

# **Påvirker avlsarbeidet for økt sykdomsresistens forekomsten av vaksineskader og effekten av vaksinerings?**

## **Mål**

Sykdommer i oppdrett av laks har negativ påvirkning på økonomi og omdømme, og på fiskens velferd. Laksen vaksineres derfor mot flere sykdommer. Samtidig selekteres det i avlsarbeid for økt sykdomsresistens basert på resultater fra smittetester med uvaksinert fisk. Det er kjent at vaksinerings fører til bivirkninger i form av sammenvoksinger og melaninavleiringer, redusert vekst og i noen tilfeller også til ryggdeformiteter. Et hovedmål var derfor å få en bedre forståelse for hvordan man bør selektere for økt resistens mot bakteriesykdommen furunkulose (forårsaket av bakterien *A. salmonicida*), og i hvilken grad dette kan påvirke bivirkninger av vaksinerings. Videre undersøkte vi hvordan vaksinebivirkninger utvikler seg over tid og størrelsen på den genetiske variasjonen i bivirkninger med tanke på eventuell seleksjon mot bivirkninger, og om en ny formulert vaksine kunne gi reduserte bivirkninger. Infeksiøs lakseanemi (ILA) og infeksiøs pankreasnekrose (IPN) er viktige virussykdommer i oppdrett av laks og vi ønsket også å undersøke hvordan disse sykdommene var korrelert til vaksinebivirkninger.

Hva som er den underliggende årsaken til den betydelige genetiske variasjonen i resistens mot furunkulose er ikke kjent; på gennivå eller på et funksjonelt, cellulært nivå. En viktig celletype i kampen mot infeksjon med *A. salmonicida* er makrofager. Et mål var derfor å finne ut om individer fra familier med høy og lav mottagelighet for furunkulose hadde ulik makrofag aktivitet, dvs. evne til å ta opp og drepe bakterier.

## **Hypotese 1-6: Genetisk sammenheng mellom sykdomsresistens hos uvaksinert og vaksinert fisk, mellom sykdomsresistens og vaksinebivirkninger og mellom ryggdeformitet og vaksinebivirkninger**

Alle sykdommene (furunkulose, ILA og IPN) viste betydelig genetisk variasjon. Den genetiske korrelasjonen mellom resistens mot furunkulose registrert på uvaksinert og vaksinert fisk var relativt lav noe som indikerer at dette er delvis to ulike egenskaper. Dagens avlsstrategi basert på smittetester med uvaksinert fisk er optimal hvis det langsiktige avlsmålet er å eliminere eller redusere bruken av vaksinerings. Men på kort sikt er seleksjon basert på vaksinert fisk en bedre strategi ettersom all fisk i næringen vaksineres. Mellom sykdommene furunkulose, ILA og IPN fant vi lave og positive genetiske korrelasjoner, Avl for økt resistens mot en av disse sykdommene vil derfor gi en positiv korrelert respons for de to andre sykdommene.

For vaksinebivirkninger (sammenvoksinger og melaninflekker) ble det funnet middels høye arvegrader, og en høy genetisk korrelasjon mellom bivirkninger registrert på fisk etter 6 og 12 måneder i sjøen. Men den genetiske korrelasjonen mellom vaksinebivirkninger registrert på fisk i ferskvann og etter noen måneder i sjøen var betydelig lavere. Det betyr at en test av familier av laks for vaksinebivirkninger må skje basert på data registret på fisk i sjøen. Fisk vaksinert med full dose av den kommersielle vaksinen hadde lavere vekst og mer vaksineskader enn fisk som fikk et redusert volum av den nykomponerte vaksinen. Vaksinert fisk hadde betydelig lavere vekst enn uvaksinert fisk. Den reduserte vekst hos vaksinert fisk ser derfor ut til å være en bivirkning av vaksinerings. Bivirkninger av vaksinen kan derfor gjennom avl reduseres ved å selektere for fisk med lite bivirkninger. Men det er sannsynlig mer hensiktsmessig å fokusere på andre tiltak som for eksempel vaksineutvikling.

Egenskapene vaksinebivirkninger, sykdomsresistens (furunkulose, ILA, IPN) og slaktevekt ble funnet å ikke være genetisk korrelerte, med et mulig unntak mellom slaktevekt og overlevelse av vaksinert fisk i smittetest (furunkulose) hvor det ble funnet en svak,

ugunstig genetisk korrelasjon. At den genetiske korrelasjonen mellom vaksinebivirkninger og vekt ikke var signifikant forskjellig fra null er i tråd med tidligere funn der en fant at laks selektert i seks generasjoner (vesentlig for tilvekst) ikke hadde mer vaksinebivirkninger enn vill laks. Dette betyr at det er mulig å gjøre et effektivt utvalg for alle disse egenskapene i avlsarbeidet, og mer spesifikt at dagens avlsarbeid med fokus på tilvekst og sykdomsresistens hos uvaksinert fisk ikke vil føre til økte vaksinebivirkninger.

Det ble funnet en betydelig genetisk variasjon i ryggdeformiteter (fusjoner), men ryggdeformitet var ikke genetisk korrelert til vaksinebivirkninger (sammenvoksinger og melanin). Med omsyn til deformitet var det ubetydelige og ingen signifikant forskjell mellom fisk som hadde fått full og redusert vaksinedose og mellom vaksinert og uvaksinert fisk. Dette tyder på at ryggdeformitet i det vesentlige er påvirket av andre genetiske faktorer enn vaksineskader.

### **Hypotese 7: Er det genetisk sammenheng mellom makrofagaktivitet og resistens mot furunkulose?**

Individer fra familier med høy og lav mottagelighet for furunkulose ble benyttet som "donorer" av makrofager (fra hodenyre) som ble isolert og holdt i kulturer. Etter at kulturene var godt etablert ble kulturene tilsatt modellbakterier (*E. coli*). Disse bakteriene er konstruert slik at man enkelt kan vurdere antall bakterier pr celle da de avgir et fluorescens-signal. På ulike tidspunkt etter at bakteriene ble tilsatt ble makrofagenes evne til fagocytose målt, hvor fagocytotisk kapasitet tas som et uttrykk for evne til å ta opp bakterier og i neste instans drepe bakteriene. Opptak av bakterier ble målt ved flow-cytometry som gir muligheter for å analysere et stort antall celler samt at målemetoden er kvantitativ.

Antall bakterier i makrofagene økte med inkuberingstiden. Et overraskende funn var at en større andel av makrofagene fra fisk fra lavresistente familier hadde tatt opp bakterier sammenlignet med makrofager fra høyresistente familier. Disse forskjellene var signifikant forskjellige både 2, 4 og 7 timer etter bakterietilsetning. Av de cellene som hadde tatt opp bakterier var det ikke forskjell i opptakskapasitet (antall bakterier per celle) mellom familiene. Funnene er overraskende og kan indikere at makrofagene hos lavresistente fisk tar opp bakteriene etter at disse har vunnet innpass i sirkulasjonen og dermed sprer infeksjonen raskere rundt i kroppen. Det bør foretas ytterligere studier for å forklare disse forholdene.

### **Hypotese 8: Genetisk sammenheng mellom antistoffrespons mot et furunkuloseantigen og resistens mot furunkulose målt i smittetest med uvaksinert og vaksinert fisk**

Vaksinert og uvaksinerte laks fra samme familiegrupper ble testet for mottagelighet for *A. salmonicida* i to uavhengige smittetester. Basert på de to testene ble serum fra vaksinert fisk fra fire utvalgte familiegrupper undersøkt for antistoffer mot *A. salmonicida* ved bruk av en ELISA. Familiene ble utvalgt mhp deres mottagelighet for furunkulose hos uvaksinert fisk (naturlig immunitet) og vaksinert fisk (indusert eller adaptiv immunitet). De fire gruppene, hver med 5 familier og 8 fisk per familie, var: (1) lav (uvaksinert) og lav (vaksinert), (2) lav (uvaksinert) og høy (vaksinert), (3) høy (uvaksinert) og lav (uvaksinert) og (4) høy (uvaksinert) og høy (vaksinert). Det ble ikke påvist noen signifikant forskjell i antistofftiter mellom de fire gruppene av familier (for de vaksinerte individene). Funnene peker mot at de medfødte, immunologiske forsvarmekanismene spiller en viktig rolle for mottagelighet (eller resistens) overfor smitte med *A. salmonicida*. Dette kan muligens tolkes som at induserte adaptive responser bare i noen grad kan veie opp for fravær av naturlig immunitet, noe som

står i kontrast til den betydning som man antar at vaksinasjon har for beskyttelse mot furunkulose.

### **Tillegg studium: Test av reproduserbarhet av antistoff ELISA for atlantisk laks**

For å evaluere immunogenisiteten til vaksiner benyttes ofte laboratoriemålinger, som ELISA. Titer kan måles ved ELISA og gjerne ved å lage en endepunkts-titreringskurve. Punktet defineres som den fortykning som gir et signal (optisk tetthet; OD) som er to-tre standard-avvik over en negativ kontroll. Ofte benyttes en enkel fortykning med avlesning av en OD verdi direkte eller som en ratio av en positiv kontroll. For å kunne sammenligne data fra ulike plater (gjennomført på ulike tidspunkter eller personer) benyttes gjerne positive kontroller, men det er få etablerte studier som angir hvilke kriterier som skal benyttes. For fiske serum er det i tillegg få studier som viser fortykningskurver eller som har vist reproduserbarheten mellom ulike oppsett.

De studiene som ble gjennomført under Hypotese 1-6 ga oss tilgang til et stort antall serumprøver og av et relativt stort volum fra samme individ. På grunn av de ikke signifikante resultatene i Hypotese 8 ble det foretatt en validering av ELISA metoden. Prøver fra samme individ ble undersøkt i to ulike oppsett og med en definert fortykning i to paralleller og samtidig på to ulike plater (ved hvert oppsett). Funnene viser en korrelasjon mellom OD verdier for individer på to ulike fortykninger på 0.93 og mellom OD verdier for individer på ulike plater på 0.96, og korrelasjonene mellom to paralleller var på 0.97. Metoden ser derfor ut til å være pålitelig.

### **Utførte FoU-oppgaver**

1. Statistisk analyse av smittetestdata (furunkulose og ILA) og vaksinebivirkningsdata fra to årsklasser laks (1995 med 62 familier; 1997 med 120 familier) fra AquaGen.
2. Data fra fire smittetester med kohabitantsmitte, hver test med fisk fra 154 familier av årsklasse 2007 fra SalmoBreed:
  - a) Vaksinert fisk (full og redusert dose av en kommersiell vaksine) testet for motstand mot furunkulose (fisk levert av SalmoBreed).
  - b) Uvaksinert fisk testet for motstand mot furunkulose (fisk levert av SalmoBreed)
  - c) Uvaksinert fisk testet for motstand mot ILA (data fra SalmoBreed)
  - d) Uvaksinert fisk testet for motstand mot IPN (data fra SalmoBreed)
3. Bivirkninger som følge av vaksiner (sammenvoksinger i bukholen og melaninavleiring, ryggdeformiteter (bedømt fra et røntgenbilde) og vekt ble registrert ved tre ulike tidspunkt:
  - a) Tre måneder på høy temp. (17 °C) i ferskvann (vaksinert med kommersiell vaksine)
  - b) Seks måneder etter sjøutsett (vaksinert med kommersiell og nykomponert vaksine)
  - c) 12 måneder etter sjøutsett (vaksinert med kommersiell vaksine)I tillegg ble det, både i ferskvann og i sjøen, inkludert en liten gruppe uvaksinert fisk.
4. Test av makrofagaktivitet med makrofager (fra hodenyre) fra individer i familier med høy og lav mottagelighet for furunkulose.

### **Involverte miljøer**

Nofima var ansvarlig for røkting av fisk fra merking (FoU oppgave 2a, 2b og 3), den praktiske gjennomføringen av forsøkene i 2a, 2b og 3 og de statistiske analysene av data. I FoU oppgave 2a og 2b og 3 ble det brukt 6-komponent vaksiner produsert av PHARMAQ, og personer fra PHARMAQ bedømte vaksinebivirkninger i de nevnte FoU oppgavene. NVH var ansvarlig for uttak av blodprøver for analyser av antistoff (3a og 3b) og for uttak av hodenyre

for dyrking av makrofager (4). Nofima, PHARMAQ og NVH har alle tatt del i planlegging av forsøkene i FoU oppgave 2, 3 og 4 og i diskusjon av resultater. Alle smittetestene ble gjennomført ved VESO Vikan.

### **Prosjektgjennomføring og ressursbruk**

Alle forsøk har blitt gjennomført uten uhell av noen slag noe som har bidratt til data av høy vitenskapelig kvalitet. Det er publisert fem vitenskapelige artikler og to populærvitenskapelige artikler. Tre av de publiserte vitenskapelige artiklene var en del av Tale K. Drangsholt sin PhD grad ved IHA/UMB. Det er holdt fem foredrag på internasjonale møter/konferanser og 10 foredrag/poster på nasjonale møter/konferanser. Prosjektet er omtalt i tre artikler publisert på [www.nofima.no](http://www.nofima.no), en på [www.kyst.no](http://www.kyst.no) og en på [www.fiskerifond.no](http://www.fiskerifond.no).

### **Betydning og nytteverdi av resultatene**

I tidligere publisert litteratur finnes det ikke for noen sykdom og dyr et estimat av den genetiske korrelasjonen mellom resistens målt på uvaksinerte og vaksinerte dyr. For furunkulose vart denne korrelasjonen funnen å være lav (0.32 - 0.54). Visst den tilsvarende korrelasjonen er låg for andre sykdommer hos laks, som for eksempel IPN, ILA og PD som det i dag ikke finnes noen effektive vaksiner mot, har det stor betydning for hvilken strategi som bør velges i avlsarbeidet for seleksjon for økt sykdomsresistens; dvs. smittetester med uvaksinert fisk (langsiktig strategi som i dag) eller vaksinert fisk (en mer kortsiktig strategi med tro på at det innen relativ kort tid vil bli utviklet en mer effektiv for den aktuelle sykdommen). Det er derfor viktig at en kan få fram pålitelige estimat av denne korrelasjonen for de nevnte sykdommene hos laks.

### **En beskrivelse av hvordan resultatene forventes fulgt opp, formidlet og utnyttet**

Resultater er formidlet i vitenskapelige og populærvitenskapelige artikler og på foredrag på flere nasjonale og internasjonale møter (se vedlegg). PHARMAQ har gjennom prosjektet opparbeidet erfaring med en ny vaksine som blir gitt med dose volum på 0.05 ml/fisk og har ei endret formulering sammenlignet med tidligere vaksiner til fisk. Den nye vaksinen gir mindre bivirkninger i form av mindre adherenser og den gir bedre tilvekst enn den tidligere vaksinen. Siden det finnes en svært effektiv vaksine mot furunkulose har avlsselskapene sluttet å teste fisken mot furunkulose og slik heller kan legge mer vekt på de tre virussykdommene IPN, ILA og PD da det ikke finnes gode vaksiner mot noen av disse virus sykdommene. I dag gjennomføres smittetestene mot disse tre virussykdommene med uvaksinert fisk, mens laksen før utsett i sjøen i økende grad også vaksineres mot disse virussykdommene. Derfor bør en få gjort smittetester med et familiemateriale av både uvaksinert og vaksinert laks også mot disse sykdommene.

### **Resultater som forventes ferdigstilt etter prosjektslutt**

Tre vitenskapelige artikler er under utarbeiding med alle resultater presentert i tabeller og figurer. I tillegg kan det bli aktuelt med en fjerde artikkel om reproduserbarhet av antistoff ELISA.