

Tidlig vaksinerings – mot sin hensikt

En av de største utfordringene for oppdrettsnæringen er infeksjonssykdommer. Nå tyder nye resultater på at kveitelarver i oppdrett bør vaksineres først etter endt metamorfose. Dersom de vaksineres tidligere, kan det føre til at de blir mer utsatt for infeksjonssykdom istedenfor at de blir beskyttet.

SONAL PATEL (sonal.patel@imr.no), AINA-CATHRINE ØVERGÅRD, INGRID U. FIKSDAL og AUDUN H. NERLAND

For å finne ut hva som er optimal tid for vaksinerings, må utviklingen av fiskens immunforsvar studeres. Hvor langt denne utviklingen har kommet når fisken vaksineres, er avgjørende for hvilken immunrespons som oppstår, og dermed om fisken oppnår tilstrekkelig beskyttelse. Optimal tid for vaksinerings av kveite vil sannsynligvis være etter endt metamorfose (overgangen fra larve til yngel), altså etter ca. 115 dager (se figur). Dette kan variere mellom de ulike artene som brukes i akvakultur, og bør derfor undersøkes for hver enkel art. I tillegg bør fettsyresammensetningen i det levende føret som ofte brukes til marine fiskelarver (*Artemia*-anrikning), undersøkes for å se om det kan bidra til å opprettholde immunstatusen.

Viktig å kontrollere infeksjonssykdommer

Infeksjonssykdommer kan gi store økonomiske tap for oppdretterne, og kan i verste fall medføre sanering av anlegg. I oppdrett av kveite er det observert høy dødelighet på larve- og yngelstadiet, ofte i forbindelse med sykdommer forårsaket av virus, under startföring og ved overgang til tørrfö. Dette viser behov for effektive vaksinasjonsregimer. For å kontrollere infeksjonssykdommer og optimalisere oppdrett av nye fiskearter skal etableres i akvakultur, er det nødvendig med kunnskap omkring de forskjellige faktorene som har betydning ved en gitt sykdom. Å forstå biologien til den aktuelle fiskearten er minst like viktig som å forstå den sykdomsfremkallende (patogene) organismen. Dette kan hjelpe i flere trinn som forbedring av hygieneforholdene, planlegging av vaksiner og tid for vaksinerings.

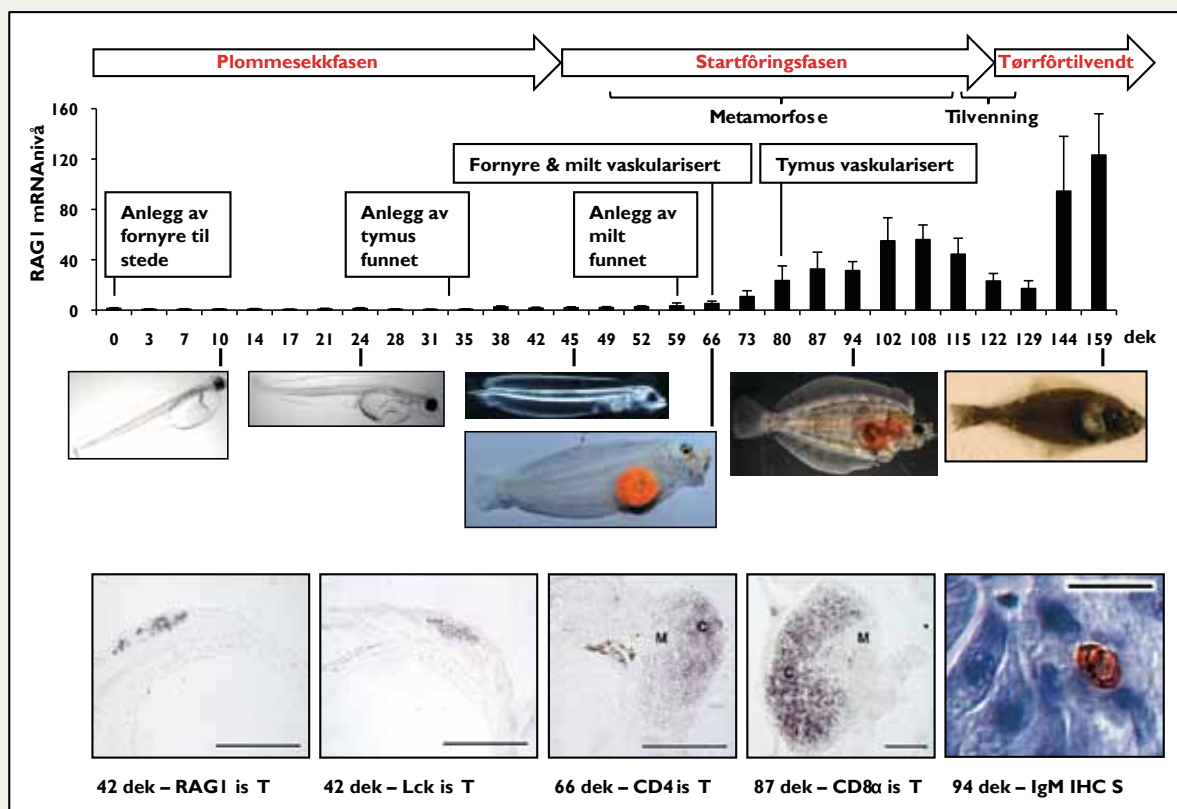
Kunnskap om immunsystemet til den aktuelle oppdrettsorganismen, hvordan dette utvikler seg fra larve til yngelstadiet, og på hvilken måte det påvirkes av miljøfaktorer som temperatur og vannkvalitet, er viktig for å optimalisere oppdrettsbetingelsene og fastsette riktig tid for vaksinerings. Sykdomsfremkallende organismer er ofte artsspesifikke, og immunsystemets utvikling og funksjon

varierer ofte mellom fiskearter. Forskningsmessig gir dette en utfordring for hver ny oppdrettsorganisme.

Immunforsvar og kveite

Fisk beskytter seg mot angrep fra patogener, i første rekke ved hjelp av fysiske barrierer som slimhinne og hud. Når barrieren krysses, forsvarer fisken seg med både det uspesifikke (medfödde) immunforsvaret som holder seg uforandret gjennom livet, og det spesifikke immunforsvaret som er under stadig utvikling og spesialisering. Det spesifikke immunsystemet involverer hovedsakelig lymfoide organer (organer som deltar i immunforsvaret) som tymus, den fremste delen av nyren (fornyre) og milt, men andre organer som gjeller og tarm har også vist seg å være viktige. Som oss mennesker, har også fisk diverse typer hvite blodceller som utförer og hjelper med de forskjellige forsvarsmekanismene. For at fisken skal ta knekken på patogener, må det bli satt i gang en kjedereaksjon som til slutt kan føre til en beskyttende immunrespons. Den vil da primært reagere på tilstedeværelse av fremmede proteiner fra for eksempel virus, bakterier, sopp eller syntetiske proteiner, og vil så danne antistoffer som på ulike måter kan nøytralisere patogenet (involverer B-celler) og/eller ødelegge de infiserte cellene direkte (involverer T-cytotoksiske celler). Mot slutten av en vellykket immunrespons blir det vanligvis dannet hukommelsesceller (B- og/eller T-celler). Hvis fisken ved et senere tidspunkt nok en gang blir utsatt for samme type patogen, kan immunforsvaret være raskere. Utvikling av effektive vaksiner avhenger i hovedsak av muligheten til å aktivere hukommelsescellene som utgjör det spesifikke immunforsvaret.

Marine larver klekkes i et miljø der de kan bli utsatt for en rekke patogener, og det er ofte observert høy dødelighet i tidlige livsstadier, da immunsystemet ikke er ferdig utviklet. Dette understreker behovet for å etablere tilstrekkelig forebyggende tiltak som vaksinasjon og bruk av probiotika.



Tidsakse (døgn etter klekking, dek) for utvikling av immunsystemet hos atlantisk kveite. Stolpediagrammet viser den generelle utviklingen for alle immunmarkører testet hittil hos kveite (her representert med RAG1-gen), med økningen i tidlig metamorfose og nedreguleringen av immungener mot slutten av metamorfose. Som sett i figuren, blir de lymfoide organene vaskularisert (blodkar dannet) til forskjellige tider. RAG1, Lck, CD4, CD8 og IgM er molekyler involvert i immunforsvaret. Forkortelser: T – tymus, S – milt, dek – døgn etter klekking, is – *in situ*-hybridiseringsanalyse som viser at det aktuelle genet er uttrykt på mRNA-nivå (lillafargede celler), IHC – immunhistokjemi som viser at det aktuelle proteinet er til stede (rød farge).

Timeline (days post hatching) for the development of immune system in Atlantic halibut. Bar diagram in the centre shows a general trend observed in development of all immune markers (represented here by RAG1 gene) that were tested in halibut, with an increase during early metamorphosis, and down regulation of immune genes during late metamorphosis phase. As shown in the figure, the lymphoid organs become vascularised (formation of blood vessels) at varying time points. RAG1, Lck, CD4, CD8 and IgM are molecules involved in immune defense. Abbreviations: T – thymus, S – spleen, dek – days post hatching, is – *in situ* hybridization analysis showing the expression of the gene of interest at the mRNA level (violet coloured cells), IHC – immunohistochemistry analysis showing the presence of the protein of interest (red colour).

Imidlertid vil aktivering av det spesifikke immunforsvaret før fisken har utviklet effektive forsvarsmekanismer muligens kunne medføre økt mottakelighet mot det spesifikke patogenet. I oppdrett av kveite er det observert høy dødelighet under startfôringen og ved overgang til tørrfôr. Vi har derfor forsket på utviklingen av milt, fornyre og tymus, samt utviklingen av B- og T-celler for å kunne vurdere hvor tidlig det er mulig å vaksinere kveitelarven/-yngelen.

Det ble regelmessig tatt prøver av befructede egg, larver og yngelstadier av kveite som ble holdt under et normalt vekstregime. De ble fôret med anrikt *Artemia* frem til de kunne gå over på tørrfôr ved ca. 120 døgn etter klekking (dek). Alle de lymfoide organene var ferdig utviklet i slutten av metamorfosen. Ved hjelp av molekylærbiologiske- (real time RT-PCR og *in situ*-hybridisering) og immunhistokjemiske analyser, kunne vi se at utviklingen av både B- og T-celler var i full gang allerede etter 66 dek. Men sannsynligvis er ikke disse ferdig utviklet før ca. 87–94 dek (se figur). Da kan B-celler som trolig er modnet, ses både i nyre og milt, mens modne T-celler kan ses i tymus. Til tross for en generell trend der alle de undersøkte immunmarkørene viste en klar økning tidlig i metamorfosestadiet, kunne det ses en nedregulering av disse rundt overgangen til tørrfôr. En del studier har vist at forandringer i fetttsyresammensetningen i levende fôr (f.eks. fetttsyreanriking av *Artemia*) kan gi bedre immunrespons på et utviklingsstadium hvor larvene er veldig utsatt for infeksjoner. Dette bør dermed undersøkes for marine arter i akvakultur.

FAKTA

Patogener

Et patogen betegner en sykdomsfremkallende organisme, og kan være virus, bakterier eller parasitter. Patogene mikroorganismer kan enten være inne i cellene (intracellulære) eller i vevet mellom celler (ekstracellulære). De kan ha svært forskjellig evne til å overleve i miljøet, ofte påvirket av faktorer som ulikheter i virulens (mikroorganismens evne å fremkalle sykdom), ulik bredde i vertsspesifisitet og ulikheter i smittespredning. I tillegg kan patogener påvirke hverandre ved å opptre samtidig eller etterfulgt av hverandre. Generelt er ekstracellulære patogener enklere å bekjempe for vertens immunsystem. De fleste bakterier tilhører denne gruppen, og det har vist seg å være relativt enkelt å utvikle vaksiner mot disse i fisk. Intracellulære patogener, som innbefatter virus og en del bakterier, gjemmer seg i vertens celler og er dermed ikke så lett tilgjengelig for angrep fra vertens eget immunforsvar.