

Norsk–indisk samarbeid: Utvikler vaksiner til fisk og reker

I 2008 innvilget Norges forskningsråd penger til et forskningssamarbeid mellom norske og indiske forskere. Målet var å utvikle nye vaksiner til fisk og reker. I løpet av prosjekttiden er det utviklet potensielle vaksinekandidater mot atypisk furunkulose hos torsk, white spot syndrom virus (WSSV) hos reker, nodavirus hos kveite og IPN-virus hos laks. I tillegg er nano- og mikropartikler testet ut som vaksinebærere.

SONAL PATEL | sonal.patel@imr.no¹, HELENE MIKKELSEN²,
KIRON VISHWANATH³, ØYSTEIN EVENSEN⁴ og ROY DALMO⁵
1. Havforskningsinstituttet, 2. Nofima, 3. Universitetet i Nordland,
4. Norges veterinærhøgskole, 5. Universitetet i Tromsø

Prosjektet er delt i fem arbeidspakker. De inkluderer karakterisering av viktige komponenter hos bakterier og virus som kan stimulere immunsystemet hos vert på en spesifikk måte (antigener), utvikling av vaksiner, uttesting og dokumentasjon av effekten av vaksiner, herunder undersøkelse av forsvarsmekanismer hos de spesifikke vertsartene.

For å bekjempe ekstracellulære patogener (bakterier) er produksjon av antistoffer viktig, men når det gjelder intracellulære patogener (virus og noen bakterier) vil andre mekanismer som aktivering av cellulære drapsmekanismer være vel så viktige for å bekjempe selve infeksjonen. Virus og noen bakterier kan unngå å bli

bundet til antistoffene ved å "gjemme" seg inne i cellene. Det er nettopp slike patogener prosjektet ønsket å utvikle vaksiner mot. Antistoffproduksjon og spesifikke immunceller som dreper infiserte celler ved for eksempel å produsere en rekke cytokiner (signalstoffer) er en del av kroppens spesifikke immunforsvar. Derfor er styrken i denne delen av immunsystemet viktig for at en vaksine skal være effektiv. Ved å studere de involverte genene og deres mengdenivå etter vaksiner, immunstimulering og under infeksjoner, kan man finne ut hvilke forsvarsresponser som er aktive og sentrale hos fisk. En av utfordringene med vaksiner er at det må utvikles en vaksine for hvert patogen, men

i tillegg må det også utvikles en vaksine som kan gi beskyttelse mot samme patogen i flere fiskearter.

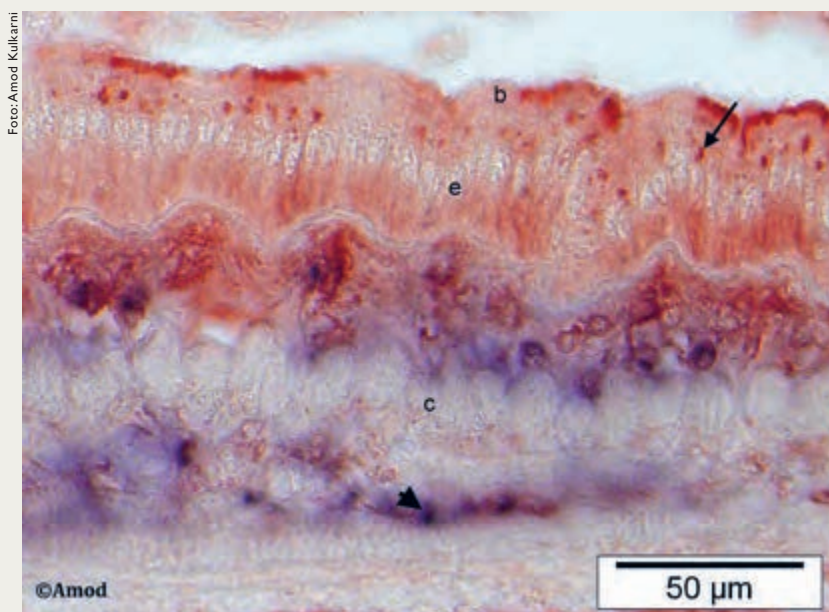
Bakterievaksiner

Bakterielle sykdommer som atypisk furunkulose, vibriose og francisellose er et stort problem for norsk torskeoppdrett, særlig ved stigende temperatur og under tilstander som fører til stress hos fisken. Vibriose har et akutt sykdomsforløp, mens furunkulose og francisellose har en mer kronisk karakter. Det finnes vaksiner mot vibriose og furunkulose, men ikke mot francisellose.

Sammen med vaksineselskapet PHARMAQ AS testet vi en oljebasert stikkvaksine med *Aeromonas salmonicida achromogenes* (bakterien som forårsaker atypisk furunkulose hos torsk) som ga god og langvarig beskyttelse mot sykdommen. Torsk som har fått en vaksine som inneholder ulike bakterier, utvikler et meget godt spesifikt immunforsvar, men for å fungere må vaksinen også inneholde de rette bakterietypene og deres komponenter. Vibriose forårsakes av flere serotyper av *Vibrio anguillarum*, og vi har vist at O2a ikke gir beskyttelse mot O2b og motsatt. I denne vaksinen er det proteinkomponenten, lipopolysakkarid (LPS), som er den viktige for å oppnå beskyttelse. Selv om torsk vaksinert mot vibriose har vist veldig lav antistoffrespons, fikk de god beskyttelse mot vibriose.

Vanskelig å lage vaksine mot francisellose

Utvikling av francisellosevaksine har vært vanskelig. En vaksine laget på tradisjonelt vis med drepte celler er testet, men den ga ingen effekt. For å studere nærmere hvordan bakterien infiserer torsken, ble makrofager (celler som aktivt spiser bakterier og dreper dem), isolert og etablert



Figur 1. Utsnitt av midttarmen i en tigerreke som fikk vaksine mot WSSV oralt. Viralt kappeprotein VP28 ble farget med anti-VP28 antistoff (rødt) og hemocytter med WSH8 antistoff (blå). Illustrasjonen viser opptak av vaksinekomponenter som resulterer i aktivering av hemocytter (markør) og oppsamling av vaksine (pil) på vei ut av tarmen. Forkortelser: b - mikrovilli på ytterste membran mot lumen, e - epitelcelle, c - bindevev under epitellaget.

i cellekultur, og deretter infisert med bakterien. Resultatet viste at bakterien *Francisella noatunensis* blir tatt opp i makrofagene, men de unngår å bli drept. Dermed kan de vokse og formere seg inne i disse cellene, og unngår dermed vertens forsvarsmekanismer. Senere kommer de ut av cellene og sprer seg videre i kroppen. Denne bakterien har i tillegg et såkalt LPS på overflaten, som torskens immunforsvar ikke gjenkjenner, og dette utgjør sannsynligvis en viktig virulensmekanisme (evne til å fremkalle sykdom) hos bakterien.

Hos karpfisk i India er det bakterien *Aeromonas hydrophila* (en slektning av bakterien som gir atypisk furunkulose) som fører til stor dødelighet i oppdrett, men vi har foreløpig ikke lyktes med å utvikle en vaksine mot denne bakterien.

IPN hos laks

IPN utgjør fortsatt et betydelig sykdomsproblem i norsk oppdrett. Selv om det kom en vaksine i 1995, har vi ikke sett stor nedgang i antall utbrudd. I dette prosjektet har vi testet en vaksine som viser at det lar seg gjøre å øke beskyttelsen mot IPN ved å optimalisere vaksinene. I forsøk viste vi at overlevelsen økes fra 40 til 90 prosent. Løsningen ligger i å øke antigenmengden i vaksinen, noe som har vært mulig ved bruk av ny dyrkningsteknologi. I samarbeid med et bioteknologiselskap på Taiwan klarte vi å tidoble mengden antigen i vaksinene, noe som igjen ser ut til å doble effekten av vaksineringsen. Oppskriften på en bedre IPN-vaksine er dermed enkel, men den betinger bruk av et virusisolat som lar seg dyrke til høye konsentrasjoner i cellekultur og som samtidig beholder immunogenisiteten, dvs. evne til å indusere en god immunrespons, særlig av nøytraliserende antistoffer.

Nodavirus hos kveite og torsk

Kapsidproteinene som finnes på nodaviruset sin overflate, ble uttrykt i *E. coli* og formulert i samarbeid med vaksineselskapet Pharmaq før vaksinen ble testet ut hos kveite. Vi undersøkte også regulering av immunrespons og reduksjon av virusmengde hos fisk etter vaksineringsen. Resultatet viste at denne vaksinen har godt potensial til å bli utviklet videre. I tillegg ble kapsidproteinene uttrykt i tobakksblader og senere i salatblader i samarbeid med Universitetet for miljø- og biovitenskap på Ås. Hensikten er å lage store mengder med antigen som gir mulighet for å lage billigere og mer effektive vaksiner. Proteinene skal renses ut av blader og testes hos kveite og torsk for å undersøke effekten.

WSSV på reker

White-spot syndrom virus (WSSV) er en sykdom som har plaget rekeoppdrett i en sykdom som har plaget rekeoppdrett i over 20 år siden det første utbruddet på Taiwan. Dette viruset infiserer en rekke rekearter i oppdrett, inkludert tigerreker (*Penaeus monodon*). Effektiv behandling er ikke tilgjengelig, og infiserte reker dør raskt. Det jobbes globalt med å utvikle vaksiner mot WSSV basert på genteknologi, og i vårt prosjekt jobber både indiske og norske samarbeidspartnere med dette.

Vi har vaksinert reker med levende WSSV eller ulike vaksinekomponenter gitt oralt, og videre mekanismer ved infeksjon og vaksinasjon ble studert. WSSV blir hovedsakelig tatt opp i mellomarmen hos reker (figur 1). En rekombinant vaksine og levende virus kan bli tatt opp ved hjelp av spesielle reseptorer, antigenene blir deretter transportert over tarmslimhinnen og immunresponsen settes i gang i bindevevet. Sannsynligvis kan oraltvaksiner være effektive på reker.

Vaksinebærere og adjuvanter

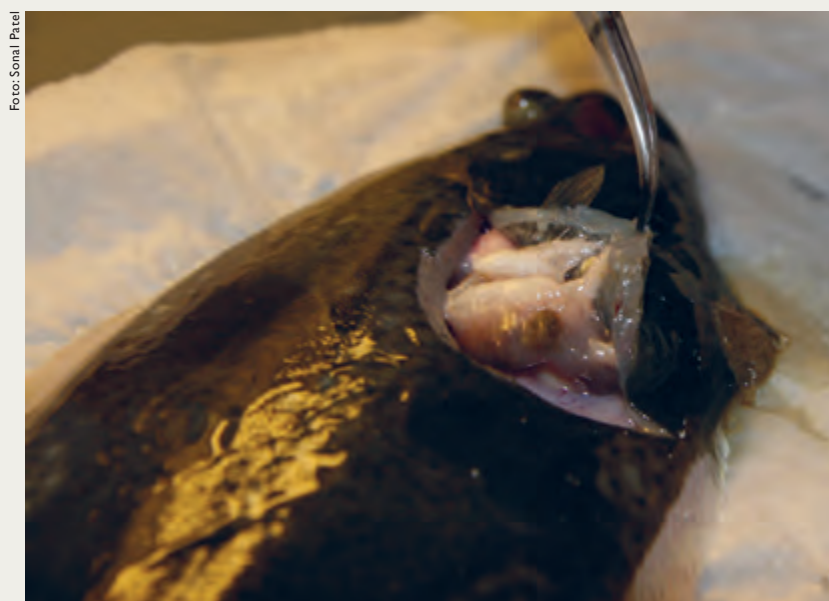
De fleste vaksiner inneholder diverse adjuvanter, dvs. hjelpestoffer som bedrer og forsterker immunforsvaret. I vaksiner til laksefisk benyttes en olje-emulsjon blandet med ulike antigener som gir spesifikk immunrespons og beskyttelse. Et lovende vaksinekonsept innebærer bruk av biologisk nedbrytbare nano- og mikropartikler som både vaksinebærere og adjuvans. Antigener kan relativt lett bakes inn i partikler sammen med immunstimulanter. Disse partiklene har noe likhet med patogenene selv – dvs. noe eksponering av antigen på overflaten samt at antigener frigis når partiklene

brytes ned. Sluttproduktet suspenderes i en egnet løsning før injeksjon i fisk. Etter injeksjon tas partiklene opp i antigen-presenterende celler som siden kan presenteres på celleoverflaten via spesifikke reseptorer. Dette bidrar til aktivisering av antistoffproduserende celler og cytotoxiske celler som igjen dreper virusinfiserte celler. Resultatene viser at slike nanopartikler er effektive mot intracellulære patogener samtidig som de induserer økt antistoffproduksjon. Når slike nanopartikler (PLGA-partikler) ble brukt i kombinasjon med IPNV, fikk laks beskyttelse mot viruset.

Konseptet med å benytte nano- og mikropartikler som vaksinebærere må utvikles videre for at det skal kunne erstatte dagens oljebaserte vaksiner som medfører bivirkninger som sammenvoksing i bukhulen hos fisk (figur 2). En av hovedutfordringene med den nye metoden er å oppnå optimal antigenmengde i partiklene.

Samarbeidet Norge–India

I løpet av prosjektperioden er det bygget opp et godt samarbeid mellom de norske og de indiske forskningsgruppene, noe som kommer til å danne grunnlag for fremtidig samarbeid innen vaksineutvikling. I løpet av prosjektperioden har det blitt jobbet med en vaksinestrategi mot tre virus som påvirker tre vidt forskjellige arter i Norge; IPN på laks, nodavirus på kveite og WSSV på reker. Tilsvarende arbeid har foregått på spesifikke patogener (for eksempel nodavirus) hos karpfisk i India. Prosjektet er planlagt avsluttet i august 2013.



Figur 2. Milde bivirkninger som for eksempel sammenvoksning i bukhulen hos kveite kan oppstå på grunn av adjuvans som brukes i dagens vaksiner. Den nye teknologien med nano- og mikropartikler kan kanskje bidra til å redusere slike bivirkninger.