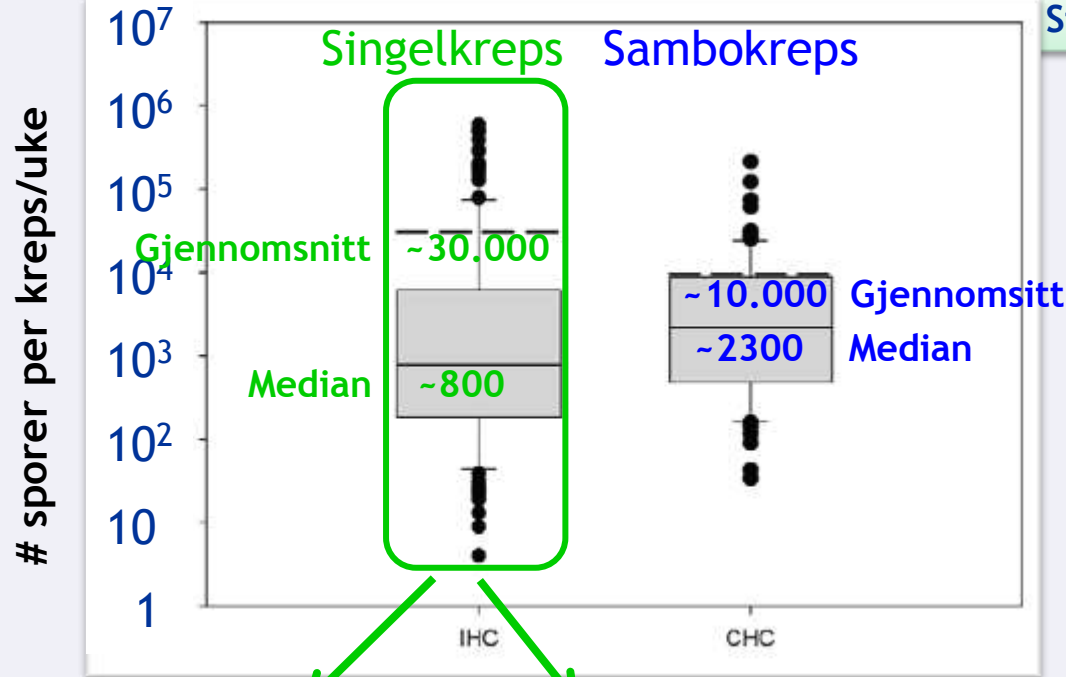


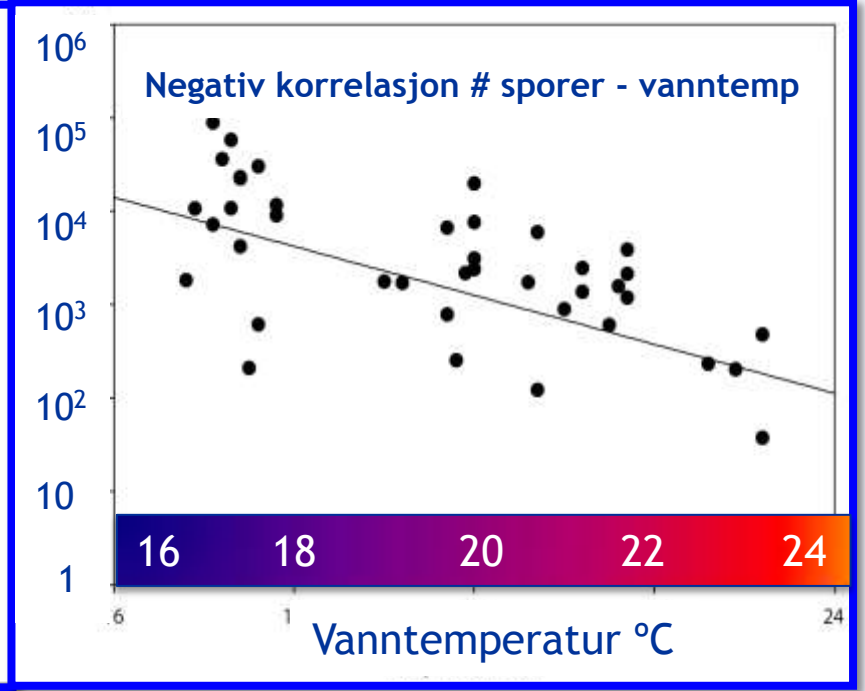
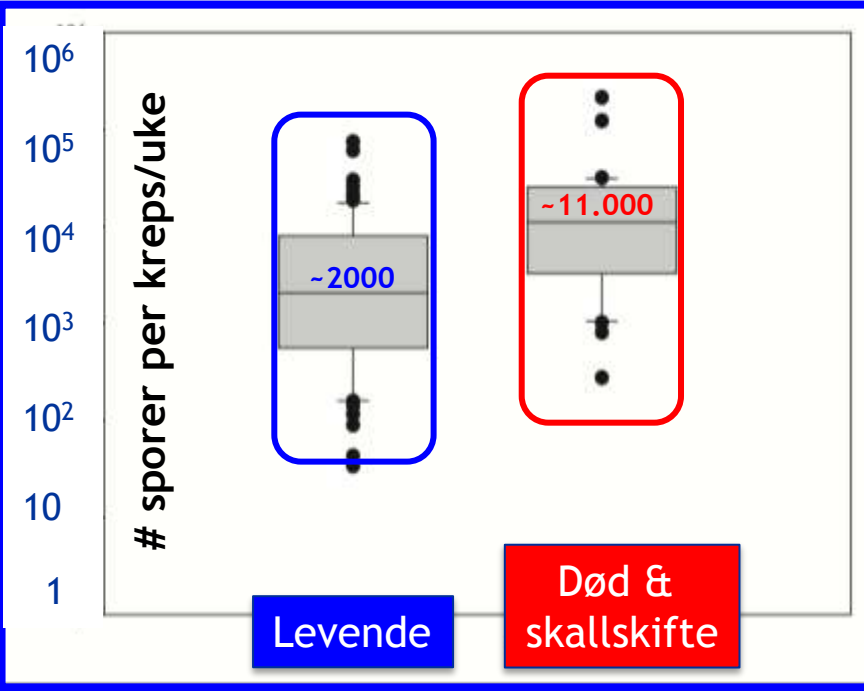
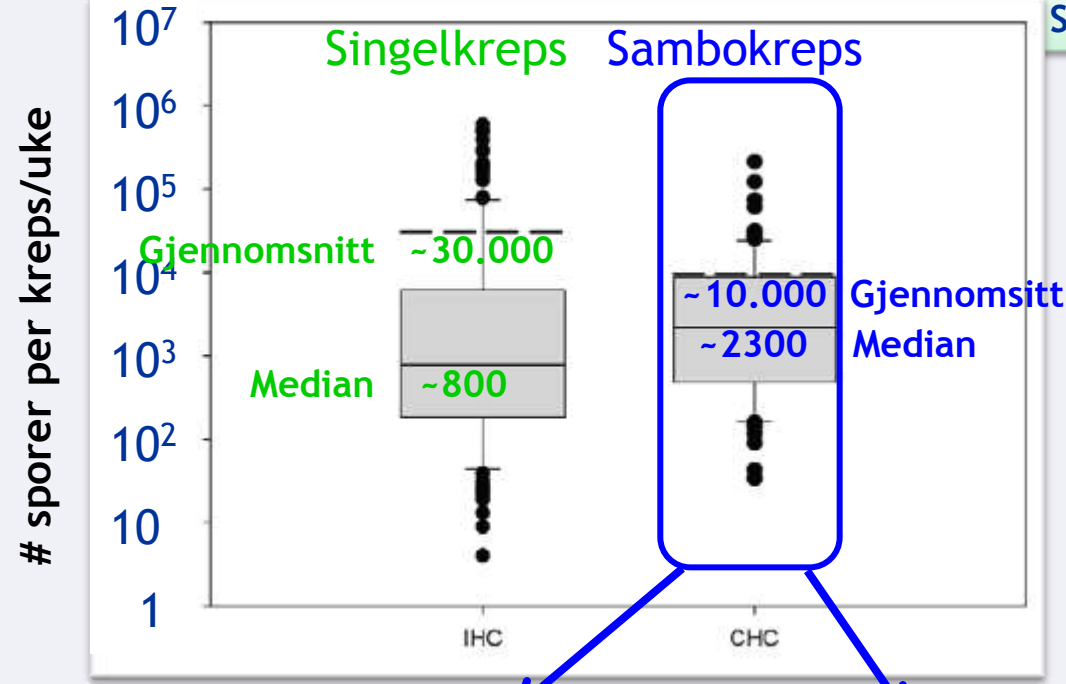
## Sambokrebs

100L vann  
20 kreps  
Romtemp (17-23) °C  
(x4 rep)

Strand et al, 2012



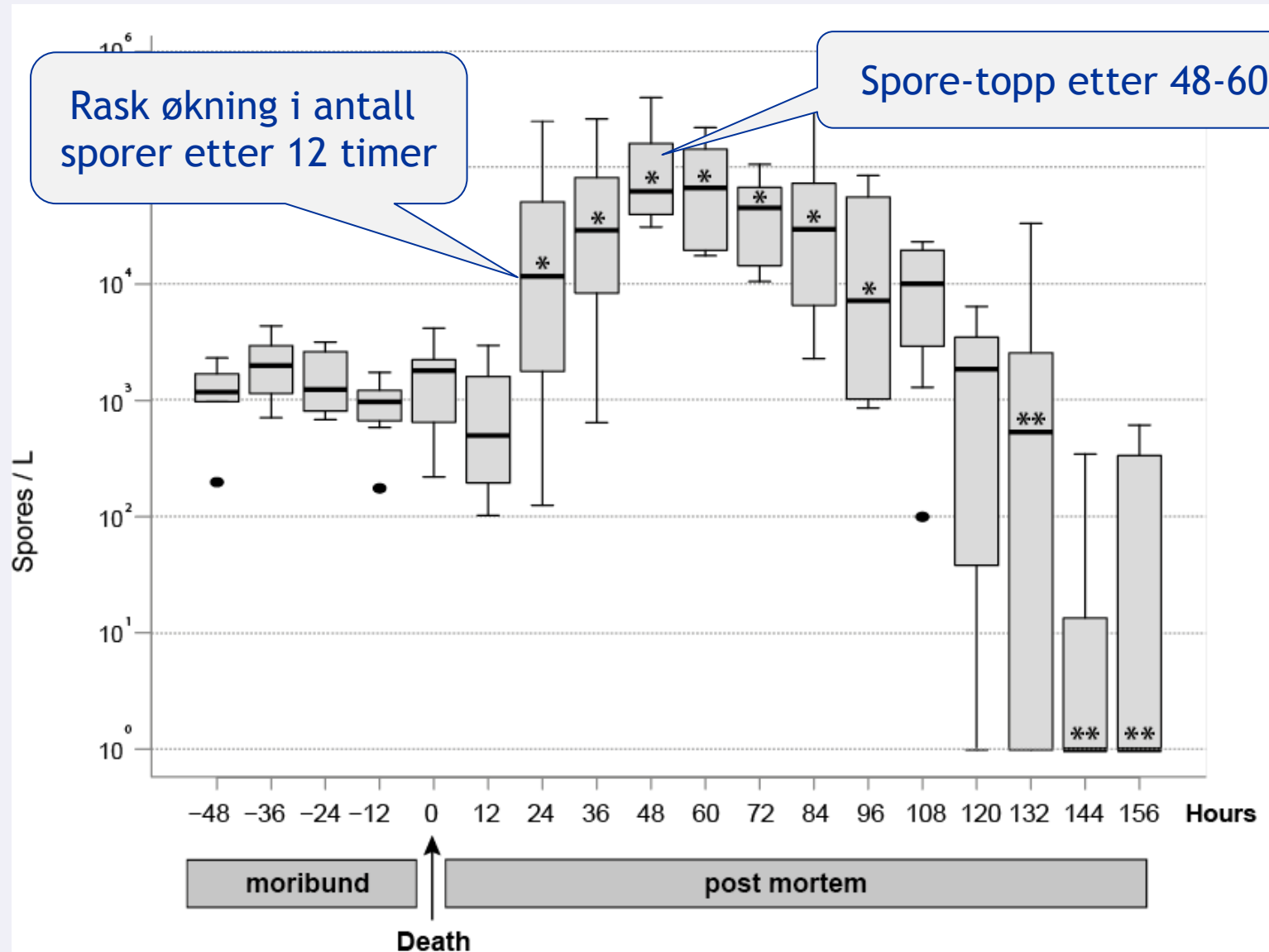




- **Hvor mye** sporer avgis under infeksjon og død av edelkreps?
- **Hvor raskt** etter infeksjon og død produseres sporer?



# Lab. forsøk - Sporulering fra infisert edelkreps (Utbrudd)





# Laboratorie forsøk - Konklusjon

- **Sensitiv metode**
  - Kan detektere en spore
  - Gir et røft spore estimat
  
- **Sporer produseres kontinuerlig av infisert bærerkreps**
  - Ved 4 °C og 18 °C
  - Økt sporeproduksjon ved skallskifte og død
  - Høyere sporetetthet ved bunn
  
- **Rask og kraftig sporulering rett etter død av infisert edelkreps**
  - Økt sporulering 12 timer etter død
  - Spore topp ca. 48-60 timer etter død



# Feltstudier - Spore deteksjon i naturlige vassdrag

## Membran-filtrering

- Polykarbonat-filter
- 3 $\mu$ m pore størrelse
- 0.1-1 L vann

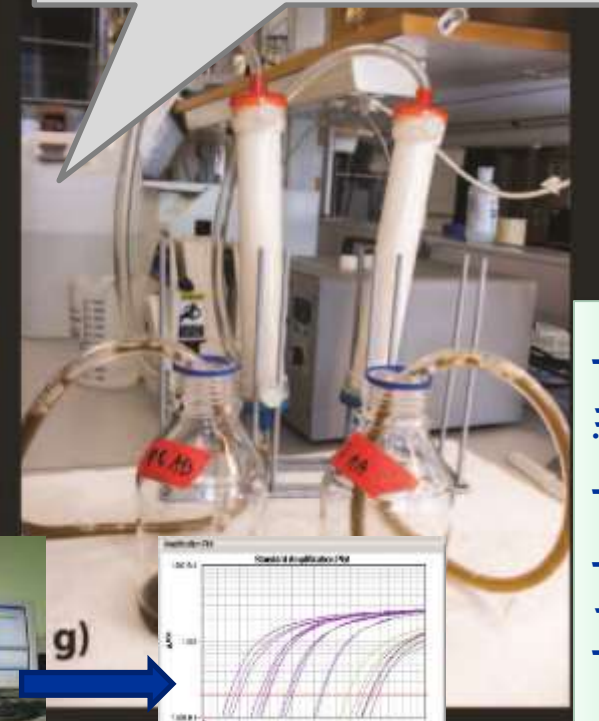
Passer for små systemer



## Ultra-filtrering

- Hemodialyse-filter
- 1.8m<sup>2</sup> membranoverflate
- >100 L vann
- Tangential-flow eller dead-end setup

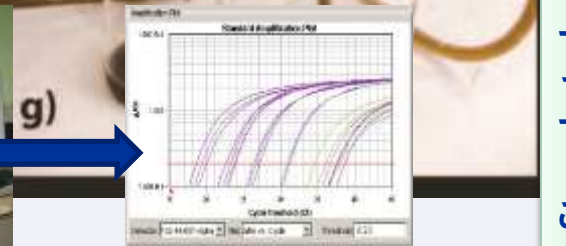
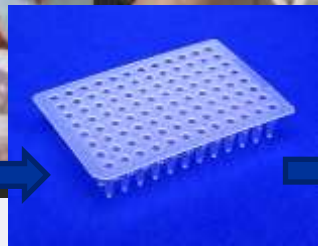
Passer for store systemer



## Dybde-filtrering

- Glassfiber-filter
- Partikler >0.9 $\mu$ m
- 2 to 10 L vann

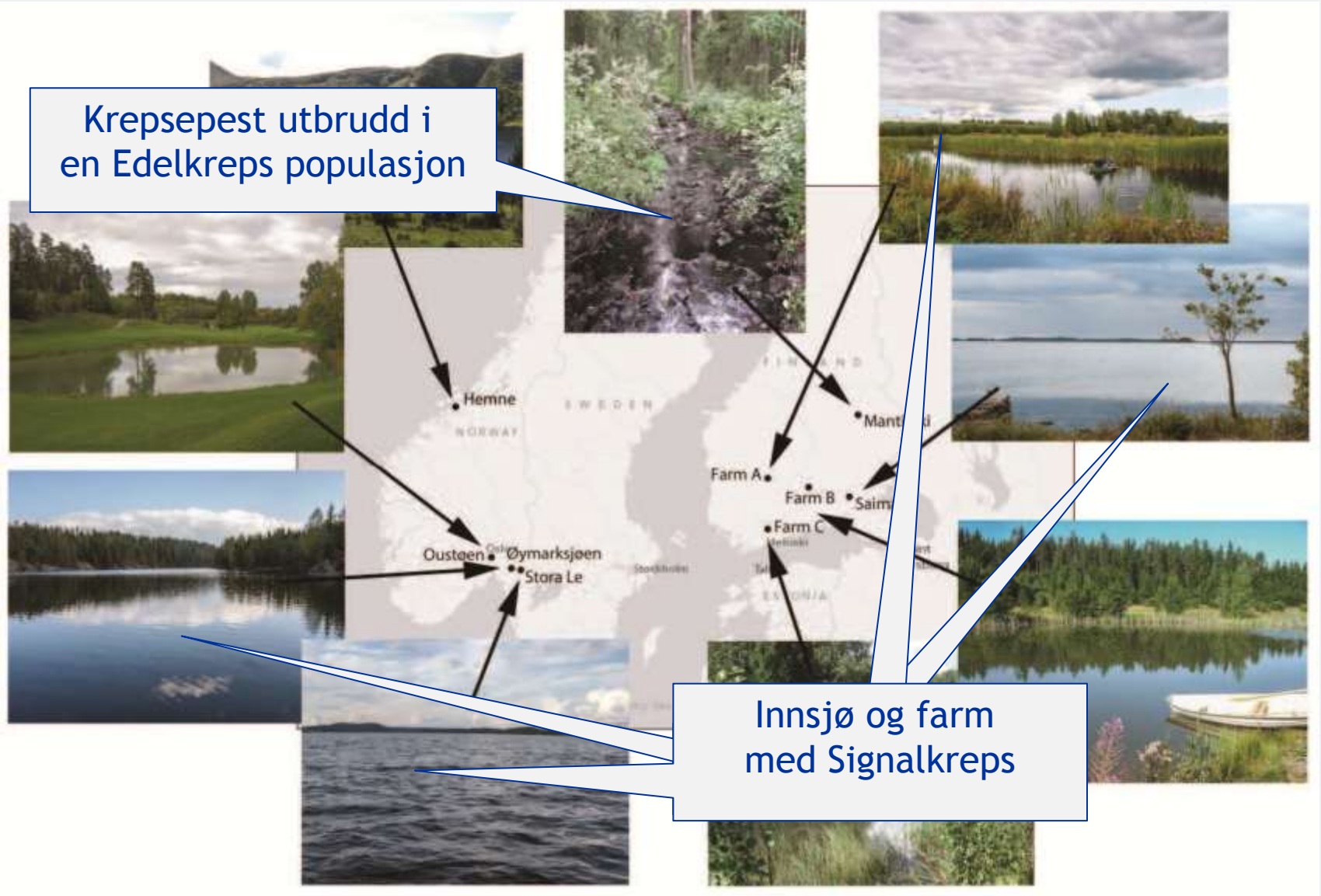
Passer for store systemer



# Feltstudier - Lokasjoner

Krepsepest utbrudd i en Edelkreps populasjon

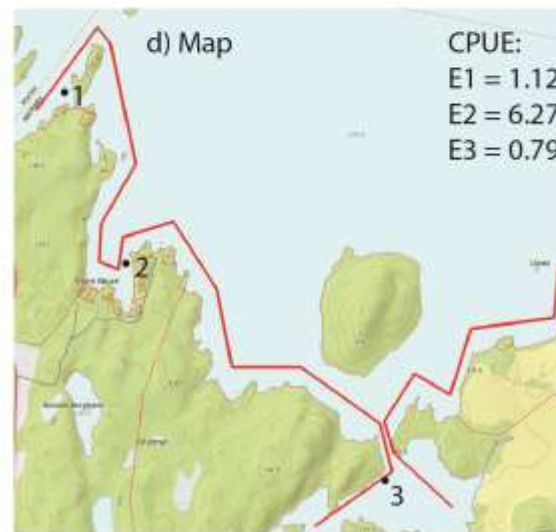
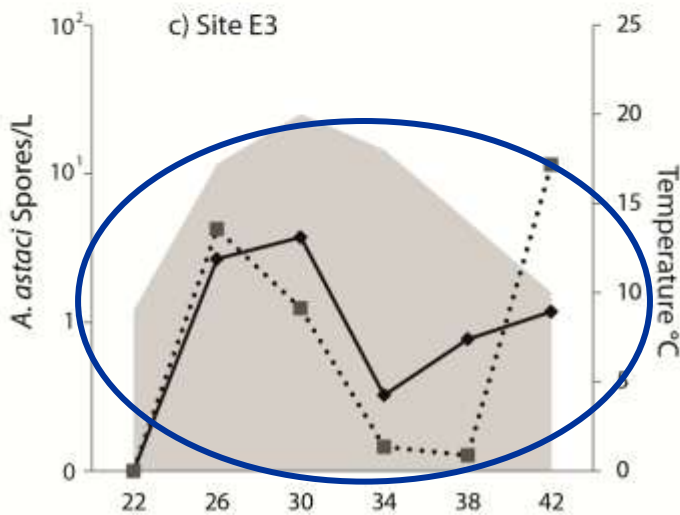
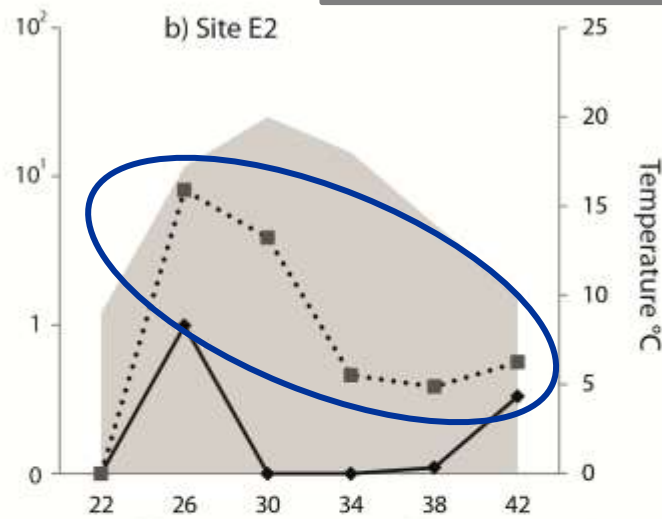
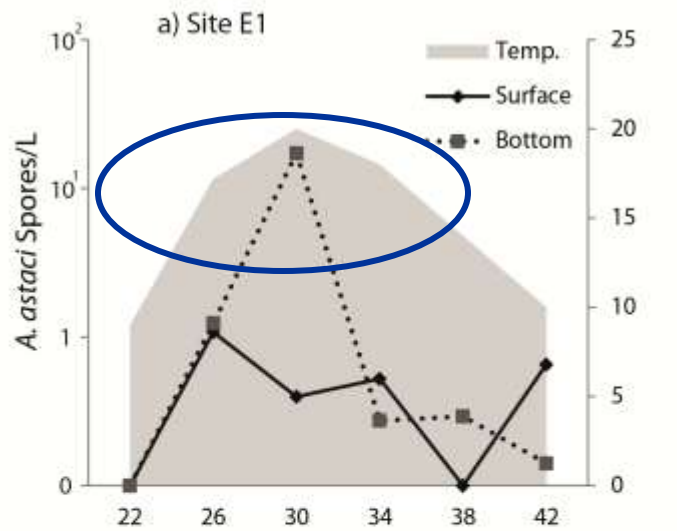
Innsjø og farm med Signalkreps



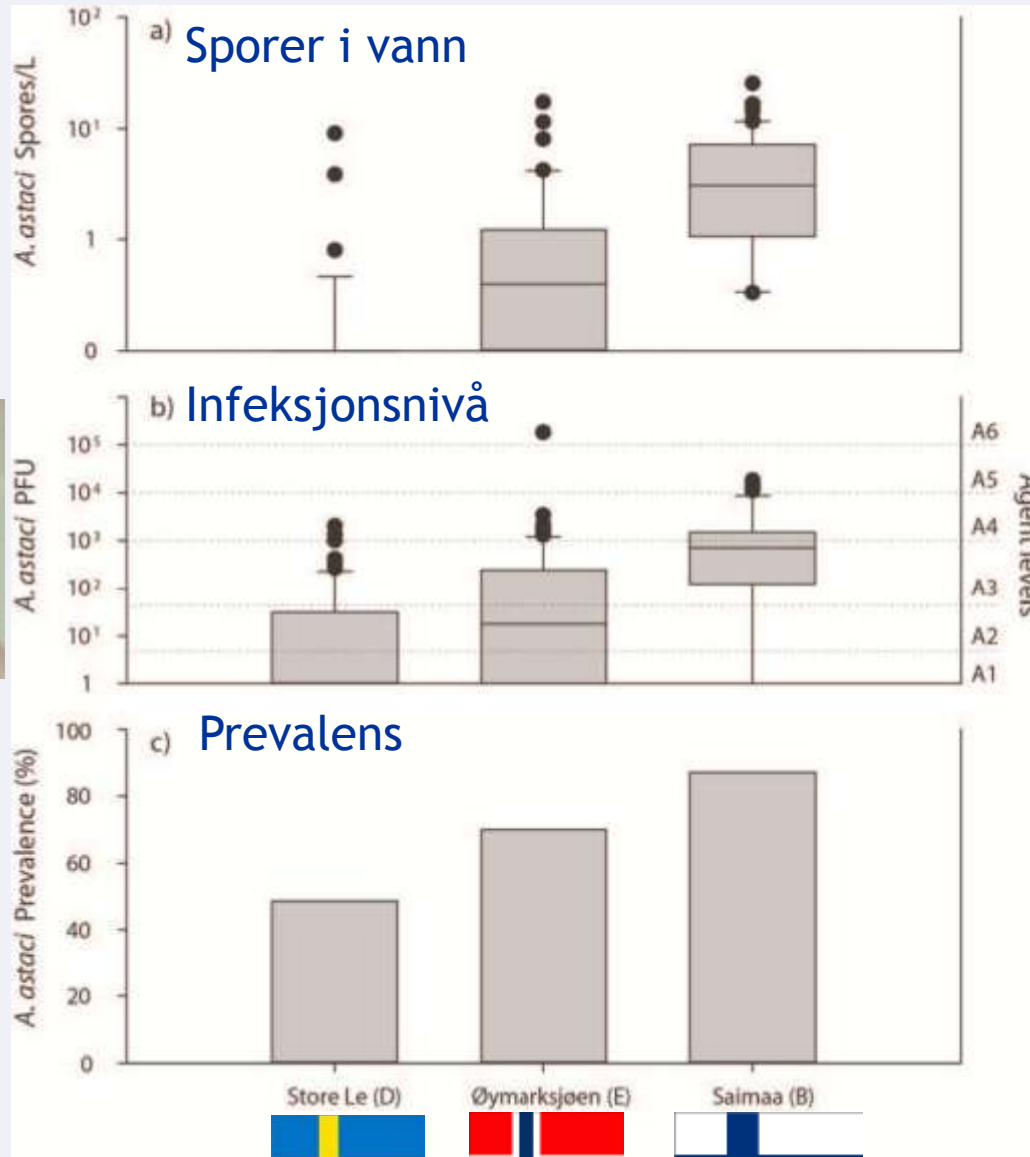
# A. astaci sporetettheter - Innsjøer

Øymarksjøen, Norge

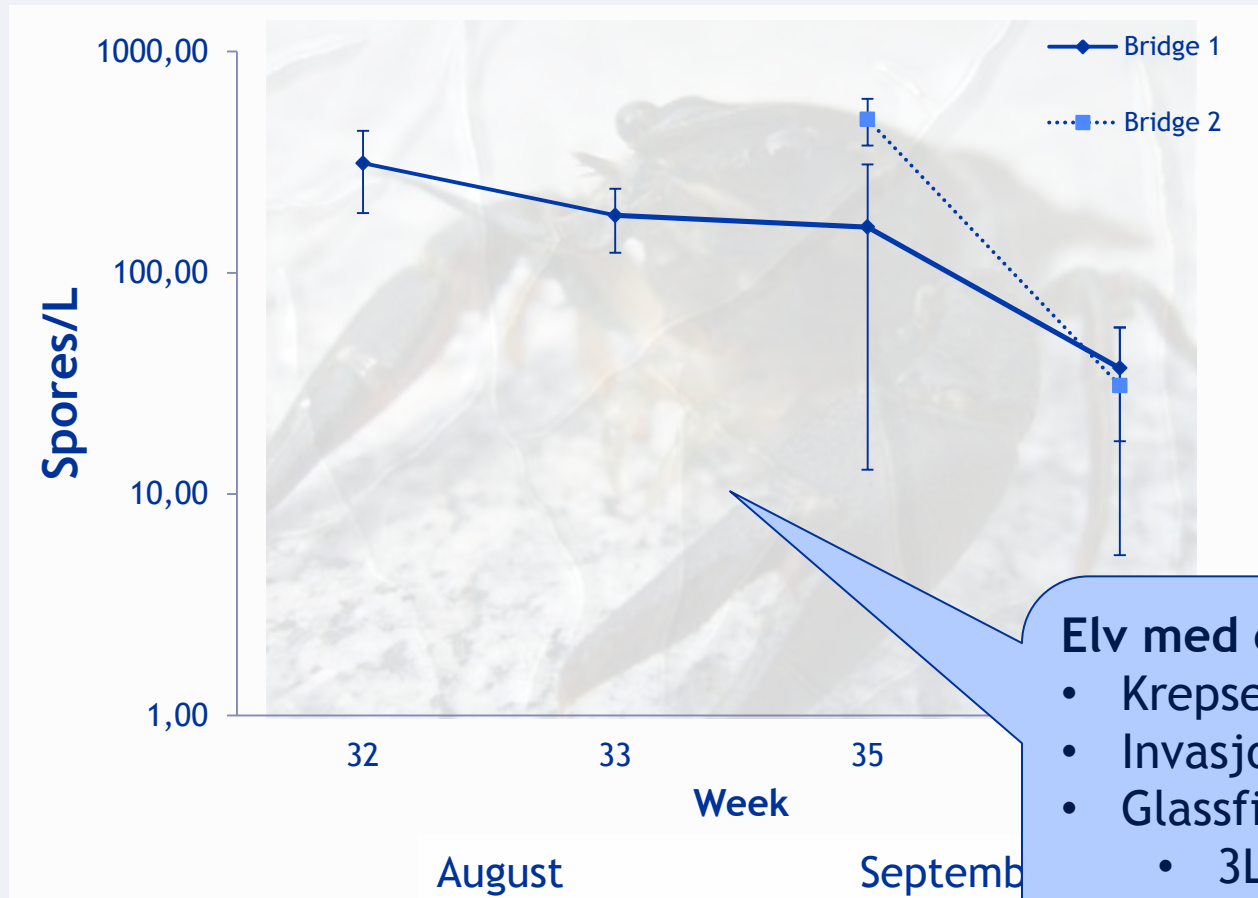
- Ultra filtrering
- 100L vannprøver
- 1 prøve ved bunn & overflate



# Sammenligning tre innsjøer



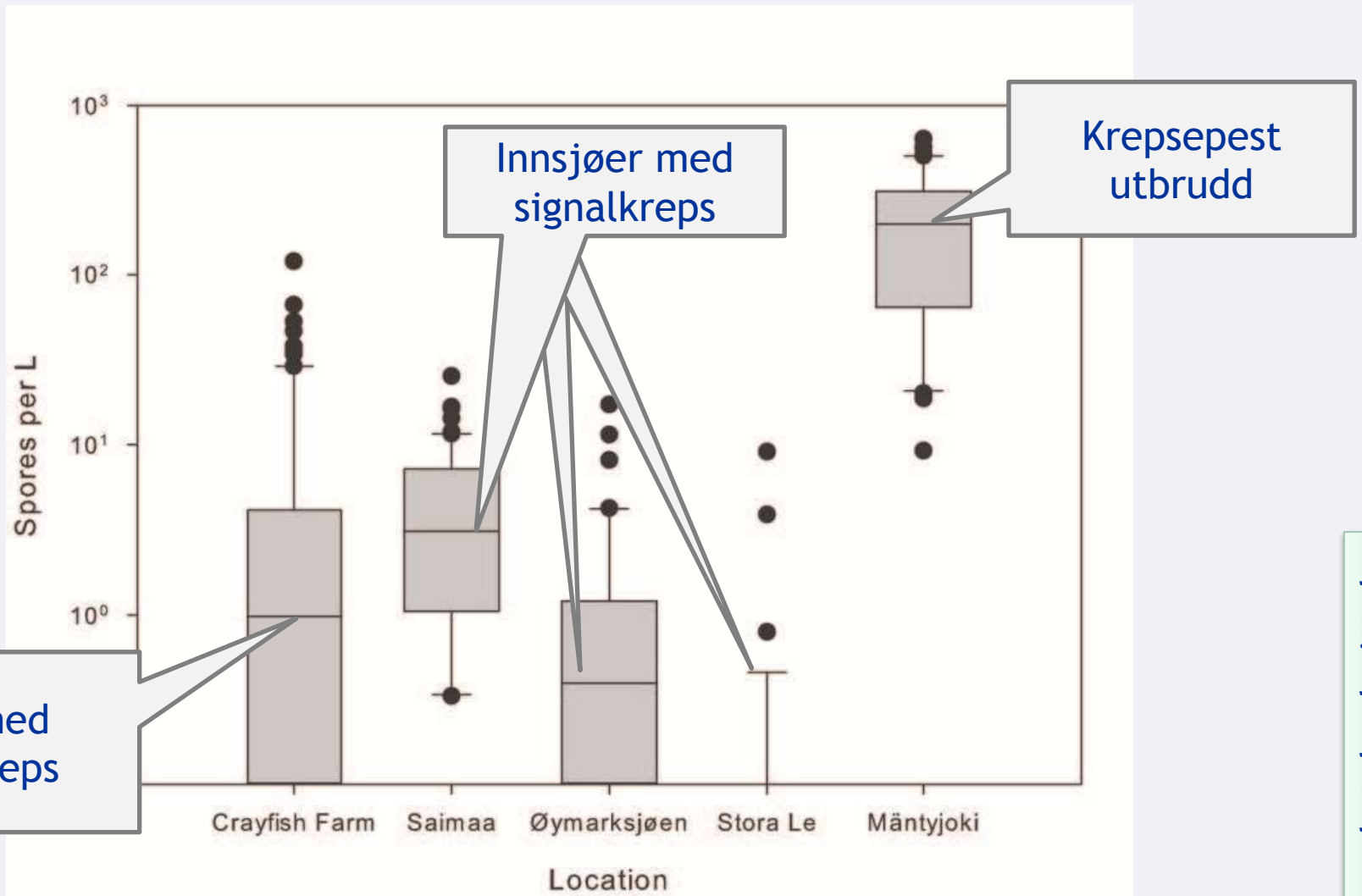
# Krepsepestutbrudd i edelkrepspopulasjon



## Elv med edelkreps

- Krepsepestutbrudd
- Invasjonsfront
- Glassfiber-filtrering
  - 3L x 5
- Høye sporetettheter

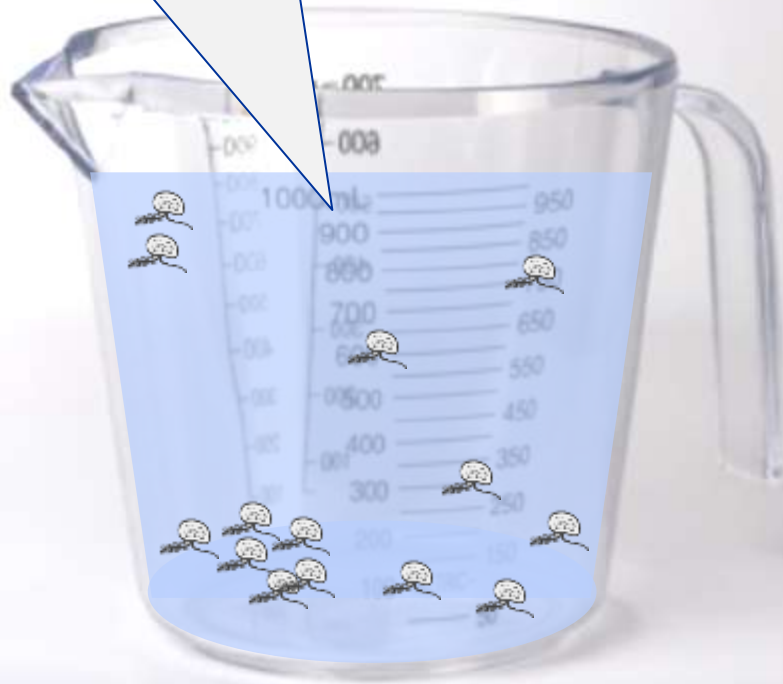
# Feltstudier - Oppsummering



# Feltstudier - Konklusjon

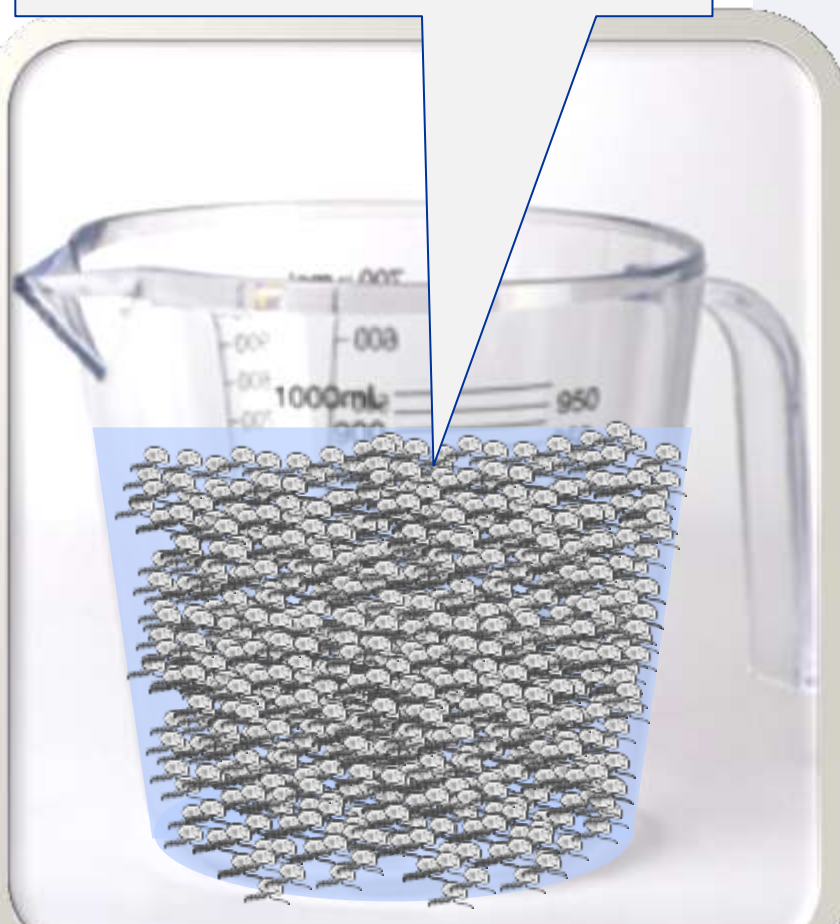
## Populasjon med Bærerkreps

- Relativt få sporer
- Heterogen fordeling
- Høyere sporetetthet ved bunn
- Assosiasjon mellom prevalens, infeksjonsnivå og sporetetthet



## Krepsepest utbrudd

- Høy sporetetthet
- Høyt infeksjons press

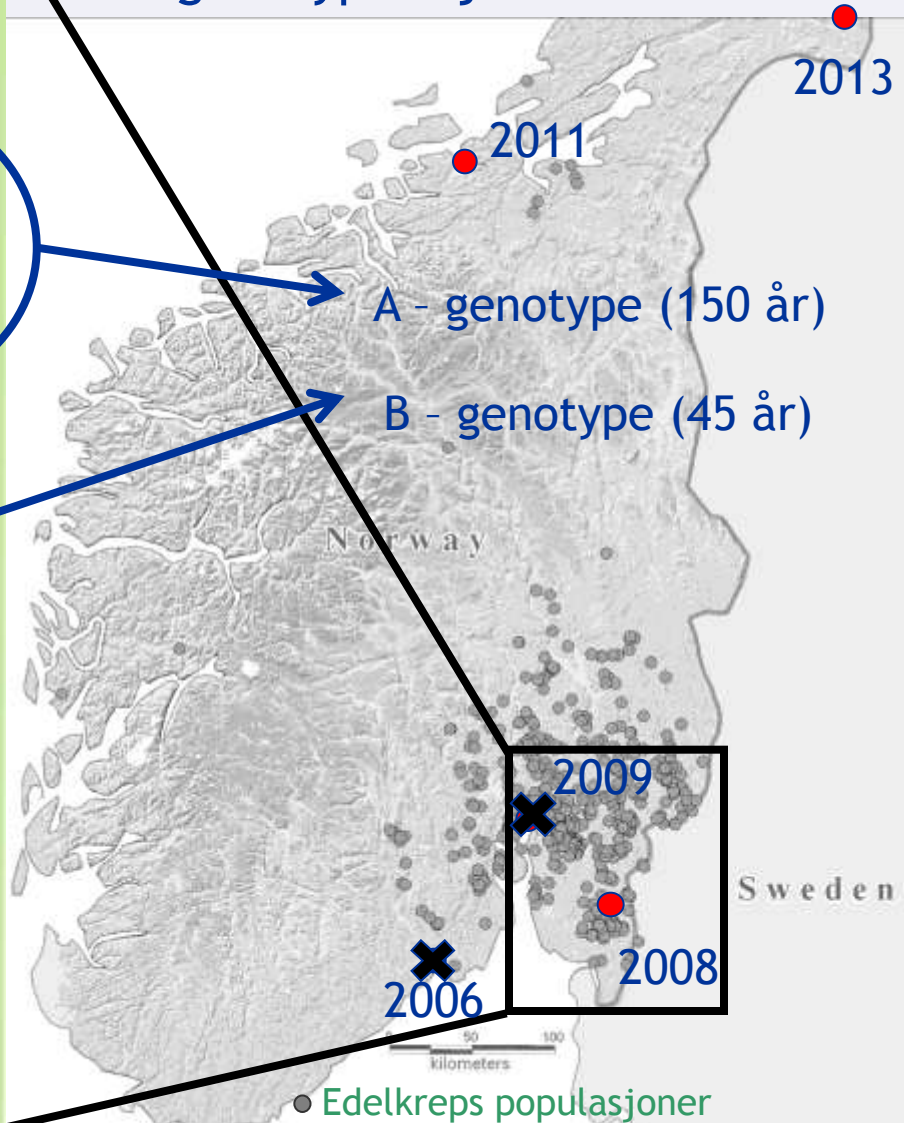
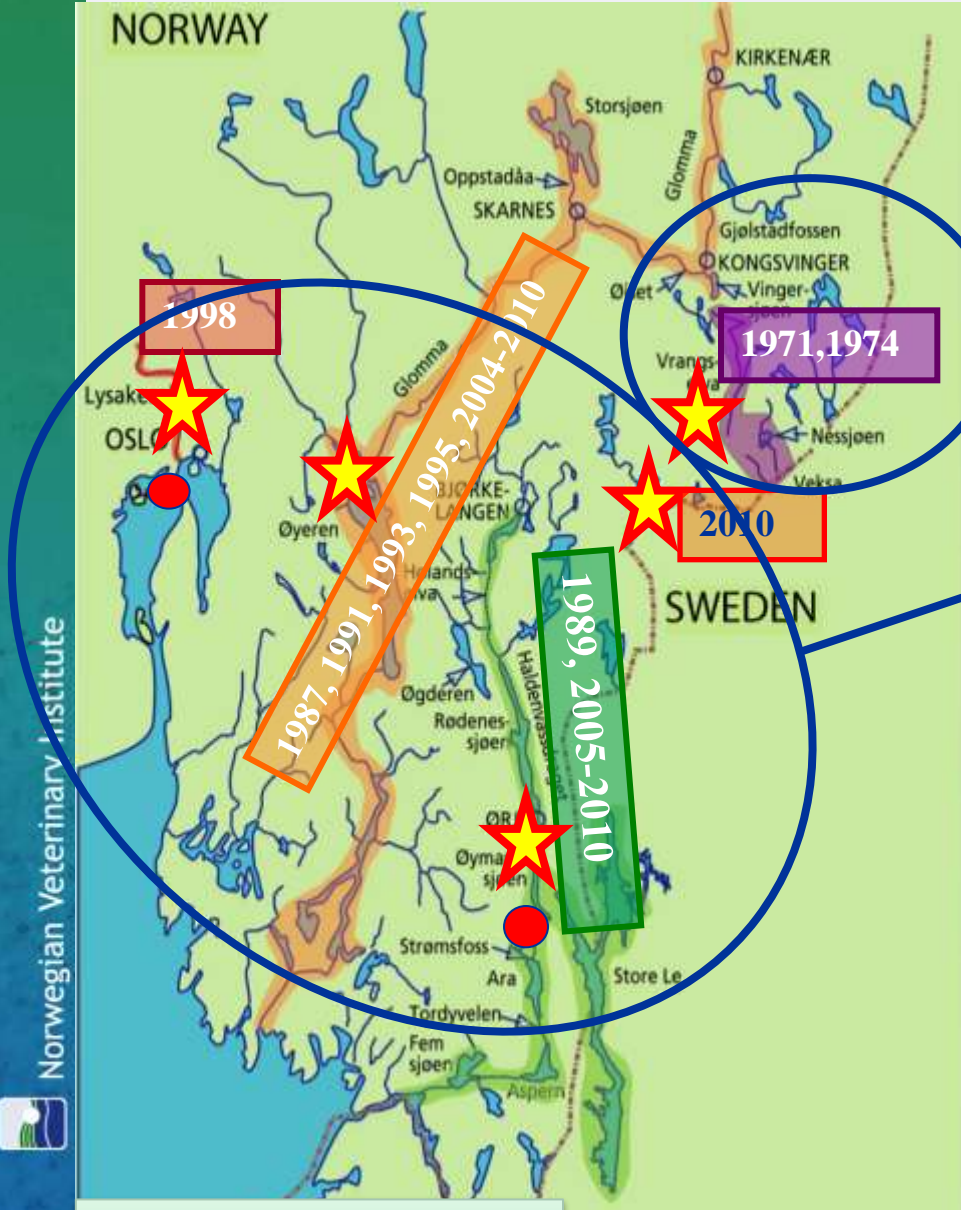




# Genotyper av Krepsepest i Norge



5 genotyper kjent: A-E

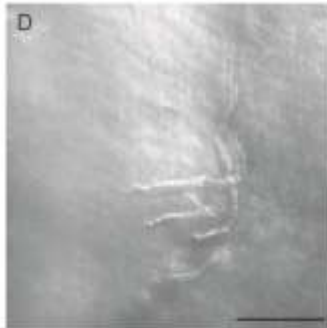
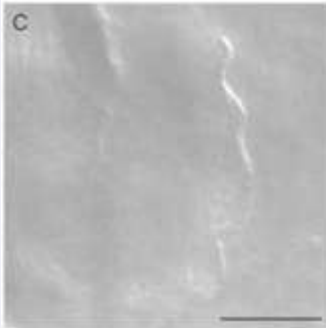
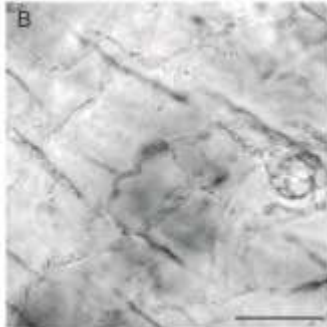
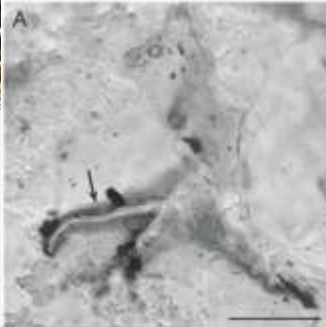


Norwegian Veterinary Institute

Vrålstad et al. submitted

- Edelkrebs populasjoner
- Ulovlig introdusert signalkrebs

# Alternative verter - Ferskvannskrabbe



# Applikasjoner av nye molekylære verktøy

- Testing av kreps for *A. astaci* infeksjon
- Tidlig deteksjon av *A. astaci* i naturlige miljøer
- Overvåking av
  - Elver og innsjøer etter utbrudd
  - Bærerpopulasjoner (signalkreps)
- Evaluering av habitater for reetablering av edelkreps
- Mer nøyaktig risikovurderinger i forhold til sykdoms kontroll og smittespredning
- Søke etter alternative verter
- Undersøke sykdomshistorie for nye og gamle utbrudd (genotype)



# Acknowledgements

## ■ Norwegian Research Council



## ■ Co-authors and collaborators

- Trude Vrålstad, Hildegunn Viljugrein, Arne Holst-Jensen, Rosa Fristad (NVI), Jannicke Wiik-Nielsen



- Bente Edvardsen, Dag Klaveness, MERG, UiO



UiO : **University of Oslo**

- Lennart Edsman, Fredrik Engdahl, SLU



Swedish University of Agricultural Sciences

- Stein Ivar Johnsen, NINA



Norwegian Institute for Nature Research

- Japo Jussila, Harri Kokko, Jenny Makkonen, UEF



- Satu Viljamaa-Dirks, EVIRA



Finnish Food Safety Authority

- Frederic Grandjean,



University of Poitiers

- Adam Petrusek, Jiri Svoboda,



Charles University in Prague

