

Rapport

FHF- prosjekt 900631 Bivirkninger som følge av vaksinerings av laks



Prosjektleder: Erling Olaf Koppang, Norges veterinærhøgskole

Prosjektansatt: Hilde Søyland Larsen, Norges veterinærhøgskole

Prosjektmedarbeider: Minoru Satoh, Universitetet i Florida, USA

Prosjektstyringsgruppe: Arnfinn Aunsmo, Norges veterinærhøgskole/SalMar; Nina Santi, AquaGen; Asgeir Østvik, Havbrukstjenesten AS; Harald Sveier, Lerøy Seafood Group ASA

Observatør i styringsgruppen: Merete Bjørgan Schrøder, FHF

Referansegruppe: Trygve Poppe, Norges veterinærhøgskole

Oppdragsgiver: FHF

Forord

Vaksinering av oppdrettslaks er en forutsetning for en industrialisert produksjon. Viktige og tapsbringende sykdommer i næringen, så som furunkulose, vibriose og kaldtvannsvibriose, er eksempler på sykdommer som uten effektiv vaksinering kunne ha medført store produksjonsmessige tap. Introduksjonen av effektive oljebaserte vaksiner i næringen for ca. 20 års tid siden muliggjorde derfor lakseoppdrett i stor skala i Norge og andre lakseproduserende land. Imidlertid har det vist seg at bruken av oljeadjuvansbaserte vaksiner kan medføre en del bi-effekter. Flere forskningsmiljøer har beskrevet slike effekter. Av spesiell bekymring for næringen er det forhold at vaksinering av laks er assosiert med påfølgende vekstreduksjon og i varierende grad sammenvoksninger mellom organer i bukhulen. Det har vært spekulert på om ulike vaksiner gir forskjellige bi-effekter, og i 2008 ble det publisert et arbeid som viste at ulike kommersielle vaksiner kunne indusere systemisk autoimmunitet hos laks. Det ble imidlertid ikke påvist noen sammenheng mellom nivå av autoantistoff og makropatologiske funn. I forbindelse med utvikling og bruk av nye vaksiner siden denne rapporten ble publisert, har det vært en spørsmålsstilling om autoimmunitet fremdeles finnes i populasjoner av oppdrettslaks.

FHF tok initiativ til å kartlegge dagens situasjon samt å belyse nye, relevante problemstillinger. I denne forbindelsen ble professor Erling Olaf Koppang ved Norges veterinærhøgskole (NVH) forespurt om å bli prosjektleder. Stipendiat Hilde Søiland Larsen ved NVH ble ansatt for å arbeide med prosjektet, videre ble det avtalt samarbeid med dr. Minoru Satoh, Det medisinske fakultet, Universitetet i Florida, U.S.A. En styringsgruppe ble opprettet, bestående av Harald Sveier (Lerøy), Arnfinn Aunsmo (SalMar), Nina Santi (AquaGen) og Asgeir Østvik (Havbrukstjenesten AS). Referansegruppen inkluderte professor Trygve T. Poppe (NVH), og Merete Bjørgan Schrøder var observatør. Prosjektet inkluderte også professor Ian Mayer og stipendiat Tom Fraser ved NVH som samarbeidspartnere, videre Tom Hansen og Per Gunnar Fjellidal ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre. Lønn- og laboratedriftsmidler til prosjektet ble finansiert av FHF. Prosjektet fikk tilgang på fisk fra forsøk utført av SalMar, samt fra Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre.

Bakgrunn

All norsk oppdrettslaks i følge Akvakulturdriftsforordningen vaksineres før utsett i sjø. Hensikten med denne forordningen er å begrense tap i næringen forårsaket av viktige laksesykdommer så som furunkulose, vibriose og kaldtvannsvibriose (Somerset *et al.* 2005). I rundt 20 år har laksenæringen fulgt denne prosedyren, og de vaksiner som benyttes er i stor grad oljebaserte vaksiner. Oljen er vanligvis emulgert i vann og kan være av ulikt opphav – både mineraloljer og animalske benyttes. Felles for oljene er at de inneholder hydrokarbonkjeder av ulik lengde, og

fraksjonen av disse er viktig for vaksineoljens egenskaper og effekt (gjennomgått i Haugarvoll *et al.* 2010). Oljen som benyttes har dels til hensikt å muliggjøre frigjøring av antigen over tid for å stimulere immunsystemet (depoteffekt), men også å virke som adjuvans, dvs. et hjelpestoff for å fremme immunresponsen. Effekten av vaksiner har ført til at flere viktige laksesykdommer er så godt som fraværende i oppdrettet, og bruken av antibiotika har blitt redusert til et minimum.

Imidlertid har det vist seg at denne formen for vaksiner av oppdrettslaks kan medføre utilsiktede effekter. Poppe og Breck (1997) var de første som publiserte en kasuistikk som beskrev utilsiktede vaksineeffekter i norsk oppdrettsnæring. Undersøkelsen viste store betennelsesmessige forandringer og melanisering i bukhalen hos vaksinert laks. Senere har en rekke studier fra flere forskjellige grupper belyst ulike utilsiktede vaksineeffekter hos oppdrettslaks. Det er vist assosiasjon med vekstreduksjon, ryggforkortelser og ulike andre misdannelser (frem til 2010 gjennomgått i Haugarvoll *et al.* 2010; Berg *et al.* 2012). I 2005 fant Haugarvoll og Koppang (2005) grunn til å fremsette teorien at de negative vaksineeffektene hos oppdrettslaks mulig delvis kunne forklares med en vaksineindusert utvikling av systemisk autoimmunitet. Det er kjent fra pattedyr og menneske at slike utilsiktede effekter kan forekomme (frem til 2009 gjennomgått av Agmon-Levin *et al.* 2009). Imidlertid er de nøyaktige mekanismene bak slike effekter ikke særlig godt forstått.

Systemisk autoimmunitet er en lidelse som kan være forbundet med store, systemiske bivirkninger som kan manifestere seg på svært ulike måter. Men bildet er ikke entydig. Hos menneske kan systemisk autoimmunitet observeres med alt fra minimale og lokaliserte forandringer til generaliserte og alvorlige kliniske manifestasjoner. Generelt kjennetegnes systemisk autoimmunitet av lokaliserte eller generaliserte betennelsestilstander der annen grunn ikke kan finnes. Tilstanden kan være besværlig å diagnostisere og diagnosen stilles som regel på bakgrunn av funn av autoantistoff og nyreforandringer (påvirkninger av basalmembran i glomeruli). I dagens oppdrett kan det være tegn til sykdom i populasjoner uten at man er i stand til å stille noen kausal diagnose (tapersyndrom) (Tangen, 2012). Her vil en differensialdiagnose kunne være systemisk autoimmunitet.

For å undersøke om systemisk autoimmunitet var til stede i populasjoner av norsk oppdrettslaks samlet Koppang *et al.* (2008) inn sera og nyrer fra ulike grupper fisk vaksinert med forskjellige kommersielle vaksiner. Det ble her vist at systemisk autoimmunitet var til stede hos flere individer i samtlige vaksinerte populasjoner. Det var ingen forskjell mellom de ulike gruppene vaksinert fisk, mens i villfisk og uvaksinert oppdrettslaks fantes ingen tegn til systemisk autoimmunitet. I en oppfølgingsstudie av Haugarvoll *et al.* (2010) ble histologiske funn i en rekke organ hos vaksinert laks gjennomgått og diskutert opp mot en bakgrunn av systemisk autoimmunitet, og funnene viste seg å være forenlige med dem man ser ved samme tilstand hos pattedyr og mennesker.

Det er gått nesten ti år siden innsamling av materiale til disse undersøkelsene ble foretatt. Siden den tid har vaksiner og næringen utviklet seg videre, men vi vet ikke hvordan forholdene med henblikk på autoimmunitet er i dagens oppdrettspopulasjon, kort sagt, om dagens vaksiner også kan assosieres med

utvikling av systemisk autoimmunitet. Vi vet heller ikke om det er noen forskjell mellom ulike vaksiner i deres eventuelle bivirkningsprofil med henblikk på systemisk autoimmunitet. Dersom fisk av samme genetisk bakgrunn utvikler en forskjellig bivirkningsprofil gitt samme oppdrettsbetingelser men vaksinert med ulike vaksiner vil det være en svært viktig opplysning for næringen. Siden denne tilstanden ikke har vært gjenstand for noen vurdering hos oppdrettsfisk siden innsamlingen av materiale i 2004/2005, var formålet med nåværende undersøkelse å kartlegge om dagens vaksiner også kan medføre nevnte bivirkninger og om det eventuelt er en påvisbar forskjell mellom vaksinene. SalMar ga prosjektet tilgang på et forsøk der ulike vaksiner fra dagens produksjon ble benyttet under ellers like betingelser. Individuer fra dette forsøket ble undersøkt for tilstedeværelse av systemisk autoimmunitet.

Vi ønsket også å belyse andre forhold knyttet til mulige påvisbare utilsiktede effekter av vaksiner. I produksjonssyklus av laks kan det være ønskelig å øke temperaturen for å fremskynde biologiske prosesser. Det har vært spekulert en del på om en slik manipulering kan gi utilsiktede effekter etter vaksiner. Videre har det knyttet seg stor interesse rundt bruken av triploid, infertil oppdrettslaks. Slik laks vil ikke ha mulighet til å gi fertile avkom i tilfelle rømming. Det har også vært hevdet at slik laks er mer mottakelig for å utvikle utilsiktede reaksjoner i forbindelse med vaksiner. Prosjektet fikk tilgang på temperaturmanipulert og triploid vaksinert og uvaksinerte laksegrupper ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre, og individer fra disse ble også undersøkt med henblikk på systemisk autoimmunitet.

Materiale og metoder

Metoder

Det er ingen enkelt test som kan avgjøre om et individ lider av systemisk autoimmunitet eller ikke. Men minst to forutsetninger må oppfylles, nemlig at det er tilstedeværelse av autoantistoff i blodet, videre at basalmembranen i nyrenes glomeruli er affisert. Dette er et tegn på nedslag av antistoff/antigenkomplekser som dannes i forbindelse med autoimmunitet. I våre undersøkelser har vi derfor benyttet disse to metodene, som vi også benyttet i tidligere undersøkelser, for å kartlegge tilstedeværelsen av autoimmunitet i de undersøkte individene. Antistoffmålingene ble foretatt med røde blodlegemer fra laks som analytt og ble utført av dr. Minoru Satoh ved Universitetet i Florida, USA. Histologiske prøver fra nyre ble tatt fra samtlige individer, og disse ble fulgt opp av elektronmikroskopiske undersøkelser. Kun et utvalg fisk, vaksinert og uvaksinert fra samtlige grupper ble undersøkt med elektronmikroskopi. Dette er fordi denne metoden er spesielt arbeidskrevende og ikke egner seg som noen screeningsmetode, men funn, eventuelle fravær av funn dokumentert i elektronmikroskop er viktig for spesifikt å kunne fastslå om basalmembranene i glomeruli er affisert som følge av antistoff/antigen nedslag. Metodene som er benyttet, altså antistoffmålinger, histologiske undersøkelser og elektroniske undersøkelser har vært beskrevet i detalj i våre tidligere publikasjoner

innen temaet systemisk autoimmunitet hos laks (Koppang *et al.* 2008; Haugarvoll *et al.* 2010).

Undersøkt fisk

Til grunn for undersøkelsene ble forskjellige fiskepopulasjoner undersøkt som i hovedsak kan inndeles på følgende måte: Feltforsøk med uvaksinert fisk (Gruppe 0) og 5 grupper med fisk vaksinert med vaksiner fra forskjellige produsenter (Grupper 1 til 5). Det var et mildt utbrudd av HSMB i forsøksperioden. Antall totalt i Merd: 171 000, snittvekt 5 700 gram sløyd. Dødelighet siden utsett: 5,92 %, usortert siden utsett. Forsøksfisk: 4469 stk. SalMar startet i 2009 opp et vaksineprosjekt med formål og benchmarke vaksiner mhp tilvekst og vaksinebivirkninger. På fisken i denne lokaliteten ble det påvist ulike diagnoser. Generelt har dette dreid seg om milde til moderate sykdomsutbrudd med noe variasjon mellom ulike merder og fiskegrupper. IPN ble påvist kort tid etter utsett, videre fantes HSMB og CMS i perioden før utslakting, og det var lakselus som ble behandlet to til tre ganger med pyretroider og organofosfater. I tillegg ble det stilt en rekke enkeltfiskdiagnoser med usikker klinisk betydning.

Videre ble materiale hentet fra et vaksineforsøk med triploid og diploid vaksinert og uvaksinert fisk ved to forskjellige smoltifiseringsregimer (ulike temperaturer) ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre. Det var ingen registrert sykdom i forsøksperioden. Triploid fisk ble konstruert ved bruk av hydrostatisk trykk mot befruktete egg (desember 2009). Oppaling foregikk i enkle, grønne, 10,7 m³ tanker av fiberglass (3 m Ø, vanndybde 1 m) før overføring til sjøanlegg ved kai etter smoltifisering. Oppsummert ble det i slutten av november 2010 valgt ut tilfeldig diploid fisk (n = 1560) og triploid fisk (n = 1560). Disse ble enten injisert intraperitonealt (ip) med 0,1 ml av en multivalent olje-adjuvantvaksine, eller de forble som uvaksinerte kontroller (n = 1560; 780 av hver ploiditet). Hvert individ ble Pit-Tag-merket slik at gruppetilhørighet kunne identifiseres ved prøvetakning. En gruppe bestående av alle fire undergrupper (diploid vaksinert og uvaksinert, og triploid vaksinert og uvaksinert) ble holdt med simulert naturlig lys og temperatur, og produsert som årssmolt (1+). Alle kar inneholdt tilfeldig blandede individer fra de fire undergruppene. Den andre gruppen, også bestående av alle fire undergrupper (diploid vaksinert og uvaksinert, og triploid vaksinert og uvaksinert) ble holdt ved forhøyet temperaturregime for produksjon av under-årssmolt (0+). Her ble temperaturen hevet med 1 °C per dag fra 4,5 °C til 16,0 °C. Deretter ble fotoperioden byttet fra simulert naturlig til kontinuerlig lys. Alle kar inneholdt tilfeldig blandede individer fra de fire undergruppene. Vannforsyningen i tankene ble endret til 8,8 °C og 34,4 ppt sjøvann i slutten av januar for 0+ smolt, og tidlig mai for 1+ smolt. Saltholdighet ble endret gradvis fra 1,47 ppt til 34,4 ppt over en 3-dagers periode. Fotoperioden for både 0+ og 1+ post-smolt ble simulert naturlig. Etter smoltifisering ble all fisk overført til sjøanlegg bestående av firkantmerder knyttet til kaianlegg. Hver merd inneholdt en tilfeldig blanding av alle fire undergrupper av enten 1+ fisk eller 0+ fisk. 1+ og 0+ fisk ble ikke blandet, men gikk i merder ved siden av hverandre.

Sera-analyser

I alt ble 300 individer fra SalMar-forsøket undersøkt der sera fra 50 fisk i den uvaksinerte gruppen ble testet for tilstedeværelse av autoantistoff i tillegg til 50 fisk fra hver av de 5 gruppene med vaksinert fisk. I Matre-forsøket ble totalt 88 fisk, bestående av ~ 11 fisk fra hver av de åtte undergruppene, tilfeldig valgt ut for seraundersøkelse. Sera ble sendt til Dr. Minoru Satoh ved Det medisinske fakultet, Universitetet i Florida, for analyse med henblikk på autoantistoff.

Histologiske og elektronmikroskopiske undersøkelser

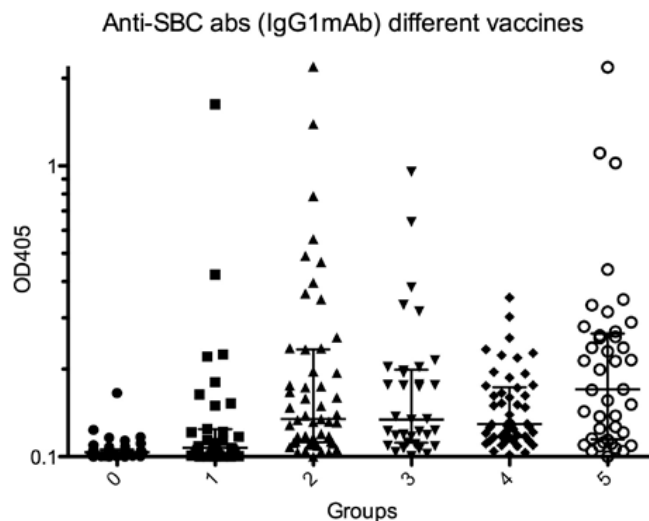
Fra SalMar-forsøket ble det i alt tatt ut nyremateriale fra totalt 248 individer for histologisk undersøkelse. Individene fordelte seg gruppevis slik: Uvaksinert fisk = 43, vaksinert gruppe 1 = 38, vaksinert gruppe 2 = 45, vaksinert gruppe 3 = 34, vaksinert gruppe 4 = 51 og vaksinert gruppe 5 = 37. For å få en detaljert oversikt ble mer enn femti løpende individnummer undersøkt spesielt nøye. I forbindelse med uttaket ble også Speilberg-score registrert. Fra Matre-forsøket ble nyreprøver fra samtlige fisk (88 individer) undersøkt nøye. Samtlige prøver ble blindet ved undersøkelsen slik at vurderingen skulle foregå på så objektivt grunnlag som mulig. Flere prøver ble videre valgt ut for immunohistokjemiske undersøkelser for en ytterligere vurdering av betennelsestilstanden.

Utvalgte nyreprøver fra vaksinert og uvaksinert fisk ble undersøkt med elektronmikroskop. Dette er en særdeles tidkrevende prosess, og derfor er materialet testet begrenset. Elektronmikroskopi ble i denne sammenhengen benyttet for å verifisere histologiske funn.

Resultater

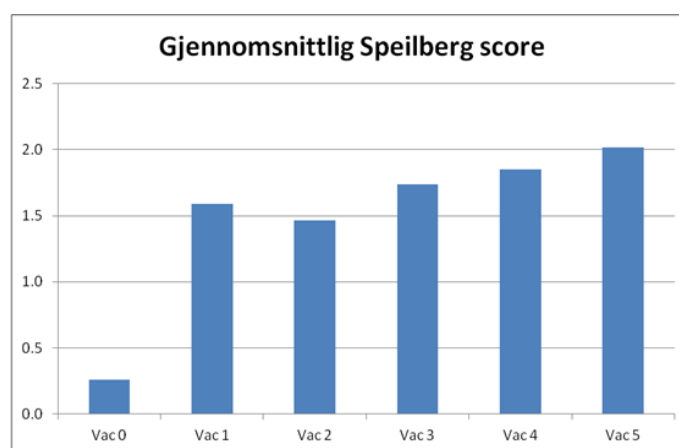
Sera-analyser

I SalMars forsøksfisk var nivåene av autoantistoff i de vaksinerte gruppene signifikant forskjellige fra den uvaksinerte gruppen. Selv om det rent statistisk ikke er noen forskjeller mellom de vaksinerte gruppene, skiller Gruppe 5 seg ut med noe høyere nivåer av målt autoantistoff. Der er mulig at denne gruppen ville ha oppnådd en statistisk signifikant forskjell fra de andre dersom antall testede individer hadde vært større. (*Figur 1*).



Figur 1. *SalMars* forsøk, forekomst og nivå av autoantistoff i individer av uvaksinert fisk (0) og i 5 grupper av vaksinert fisk (1-5), hver vaksinert med hver sin forskjellige kommersielle vaksine. Reaktiviteten er målt mot røde blodlegemer fra laks (SBC). Innen gruppene er individene i noen grad spredd langs X-aksen for å bedre visualiseringen.

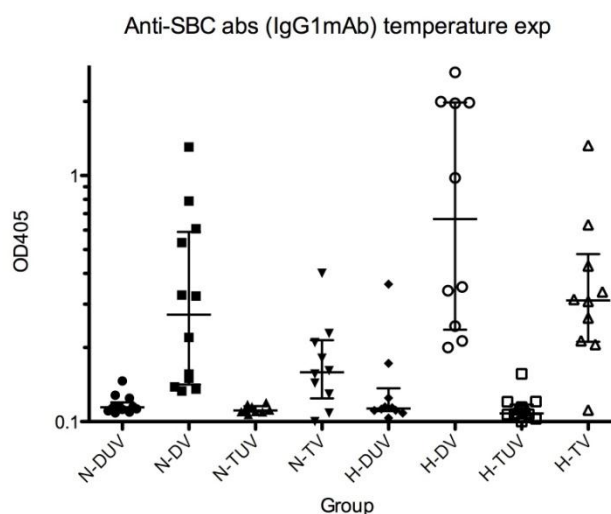
I disse fiskene ble også Speilberg score registrert med 0,1 intervaller ved obduksjon, og resultatet er presentert i *Figur 2*. I den uvaksinerte fisken var det minimalt med forandringer sammenliknet med dem i de vaksinerte gruppene.



Figur 2. *Speilberg* score registrert i individer av uvaksinert fisk (0) og i 5 grupper av vaksinert fisk (1-5).

I *Matre*-forsøkene med vaksinert og uvaksinert diploid og triploid fisk, smoltifisert under ulike temperaturregimer, var nivåene av autoantistoff i de vaksinerte gruppene signifikant forøket fra dem funnet i de uvaksinerte gruppene. Videre var det klare trender i dette materialet, men forskjellene var ikke signifikante. Dette kan skyldes at 10 individer/gruppe var for lite grunnlag til å kunne oppnå ønsket signifikans. Vi merker oss uansett disse trendene, som også er åpenbare i presentasjonen av nivå

målt autoantistoff på individnivå (*Figur 3*, obs! 1+ er beskrevet som N for normal smoltifisering, 0+ tilsvarer H for smoltifisering ved høy temperatur). Det er en temperatureffekt både i den diploide vaksinerte laksen (N-DV og H-DV) så vel som i den triploide vaksinerte laksen (N-TV og H-TV). Dersom man sammenlikner triploid mot diploid laks, er trenden at det er lavere nivå av autoantistoff hos den triploide fisken (N-DV/N-TV og H-DV/H-TV). Selv om disse beskrevne forskjellene ikke er signifikante, har disse undersøkelsene lagt grunnlaget for at det kan være interessante opplysninger å få frem dersom man øker antallet fisk og gjentar forsøkene.

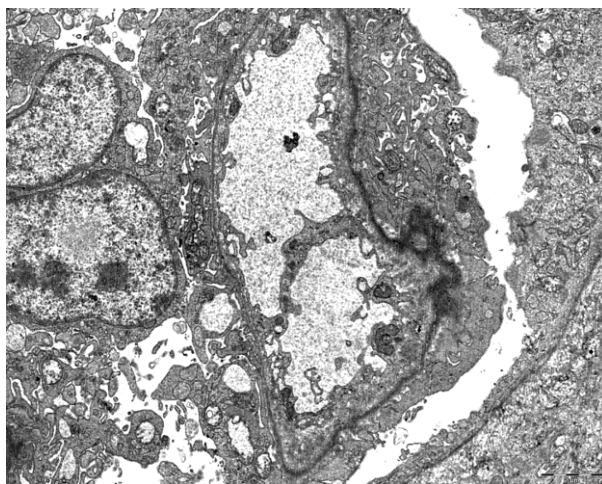


Figur 3. Forekomst og nivå av autoantistoff i individer av uvaksinert fisk gruppert etter følgende: N-DUV (normal temperatur, diploid uvaksinert); N-DV (normal temperatur (1+), diploid vaksinert); N-TUV (normal temperatur (1+), triploid uvaksinert); N-TV (normal temperatur (1+), triploid vaksinert); H-DUV (høy temperatur (0+), diploid uvaksinert); H-DV (høy temperatur (0+), diploid vaksinert); H-TUV (høy temperatur (0+), triploid uvaksinert) og H-TV (høy temperatur (0+), triploid vaksinert). Reaktiviteten er målt mot røde blodlegemer fra laks (SBC).

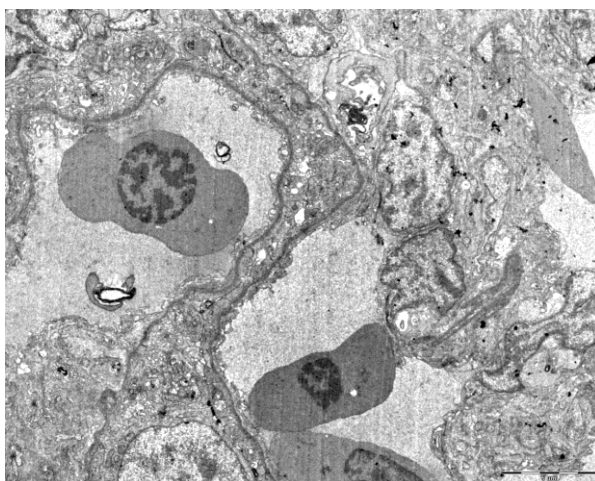
Histologiske og elektronmikroskopiske undersøkelser

I fisk fra SalMars feltforsøk ble tegn på glomerulonefritt funnet i nær samtlige individer, både vaksinert og uvaksinert fisk. Glomerulonefritt er en betennelsestilstand i glomeruli, altså i de karnøstene i nyrene som danner filtratet som er opphavet til urin.. Følgende ble funnet: celleproliferasjon i mer enn ti glomeruli i samtlige snitt fra individ 401-511, kun mononukleære celler, mild til moderat fibrose i multiple glomeruli, enkelte dilaterte tubuli. Immunhistokjemiske undersøkelser viste infiltrasjoner av betennesceller i glomeruli. Det var ikke mulig å skille vaksinert fisk fra uvaksinert fisk med disse metodene. Imidlertid ga elektronmikroskopiske undersøkelser forskjeller der basalmembranfortykkelser og -irregulariteter ble sett i fisk fra de vaksinerte gruppene, mens uvaksinert fisk ikke hadde slike forandringer.

I fisk fra Matre-forsøket ble glomerulonefritt kun funnet hos individer fra de vaksinerte gruppene. I de vaksinerte gruppene var slike funn gjennomgående, dog av varierende alvorlighetsgrad. Det var ikke mulig å si om grad av alvorlighet i glomeruliforandringene samsvarte med nivå av målt autoantistoff i samme individ. Man kan merke seg at på pattedyr er en slik sammenheng ikke blitt dokumentert. Elektronmikroskopiske undersøkelser viste at basalmembranen i glomeruli var fortykket og uregelmessig hos vaksinerte individer, men slike forandringer var fraværende i de uvaksinerte gruppene (*Figur 4* og *Figur 5*). Morfologiske undersøkelser ga intet grunnlag for å kunne skille gruppene på noe annet kriterium enn vaksinasjonsstatus.



Figur 4. Elektronmikroskopisk bilde fra glomerulus hos vaksinert laks. Basalmembranen ses som en mørk, tynn og sirkulær struktur sentralt i bildet. Til høyre ses uregelmessige fortykkelser, forenlig med nedslag av antigen-immunglobulinkomplekser.



Figur 5. Elektronmikroskopisk bilde fra glomerulus hos uvaksinert laks. Det ses to hele røde blodlegemer i lumen i to kapillærer. Den tilhørende basalmembranen er jevn og uten anmerkninger.

Sammendrag, konklusjoner og diskusjon

Vi har i dette prosjektet vist at autoimmunitet som tidligere beskrevet av Koppang *et al.* (2008) er assosiert med bruk av dagens kommersielle vaksiner i norsk lakseoppdrett. Fem forskjellige kommersielle vaksiner er blitt testet, men det var ingen forskjell mellom disse målt i utslag av autoantistoff eller grad av sammenvoksninger i bukchulen. Individuer fra samtlige vaksinegrupper viste forandringer i glomerulis basalmembran, men slike funn ble ikke gjort hos uvaksinert fisk. Disse funnene, sett i sammenheng med påvisning av autoantistoff, er indikative for tilstanden systemisk autoimmunitet. Videre har vi vist at diploid og triploid fisk kan reagere med utvikling av systemisk autoimmunitet i forbindelse med vaksinerings. Det var ingen signifikante forskjeller i vårt materiale mellom de to gruppene målt med antistoffpåvisning. Det var heller ingen signifikante forskjeller i fisk med temperaturstimulert smoltifisering sammenliknet med fisk som ikke undergikk temperaturstimulert smoltifisering. Som konklusjon ser vi en assosiasjon mellom vaksinerings og utvikling av systemisk autoimmunitet, mens assosiasjoner mellom temperaturstimulert smoltifisering og diploid/triploid fisk vektet mot utvikling av systemisk autoimmunitet er fraværende.

Utgangspunktet for prosjektet var å foreta en oppfølging av de funn som ble publisert av Koppang *et al.* (2008) samt å utvide spekteret for mulige faktorer av betydning (temperatur og triploiditet). Systemisk autoimmunitet er en tilstand der organismens immunsystem reagerer mot selve individet. Diagnosen kan benyttes dersom flere kriterier er oppfylt, viktigst er tilstedeværelse av autoantistoff i kombinasjon med nyreforandringer som følge av nedslag av antigen/antistoffkompleks. Det er viktig å merke seg at en enkelt test derfor ikke kan gi svaret på om det foreligger systemisk autoimmunitet eller ikke. Eksempelvis vil ikke funn av autoantistoff alene være nok. Hos pattedyr, og særlig hos menneske, er det mange individer som kan ha høye nivå av autoantistoff uten å ha noen plager av dette.

Publiseringene i 2008 (Koppang *et al.* 2008) og 2010 (Haugarvoll *et al.* 2010) hadde som utgangspunkt fisk som ble vaksinert med forskjellige vanlig brukte kommersielle vaksiner i 2003 og 2004. Siden innhenting av dette materialet, er det ikke foretatt noen vurdering med henblikk på forekomst av autoimmunitet hos oppdrettslaks. Det ble innhentet materiale fra et forsøk utført hos SalMar der fisk ble vaksinert med fem forskjellige vaksiner fra ulike produsenter. Videre fikk prosjektet tilgang på materiale fra et vaksineforsøk utført med en av de vaksinene som også ble benyttet hos SalMar (Gruppe 5). Dette forsøket ble utført ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre der det ble vaksinert diploid og triploid laks med utgangspunkt i grupper som hadde gått på forhøyet og normal smoltifiseringstemperatur. Fisk ble undersøkt med henblikk på forekomst av autoantistoff samt nyreforandringer.

Vi hadde forventet at vi skulle kunne bruke resultatene fra histologisk undersøkelse for å kunne identifisere kandidater som egnet seg for elektronmikroskopiske analyser. I tidligere forsøk har vi brukt glomerulonefritt som

utvalgskriterium i denne forbindelsen. Det var glomerulonefritt i nær sagt all fisk, vaksinert så vel som uvaksinert i materialet fra SalMar. Det er ikke mulig å ha noen oppfatning om hva dette forholdet skyldes, men siden forsøkspopulasjonen har blitt holdt under naturlige oppdrettsforhold og ikke vært del av et standardisert laboratorieeksperiment, kan eksterne faktorer som vi ikke kjenner til ha hatt en betydning. Utvalgskriteriene for elektronmikroskopisk undersøkelse ble dermed individer med høyt nivå av autoantistoff fra alle vaksinerte grupper sammenlignet med uvaksinert fisk. Resultatet viste at fisk med høye autoantistoff fremviste klassiske forandringer på autoimmunitet med fortykkelse og forgreninger av basalmembranen mens slike forandringer ikke var å finne i uvaksinert fisk til tross for at betennelsesforandringer i glomeruli var til stede.

Hvorfor oppstår systemisk autoimmunitet i sammenheng med vaksinering? Dette blir spekulasjoner, men i musmodeller har cytokinet IL-1 en nøkkelrolle som regulator i betennelsesprosesser. Produksjon av IL-1 induseres i adjuvans-inisert mus (Reeves et al. 2009). Det er også vist at IL-1 induseres i vaksinert laks (Haugland et al. 2005), så det er mulig å tenke seg liknende mekanismer her.

Problemer i norsk oppdrett omfatter uspesifikk dødelighet (Tangen, 2012). Hos menneske er systemisk autoimmunitet en tilstand som er forbundet med nedsatt livskvalitet, økt mottakelighet for flere sykdomstilstander og nedsatt levealder. Slike parametere er vanskelig å bedømme på fisk i oppdrett. Imidlertid er det grunn til å tro at systemisk autoimmunitet kan ha en betydning for sykdomsbildet hos vaksinert fisk, spesielt bør man kunne tenke seg dette hos såkalte tapere. Systemisk autoimmunitet hos fisk en patologisk tilstand som bør unngås, og så lange den er assosiert med vaksinasjon, er det gode grunner for å tilstrebe utvikling av vaksiner med en lavere bivirkningsprofil.

Prosjektet kan oppsummeres som følgende:

- Grupper av vaksinert og uvaksinert fisk lar seg skille serologisk på forekomst av autoantistoff.
- Det er ingen signifikant forskjell i autoantistofftiter mellom 5 ulike vaksiner.
- Det er elektronmikroskopisk detekterbare forskjeller i glomeruli mellom grupper av vaksinert og uvaksinert fisk.
- Det er ingen signifikant effekt på tilstanden i fisk som har undergått forhøyet smoltifiseringstemperatur.
- Det er ingen signifikant effekt på tilstanden hos fisk som er triploid sammenliknet med diploid fisk.

Summary in English

In this project, Atlantic salmon was investigated for systemic autoimmunity. Systemic autoimmunity is a condition which previously has been associated with vaccination (Koppang *et al.* 2008). Five different commercial vaccines were tested with respect to the association of autoantibodies and characteristic glomeruli changes in recipient

fish. Further, the effects of an elevated smoltification temperature both in triploid and diploid fish were investigated. We found an association between vaccination and signs of systemic autoimmunity in vaccinated fish as investigated for the presence of autoantibodies and characteristic glomeruli changes. There was no significant difference in the incidence of the condition between different vaccine groups. Further, we detected no effect from temperature stimulation or genetic status (diploid/triploid) of the fish. As a conclusion, an association between vaccination and the development of systemic autoimmunity was detected in the investigated material.

Referanseliste

Agmon-Levin et al. Vaccines and autoimmunity. *Net Rev Rheumatol* 2009;5:648-652.

Berg et al. Vaccinated farmed Atlantic salmon are susceptible to spinal and skull deformities. *J Appl Ichthyol* 2012;28:446-452.

Haugarvoll et al. Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine* 2010;28:4961-4969.

Haugarvoll og Koppang. Vaksinerings av oppdrettsfisk – sjukdomsvern med attåttsmak. *Nor vet Tidsskr* 2005;117:286-290.

Haugland et al. Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) at early time post vaccination. *Vaccine* 2005;23:5488-5499.

Koppang et al. Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *J Immunol* 2008;181:4807-4814.

Poppe og Breck. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Dis Aquat Org* 1997; 29:219-26.

Reeves et al. Induction of autoimmunity by pristine and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol* 2009;30:455-64.

Sommerset et al. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:89-101.

Tangen. Smoltkvalitet som tapsårsak for sjøutsatt fisk. *Nor Vet Tidsskr* 2012;124:162-163.

Publisering og planlagt publisering

1. Larsen HA, Satoh M, Aunsmo A, Sveier H, Santi N, Østvik A, Fraser T, Mayer I, Fjelldal G, Koppang EO. Bivirkninger som følge av vaksinerings av laks. Muntlig presentasjon. Programkonferansen HAVBRUK 2012, Stavanger 16.-18. april 2012, s. 93.
2. Koppang EO. Bivirkninger som følge av vaksinerings. FHF verdikjede havbruks samlingsmøte, Radisson Blu Airport Hotel Gardermoen, Gardermoen 14.-15. mai 2012.

3. Planlagt publikasjon: Larsen HA, Satoh M, Aunsmo A, Sveier H, Santi N, Østvik A, Fraser T, Mayer I, Fjelldal G, Koppang EO. Systemic autoimmunity in vaccinated salmon – effects of temperature and triploidy in vaccinated fish? (planlegges sendt til J Fish Dis).