

SELVLYSENDE BAKTERIER OG GENNEMSIGTIGE FISK

– nye redskaber
i vaccineforskningen

Forskere har hidtil studeret vacciners virkningsmekanismer med indirekte metoder. Men med fremkomsten af gennemsigtige fisk og selvlysende bakterier kan man nu få direkte syn for sagen.



Louise von Gersdorff Jørgensen er adjunkt og forsker i fiskens immunsystem, fiskesygdomme og vaccineudvikling. lvgi@sund.ku.dk



Kurt Buchmann er professor og arbejder med interaktioner mellem vært og patogen samt bæredygtige løsninger i akvakultur. kub@sund.ku.dk

Institut for Veterinær Sygdomsbiologi, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet
Københavns Universitet

Hvidpletsyge, også kendt under navnet fiskedræber, er en alvorlig sygdom hos ferskvandsfisk og forekommer på alle kontinenter. Den forårsages af en encellet parasit med det videnskabelige navn *Ichthyophthirius multifiliis*, der frit oversat betyder "fiskelusen med de mange børn". En enkelt snylter kan nemlig på få dage formere sig til tusind nye parasitter, hvilket kan tage livet af selv en sejlivet fisk, deraf tilnavnet "fiskedræber". Snylteren er et encellet fimredyr, der er i stand til at bore sig ind i gæller og hud på ferskvandsfisk. Her æder snylteren fiskens celler og vokser derved op til en meget stor celle med en diameter på op til 1 mm, som kan ses med det blotte øje. Den trænger dernæst ud fra sit opholdssted, hvorved der skabes en betydelig læsion i fiskens overfla-

de, og ved kraftige infektioner vil de mange perforationer slå fisken ihjel. Snylteren er derfor frygtet i både fiskeopdræts- og akvariefisk-industrien over hele verden.

Forebyggelse nødvendig

Man anvendte tidligere en række kemikalier for at holde parasitten under kontrol. Flere af disse var miljømæssigt eller sundhedsmæssigt problematiske, hvorfor man har fjernet dem fra dambrugenes hylder. Flere mere skånsomme og miljøvenlige stoffer (såsom natriumperkarbonat og pæreddikesyre) er nu tilgængelige, men de kræver en større arbejdsindsats at bruge. Derfor er vaccination mod sygdommen vejen frem, hvis vi vil opnå en bæredygtig fremtid indenfor akvakultur. Vacciner har nemlig allerede vist sig særdeles effektive til at forebygge en række bakterie- og virussygdom-

me hos fisk. Derfor virker det nærliggende at producere en vaccine imod hvidpletsygen. Desværre har parasitter fra naturens side en evne til at snyde værtens immunsystem, så man må stå tidligt op for at have en chance mod fiskedræberen. Desuden er det også en udfordring, at fisken skal vaccineres som en ganske lille fisk på få gram, idet den allerede på yngelstadiet bliver udsat for smitte.

Vaccinen smugles ind med en bakterie

Vi har derfor udnyttet en kendt metode til at vaccinere fisk mod sygdommen yersiniose også kaldet rødmundsyge forårsaget af bakterien *Yersinia ruckeri*. Det er en ubehagelig og dødelig sygdom i regnbueørred, men man kan med succes vaccinere fiskene imod den ved at dyppe de små fisk i døde



Regnbueørred (*Oncorhynchus mykiss*) inficeret med fiskedræberparasitten *Ichthyophthirius multifiliis*.

Genmanipulerede *Yersinia ruckeri*-bakterier med fiskedræberparasitens overflade-antigener, som fluorescerer grønt ved belysning med 488nm pga. proteinet GFP.



Vildtype zebrafisk



Gennemsigtig zebrafisk

Fotos: Louise von Gersdorff

bakterier i 30 sekunder. De døde bakterier bliver herved optaget af fisken gennem overfladerne, og der udvikles en god immunitet mod de levende bakterier, når de efterfølgende forsøger at invadere ørreden.

For at tilpasse metoden til fiskedræber har vi modificeret *Yersinia*-bakterien ved at indsætte et gen, som koder for fiskedræberparasitens overflade-antigener i bakterien. For præcist at kunne følge de døde bakteriers vej ind i fisken, har vi også indsat et gen, der får bakterierne til at udtrykke et protein kaldet Green Fluorescent Protein (GFP), som fluorescerer grønt, når man belyser det med en bestemt bølgelængde (488 nm).

De genmodificerede bakterier blev slået ihjel med formalin, og dermed

havde vi en vaccine, der kunne bruges til forsøg.

Syn for sagen med gennemsigtige fisk

Indenfor vaccineforskningen må man som oftest vurdere de komplicerede immunreaktioner i organismen ved at bruge en række tidskrævende metoder. Men indenfor fiskeforskningen er der nu etableret forsøgsdyrmodeller, der giver forskerne en enkel mulighed for at studere fænomenerne direkte. Vi har således inddraget en gennemsigtig zebrafisk og brugt den som model for regnbueørreden for at være i stand til at følge bakteriens optagelse og videre skæbne i fisken. Den gennemsigtige zebrafisk har fået udkoblet to gener, som medfører at huden bliver gennemsigtig, og man kan derfor følge de fysiologiske processer og anatomi-

ske detaljer på første parket. Det er således muligt at se hjertet slå, følge blodet og dets immunceller på deres vej til immunorganer (hovednyre, thymus og milt) samt til leveren, svømmeblæren, tarmen og gællerne.

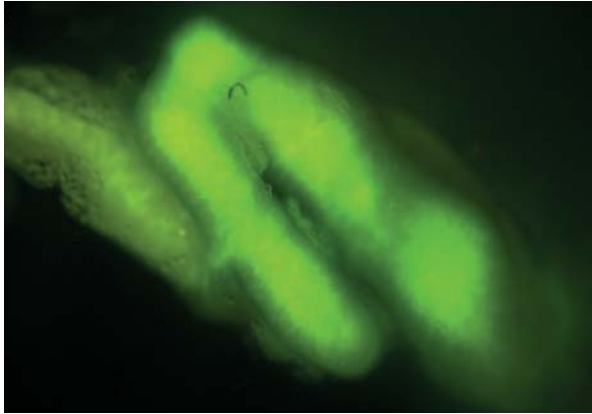
Vi har i vores forskning vist, at det er muligt at dyppe de gennemsigtige fisk i den kombinerede bakterie- og parasitvaccine og efterfølgende registrere optagelsen til forskellige tidspunkter ved hjælp af et fluorescens-mikroskop. Bakterierne med parasitproteiner og GFP blev optaget i fisken via tarmsystemet og hudens skællommer og kunne efterfølgende spores i milt, lever og hovednyre efter et par dage. Denne måde at optage "bad-vacciner" på i zebrafisk minder meget om de tilsvarende mekanismer i regnbueørred. Og da zebrafisk også

Videre læsning

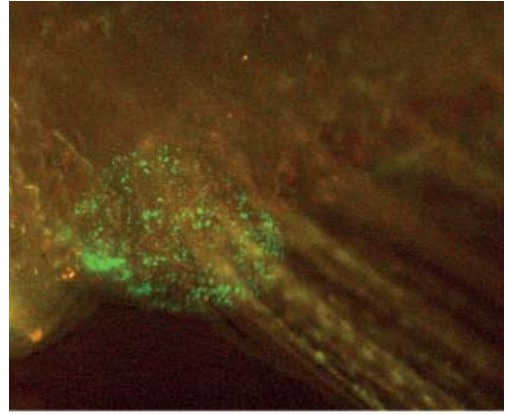
Xu, Z. et al (2013). Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. PNAS 110 (32): 13097-13102.

Jørgensen, L. v. G. et al (2012). Approaches towards DNA vaccination against a skin ciliate parasite in fish. PLOS ONE 7: 11, e-48129, 1-16.

Jørgensen, L.v.G. et al (2011). Experimental evidence for direct in situ binding of IgM and IgT to early trophonts of Ichthyophthirius multifiliis (Fouquet) in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 34: 749-755



Fotoet viser tarmen fra en zebrafisk, som lyser grønt på grund af de genmanipulerede bakterier med GFP.



På billedet kan man se, at bakterierne har samlet sig i en skællomme ved en finne.

kan få hvidpletsyge, kan vi nu bruge zebrafisken som modelorganisme for denne fødevarerfisk.

En model for fremtiden

Det har altid været forbundet med stort besvær, manglende succes og stor frustration at fremstille vacciner mod parasitter. Med fremkomsten af den gennemsigtige fiske-model og de selvlysende vacciner har vi nu et redskab til at vurdere,

hvorledes fremtidens vacciner optages i værten. Vi vil kunne se, hvor immunreaktionerne etableres, og hvordan den vaccinerede vært reagerer mod de snedige snyltere.

Vi har dog endnu ikke løst problemet med fiskedræberen, da vaccinen ikke viste sig særlig effektiv i regnbueørred. Vores teori er, at bakterien ikke kunne fremstille parasitproteinet på en sådan måde, at det lignede

det virkelige protein. Derfor er vi nu på jagt efter et andet antigen, der giver beskyttelse og er lettere for bakterierne at producere i en velliggende udgave. Når vi har fundet et sådant, har vi forhåbentlig løsningen på problemet med fiskedræberparasitten. Vi vil fremadrettet kunne teste alle vacciner imod fiskedræber i zebrafisk, hvilket vil være en stor økonomisk fordel, da zebrafisk er meget lettere at holde end regnbueørred. ■

ANNONCE