



UNIVERSITETET I
NORDLAND

Probiotika og immunstimulerende midler for å bedre helse

SATS PÅ TORSK

Nettverksmøte 2011, 9-10 February

Kiron Viswanath

Faculty of Biosciences and Aquaculture, University of Nordland

Sykdommer på torsk: årsaker



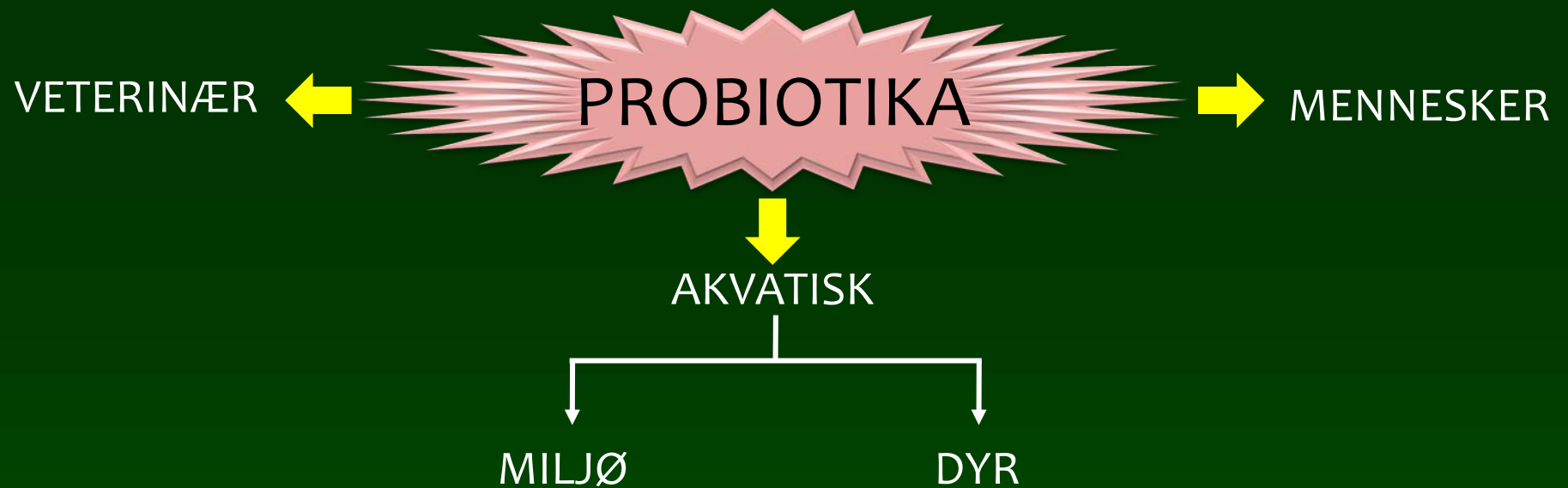
Håndtering av fiskehelsen

- “Status-quo” på fiskehelse
- Identifisere risiko og håndtere dette
- Utbrudd av sykdom – begrense eksponering og kontrollere spredning av patogener
- Senitive og effektive behandlingsmetoder
- **Forebyggende helsearbeid**

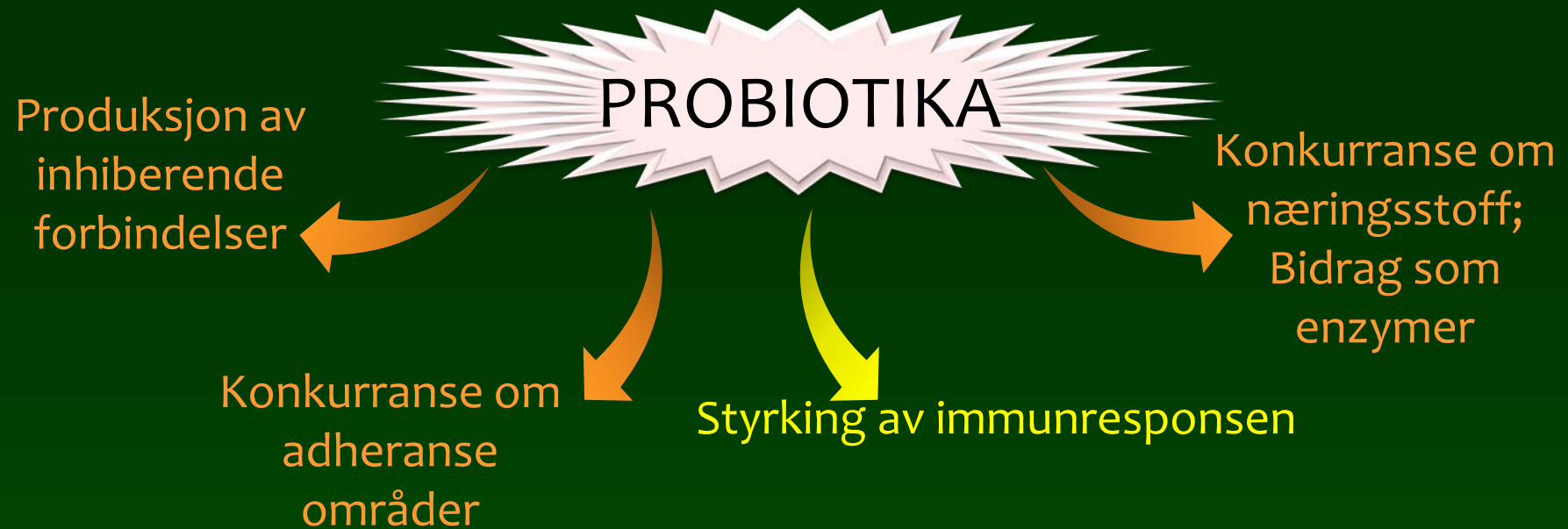
FAO anbefalinger for å kontrollere sykdom

- Utvikle av rimelige men effektive vaksiner
- Bruk av immunostimulanter og uspesifikke immunstimulanter
- Bruk av probiotika
- Bioaugmentasjon – bruk av mikroorganismer for å bedre vannkvaliteten og miljøet

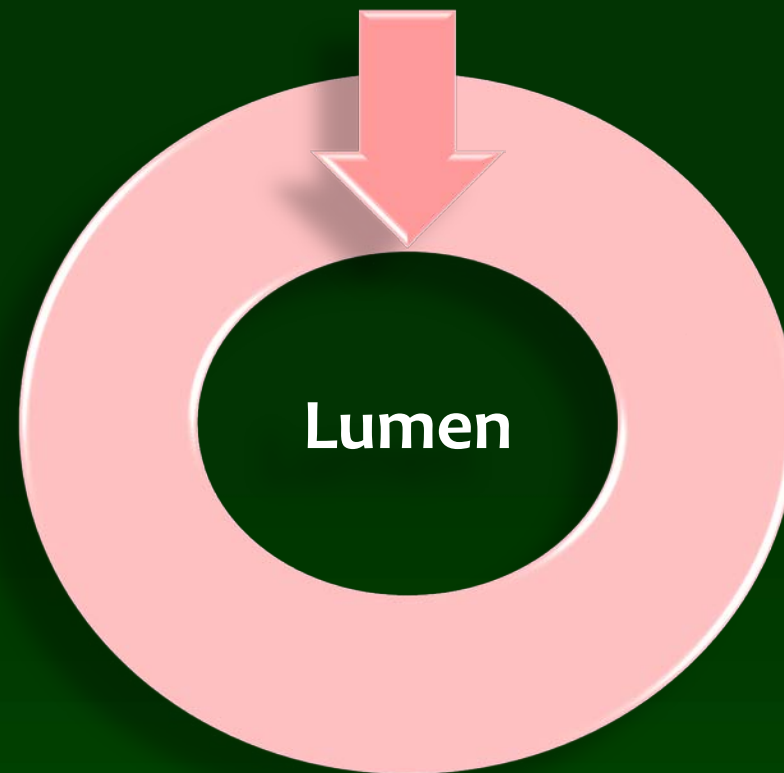
Probiotika i akvakultur



Måter å virke på

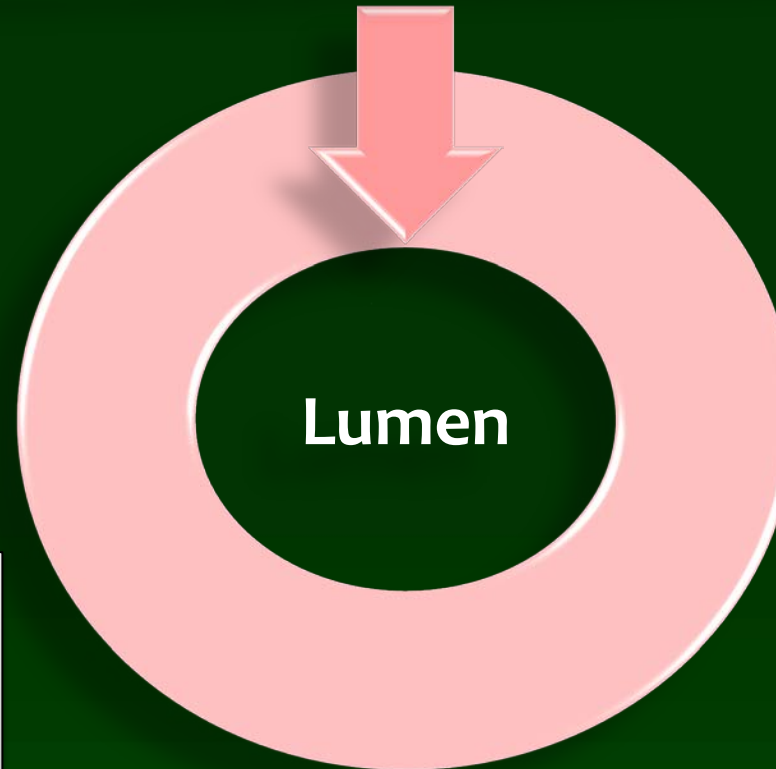


Tarmepitel– en barriere mot det ytre miljø



- Mukus fra goblet celler
- Apikal surt mikromiljø i tarmepitel
- Cell turnover
- Peristalsis
- Antibakteriell aktivitet i epidermal mukus

Tarmepitel- en barriere mot det ytre miljø



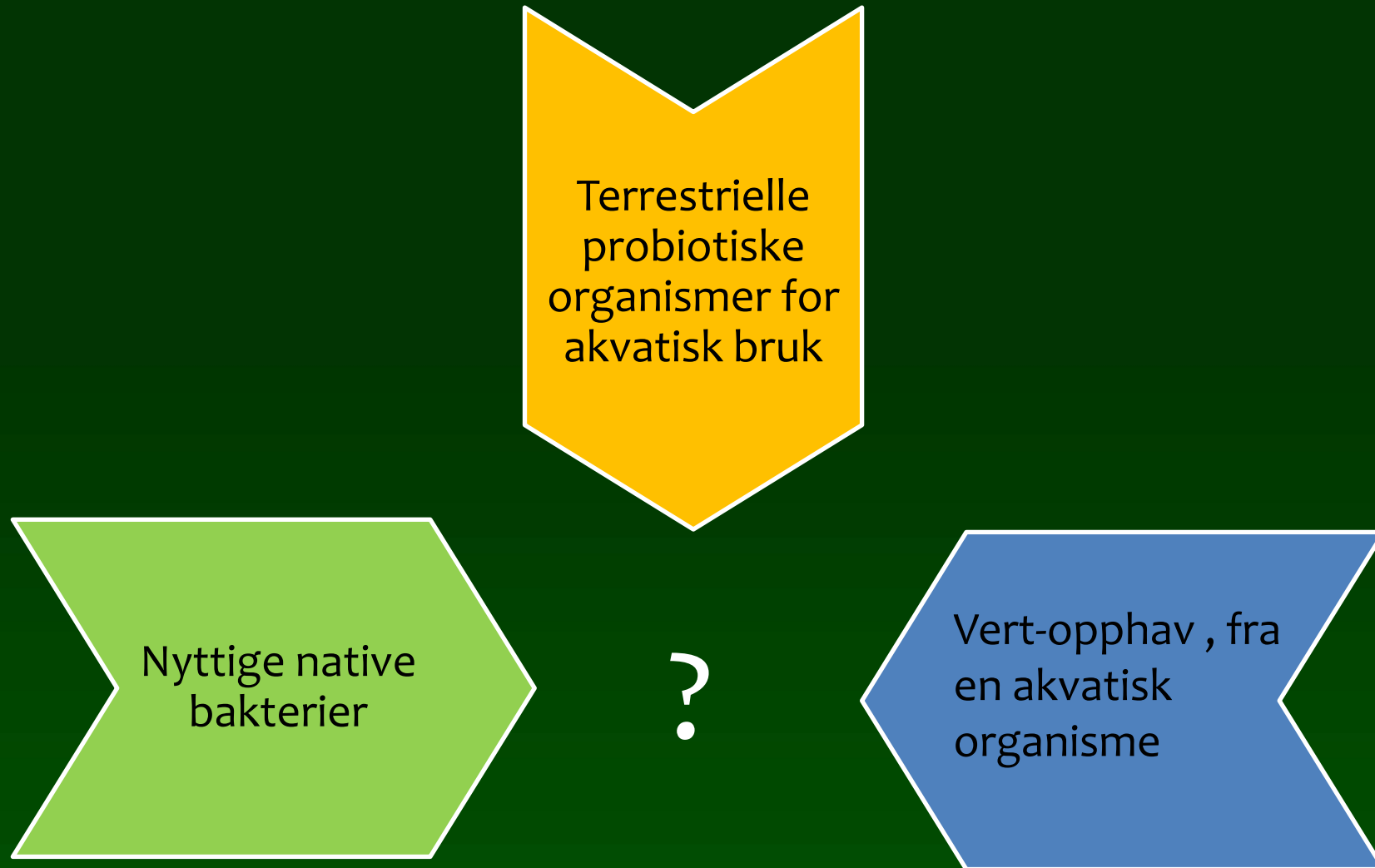
Disse proteiner gjør epitelceller i stand til å koordinere hendelser i tarmen.

ENTEROCYTT FUNKSJONER

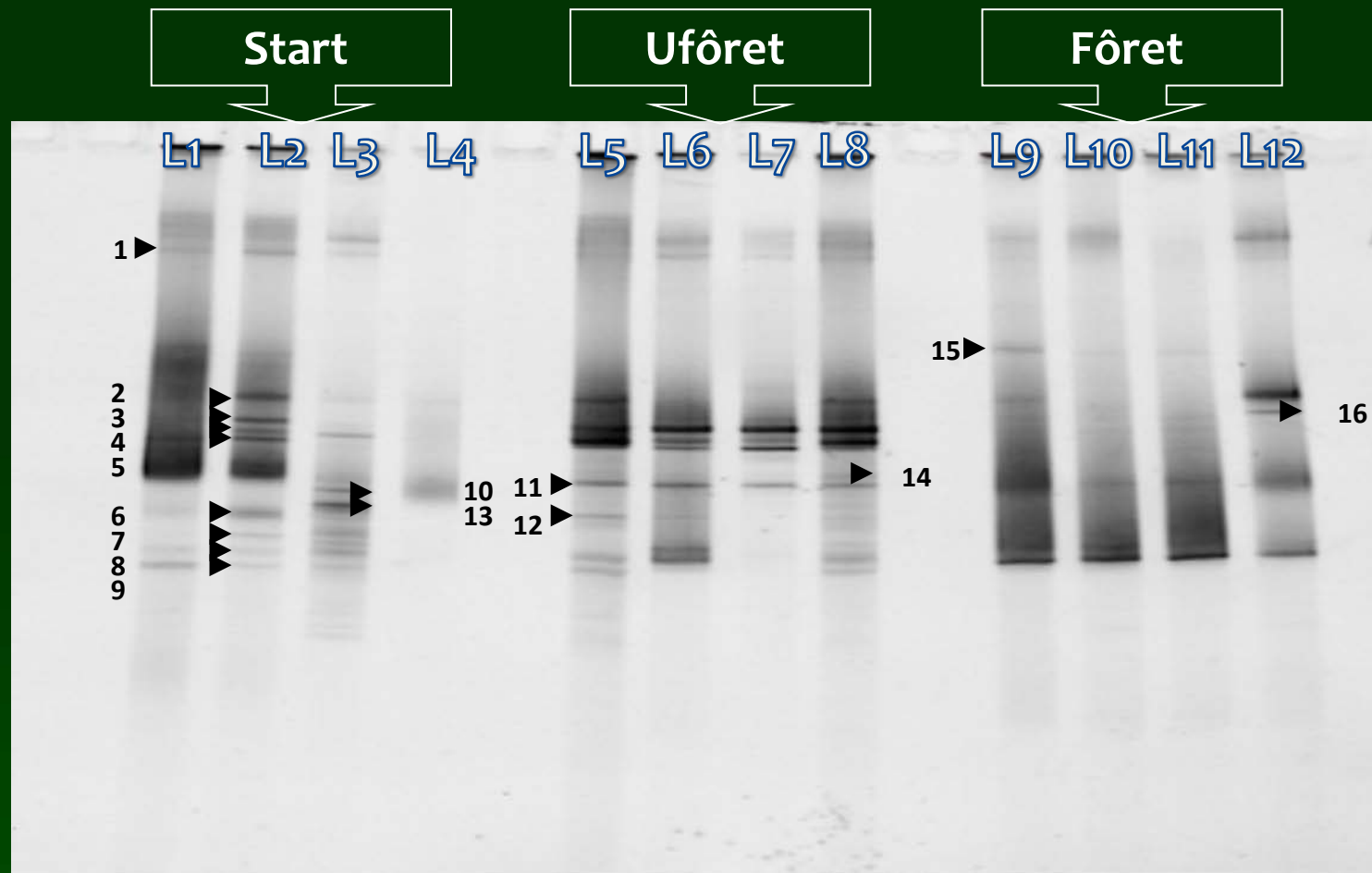
- Fanger opp makromolekyler
- Absorberer næring
- Fungerer som **immunceller**

- Tilstedeværelse av reseptorer for bakterielle produkter
- Uttrykking av overflatemolekyler som inneholder immunoglobulin områder
- Uttrykker **proteiner** som har interaksjoner med immunocytter i tarm

Kilder til nyttige bakterier

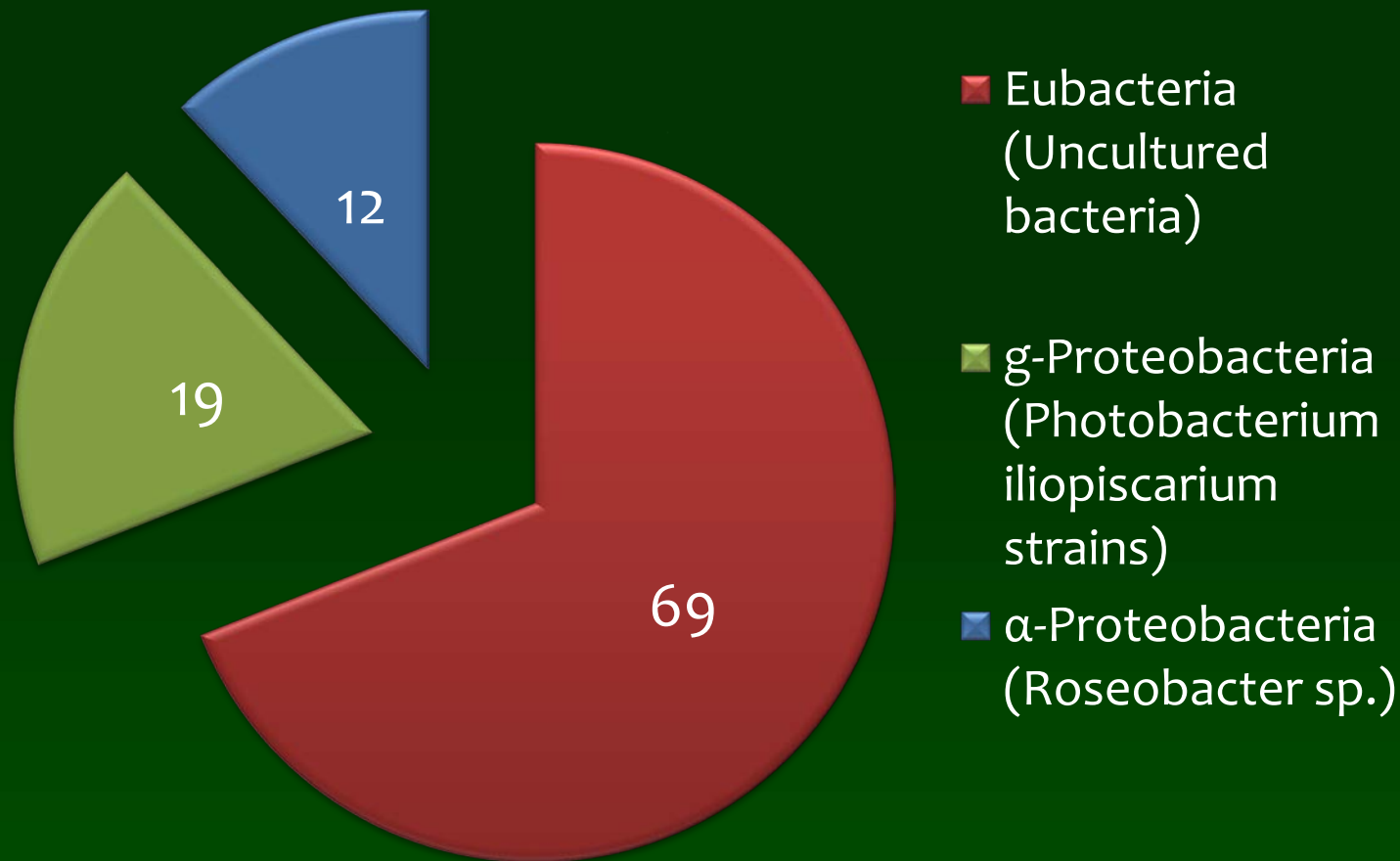


Bakteriell diversitet i tarm hos vill-fanget torsk



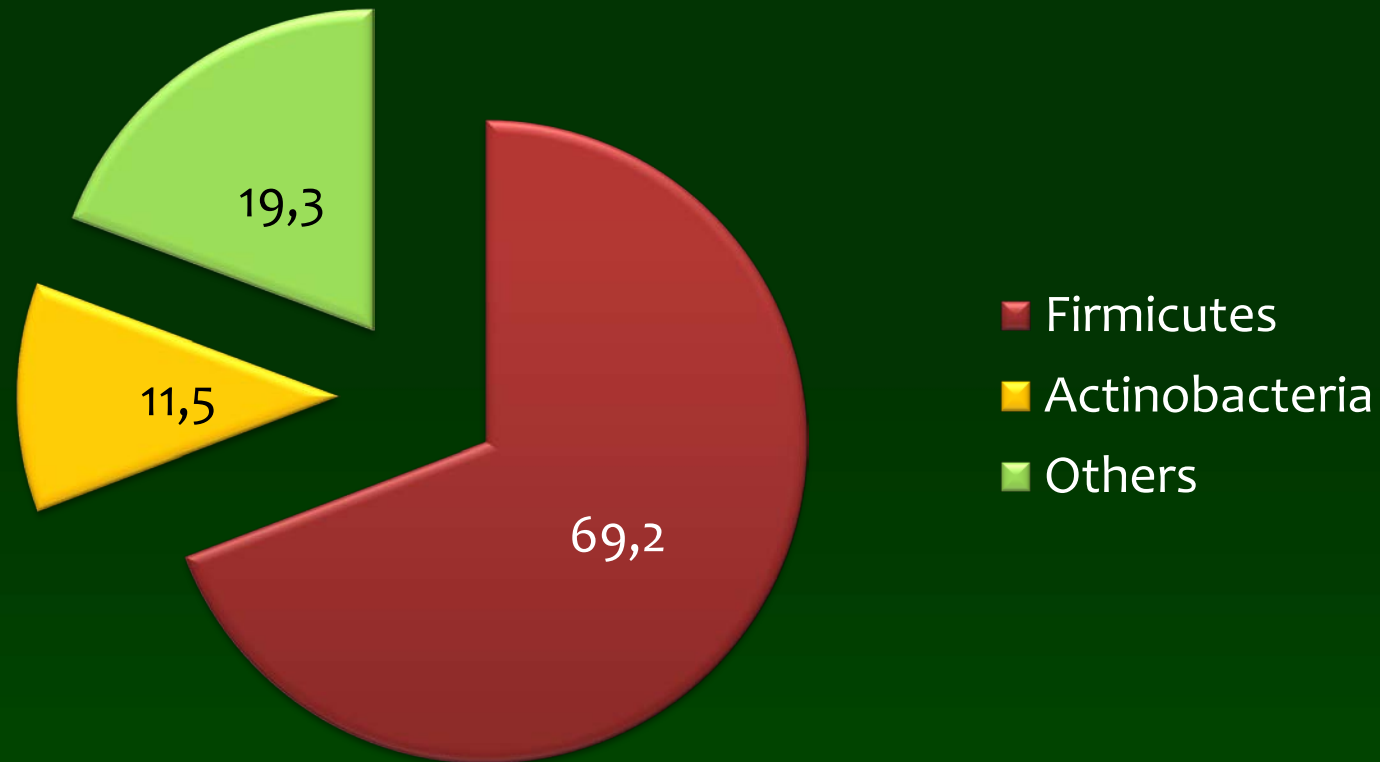
Diversiteten i det bakterielle tarmsamfunnet ble redusert som følge av fôring, mens det var liten forandring ved sulting.

Gruppering av bakterieisolater i tarm fra vill-torsk



197 isolater ble undersøkt, 29 (14.8%) var antagonistisk mot *Vibrio anguillarum*, *A. salmonicida*.

Potensielle probionter fra torskeklekkeri



188 isolater ble undersøkt, 6 (3.2%) var antagonistisk mot *Vibrio anguillarum*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* og *V. salmonicida*

Evolusjon av mikrobiota assosiert med torskelarver i klekkeri

Egg/start
fôring

- *Colwellia* spp. (rapidly disappeared from microbiota)

1. 3 uker
med fôring

- *Vibrio logei*, *V. fischeri* & *V. anguillarum*
- *V. anguillarum*, *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp. - (larval GI tract)

2. 3 uker
med fôring

- *Flexibacter aurantiacus*, a species of *Sulfitobacter*, & putative *Mycoplamsa* sp (50th day dominant).

Ingen korrelasjon mellom mikrobiota assosiert med levende fôr og i tarm hos torskelarver.

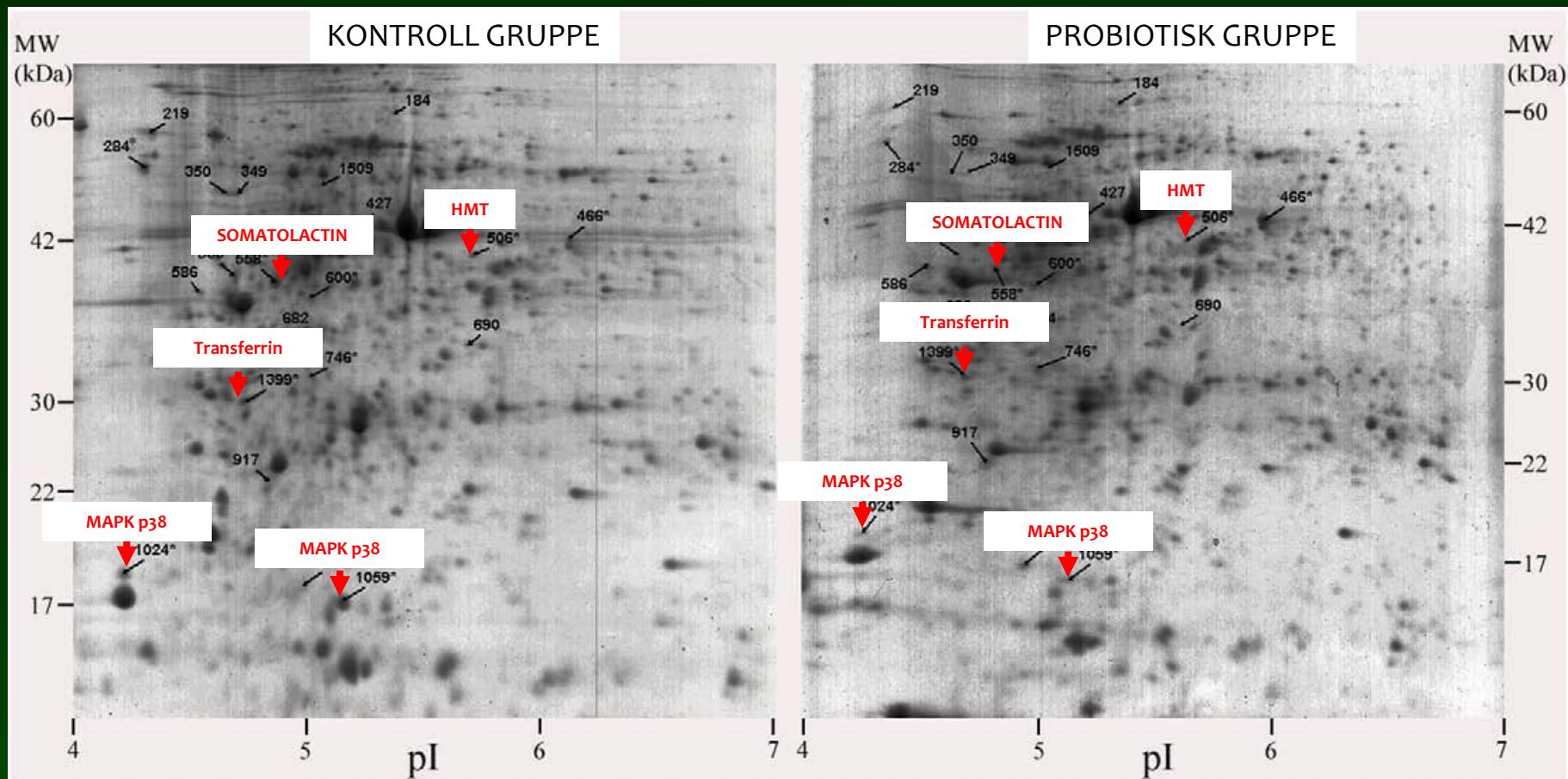


Probiotika behandling gjennom larvefasen



**0.1 g/l probiotiske bakterier i sjøvann, *0.04g/l probiotiske bakterier i sjøvann
+hjuldyr anriket med 12 g blanding med probiotiske bakterier/500,000 hjuldyr

Proteiner fra torskelarver etter fôring med probiotika

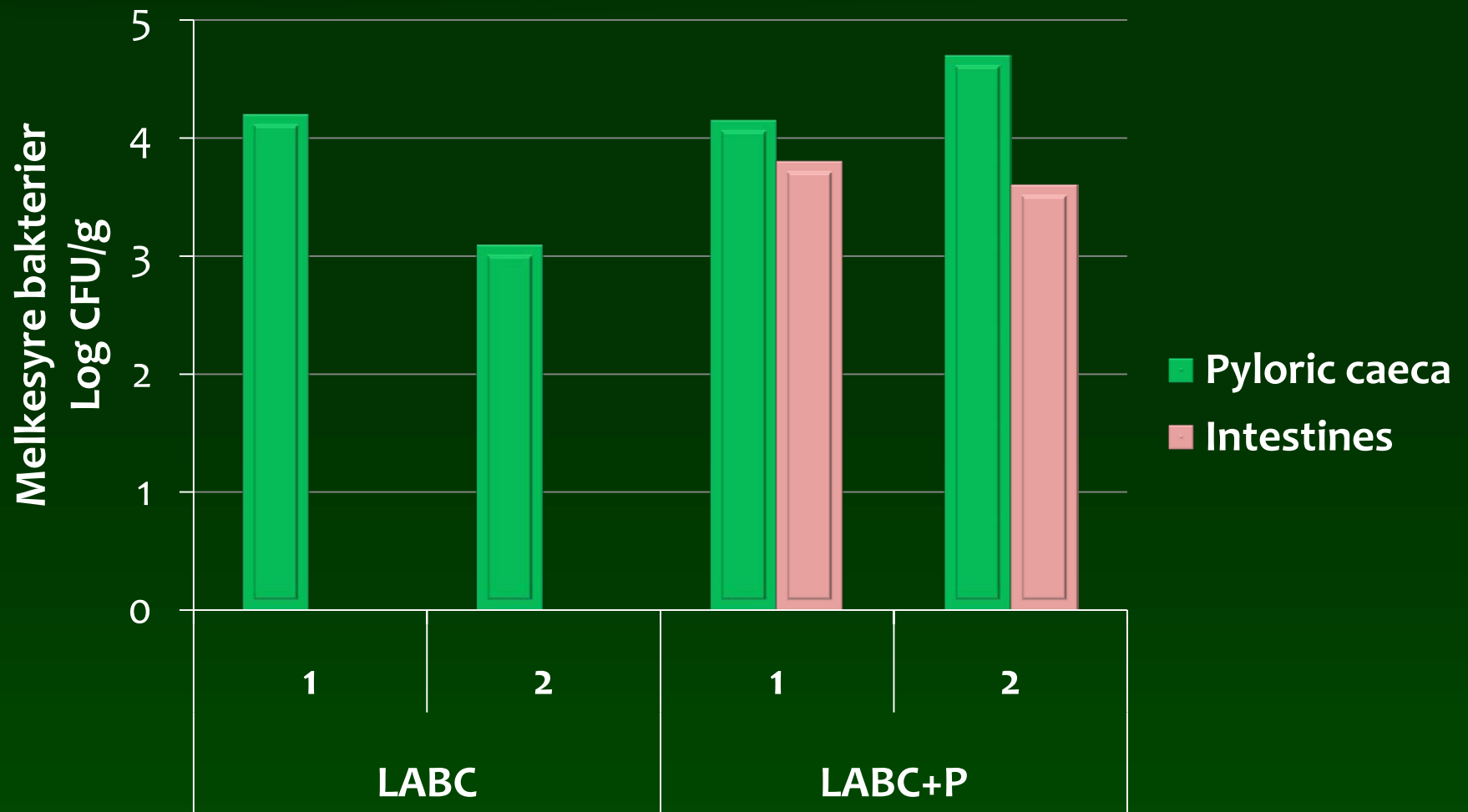


3 til 3.6 gang nedregulering av immunrelaterte proteiner i probiotisk gruppe. Probiotiske bakterier kan ha utkonkurrert patogene bakterier, som kan ha resultert i lavere uttrykking av immunrelaterte proteiner i denne gruppen.

Probiotika med opphav fra verten

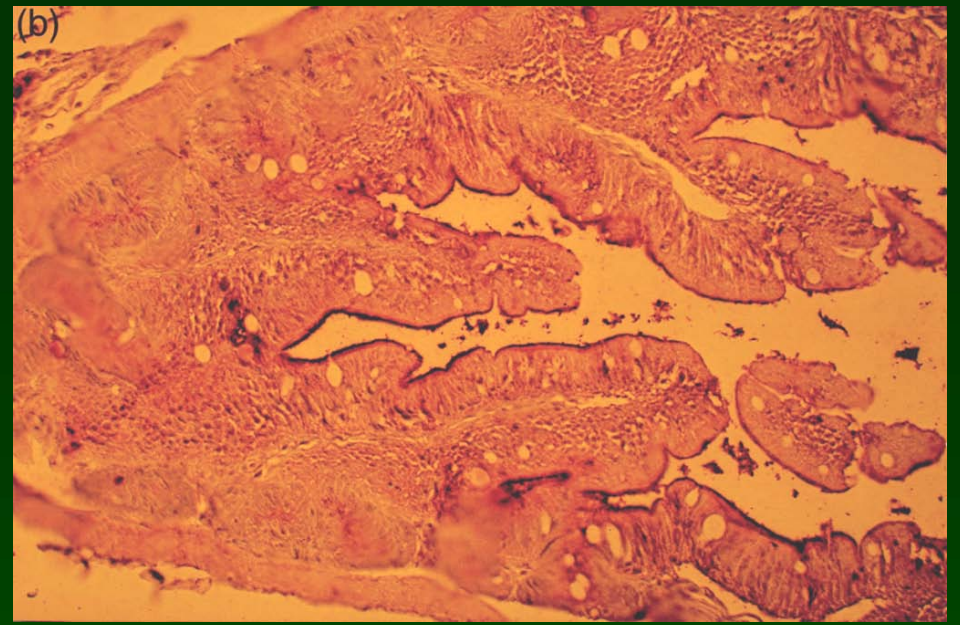
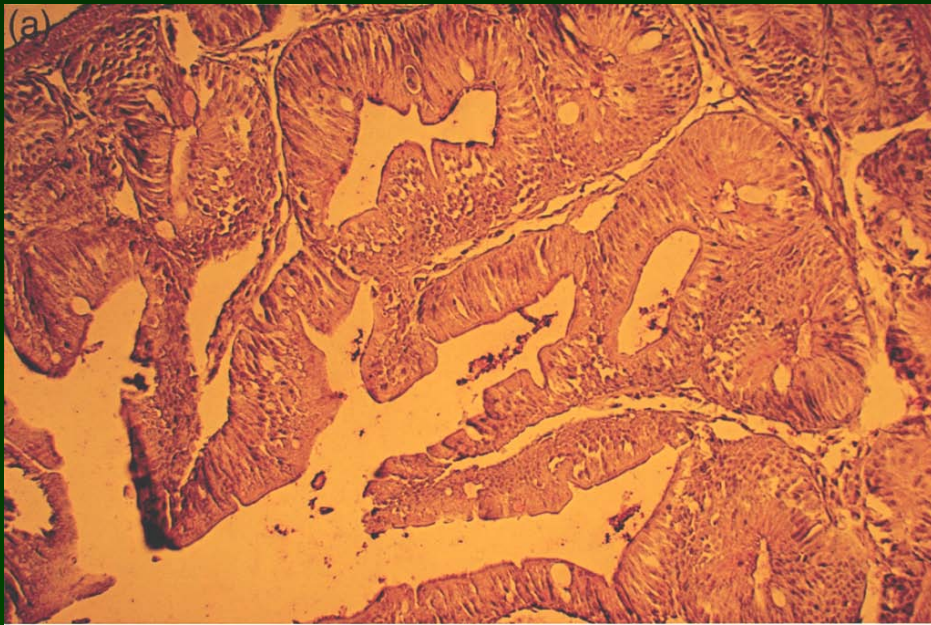


Fôring med probiotiske bakterier fra tarm hos torsk



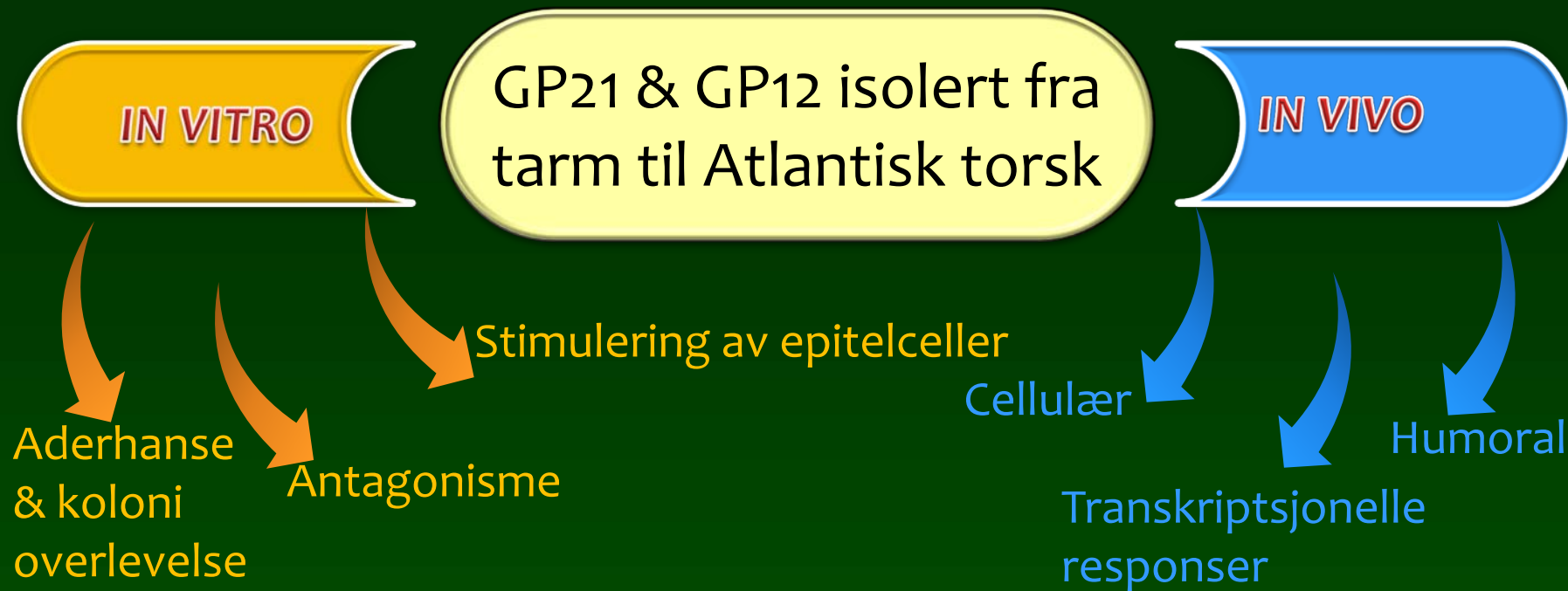
Torskeyngel (prøver 1 & 2; 5 fisk hver) etter 3 uker på fôr som inneholdt *Carnobacterium divergens* (LABC); LABC + P gruppe – Som også inneholdt immunstimulerende peptider (fiskeprotein hydrolysate)

Immunofarging av torskøyngel pyloric caeca som viser probiont



A – Fisk som er gitt kontrol fôr. B - Fisk som er gitt fôr inneholdende *C. divergens*

Tarmbakterier som probiotika



Probiotiske egenskaper

Karakterer undersøkt	GP21	GP12
Antagonistisk mot patogener* Bakteriesuspensjon <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Aeromonas salmonicida</i>	Sterk Svak	Svak Moderat
Antagonistisk mellom GP21 & GP12	Nei	Nei
Produksjon av syre	Nei	Nei
Produksjon av sideroforer (enheter)	33%	15%
Resistent mot syre (pH 3)	Ja	Ja
Resistent mot galle (5%)	Ja	Ja
Ufarlig for vert	Ja	Ja

* Inhiberingszone : Sterk, > 6 mm; Moderat, 3-6 mm; Svak, < 3mm.



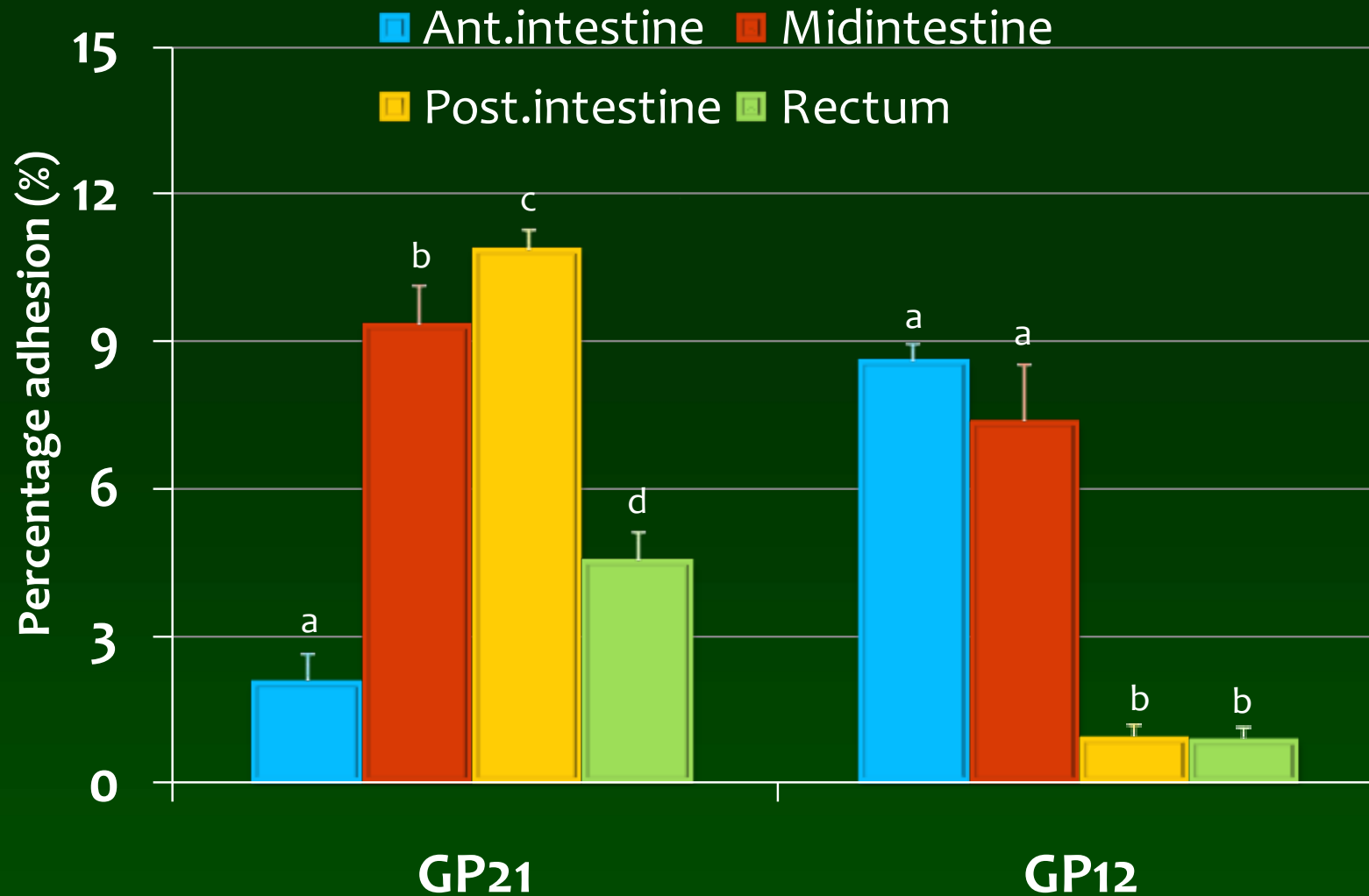
Potensial for immunstimulering med levende og varme-innaktiverede tarmbakterier

Control Live HI



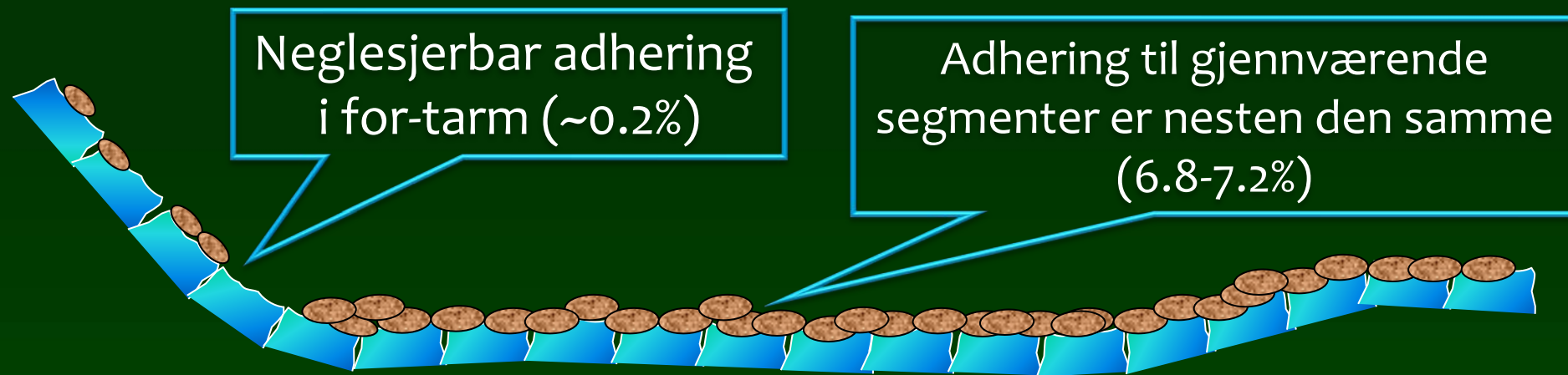
Relativ ekspresjonsprofiler (gjennomsnitt \pm SD) av bakterielle forsvarsgener (BPI/LBP) i hodenyre leukocytter co-inkubert med levende og varme-innaktiverede tarmbakterier. (n = 7)

Adhering til tarmepitel celler



N = 3 forsøk i triplikat

Interferanse med adherende *Aeromonas salmonicida*

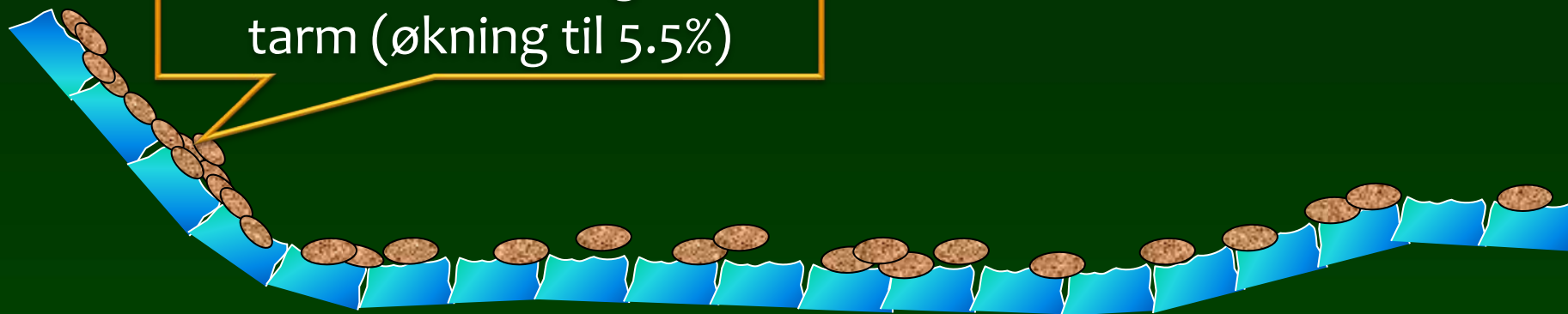


N = 3 forsøk i triplikater

Interferanse med adherende *Aeromonas salmonicida*

Med tilstedeværelse av GP21

Forbedret adhering til for-
tarm (økning til 5.5%)



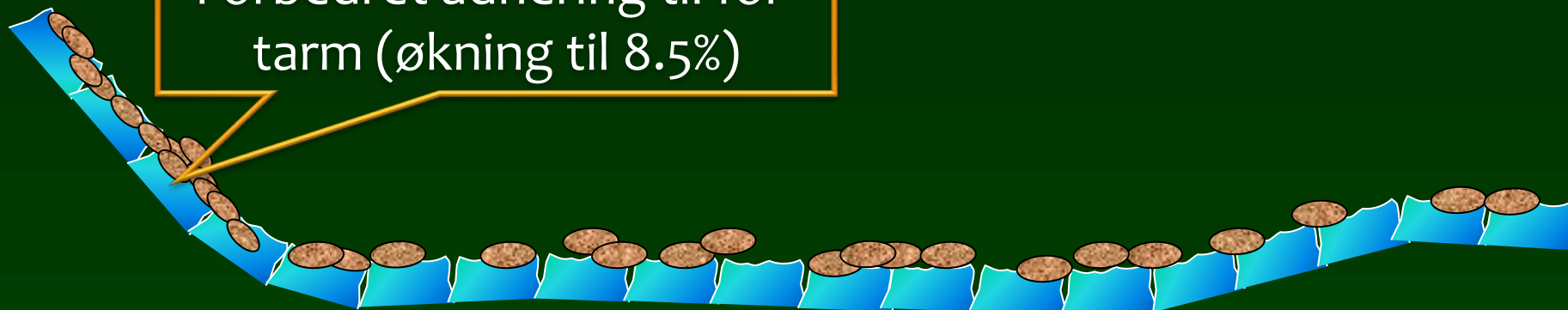
Interferanse av adhering gjennom KONKURRANSE

N = 3 forsøk i triplikater

Interferanse med adherende *Aeromonas salmonicida*

Med tilstedeværelse av GP12

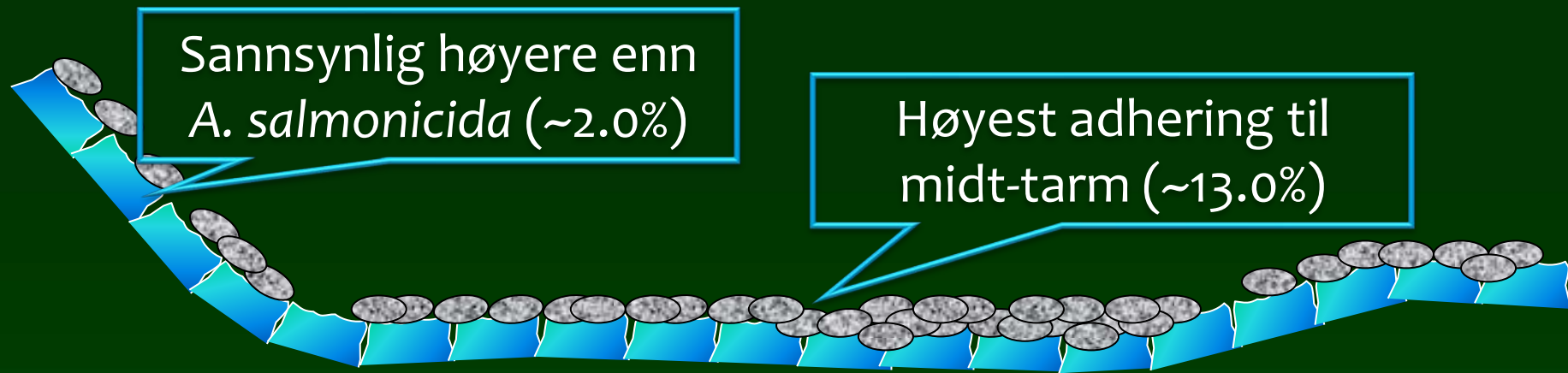
Forbedret adhering til for-
tarm (økning til 8.5%)



Interferanse av adhering gjennom EKSKLUDERING

N = 3 forsøk i triplikater

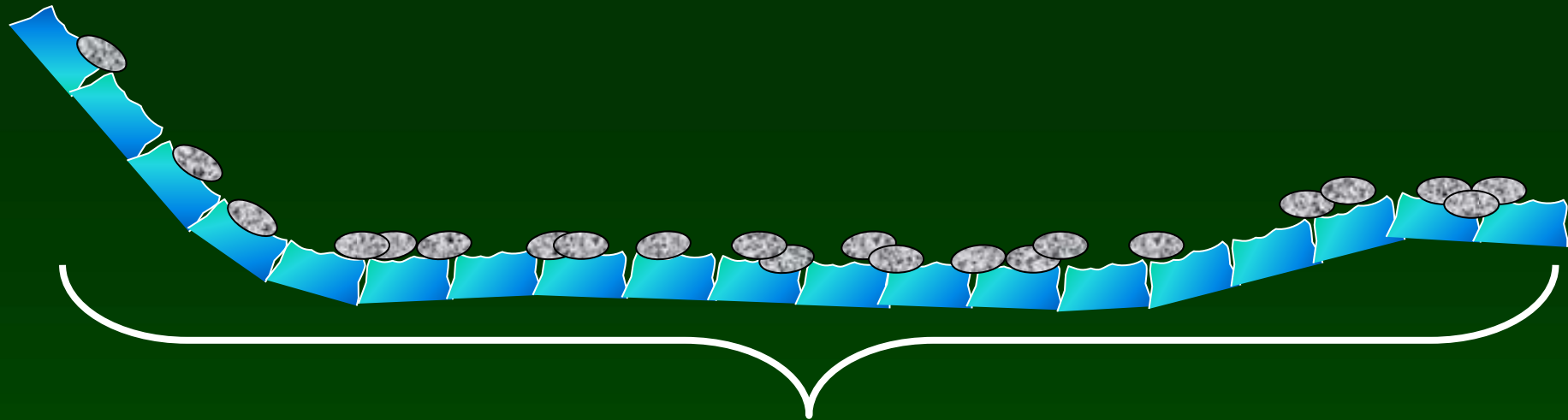
Interferanse av adhering av *Vibrio anguillarum*



N = 3 trials in triplicates

Interferanse av adhesion av *Vibrio anguillarum*

Med tilstedeværelse av GP21

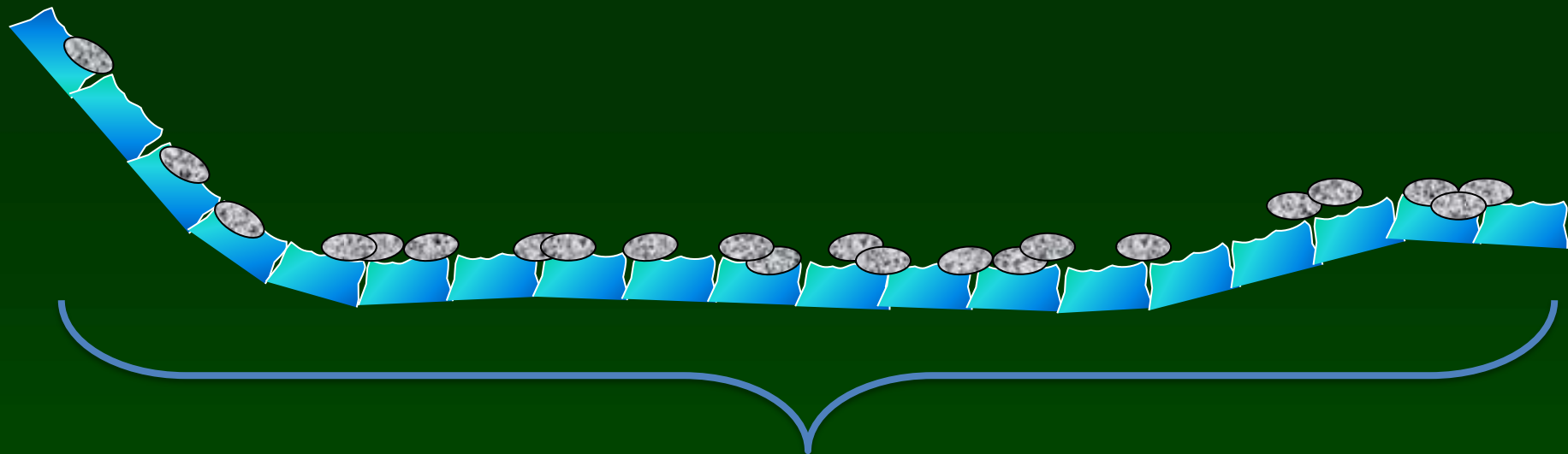


IKKE noe definitivt mønster med bakteriell interferanse!

N = 3 trials in triplicates

Interferanse av adhering av *Vibrio anguillarum*

Med tilstedeværelse av GP12



Interferanse av adhering gjennom KONKURRANSE (AI, MI og PI) og FORSKYVNING (PI og RC)

N = 3 trials in triplicates

Uttrykking av immun gener i tarm

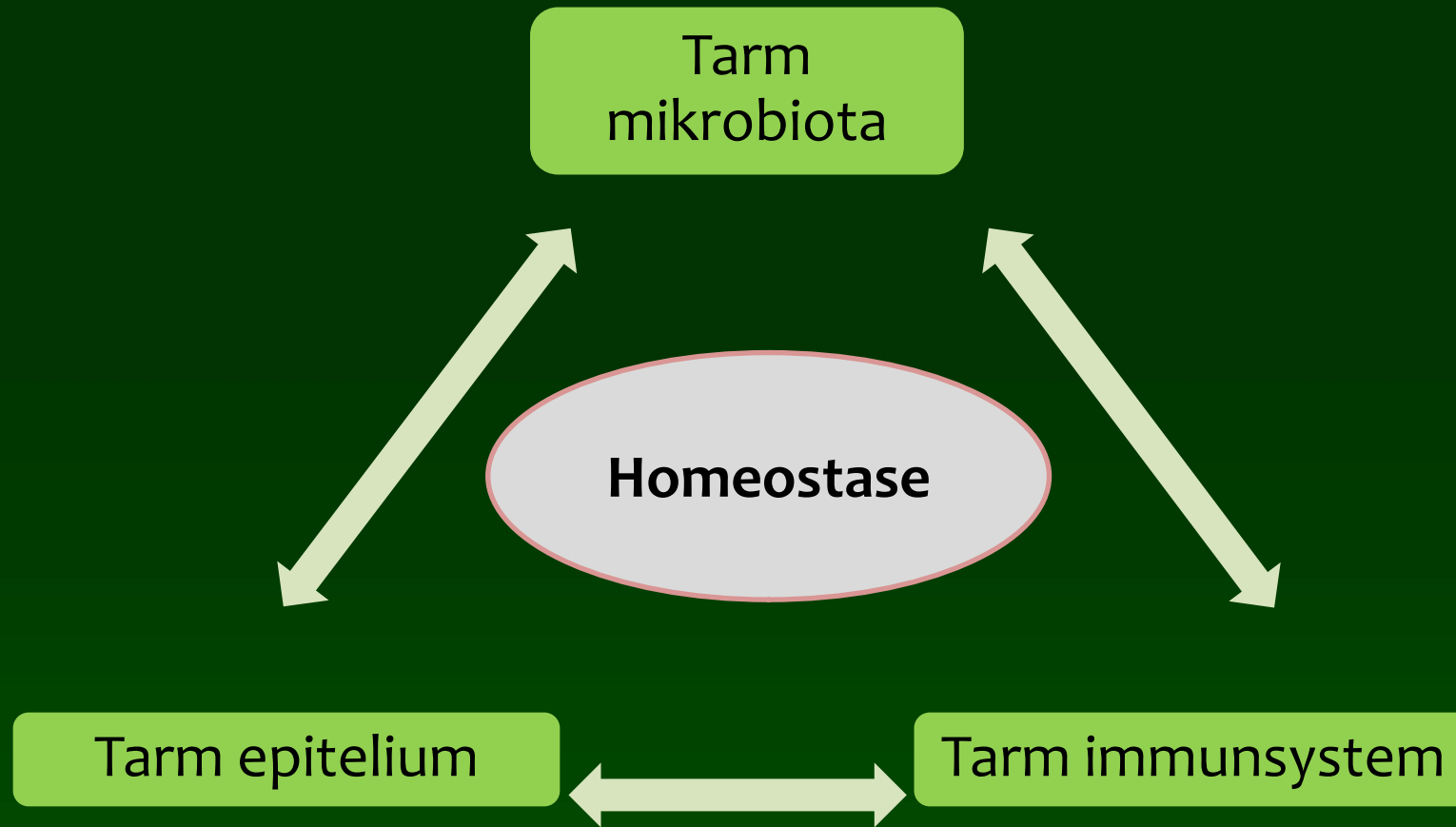
Probiotisk	GP21			GP12		
	F	H	R	F	H	R
BPI	↓		↑	↑	↑	
Hepcidin		↑		↑	↑	↓
Lysozyme	↓		↓	↓	↓	↓
Galectin	↓			↓		↑
Metallothionein	↓			↓	↓	↓
IL-1 β		↑		↑	↑	↑
IL-10	↓			↑		↓

Opp- eller nedregulering sammenlignet med kontrollgruppen, $P < 0.05$

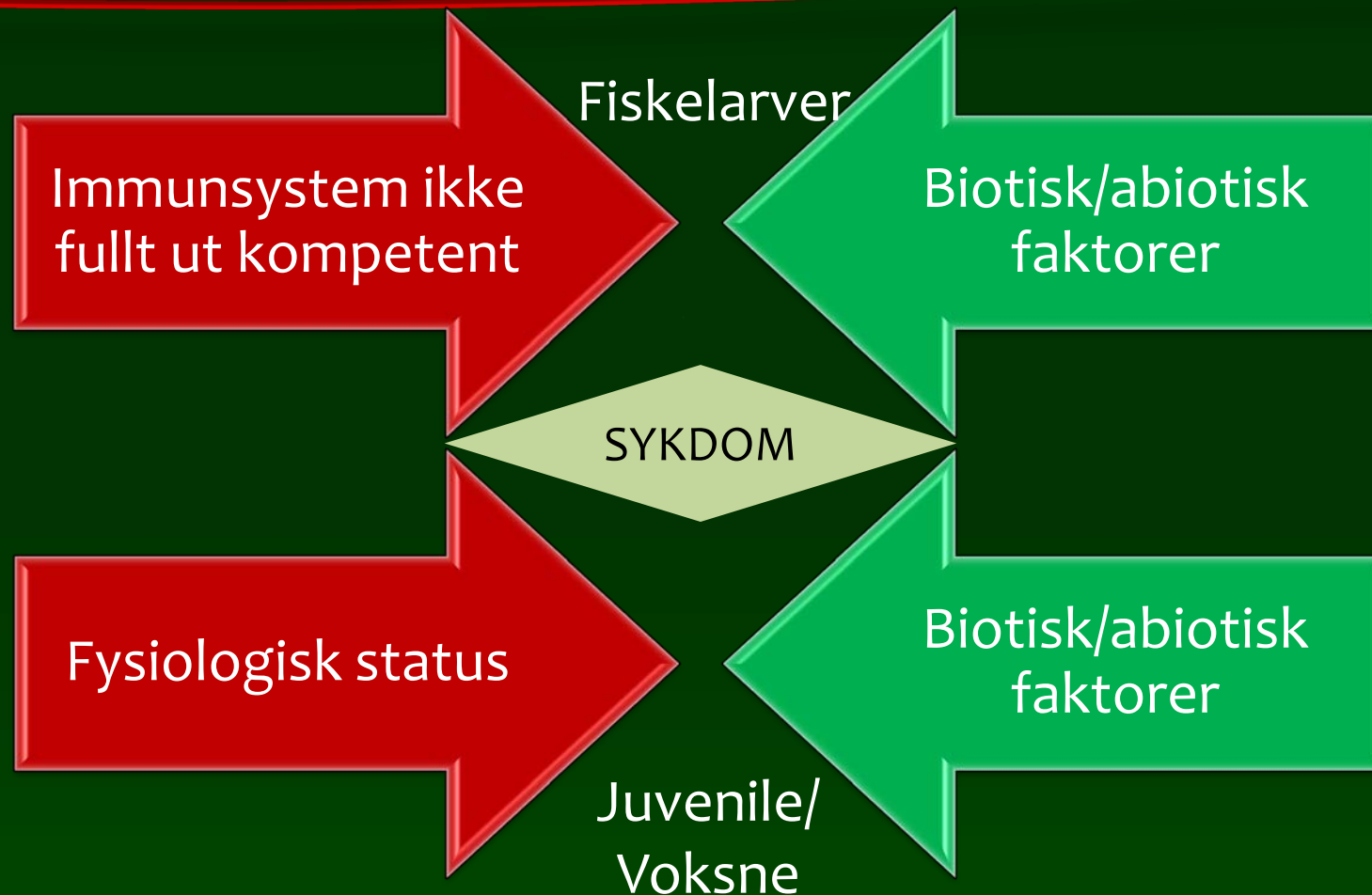
Oppsummering

- Fôring med probiotika med opphav i verten forbedrer evnen fisken har til å inhibere patogener etter 20 dager
- Transkriptom responser var mer prominente i for-tarmen; men andre regioner ble også funnet å bli stimulert ved opptak av probiotika i fôr

Probiotika – terapeutisk design for kontroll med sykdom



Sykdomskontroll gjennom immunmodulering



Bærekraftige alternativer
Vaksinasjon?

Priming av immunsystem – innate/ikke-spesifikke forbindelser

Immunologisk ernæring

MAKRO & MIKRONÆRINGSTOFF

Aminosyrer, Fettsyrer,
Polysakkarider, Mineraler,
Vitaminer

BIOLOGISKE TILEGG

Bakteriell/Sopp derivater
Dyr & plante derivater

FRISK FISK

Effektive immun-
responser

Sykdomsmotstand



Immunstimulant/immunmodulator?

Vert får bedre
motstandskraft
mot sykdom

Utløser forsvarsmekanismer/veier

Aktiverer celler



overflate reseptorer

Immun'stimulant'
Naturlig forekommende
forbindelser



Evaluering av immunmodulering

In vitro assays på leukocytter: fagocytose, produksjon av frie radikaler, migrasjon, cytokin produksjon, enzym aktivitet, produksjon av nitric oksid, evne til å drepe bakterier, cytotoxicitet, cell proliferasjon

In vivo evaluering: Antistoff produksjon–vaksinasjon, overlevelse i smitteforsøk (bakterier/virus), anti-parasitisk effekt, vekstfremming

Immunstimulering av torskelarver og yngel

Magnadottir et al.

Asa-LPS: *A. salmonicida* ssp. LPS ✓

Ec-LPS: *Escherichia coli*

Lichenan: Et linjært (1–3), (1–4) β -glucan fra *Cetraria islandica*

Thamnolan: Et komplekst heteroglycan fra *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*

Chitosan: Crustacean polysakkarider

DNA: Fra gjær, *Saccharomyces cerevisiae*

Polymannuronic syre: Fra brunalgen *Durvillea antarctica*

Laminarin: Fra algen *Laminaria digitata*

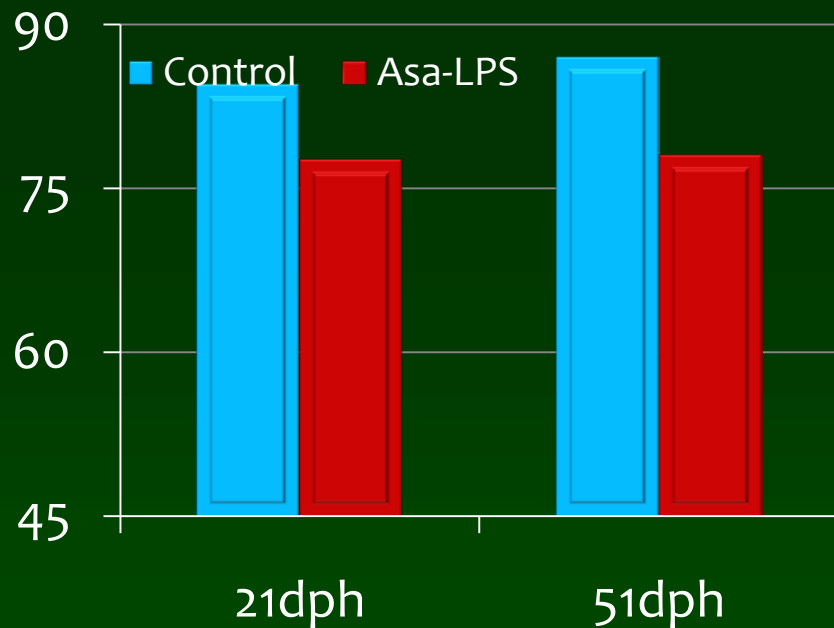
Levamisol: En syntetisk stimulant

Vitamin C: Askorbinsyre

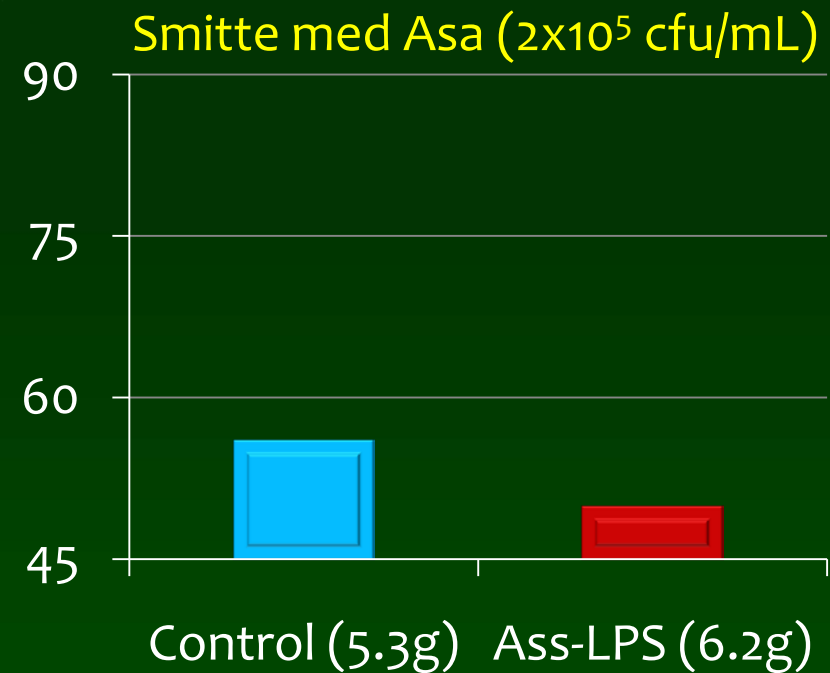
Oil: Fra torskelever

Smitteforsøk – torskelarver og juveniler

Dødelighet (%) ved 5.5°C



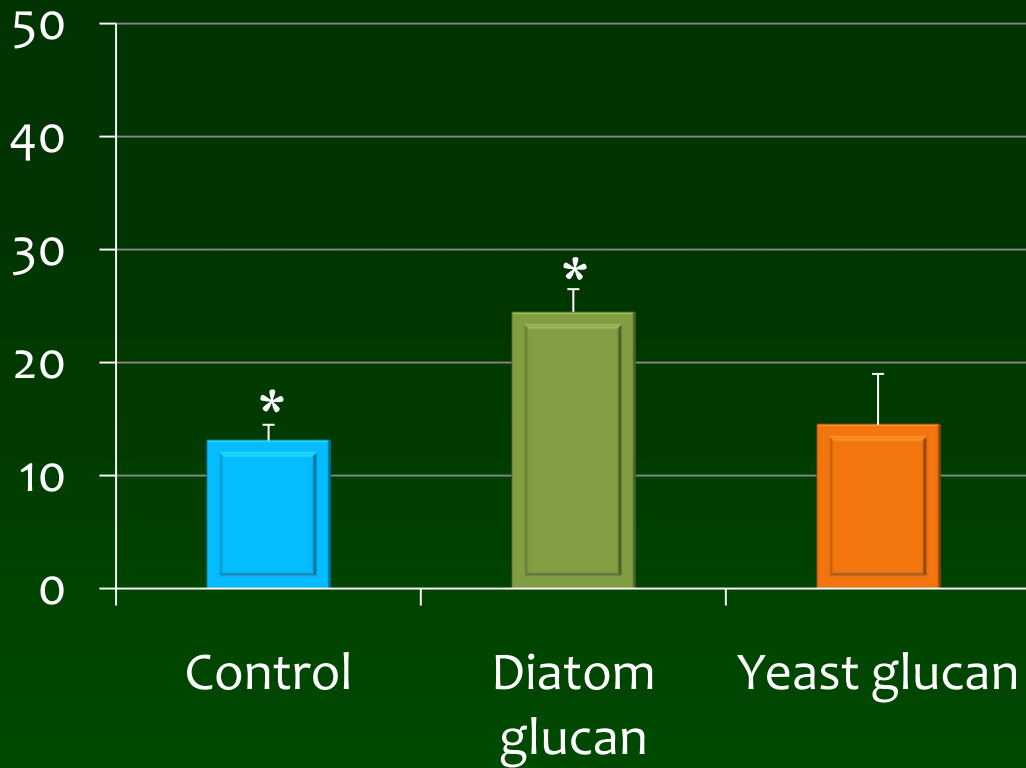
Dødelighet (%) ved 10°C



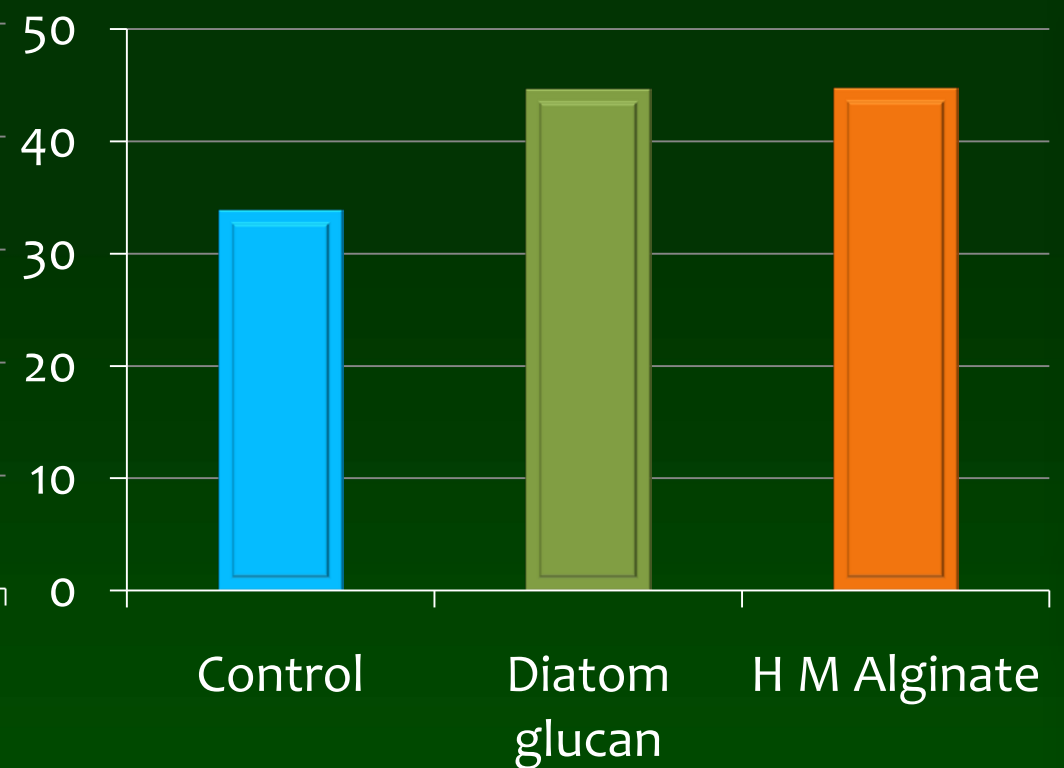
Asa-LPS behandling – foredret motstand mot sykdom

Overlevelse av torskelarver fôret med glukaner og alginater

Overlevelse (%) ved 27 dph



Overlevelse (%) ved dag 18-30



Perspektiver for fremtiden

Dybdeforståelse av substansene som stimulerer

Kunnskap om reseptorer i vertens celler som kan gjenkjenne og respondere på disse substansene

Kartlegge responsene i humorale markører som er lette å måle



Dokumenterte effekter → praktisk bruk i oppdrett
Functional feeds?



TAKK TIL

FORSKNINGSRÅDET
(Prosjektene: Preventive Health Care of Farmed Fish; Mucosal Immune System of Atlantic Cod – Creating a Knowledge Base)

•HAVFORSKNINGSINSTITUTTET
(Øivind Bergh, Hari Rudra, Rolf Hetlelid Olsen, Ann Cathrine Einen)

- Anusha Dhanasiri
- Carlo Lazado
- Christopher Caipang
- Kjetil Korsnes
- Hilde Ribe
- Ingvild Berg
- Monica Brinchmann