

**IMMUCOL:  
Immunisointimenetelmän kehittäminen columnaris-  
tautia vastaan lohikalojen poikastuotannon  
turvaamiseksi Suomessa**

**Heidi Kunttu ja Jouni Taskinen**

**Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos**

**Loppuraportti 1.6.2015  
Pilottihanke numero 1001669**

**EU investoi kestäväan kalatalouteen**



**Suomen elinkeinokalatalouden  
toimintaohjelma  
2007-2013**



## Sisällysluettelo

	<b>sivu</b>
1. Hankkeen taustaa	3
2. Hankeen toteutus	5
3. Tutkimukset	
3.1. Menetelmät	5
3.2. Tulokset	15
3.3. Tulosten tarkastelu	20
4. Johtopäätökset ja hankeen vaikuttavuus	28
5. Hankeen tuloksista tiedottaminen	28
6. Kiitokset	29
7. Kirjallisuus	29

## 1. Hankkeen taustaa

Suomen kalanviljelylaitoksilla tuotetaan vuosittain noin 22 miljoonaa lohen (*Salmo salar*), taimenen (*Salmo trutta*) ja kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasta istutukseen tai jatkokasvatusta varten (Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen tilastot 2013). Poikastuotanto on kuitenkin vaarassa heikentyä huomattavasti maailmanlaajuisestikin kalanviljelyssä esiintyvän columnaris-taudin (aiheuttaja *Flavobacterium columnare*) aiheuttamien vaikeiden ongelmien takia. Columnaris-tauti on noussut Suomen poikaskalanviljelyn suurimmaksi ongelmaksi 1990-luvulta lähtien. Ensimmäiset tautitapaukset havaittiin 1980-luvun alussa, ja infektioiden määrä on lisääntynyt huolestuttavasti viimeisten 25 vuoden aikana (Eskelinen 2009, Pulkkinen ym. 2010, Vennerström 2014). Vuosittain infektiot aiheuttavat merkittäviä taloudellisia tappioita kalanviljelyelinkeinolle, sillä tauti tarttuu ja uusiutuu erittäin helposti ja sitä esiintyy kesäisin lämpimän veden aikaan lähes kaikilla sisävesialueiden poikasviljelylaitoksilla. Hoitamattomana columnaris-tauti voi aiheuttaa 100 % kuolleisuuden sairastuneessa poikaserässä.

*F. columnare* -bakteeri on alun perin harmiton vesibakteeri. Ilmaston lämpeneminen ja kalanviljelyolosuhteet (kalatiheys, jatkuvasti vaihtuvat kalapopulaatiot) ovat todennäköisesti aiheuttaneet bakteerin pesiytymisen kalanviljelylaitoksille ja kehittymisen virulentiksi taudinaiheuttajaksi (Pulkkinen ym. 2010). *F. columnare* siis esiintyy luonnossa, mistä se todennäköisesti päätyy laitoksille joka kesä vedenoton mukana (Kunttu ym., 2012). Tutkimustemme mukaan *F. columnare* pystyy lisäksi elämään järvisedessä ilman ravintoa ainakin kaksi vuotta ja taudinaiheutuskykyisenä kalaisännän ulkopuolella vähintään viisi kuukautta (Kunttu ym. 2009a, Kunttu 2010). Näin bakteeri pystyy välttelemään kaloille annettavia antibioottikuureja ja aiheuttamaan toistuvia taudinpurkauksia.

Ainoa tällä hetkellä columnaris-tautiin tehoava hoitomuoto on siis antibioottilääkintä, johon joudutaan turvautumaan maamme kalanviljelylaitoksilla lähes jokaisen poikaserän yhteydessä jopa useita kertoja kesässä. Myös muissa maissa esiintyvien columnaris-infektioiden hoitoon käytetään antibiootteja. Antibioottien käyttö aiheuttaa monenlaisia riskejä; sekä antibiooteille vastustuskykyisten bakteerikantojen kehittymisen riskin kalanviljelylaitoksilla että antibioottikuormitusta luonnonvesiin. Toistuvan lääkitsemisen seurauksena myös kalanpoikasten immunitetin kehittyminen taudinaiheuttajaa vastaan estyy. Vaihtoehtoisia menetelmiä *F. columnare* -infektioiden torjumiseen tarvitaan siis kipeästi.

Columnaris-tauti on ongelma kalanviljelyssä myös ympäri maailmaa. Pohjois-Amerikassa onkin kehitetty kaupallinen kylvetyrokote, AQUAVAC-COL™, pilkkupiikkimonnin (*Ictalurus punctatus*) columnaris-taudille (Shoemaker ym. 2007), ja saman rokotteen on todettu tehostavan myös isobassin (*Micropterus salmoides floridanus*) columnaris-taudin vastustuskykyä (Bebak ym. 2009, Shoemaker ym. 2011). Kyseinen rokote ei kuitenkaan välttämättä anna suojaa lohikalojen ja suomalaista columnaris-tautia vastaan, koska Euroopan *F. columnare* -kannat poikkeavat geneettisesti rokotteen käytetystä pohjoisamerikkalaisesta kannasta (Suomalainen ym. 2006a). Lisäksi luvan saaminen pohjoisamerikkalaisen rokotteen testaamiseen Suomessa ei ole tällä hetkellä mahdollista, sillä rokote on elävä, heikennetty bakteeri, ja näin ollen erittäin riskialtis käytettäväksi kalanviljely-ympäristössä elävän ja muunnellun bakteerin leviämisen mahdollisuuden tähden. Myös Chilessä on erään selvityksen mukaan ollut käytössä FryVacc-niminen lohikaloille tarkoitettu kylvetyrokote (tuhottu bakteeri) columnaris-tautia vastaan (Bravo & Midtlyng 2007), mutta tämän rokotteen valmistuksesta, siinä käytetystä bakteerikannasta tai sen toimivuudesta ei ole saatavana tieteellisiä tutkimustuloksia, eikä kyseistä rokotetta niin ikään saa Suomeen testattavaksi.

Suomen lohikalanviljelyssä esiintyvien *F. columnare* -ongelmien torjunnassa tehokkain ajateltavissa oleva keino on immunisointimenetelmän kehittäminen. Lohikalojen hankittua immunitettia eli vasta-ainetuotantoa *F. columnare* -bakteeria vastaan ja sen aikaansaamaa suojavaikutusta columnaris-infektioissa on kuitenkin tutkittu erittäin vähän: aiheesta on vain kolme tieteellistä julkaisua noin 40 vuoden takaa (Fujihara & Nakatani 1971, Ransom 1975, Becker & Fujihara 1978). Näissä tutkimuksissa vasta-ainevaste *F. columnare* -bakteerille saatiin aikaan

kirjolohen poikasille immunisoimalla kalat kuumentamalla tuhotulla *F. columnare* -bakteerilla (bakteriini) ruumiinonteloon (IP-immunisaatio = intra peritoneal immunization) tai ihon alle sekä kuningaslohen poikasille (*Oncorhynchus kisutch*) immunisoimalla kalat rehuun sekoitetulla bakteriinilla eli oraalisesti (Fujihara & Nakatani 1971). Vasta-aine-vaste saatiin aikaan myös *F. columnare* -bakteerilla infektoiduille kirjolohen poikasille, ja tehostunut vastustuskyky luonnollista columnaris-infektiota vastaan kaikilla mainituilla immunisointimenetelmillä sekä immunisoimalla kirjolohen poikaset oraalisesti hajotetuilla *F. columnare* -soluilla. Ransom (1975) puolestaan sai aikaan kuningaslohelle columnaris-infektiosuojavaikutuksen oraalilla immunisaatiolla käyttäen bakteriinia, joka oli valmistettu formaliinilla tuhoamalla, ja Becker & Fujihara (1978) havaitsivat kirjolohen luonnollisen columnaris-infektion tehostavan kalojen puolustusta seuraavassa luonnollisessa columnaris-infektiossa. Omassa, kirjolohella aikaisemmin tekemässämme tutkimuksessa havaitsimme, että entsyymeihin perustuvan, luontaisen immunitetin tehostaminen niin sanotuilla immunostimulanteilla ( $\beta$ -glukaani ja hydroksimetyylilybutyraatti), ei suojaa kalaa columnaris-taudilta (Kunttu ym. 2009b), mutta toisessa, kollegoittemme tekemässä tutkimuksessa, seleenilisiä rehussa antoi heikon suojan tautia vastaan (Suomalainen ym. 2009). Kylvetysrokotuksen antama tehokas suoja pilkkupiikkimonnille ja isobassille (ks. yllä) kuitenkin osoittaa, että hankittu vasta-aineiden tuotantoon perustuva immunitetti on ratkaiseva kalan puolustautumisessa *F. columnare* -bakteerilta.

Patogeenisilla bakteereilla solun pintarakenteet ja bakteerien erittämät yhdisteet toimivat niin sanottuina immunogeenisinä komponentteina, jotka isäntäeliön immuunipuolustus tunnistaa vieraisiksi rakenteiksi ja joita vastaan isännän immuunipuolustus toimii mm. tuottamalla vasta-aineita. Tästä syystä näitä rakenteita ja yhdisteitä voidaankin käyttää tehostamaan isännän immuunipuolustusta tauteja vastaan. Kalojen immuunipuolustusta bakteeritauteja vastaan tehostettaessa immunogeeninä voidaan käyttää joko heikennettyjä taudinaiheuttajabakteereja, eri tavoin tuhottuja tai hajotettuja bakteereja, kuten edellisessä kappaleessa on esitetty, tai pelkästään bakteerin solupinnan rakenteita. Esimerkiksi pilkkupiikkimonnin on havaittu tuottavan vasta-aineita *F. columnare* -bakteerin hajotettuja tai formaliinilla tuhottuja soluja vastaan (Bader ym. 1997), ja *Aeromonas hydrophila* -bakteerin ulkokuoren proteiinin (OMP = outer membrane protein) tehostavan sekä lahnan (Chinese bream, *Megalobrama amblycephala*) vasta-ainevastetta että vastustuskykyä kyseisen bakteerin aiheuttamia infektioita vastaan (Wang ym. 2013). *Flavobacterium psychrophilum* -bakteerin kahden solukuoren proteiinin on osoitettu tehostavan vasta-ainetuotantoa kirjolohella (Dumetz ym. 2006 ja 2007) ja toisen näistä myös tehostavan immuunipuolustusta bakteerin aiheuttamaa kylmän veden tautia vastaan (Dumetz ym. 2006). On myös havaittu, että bakteerin kasvuympäristö vaikuttaa bakteerisolun pintarakenteisiin ja siten niiden immunogeenisuuteen. *F. columnare* -bakteerin on todettu kasvavan eri tavoin eri kasvatusalustoilla (Kunttu ym. 2009c) ja lisäävän tiettyjen, noin 82 kDa kokoisten OMP:ien tuotantoa rautaköyhässä kasvatusalustassa kasvatettaessa (Guan ym. 2013). Heikennetyt, rautaköyhässä kasvatusalustassa kasvatetun *F. psychrophilum* -bakteerin on kylvetysimmunisoinnissa immunogeeninä käytettynä todettu tehostavan kuningaslohen poikasten puolustuskykyä taudinaiheutuskykyistä *F. psychrophilum* -kantaa vastaan (Long ym. 2013). Rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetuilla rokotteilla on pystytty tehostamaan kirjolohen immuunipuolustusta myös *Aeromonas salmonicida* -bakteerin aiheuttamaa paisetautia (furunkuloosi) vastaan (Hirst & Ellis 1994, Durbin ym. 1999). Lisäksi tehostunut vasta-ainetuotanto ja vastustuskyky *Vibrio alginolyticus* -bakteeria vastaan on saatu aikaan karpilla (*Cyprinus carpio*) käytettäessä immunogeeninä rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetun *V. alginolyticus* -bakteerin erästä OMP:a (Xiong ym. 2010).

Columnaris-tauti on pääasiassa juuri kuoriutuneiden ja ensimmäisen kasvukauden kalanpoikasten tauti, jolloin käytännössä ainoa käyttökelpoinen immunisointitapa on kylvetys. Immunisointi tulee tehdä mahdollisimman varhaisessa vaiheessa kuoriutumisen jälkeen ja siksi IP-immunisaatio tai immunisointi lihakseen on hyvin hankalaa tai mahdotonta poikasten pienen koon tähden. Kylvetysimmunisointi on myös käytännön kalanviljelyn kannalta nopein ja kustannustehokkain

menetelmä, sillä tuhansia kalayksilöitä voidaan immunisoida samanaikaisesti. Immunisointi oraalisesti on teoriassa myös mahdollinen, joskaan ei välttämättä yhtä tehokas menetelmä sillä immunisointiannos ei ole sama kalayksilöiden välillä sen suuruuden perustessa yksilön nauttimaan rehuannoksen kokoon. Isommille kaloille tehokkain immunisointimenetelmä on IP-immunisaatio, ja olemmekin esikokeissamme saaneet IP-immunisoinnilla (immunogeeninä formaldehydillä tuhottu *F. columnare* -bakteeri) aikaan kirjolohelle sekä vasta-ainevasteen että vastustuskyvyn tehostumisen columnaris-tautia vastaan (Kunttu, julkaisematon). Tämän sekä yllä esitettyjen lohikaloilla tehtyjen tutkimusten (Fujihara & Nakatani 1971, Ransom 1975, Becker & Fujihara 1978) perusteella tiedämme siis lohikalojenkin kehittävän immuunivasteen *F. columnare* -bakteerille.

## 2. Hankkeen toteutus

Yllä esitettyihin seikkoihin pohjautuen Keski-Suomen ELY-keskus myönsi hankerahoituksen lohikalojen kylvetysimmunisointimenetelmän kehittämiseksi Suomessa esiintyviä columnaris-infektioita vastaan. Hanke toteutettiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella kolmen vuoden ja kolmen kuukauden mittaisena aikavälillä 2.4.2012 – 30.6.2015 yhteistyössä Hanka Taimen Oy:n kanssa. Voimalohi Oy ja Suomen Kalankasvattajaliitto Ry olivat projektin tukijoita. Projektin johtajana toimi FT Heidi Kunttu, varajohtajan professori Jouni Taskinen ja yhteistyökumppanina FT, dosentti Lotta-Riina Sundberg.

Hankkeen aikana selvitettiin seuraavat asiat:

1. Millä tavoin tuotettu ja tuhottu *F. columnare* -bakteeri toimii immunogeeninä?
  - a. Millaiselle immunogeenille altistaminen kylvetysinfektiossa saa aikaan vasta-ainetuotannon kalan plasmassa ja/tai iholimassa *F. columnare* -bakteeria vastaan?
  - b. Millaiselle immunogeenille altistaminen kylvetysinfektiossa herättää kalan immuunivasteen siten, että se suojaa kalaa columnaris-infektioilta?
2. Mikä on oikea immunisointiannos ja immunogeenille altistusaika?
3. Mikä on se kalanpoikasten kehitysvaihe (koko/ikä), jossa immunisointi tulee tehdä?
4. Suojaako kylvetysimmunisointi kalanviljelyolosuhteissa tapahtuvilta luonnollisilta infektioilta?

## 3. Tutkimukset

### 3.1 Menetelmät

**Kalat.** Kokeissa käytettiin 0–1-vuotiaita kirjolohen poikasia, joiden koko oli kokeen alussa kokeesta riippuen 0,45–20 g. Yhdessä kokeessa käytettiin myös kirjolohen lähes kuoriutumisvaiheessa olevia mätimunia. Kalat ja mäti saatiin Keski-Suomessa sijaitsevalta kalanviljelylaitokselta. Kaloja säilytettiin kalanviljelylaitoksen kokeissa (KVL 2012–2014, Taulukko 1) normaaleissa kalanviljelyolosuhteissa ja niitä hoidettiin normaalin viljelyrytmin mukaisesti laitoksen henkilökunnan toimesta. Laboratoriossa tehdyissä kokeissa (Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella suoritettavat kokeet IMM I–VII, Taulukko 1) kaloja säilytettiin 1 m<sup>3</sup> kokoisissa läpivirtausaltaissa, joihin johdettiin käsiteltyä (esisuodatin, pehennin, kalkkikivisuodatin) ja ilmastettua porakaivovettä. Vesitilavuus altaissa oli noin 500 l ja lämpötila noin 14–17 °C. Jokaisen altaan vesi ilmastettiin vielä altaassa. Kalat ja niiden olosuhteet (ilmastuksen toimivuus, veden virtaus, kalojen kunto) tarkistettiin vähintään kerran päivässä ja kalat ruokittiin päivittäin niiden kulloistakin kokoa vastaavalla rehulla määrällä, joka vastasi 1–2 % niiden painosta. Laboratoriossa kaloja ei ruokittu infektiopäivänä (ks. alla) ja sen jälkeen. Laboratorioon tuonnin jälkeen kalojen annettiin tottua laboratorio-olosuhteisiin 1–5 viikon ajan ennen kokeisiin siirtämistä. Jokaisesta tuodusta kalaerästä otettiin 8–12 kalasta kidukselta bakteeriviljely, jolla varmistettiin, etteivät kalat ole *F. columnare* -

bakteerin kantajia. Bakteriviljely tehtiin seuraavasti: kalat nukutettiin yliannoksella tricaine-anestesia (MS-222, Sigma-Aldrich Co. USA) ja niiden kiduksilta tehtiin primääriset bakteriviljelmät 0,1 µl viljelysilmukalla *F. columnare* -bakteerille spesifeille elatusainemaljoille, muokatulle Shieh-kasvatusalustalle (Song ym. 1988). Kalat lopetettiin tämän jälkeen dekapitaatiolla (nopea niskan katkaisu). Bakteriviljelmiä kasvatettiin kaksi vuorokautta, minkä jälkeen mahdollinen bakterikasvu maljoilla tarkastettiin.

**Bakteerit.** Kokeissa käytettiin columnaris-infektioon sairastuneista kaloista eristettyjä *F. columnare* -bakteereja. Kunkin vuoden kokeissa käytettiin joko edellisen tai sitä edellisen vuoden kesänä eristettyä bakterikanta, jotta siitä valmistettu immunogeeni (ks. alla) vastaisi parhaiten seuraavan kesän infektoita aiheuttavia *F. columnare* -kantoja. Vuoden 2012 kokeissa käytetty kanta (B402) oli eristetty siinä kesällä 2010 ja vuosien 2013 ja 2014 kokeissa käytetyt kannat (vastaavasti B480 ja B541) kirjolohesta vastaavasti vuosina 2012 ja 2013. Myös *F. columnare* -tyyppikannan ATCC 23463 käyttömahdollisuutta testattiin, mutta se ei kasvanut tarpeeksi kokeita varten (ks. alla). Käytetyt bakteerit eristettiin kuten kohdassa ”*Kalat*” on esitetty. Kun *F. columnare* -bakterikasvua havaittiin primääriviljelmissä, siirrostettiin yksi bakteripesäke 5 ml:aan muokattua Shieh-kasvatuslientä. Näitä viljelmiä kasvatettiin noin kaksi vuorokautta tasoravistelijassa (120 rpm = 120 kierrosta minuutissa) huoneen lämmössä (room temperature, RT, noin 22–23 °C), minkä jälkeen 400 µl bakterisuspensiota, johon lisättiin 50 µl vasikan sikiön seerumia (fetal calf serum, FCS, Gibco, BRL Co.) ja 50 µl glyserolia, pakastettiin 1,5 ml:n kryoputkissa (Nalge Nunc International, USA) –80 °C:ssa. Bakteereja säilytettiin tällä tavoin stokeissa, kunnes ne käytettiin kokeissa ja analyyseissä. Kokeita varten bakteristokit sulatettiin RT ja niistä siirrostettiin 20–40 µl 5 ml:aan Shieh-lientä. Näitä bakteriymppejä kasvatettiin 1–3 vrk RT tasoravistelijassa (120 rpm), minkä jälkeen niistä valmistettiin eri tilavuuksia (kokeesta, sen vaiheesta ja analyysistä riippuen) massakasvatusliuoksia Shieh-liemeen siten, että yksi 5 ml:n ymppeä lisättiin 50–100 ml:aan Shieh-lientä kohti. Massakasvatusta kasvatettiin 21–72 h tasoravistelijassa (110–150 rpm) RT – 26 °C:een lämpötilassa. Suuria massa kasvatusta varten 50 ml:n massakasvatus lisättiin 1 l:aan Shieh-lientä ja tätä massakasvatusta kasvatettiin kuten yllä. Rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetun immunogeenin (ks. IMM VI ja VII) valmistusta varten massakasvatukset tehtiin Shieh-liemeen, jonka valmistuksessa ei käytetty ferrosulfaattia (FeSO<sub>4</sub>) ja johon lisättiin rautakelaattoriksi 2,2'-bibirydyliä 50 µM (Sigma-Aldrich Co., USA). Kasvatuksen jälkeen massakasvatusten optinen tiheys (optical density, OD) mitattiin 96-kuoppalevyillä 200 µl:n tilavuudessa levylukijalla (Viktor<sup>TM</sup>X4, 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) 570 nm:n aallonpituudella. OD-lukeman perusteella määritettiin liuoksen sisältämien bakterisolujen lukumäärä (colony formig units, CFU) millilitrassa kasvatusliuosta aikaisemmin kootun OD–CFU-vastaavuustaulukon perusteella. Massakasvatusta käytettiin immunogeenin valmistukseen, OMP-eristykseen sekä infektioliuoksina (ks. alla). Bakteerien infektiivisyys varmistettiin laboratorioesikokeissa, joissa 5–10 kalaa altistettiin 6,5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml pitoisuudelle kutakin eristettyä bakterikantaa kohdassa ”*Infektio*” kuvatun menetelmän mukaisesti.

**Immunogeenit.** Immunogeenit valmistettiin massakasvatusliuoksista, jotka oli valmistettu kohdassa ”*Bakteerit*” kuvatun menetelmän mukaisesti, tuhoamalla *F. columnare* -bakteerit joko kuumentamalla, käsittelemällä formaldehydillä, sonikoimalla (johtamalla bakteriliukseen ultraääntä, mikä hajottaa bakterisolut) ja sen jälkeen pakastamalla ja sulattamalla muutamia kertoja, tai pakastamalla ja sulattamalla useita kertoja peräkkäin. Kuumentamalla tuhottu immunogeeni valmistettiin inkuboimalla massakasvatusliuoksia 25–28 ml:n erissä 60 °C:ssa 90 minuutin ajan. Liuoksia ravisteltiin muutaman kerran inkuboinnin aikana. Formaliinilla tuhottu immunogeeni valmistettiin seuraavasti: massakasvatukset sentrifugoitiin 50 ml:n erissä (4 500 x g, 20 min, RT) bakteerien erottamiseksi kasvatusliemestä. Bakteripelletti liuotettiin 50 ml:aan steriloitua porakaivovettä (ks. ”*Kalat*”) ja suspensioon lisättiin 350 µl 37 %N vahvuista formaldehydiä, jolloin formaldehydi laimeni 0,26 %:seksi. Suspensiota inkuboitiin noin 24 h 4 °C:ssa, suspensioputket jatkuvassa pyörytyksessä. Inkuboinnin jälkeen suspensiot sentrifugoitiin kuten yllä ja bakteripelletit pestiin kolme kertaa (sentrifugointi: 4 500 x g, 1 x 10 min, 2 x 5 min,

RT) 5 ml:lla yksinkertaista fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (1 x phosphate buffered saline = 1 x PBS). Bakteripelletit yhdistettiin ja suspensoitiin 50 ml:aan steriiliä porakaivovettä ja suspension bakterisolupitoisuus (CFU/ml) laskettiin alkuperäisen massakasvatuksen pitoisuuden perusteella (ks. ”*Bakteerit*”). Sonikoimalla ja sen jälkeen pakastamalla ja sulattamalla tuhottu immunogeeni valmistettiin sonikoimalla massakasvatusliuokset 40 ml:n erissä 1 min ajan ja erottamalla hajonneet bakterisolut (bakteerien solukuoret) kasvatusliuoksesta sen jälkeen sentrifugoimalla (4 500 x g, 30 min, RT). Solukuoripelletit pestiin kerran 5 ml:lla 1 x PBS:ää (4 500 x g, 30 min, RT), yhdistettiin halutun pitoisuuden aikaansaamiseksi immunisointia varten ja suspensoitiin 50 ml:aan 1 x PBS:ää. Tämä jälkeen mahdollisesti sonikaatioissa hajoamatta jääneet bakterisolut tuhottiin (hajotettiin) pakastamalla ja sulattamalla (–20 °C – RT) sonikoidut suspensiot neljä kertaa. Pakastamalla ja sulattamalla tuhottu immunogeeni valmistettiin seuraavasti: Massakasvatukset sentrifugoitiin 50 ml:n tai 950 ml:n erissä (riippuen massakasvatuksen tilavuudesta) bakteerin erottamiseksi kasvatusliuoksesta (50 ml:n tilavuus: 4 500 x g, 45 min, RT; 950 ml:n tilavuus: n. 10 537 x g, 50 min, +19 °C) ja bakteripelletit pestiin kerran pelletin koosta riippuen 5 ml:lla (50 ml erät) tai 50 ml:lla (950 ml:n erät) 1 x PBS:ää [4 500 x g, 30 min (50 ml erät), 45 min (950 ml:n erät), RT]. Pestyt solupelletit yhdistettiin halutun pitoisuuden aikaansaamiseksi immunisointia varten ja suspensoitiin 50 ml:aan 1 x PBS:a. Tämän jälkeen bakterisuspensiot pakastettiin ja sulatettiin (–20 °C – RT) kahdeksan kertaa bakterisolujen hajottamiseksi. Valmiista immunogeeniliuoksista viljeltiin 100 µl muokatulle Shieh-kasvatusmaljalle bakteerien tuhoutumisen varmistamiseksi. Pakastamalla ja sulattamalla tuhotusta immunogeenistä valmistettiin kylvetysimmunogeenin lisäksi sekä IP-immunogeeni että immuunirehu. IP-immunogeeni valmistettiin sekoittamalla immunogeeniliuosta, jonka pitoisuus oli tunnettu, Freundin täydelliseen adjuvanttiin (Freund’s complete adjuvant, FCA, Sigma-Aldrich Co., USA) valmistajan ohjeiden mukaan käyttäen kolmitiehanalla yhdistettyjä 5 ml:n lasiruiskuja. Näistä ruiskuista immunogeeniseos siirrettiin 1 ml:n muoviruiskuihin, joita säilytettiin immunisointiin saakka (noin 18 h) 4 °C:ssa. Immuunirehu valmistettiin sekoittamalla immunogeeniliuosta rehuun (raekoko 0,8 mm) siten, että liuoksen paino vastasi 3,3 %:a rehun painosta ja immunogeenin pitoisuus rehussa oli noin  $6,6 \times 10^6$  CFU/g rehua. Immunogeeniliuos lisättiin rehuun kahdessa erässä välillä huolellisesti sekoittaen, minkä jälkeen rehun annettiin kuivua RT noin 18 h ajan. Rehu, johon immunogeeni oli sekoitettu, päällystettiin immunogeenin rehuun sitomiseksi sekoittamalla rehun joukkoon ruokaöljyä 2 % rehun painosta. Öljyn annettiin imeytyä rehuun kuuden tunnin ajan välillä sekoittaen, minkä jälkeen rehu säilöttiin 4 °C:ssa kunnes se käytettiin kokeissa. Varjoimmunogeenissä (annettiin varjokäsittelyille, ks. ”*Kokeet KVL 2012–2014*” ja ”*Kokeet IMM I–VII*” sekä Taulukko 3) käytettiin immunogeenin tilalla pelkkiä immunogeenin liuottimia tai sidosaineita eli Shieh-lientä, steriiliä porakaivovettä ja 1 x PBS-liuosta (kylvetysimmunisoinnit) sekä 1 x PBS:n ja FCA:n suspensiota (IP-immunisointi) ja rehua, johon oli immunogeenin sijasta lisätty 1 x PBS:a (ruokintaimmunisointi).

*OMP (outer membrane protein = solun ulkokuoren proteiini) -eritys. F. columnare* -kannan B541 solun ulkokuoren proteiinit eli OMP:t eristettiin massakasvatusliuoksista, jotka oli valmistettu kohdassa ”*Bakteerit*” kuvatun menetelmän mukaisesti, mutta joiden kasvatuksessa käytettiin normaalin ja 50 µM 2,2’-bipyridyyliä sisältävien Shieh-kasvatusliuosten (kokeissa IMM VI ja VII käytetty immunogeenintuottoliuos) lisäksi 75 ja 100 µM 2,2’-bipyridyyliä sisältäviä Shieh-liuoksia ja normaalia sekä 50, 75 ja 100 µM 2,2’-bipyridyyliä sisältäviä FCGM-liuoksia (Farmer 2004, Guan ym. 2013). Myös *F. columnare* -bakteerin tyypikantaa yritettiin käyttää tässä analyysissä, mutta se ei kasvanut riittävästi OMP-eristystä varten. Eristys tehtiin kuten artikkelissa Högfors-Rönholm & Wiklund (2010) joitakin kohtia muuttaen. Massakasvatuksen bakterisolut konsentroidiin 45 ml:n erissä sentrifugoimalla (4 750 x g, 30 min, RT) bakterit ja liuottamalla solupelletit 10 ml:aan 20 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA pH 7,2 -liuosta. Joissakin tapauksissa 2–4 pellettä (näytteestä riippuen) yhdistettiin ennen liuotusta riittävän suuren solukonsentraation aikaansaamiseksi. Liuotetut bakterisolut hajotettiin joko sonikoimalla ja sen jälkeen pakastamalla ja sulattamalla muutamia kertoja, tai pakastamalla ja sulattamalla useita kertoja peräkkäin kuten kohdassa ”*Immunogeenit*”. Suspensiot sentrifugoitiin (4 867 x g, 30 min, +4 °C) ja OMP:t sisältävät

supernatantit otettiin talteen ja siirrettiin ultrasentrifugiputkiin. Putkia sentrifugoitiin (50 000 x g, 4 °C) ultrasentrifugissa (Optima™ L-90k Ultracentrifuge, Beckman Coulter) 60 min ajan ja pelletit liuotettiin 0,5 % N-lauroyylisarkosiini + 20 mM Tris-HCl pH 7,2 -liuokseen. Putkia inkuboitiin jäällä 4 °C:ssa tasoravistelijassa (100 rpm) 20 min, minkä jälkeen putket sentrifugoitiin, pelletit liuotettiin ja vielä kerran sentrifugoitiin kuten yllä. Tämä jälkeen pelletit pestiin kaksi kertaa 4 ml:lla ja liuotettiin lopuksi 100 µl:aan 20 mM Tris-HCl pH 7,2 -liuosta. Näistä näytteistä mitattiin OMP-konsentraatio Bradfordin (Bradford 1976) menetelmällä käyttäen Bio-Rad Protein Assay -värireagenssia (Dye Reagent Concentrate, BIO-RAD, Kanada) seuraavasti: Naudan seerumin albumiinista (bovine serum albumin = BSA) valmistettiin standardinäytteet (0–100 µg/ml) liuottamalla 1 x PBS:iin tunnetut määrät BSA:ta ja niitä pipetoitiin 96-kuoppalevyille kaksi toistoa/pitoisuus, 160 µl/kuoppa. Varsinaiset näytteet laimennettiin 1 x PBS:än 1:10 ja 1:100 ja näitä pipetoitiin kuoppalevyille kuten standardinäytteitä. Kuoppiin lisättiin 40 µl värireagenssia, jonka aikaansaaman värinmuutoksen voimakkuus mitattiin absorbanssilukemana 595 nm:n aallonpituudella (mitä voimakkaampi värinmuutos, sitä suurempi absorbanssi ja proteiinkonsentraatio). Standardisuoran absorbanssiarvoista piirrettiin käyrä, ja näytteiden OMP-pitoisuudet laskettiin sijoittamalla niiden absorbanssiarvot käyrän yhtälöön. OMP-näytteet, joiden proteiinipitoisuus nyt tiedettiin, laimennettiin tarvittaessa samaan pitoisuuteen ja analysoitiin Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis -analyysillä (SDS-PAGE) proteiinifragmenttien erottelun ja OMP-erojen selvittämiseksi erilaisissa kasvatusalustoissa tuotettujen bakteerien/immunogeenien välillä.

*SDS-PAGE.* Analyysi tehtiin artikkelin Laemmli (1970) mukaan joitakin kohtia muuttaen: OMP-näytteet laimennettiin ensin 1:1 näytekupuriin ja kuumennettiin sen jälkeen 5 min ajan 98 °C:ssa. Elektroforeesi tehtiin vertikaalisella Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Kanada) -ajolaitteella. Näytteet (20 µl/näyte) sekä kokomarkkeri (5 µl) (PageRuler Plus prestained protein ladder, Thermo Scientific, USA) pipetoitiin ajolasien väliin valettuun 4 % ylägeeliin ja niitä ajettiin erottelu-geelin rajalle asti 100 V jännitteellä. Tämän jälkeen jännite nostettiin 200 V:iin ja näytteitä ajettiin 14 % erottelu-geelissä kunnes 15 kDa -kokomarkkeri oli ajautunut geelin alareunaan tai kun 25 kDa -markkeri oli ajautunut ¾ geelistä. Geelit pestiin kolme kertaa tislattulla vedellä ja niitä värjättiin (Bio-Safe™ Coomassie, Coomassie G250 Stain, BIO-RAD, Kanada) 1–20 h tasoravistelijassa (50 rpm). Geelit pestiin kuten yllä ja ne kuvattiin joko digikameralla tai kopiokoneella kahden kalvon välissä. Eroteltujen proteiinifragmenttien intensiteettejä ja kokoja vertailtiin eri näytteiden kesken ("*OMP-eristys*").

*Immunisointi ja tehoste* (Taulukko 1). Kylvetysimmunisoinneissa (kaikki kokeet) immunogeeniliuosta, jonka bakteerisolupitoisuus (CFU/ml) oli tunnettu (ks. "*Bakteerit*"), lisättiin immunisointialtaissa olevaan veteen siten, että sen pitoisuus laimeni kussakin kokeessa haluttuun pitoisuuteen (ks. alla). Kalanviljelylaitoksen kokeissa kalat immunisoitiin kylvettämällä kokeesta riippuen 10 tai 50 litran vesitilavuudessa erillisissä immunisointialtaissa, yhden käsittelyn kalat samassa immunisointialtaassa, noin 1,0–7,0 kg kerrallaan. Immunisoinnin jälkeen kalat siirrettiin takaisin kasvatusaltaisiin. Immunogeeniannos (ks. kohta "*Immunogeeni*") oli  $6,5 \times 10^6 - 5,0 \times 10^8$  CFU/ml, immunisointilämpötila 3,0–17,0 ja aika 1–15 min. Laboratoriokokeissa kalat immunisoitiin kylvettämällä kokeesta riippuen 1,45–12,5 l:n vesitilavuudessa erillisissä immunisointialtaissa, yhden käsittelyn kalat allas kerrallaan samassa immunisointialtaassa. Immunogeeniannos oli  $1,0 \times 10^6 - 5,0 \times 10^8$  CFU/ml, lämpötila 17,0–20,0 °C ja immunisointiaika 1–120 min. Laboratoriokokeissa testattiin myös immunisointia ruumiinonteloon (IP-immunisointi) ja oraalisesti (ruokintaimmunisointi). IP-immunisoinnissa (IMM V) immunogeeniannos oli  $1,0 \times 10^8$  CFU/kala ja se injektoidiin 1 ml:n ruiskuilla, 50 µl:n tilavuudessa, 25 G neulalla ruumiinonteloon (ks. valmistus kohdassa "*Immunogeeni*"). Injektoinnin ajaksi kalat nukutettiin 0,01 % MS-222 -liuoksella, minkä jälkeen ne siirrettiin puhtaaseen veteen heräämään ja siitä koealtauksi. Ruokintaimmunisointi (IMM V) tapahtui ruokkimalla kaloja immuunirehulla päivittäin infektiioon saakka annoksella, joka oli 3 % kalan painosta ja jonka immunogeeniannos vastasi



pitoisuutta  $2,0 \times 10^5$  CFU/kalan painogramma/päivä. Kaloille annettiin tehosteimmunisointi kokeesta riippuen 14–54 päivää immunisoinnin jälkeen (days post immunization, dpi).

*Infektio.* Kalanviljelylaitoksella kalat saivat luonnollisen, kalanviljelyolosuhteissa kesän aikana ilmenevän *F. columnare* -infektion kokeesta riippuen 59–123 dpi (5–69 päivän jälkeen tehosteesta, days post boost, dpb) veden lämpötilan ollessa 19,0–25,0 °C. Kalojen sairastumista columnaris-infektioon (tummunut väritys; kidus-, evä-, pyrstö- tai leukarappeuma; ihovauriot) seurattiin kokeesta riippuen 5–40 vuorokautta taudinpurkauksen alkamisen jälkeen. Kalat tarkastettiin useita kertoja päivässä. Sairaast kalat, jotka olivat menettäneet normaalin uintikykynsä, eivätkä vastanneet ulkoisiin ärsykkeisiin, katsottiin kuolleiksi, poistettiin kokeesta ja lopetettiin dekapitaatiolla. Sairaista kaloista otettiin bakteeriviljelyt *F. columnare* -infektion varmistamiseksi kuten kohdassa ”*Kalat*”. Laboratoriossa koealtaisiin virtaavan veden lämpötilaa nostettiin infektiota varten kokeesta riippuen 0,5–1,0 °C päivässä 23,0–25,0 °C:een, missä kalat olivat kokeen loppuun saakka. Kalat infektoitiin kokeesta riippuen 35–56 dpi (14–30 dpb) erillisissä infektioltaissa, kunkin koealtaan kalat omassa infektioltaassaan, 1,9–9,0 l:n vesitilavuudessa ja 23,0–25,0 °C:een lämpötilassa. Kalat altistettiin kahden tunnin ajan samalle, mutta ei tuhotulle *F. columnare* -bakteerikannalle, kuin millä immunisointi tehtiin, pitoisuudessa  $1,0 \times 10^6$  CFU/ml (IMM VI–VII) tai  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml (IMM I–V). Infektioliuosta, jonka bakteeripitoisuus oli määritetty (ks. kohta ”*Bakteerit*”), lisättiin infektioltaiden veteen siten, että pitoisuus laimeni kussakin kokeessa haluttuun pitoisuuteen (ks. alla). Varjoinfektiossa infektioltaisiin lisättiin pelkkää Shieh-lientä. Infektion jälkeen kalat siirrettiin takaisin koealtaisiin, ja niiden sairastumista columnaris-infektioon (ks. yllä) seurattiin kuudesta yhdeksään vuorokautta. Kalat tarkastettiin useita kertoja päivässä. Sairaast kalat (ks. yllä) poistettiin kokeesta ja lopetettiin dekapitaatiolla. Sairaista kaloista otettiin bakteeriviljelyt *F. columnare* -infektion varmistamiseksi kuten kohdassa ”*Kalat*”. Käsittelykohtainen kumulatiivinen mortaliteettiprosentti laskettiin 24 h välein kalanviljelylaitoksen kokeissa ja 12 h välein laboratorioskokeissa ja arvoja vertailtiin eri käsittelyjen kesken immunisoinnin tehon määrittämiseksi.

*Bakteeri-, iholima- ja plasmanäytteenotto.* Kokeiden yhteydessä kaloista otettiin bakteeriviljelyt (ks. ”*Kalat*”), joilla varmistettiin, etteivät kalat ole saaneet *F. columnare* -tartuntaa immunogeenistä, sekä iholima- ja plasmanäytteet *F. columnare* -spesifien vasta-aineiden Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) -määrittystä (ks. alla) varten (koekohtaiset tarkemmat näytteenottajankohdat: Taulukko 2). Näytteenottoja varten kalat nukutettiin kuten kohdassa ”*Kalat*” on kerrottu. Iholimanäytteet otettiin kaapimalla kalan kyljistä iholimaa skalpellilla etukäteen punnittuihin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin, joissa oli 200 µl 1 x PBS:ää. Putkien sisältö sekoitettiin vorteksoimalla, putket spinnattiin (nopea pyöritys mikrosentrifugissa) ja ne pakastettiin –20 °C:ssa kunnes ne käytettiin ELISA-mittauksissa. Vasta-ainemäärittystä varten iholimaputken sulatettiin ja niihin lisättiin 1 x PBS:ää siten, että iholima laimeni 1:2. Tämän jälkeen putket vorteksoitiin ja sentrifugoitiin (n. 21 139 x g, 20 min, 4°C) liman erottamiseksi vasta-aineista. Vasta-aineet sisältävä neste pipetoitiin uuteen 1,5 ml:n putkeen. Plasmanäytteet otettiin kalan verestä leikkaamalla pyrstö poikki ja ottamalla veri 18 µ:n hematokriitikapillaareihin. Plasman erottamiseksi punasoluista kapillaarit sentrifugoitiin hematokriitiroottorissa (13 800 x g, 5 min, RT). Plasmat otettiin talteen kapillaareista 96-kuoppaveyville. Riittävän näyttemäärän saamiseksi 2–6 saman käsittelyn saaneen, samasta koealtaasta otetun kalan plasmat yhdistettiin. Plasmanäytteet pakastettiin kuten iholimanäytteet. Vasta-ainemäärittystä varten plasmat sulatettiin ja laimennettiin 1,5 ml:n putkissa 1 x PBS:ään 1:20, joka oli todettu sopivaksi laimennukseksi esikokeissa. Laimennetuille iholima- ja plasmanäytteille tehtiin ELISA-analyysi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

*Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – vasta-aineiden määrittely.* Kalojen *F. columnare* -spesifi vasta-ainetuotanto määritettiin sitouttamalla kalojen plasman ja iholiman vasta-aineet elävään *F. columnare* -bakteeriin ja mittaamalla sitoutuneiden vasta-aineiden määrä ELISA-menetelmällä. *F. columnare* -massakasvatuksen bakteerit sentrifugoitiin 20 ml:n erissä 50 ml:n

putkissa (4 500 x g, 20 min, RT) ja solupelletit pestiin kerran 5 ml:lla 1 x PBS:ää (4 500 g, 10 min, RT). Bakterisolut suspensoitiin 1 x PBS:ään siten, että solupitoisuudeksi saatiin  $4,0 \times 10^8$  CFU/ml. Tätä suspensiota pipetoitiin ELISA-96-kuoppalevyille (F96 Cert. Maxisorb, Nunc-Immuno Plate, Nalge Nunc International, USA) 50 µl/kuoppa ja bakterisolujen annettiin kiinnittyä levyille 18–22 h ajan 4 °C:ssa. Tämän jälkeen kuoppalevyt pestiin joko käsin (pipetointi ja sen jälkeen kuoppalevyn tyhjennys paperiin kopauttamalla) 100 µl:lla tai kolme kertaa ELISA-pesurilla (Wellwash 4 Mk 2, Thermo Labsystems, USA) 400 µl:lla 1 x PBS + 0,05 % Tween-20 -liuosta. Levyille pipetoitiin 100 µl 1 x PBS + 0,05 % Tween-20 + 0,2 % maitojauhe -blokkauksliuosta, minkä jälkeen niitä inkuboitiin RT 1 h ajan, tai 200 µl synteettistä blokkauksliuosta (Synthetic Blocking Buffer for ELISA, Ke-En-Tec Diagnostics A/S, Denmark), jolloin inkubointiaika oli 10 min. Blokkauksen tarkoituksena on peittää ne kohdat kuoppalevyiltä, joihin bakteeri ei ole kiinnittynyt. Levyistä ravistettiin blokkauksliuos pois (käsinpesu) tai ne pestiin ELISA-pesurilla kuten edellä on esitetty. Laimennettuja plasma- ja iholimanäytteitä ("*Bakteeri-, plasma- ja iholimanäytteenotto*") sekä positiivista (aikaisemmissa kokeistamme eristetty 1:100 laimennettu IP-immunisoidun kalan plasma) ja negatiivista (1 x PBS) mittauskontrollinäytettä pipetoitiin levyille 50 µl kahdesta kolmeen rinnakkaiseen kuoppaan/näyte/laimennus, kokeesta riippuen kahdesta kahteentoista plasmanäytettä/käsittely ja kolmesta yhdeksääntoista iholimanäytettä/käsittely. Levyjä inkuboitiin RT 2 h ajan. Levyt pestiin kolme kertaa käsin tai pesurilla kuten yllä on esitetty. Lohikalojen vasta-aineisiin sitoutuva, fosfataasileimattu vasta-aine (Mouse anti-salmonid IgG alkaline phosphatase, 1 µg/µl, Cedarlane, Canada) laimennettiin 1:1000 plasma- ja 1:250 iholimanäytteiden analyysijä varten 1 x PBS + 0,05 % Tween-20 + 0,2 % maitojauhe -blokkauksliuokseen (analyysit, joissa käytettiin ko. liuosta myös blokkaukseen) tai 1 x PBS:ään (analyysit, joissa käytettiin blokkaukseen synteettistä blokkauksliuosta) ja sitä pipetoitiin kuoppalevyille 50 µl/kuoppa. Levyjä inkuboitiin RT 1 h. Levyt pestiin kolme kertaa joko käsin tai pesurilla. Fosfataasin substraatti (Phosphatase Substrate, Sigma Sigma-Aldrich Co. USA) liuotettiin dietanoliamiinipuskurin (1 M dietanoliamiini + 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,8) pitoisuuteen 1 mg/ml ja tätä liuosta lisättiin levyille 100 µl/kuoppa. Kaupallisessa vasta-aineessa kiinni olevan fosfataasin reagoidessa substraatin kanssa muodostuu värireaktio, joka on sitä voimakkaampi, mitä enemmän näytteessä on vasta-ainetta, johon fosfataasilla leimattu vasta-aine sitoutuu. Tämän reaktion annettiin tapahtua 45 minuutin ajan, minkä jälkeen värinmuutoksen voimakkuus mitattiin absorbanssina 470 nm aallonpituudella levylukijalla (joko Viktor<sup>TM</sup>X4, 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA tai Multiscan Ascent, Thermo Labsystems, USA). Näytteiden absorbansseista vähennettiin negatiivisen mittauskontrollinäytteen antama absorbanssilukema (1 x PBS) eli mittaustausta, saaduista luvuista laskettiin käsittelykohtaiset keskiarvot ja niitä vertailtiin eri käsittelyn saaneista kaloista otettujen näytteiden kesken spesifin *F. columnare* -vasta-ainevasteen määrittämiseksi.

*Bakterisidinen aktiivisuus.* Kokeissa KVL 2013 ja IMM III testattiin immunisoitujen ja varjoimmunisoitujen kalojen plasman ja iholiman bakterisidistä aktiivisuutta eli kykyä tuhota bakteereja. Testit tehtiin samalla periaatteella kuin Raida ym. (2011) tekivät *Yersinia ruckeri* -bakteerin kylvetysimmunosointitutkimuksissa. Näistä testeistä ei kuitenkaan saatu selkeitä tuloksia eivätkä ne olleet toistettavissa muiden kokeiden yhteydessä, joten niitä ei käsitellä tässä raportissa tämän enempää.

*Koeasetelmat.* Kalanviljelylaitoksella koealtaina toimivat 4 m<sup>2</sup>:n kokoiset viljelyaltaat, joiden vedenpinnakorkeus/vesitilavuus vaihteli kalamäärän ja -koon mukaan. Kokeissa käytettiin normaalia viljelytiheyttä. Laboratoriossa kalat siirrettiin kokeita varten 15 l koealtaisiin, joiden vesitilavuus oli 12,5 l. Koealtaisiin johdettiin läpivirtauksella ilmastettua porakaivovettä (lämpötila 17,0–25,0 °C kokeesta ja sen vaiheesta riippuen) ja jokaisen altaan vesi ilmastettiin vielä erikseen. Kalamäärä/allas vaihteli kokeen ja kalojen koon mukaan. Kalat tarkastettiin ja ruokittiin kuten kohdassa "*Kalat*" ja "*Infektio*" on kerrottu. Kokeissa IMM I–VII alkunäytteet otettiin varastokaloista ("*Kalat*"). **Kokeiden yksityiskohtainen toteutus käy ilmi Taulukosta 1, 2 ja 3 sekä alla olevista kuvauksista "*Kokeet KVL 2012–2014*" ja "*Kokeet IMMI–VII*".**

*Kokeet KVL 2012–2014.* KVL 2012 kokeessa 10 000 kirjolohen poikasta immunisoitiin kylvettämällä ja 10 000 poikaselle annettiin varjokylvetysimmunisointi. Kylvetys tehtiin 10 l:n immunogeeniliuostilavuudessa noin 1 kg:n kalaerälle kerralla. Kaloja oli kokeen alussa yksi allas/käsittely ja kokeen lopussa kuusi allasta/käsittely johtuen normaalissa kalaviljelyrytmissä tehdyistä harvennuksista ja lajitteluista. Luonnollinen taudinpurkaus koekaloilla kesti noin 23 päivää ja loppui itsestään. Kokeen aikana kaloja jouduttiin lääkitsemän kerran *F. psychrophilum* -bakteeri-infektion takia (10 päivän antibioottikuuri 14 dpi alkaen) ja kerran *Chilodonella*-loisinfektion takia (suolakylvetys 68 dpi, 42 dpb). Yhden immunisoidun altaan kalojen kuolleisuus ja vasta-ainetulokset tulokset jätettiin huomioimatta kalojen voimakkaan *Chilodonella*-infektion tähden, sillä voimakkaasti loisen infektoimien kalojen tulokset olisivat antaneet virheellisen kuvan kalojen immuunivasteesta *F. columnare* -bakteeria vastaan. KVL 2013 -kokeessa 10 000 kirjolohen kuoriutumassa olevaa mätijyvää immunisoitiin kylvettämällä ja 10 000 mätijyvälle annettiin varjokylvetysimmunisointi noin 10 l:n tilavuudessa. Tehoste annettiin kuoriutuneille poikasille 10 l:n tilavuudessa 0,7–1,6 kg:n kalaerälle kerralla. Kaloja oli kokeen alussa yksi allas/käsittely ja kokeen lopussa kahdeksan allasta kylvetysimmunisoinnin ja seitsemän varjokylvetysimmunisoinnin saaneita. Kokeen aikana esiintyi kolme taudinpurkausta, joista ensimmäinen loppui itsestään noin 20 päivää alkamisen jälkeen ja joista toisen ja kolmannen yhteydessä kalat lääkittiin antibiooteilla kaksi päivää taudinpurkauksen alkamisen jälkeen normaalin viljelymenettelyn imitoimiseksi. KVL 2014 kokeessa kalat olivat kokeen alussa kuudessa altaassa, 6 000 kalaa/allas. Kolmen altaan kalat saivat kylvetysimmunisointi- ja kolmen varjokylvetysimmunisoitinkäsittelyn. Kalat immunisoitiin 50 l:n tilavuudessa noin 7 kg:n erissä. Kokeen lopussa altaita oli viisi/käsittely, ja kaloja poistettiin kokeesta jatkokasvatukseen kokeen edetessä ja kalakoon kasvaessa. Luonnollinen taudinpurkaus alkoi normaalia myöhemmin, mutta voimakkaana. Antibioottikuuri annettiin viisi päivää taudinpurkauksen alkamisen jälkeen, jotta ehdittiin nähdä onko käsittelyjen välillä eroja kalojen sairastumisnopeudessa. Kokeen aikana kaloja jouduttiin lääkitsemän kaksi kertaa *Chilodonella*-loisinfektion poissulkemiseksi (suolakylvetys 74 dpi/60 dpb ja 77 dpi/63 dpb). Kummallakaan kerralla loista ei löydetty kaloista. Lisäksi yhden kontrollikäsittelyn saaneen altaan kaloissa havaittiin *Trichodina*-loista 70dpi/56 dpb.

*Kokeet IMM I–VII.* IMM I ja II kokeissa kalat jaettiin 21 koealtaaseen, 50 kalaa/allas. Altaat jaettiin seitsemään käsittelyryhmään, kolme allasta/käsittely: kylvetysimmunisointi + infektio, kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, kolme käsittelyä kuten edelliset, mutta ei infektiota, sekä kontrollikäsittely, joka toimi taustakuolleisuuden kontrollina. Kylvetysimmunisointi ja -tehoste tehtiin 10 l:n tilavuudessa ja infektio 2 l tilavuudessa. IMM III kokeessa kalat jaettiin 15 koealtaaseen, 40 kalaa/allas. Altaat jaettiin viiteen käsittelyryhmään, kolme allasta/käsittely: kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, kaksi käsittelyä kuten edelliset, mutta ei infektiota, sekä kontrollikäsittely. Kylvetysimmunisointi ja -tehoste tehtiin 10 l:n tilavuudessa ja infektio 7 l:n tilavuudessa. IMM IV kokeessa kalat jaettiin käsittelyihin kuten kokeessa IMM III, mutta kaloja oli 26 kpl/allas. Kylvetysimmunisointia ja -tehostetta varten veden virtaus koealtaissa pysäytettiin ja immunogeeniliuos lisättiin suoraan koealtaisiin. Kahden tunnin kuluttua immunogeenin lisäämisestä virtaus koealtaisiin käynnistettiin uudestaan. Infektiot tehtiin 9 l:n tilavuudessa. IMM V kokeessa kalat jaettiin 21 koealtaaseen ja seitsemään käsittelyryhmään, 3 allasta/käsittely, seuraavasti: kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, ruokintaimmunisointi + infektio, kylvetys- ja ruokintaimmunisointi + -tehoste + infektio, varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio, IP-immunisointi + -tehoste + infektio, varjo-IP-immunisointi + -tehoste + infektio sekä IP-immunisointi + -tehoste + ei infektiota. IP-käsittelyt olivat kokeessa immunogeenin immuunivasteen herättämiskyvyn varmistamiseksi, sillä tiedämme aikaisempien kokeittemme perusteella formaliinilla tuhoamalla valmistetun immunogeenin tehostavan kirjolohen poikasten (20 g) *F. columnare* -vasta-ainetuotantoa IP-reittiä annettuna (Kunttu ym., julkaisematon tulos; ks. ”Hankkeen taustaa”). IP-käsittelyt saaneita kaloja oli 40 kpl/allas, muut käsittelyt saaneita 50 kpl/allas. Kylvetysimmunisointi tehtiin 1,45 l:n, -tehoste 1,7 l:n ja infektio 6 l:n tilavuudessa. IMM VI ja VII kokeissa kalat jaettiin 21 koealtaaseen, 50 kpl/allas kokeessa IMM VI ja 39 kpl/allas

kokeessa IMM VII. Altaat jaettiin seitsemään käsittelyryhmään seuraavasti: kylvetysimmunisointi normaalissa kasvatusalustassa tuotetulla immunogeenillä (= kylvetysimmunisointi) + -tehoste + infektiio, kylvetysimmunisointi rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetulla immunogeenillä (= kylvetysimmunisointi-Fe) + -tehoste + infektiio, varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektiio, kolme käsittelyä kuten edelliset, mutta ei infektiota, sekä kontrollikäsittely. Kylvetysimmunisointi ja -tehoste tehtiin kokeessa IMM VI 1,5 l:n ja infektiio 1,9 l:n tilavuudessa, ja kokeessa IMM VII vastaavasti 4 l:n ja 9 l:n tilavuudessa. Kokeessa IMM VI kalat jouduttiin lääkitsemään kerran *Chilodonella*-loisinfektion takia (29 dpi, 3 dpb).

*Tilastoanalyysit.* Tilastoanalyysit tehtiin kuolleisuus- ja vasta-ainevasteaineistolle (ELISA-aineisto) IBM SPSS Statistics 22 -ohjelmalla. Kuolleisuusaineisto analysoitiin Kaplan-Meier Survival analysis -testillä (Overall comparisons: KVL-kokeissa vertailut käsittelyjen välillä; Pairwise comparisons, Log Rank, Mantel-Cox: KVL-kokeissa vertailut altaiden välillä ja IMM-kokeissa vertailut käsittelyjen välillä), ja ELISA-aineisto parametrittömällä Kruskal-Wallis-testillä (Multiple comparisons; IMM V ennen tehostetta, IMM VII) tai Oneway ANOVA -testillä (Multiple comparisons, LSD; IMM V tehosteen jälkeen, IMM VI), jota varten ELISA-aineistolle tehtiin neliöjuurimuunnos varianssien yhtäsuuruuden aikaansaamiseksi. Kokeiden KVL 2012–2014 sekä IMM I–IV ELISA-aineistolle ei tehty tilastoanalyysijä sillä aineistosta kävi ilmi, ettei immunisointi ollut vaikuttanut vasta-ainepitoisuuteen.

*Tutkimuksen eettisyys.* Tutkimuksen aikana suoritettut kokeet tehtiin Etelä-Suomen aluehallintoviraston Eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen myöntämän eläinlääkintöluvan numero ESAVI/1409/04.10.03/2012 ja muutosluban numero ESAVI/4083/04.10.07/2013 puitteissa.

Taulukko 1. IMMUCOL-projektin aikana suoritettavat kokeet. CFU = colony forming units = bakteerisolujen lukumäärä, IP = intraperitoneal = ruumiinontelo-, dpi = days post immunization = päivää immunisoinnin jälkeen, dpb = days post boost = päivää tehosteen jälkeen.

Koe	Kalat alussa		Altaat		Immunogeeni			Immunisointi			Tehoste		Taudinpurkaus/ Kokeellinen infektio		Kokeen lopetus
	Vuosi	Paino á g	Määrä kpl/allas	Määrä kpl	Kasvatus- alusta	Tuhoamistapa	Annos CFU/ml	Tapa	Aika min	T °C	Ajankohta dpi	T °C	Ajankohta dpi/dpb	T °C	Ajankohta dpi/dpb
KVL 2012	2012	1,0–2,0	10 000	2	normaali	60 °C	6,5x10 <sup>6</sup>	kylvetys	1	3,0	26	13,0	69/43	19,5	105/79
KVL 2013	2013	mäti 0,69–0,80	10 000	2	normaali	pakastus-sulatus	2,076x10 <sup>7</sup> 1,0x10 <sup>8</sup>	kylvetys kylvetys	15 1	11,0	54	17,0	84/30 59/5	25,0 23,7	154/100
KVL 2014	2014	2,30	6 000	6	normaali	pakastus-sulatus	5,0x10 <sup>8</sup>	kylvetys	15	9,3	14	15,1	73/59	24,3	84/70
IMM I	2012	2,50	50	21	normaali	60 °C	6,5x10 <sup>6</sup>	kylvetys	1	17,0	21	17,0	35/14	25,0	43/22
IMM II	2012	1,86	50	21	normaali	formaldehydi	8,17x10 <sup>6</sup>	kylvetys	1	17,0	28	17,0	52/24	24,0	58/30
IMM III	2012	3,29	40	15	normaali	sonikointi ja pakastus-sulatus	8,0x10 <sup>6</sup>	kylvetys	1	17,0	21	20,0	48/27	24,0	55/34
IMM IV	2013	19,26	26	15	normaali	pakastus-sulatus	1,0x10 <sup>6</sup>	kylvetys	120	20,0	28	20,0	45/17	23,0	53/25
IMM V	2013	3,80	50	12	normaali	pakastus-sulatus	5,0x10 <sup>8</sup> 2,0x10 <sup>5</sup> CFU/g/pvä ks. yllä	kylvetys ruokinta kylv+ruok	5 jatkuva ks. yllä	15,6	28	17,6	56/28	23,5	65/39
IMM VI	2014	7,40 0,45	40 50	9 21	normaali	pakastus-sulatus	1,0x10 <sup>8</sup> CFU/kala 5,0x10 <sup>8</sup>	IP kylvetys	15	17,2	26	20,0	56/30	23,2	62/36
IMM VII	2014	4,88	39	21	normaali	pakastus-sulatus	5,0x10 <sup>8</sup>	kylvetys	30	17,6	25	19,0	53/28	24,0	60/35

Taulukko 2. IMMUCOL-projektin aikana suoritetuissa kokeissa tehdyt bakteeriviljely-, iholima- ja plasmanäytteenotot. <sup>a</sup>: altaita 6/käsittely, mutta näytteet otettiin vain 3 altaasta/käsittely; <sup>b</sup>: immunisoituja altaita 8 ja varjoimmunisoituja altaita 7, mutta näytteet otettiin vain 4 altaasta/käsittely; <sup>c</sup>: 30 kalasta plasmanäyte, loppuista iholimanäyte; <sup>d</sup>: näytteet otettu varastokaloista ("*Kalat*"). dpi = days post immunization = päivää immunisoinnin jälkeen, dpb = days post boost = päivää tehosteen jälkeen.

Koe Nimi	Näyte			Altaat		Kalat		Ajankohta	
	Bakteeriviljely	Iholima	Plasma	kpl /käsittely	kpl /allas	kpl /käsittely	alku	dpi	dpb
KVL 2012	x		x	1	48	48	x		
	x		x	1	48	48		17	
	x		x	2	22	48		60	34
	x		x	3	6	18		91	65
	x	x	x	6	10	30 <sup>a</sup>		105	79
KVL 2013	x		x	1	48	48		74	20
	x		x	4	6	24		125	71
	x	x		7–8	4	16 <sup>b</sup>		137	83
KVL 2014	x	x	x	3	19–26	62–72 <sup>c</sup>	x		
	x	x	x	3	18–20	62–60 <sup>c</sup>		14	
	x	x	x	3	15–22	60–48 <sup>c</sup>		35	21
	x	x	x	5	10–13	51–57 <sup>c</sup>		56	42
	x	x	x	5	10	40 <sup>c</sup>		84	70
IMM I	x		x		32 <sup>d</sup>		x		
	x		x	3	8	24		17	
	x		x	3	8	24		34	17
IMM II	x		x		32 <sup>d</sup>		x		
	x		x	3	8	24		27	
	x		x	3	8	24		51	23
IMM III	x		x		24 <sup>d</sup>		x		
	x		x	3	4	12		20	
	x	x	x	3	4	12		47	26
IMM IV	x		x		12 <sup>d</sup>		x		
	x		x	3	2	6		25	
	x	x	x	3	2	6		44	16
IMM V	x		x		30 <sup>d</sup>		x		
	x		x	3	6	18		27	
	x	x	x	3	6	18		55	27
IMM VI	x				5d <sup>c</sup>		x		
	x		x	3	10	30		50	24
IMM VII	x	x	x		24 <sup>d</sup>		x		
	x	x	x	3	6	18		21	
	x	x	x	3	6	18		48	23

### 3.2 Tulokset

*Kokeet KVL 2012–2014.* Katso Taulukko 3: kuolleisuus luonnollisten taudinpurkausten yhteydessä. Kalanviljelylaitoksella tehdyissä kokeissa KVL 2012 ja 2013 ei havaittu vasta-ainevasteen nousua kylvetysimmunisoitujen kalojen plasmassa tai iholimassa verrattuna varjokylvetysimmunisoituihin kaloihin. Kokeessa KVL 2012 immunisoitujen kalojen kuolleisuus oli immunisoinnin jälkeen (yksi allas/käsittely) korkeampi kuin varjoimmunisoitujen, mutta kuolleisuus ei johtunut columnaris-taudinpurkauksesta, sillä kaloilla ei ollut columnaris-infektion oireita, eikä *F. columnare* -bakteeria saatu eristettyä sairaista kaloista. Tehosteen ja sen yhteydessä tehdyn harvennuksen jälkeen (kaksi allasta/käsittely) immunisoitujen kalojen kokonaiskuolleisuus oli alhaisempi kuin varjoimmunisoitujen, mutta tämäkään kuolleisuus ei johtunut columnaris-infektiosta. Seuraavan harvennuksen jälkeen (kolme allasta/käsittely), seuranta-aikavälillä johon columnaris-taudinpurkaus (kaloilla oli columnaris-infektion oireita, ja *F. columnare* -bakteeria saatiin eristettyä sairaista kaloista) ajoittui, immunisoitujen kalojen kokonaiskuolleisuus oli korkeampi kuin varjoimmunisoitujen kalojen, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ( $P = 0,459$ ) (ks. käytetyt tilastoanalyysit kohdasta ”*Tilastoanalyysit*”). Tämä johtui kuitenkin kuolleisuudesta yhdessä kylvetysimmunisoituidussa altaassa, mikä oli korkeampi kuin kuolleisuus varjokylvetysimmunisoituidussa altaassa ( $P = 0,000$ ). Kaikissa kolmessa varjokylvetysimmunisoituidussa altaassa kuolleisuus oli korkeampi kuin kahdessa muussa kylvetysimmunisoituidussa altaassa ( $P = 0,000$ ). Taudinpurkauskauden jälkeen koekalojen kuolleisuus oli erittäin vähäistä. Kokeessa KVL 2013 ensimmäinen taudinpurkaus alkoi viisi vuorokautta tehosteimmunisoinnin jälkeen. Taudinpurkauksen yhteydessä (yksi allas/käsittely) immunisoitujen kuolleisuus oli varjoimmunisoitujen kuolleisuutta alhaisempi ( $P = 0,000$ ). Toisen taudinpurkauksen yhteydessä (kaksi allasta/käsittely) eroja kuolleisuuksissa käsittelyjen välillä ei ollut ( $P = 0,910$ ) ja kolmannen taudinpurkauksen yhteydessä (neljä allasta/käsittely) immunisoitujen kokonaiskuolleisuus oli varjoimmunisoitujen kuolleisuutta korkeampi ( $P = 0,000$ ). Immunisoitujen kokonaiskuolleisuus kokeen KVL 2013 taudinpurkausajana oli alhaisempi kuin varjoimmunisoitujen ( $P = 0,000$ ). Kokeessa KVL 2014 havaittiin heikko vasta-ainevasteen nousu kylvetysimmunisoinnin saaneiden kalojen plasmassa, mutta ei iholimassa, verrattuna varjokylvetysimmunisoituihin kaloihin sekä ensimmäisen immunisoinnin että tehosteimmunisoinnin jälkeen otetuissa näytteissä (Kuva 1 a). Selkeintä kohoaminen oli viimeisen näytteenoton yhteydessä (84 dpi/70 dpb), mikä tapahtui taudinpurkauksen jälkeen. Myös varjokylvetysimmunisoitujen kalojen vasta-ainevaste oli selkeästi kohonnut tässä näytteenotossa. Näitä vasta-ainetuloksia ei kuitenkaan voitu analysoida tilastollisesti, sillä jokaisen näytteenoton plasmata jouduttiin yhdistämään käsittelykohtaisesti yhdeksi näytteeksi riittävän suuren näyttemäärän aikaansaamiseksi ELISA-analyysiä varten. Suurin osa näyteplasmoista kului ELISA-analyysihin, jotka epäonnistuivat, joten plasmojen yhdistys oli välttämätöntä yhden luotettavan analyysituloksen aikaansaamiseksi. Kokeessa kuolleisuus oli erittäin vähäistä molemmissa käsittelyissä ennen ja jälkeen taudinpurkauksen. Taudinpurkauksen aikana (viisi allasta/käsittely) immunisoitujen kokonaiskuolleisuus oli varjoimmunisoitujen kuolleisuutta alhaisempi ( $P = 0,000$ ), mutta saman käsittely saaneiden altain välillä kuolleisuus vaihteli voimakkaasti ja oli korkea sekä immunisoiduilla että varjo-immunisoiduilla kaloilla.

*Kokeet IMM I–VII.* Katso Taulukko 3: kuolleisuus kokeellisten infektioiden yhteydessä. Laboratoriossa tehdyissä kokeissa ei havaittu vasta-ainevasteen nousua immunisoitujen kalojen plasmassa tai iholimassa verrattuna varjoimmunisoituihin kaloihin kokeissa IMM I–IV eikä iholimassa kokeissa IMM V–VII. Kokeellisen *F. columnare* -infektion seurauksena kokeessa IMM I infektoiduista kaloista varjokylvetysimmunisoinnin ja -tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuus oli alhaisin ja erosi tilastollisesti kylvetysimmunisoinnin (ei tehostetta) saaneiden kalojen ( $P = 0,002$ ), mutta ei kylvetysimmunisoinnin ja tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuudesta. Kylvetysimmunisointikäsittelyn saaneiden kalojen kuolleisuus oli korkein, mutta ei eronnut kylvetysimmunisoinnin ja tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuudesta. Kokeessa IMM II infektoiduista kaloista varjokylvetysimmunisoinnin ja -tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuus oli

alhaisin ja erosi tilastollisesti kylvetysimmunosoinnin ja tehosteen saaneiden kalojen ( $P = 0,041$ ), mutta ei kylvetysimmunosoinnin (ei tehostetta) saaneiden kalojen kuolleisuudesta. Kylvetysimmunosoinnin ja tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuus oli korkein ja erosi myös kylvetysimmunosoinnin (ei tehostetta) saaneiden kalojen kuolleisuudesta ( $P = 0,000$ ). Kokeessa IMM III infektoiduista kaloista varjokylvetysimmunosoinnin ja -tehosteen saaneiden kalojen kuolleisuus oli alhaisin ja erosi tilastollisesti kylvetysimmunosoinnin ja tehosteen saaneiden kalojen ( $P = 0,003$ ) kuolleisuudesta. Kokeessa IMM IV infektoidujen käsittelyjen kuolleisuudet olivat yhtä suuret eivätkä eronneet toisistaan tilastollisesti ( $P = 0,837$ ). Taustakuolleisuutta esiintyi kokeissa IMM I–IV kontrollikaloilla sekä kokeissa IMM I–III lisäksi kaloilla jotka eivät saaneet infektiota, mutta näiden kuolleisuus erosi tilastollisesti merkitsevästi infektion saaneiden kalojen kuolleisuudesta. Kokeessa IMM V havaittiin ensimmäisen immunosoinnin jälkeen ennen tehostetta (27 dpi) heikko, mutta tilastollisesti merkitsevä, vasta-ainevasteen nousu kylvetysimmunosoiduilla ( $P = 0,016$ ) sekä varjo-IP-immunosoiduilla kaloilla verrattuna varjokylvetysimmunosoituihin kaloihin ( $P = 0,020$ ). IP-immunosoiduilla kaloilla havaittiin voimakas vasta-ainevasteen nousu, joka erosi tilastollisesti kaikista muista käsittelyistä ( $P = 0,000$ ). Tehosteen jälkeen ennen infektiota (55 dpi, 27 dpb) sekä kylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn ( $P = 0,007$ ) että kylvetys- ja ruokinta-immunosointi + -tehoste -käsittelyn ( $P = 0,000$ ) saaneiden kalojen vasta-ainevaste oli kohonnut tilastollisesti merkitsevästi verrattuna varjokylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneisiin kaloihin (Kuva 1 b). Käsittelyn kylvetys- ja ruokinta-immunosointi + -tehoste absorbanssiarvo oli lähes kaksinkertainen käsittelyn kylvetysimmunosointi + -tehoste arvoon, mutta nämä eivät eronneet toisistaan tilastollisesti. Myös varjo-IP-immunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneiden kalojen vasta-ainevaste oli kohonnut lähes yhtä paljon kuin kylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn kaloilla, eikä eronnut tästä tai kylvetys- + ruokinta-immunosointi + -tehoste -käsittelystä tilastollisesti. IP-immunosoiduilla kaloilla vasta-ainevasteen nousu oli erittäin voimakas ja poikkesi tilastollisesti kaikkien muiden käsittelyjen saaneiden kalojen vasta-ainevasteesta ( $P = 0,000$ ). Ruokinta-immunosoinnilla ei ollut vaikutusta vasta-ainevasteeseen. Alkunäytteitä ei huomioitu tässä analyysissä, sillä niiden absorbanssit saivat negatiivisen arvon tausta-absorbanssin huomioimisen jälkeen. Kokeellisen infektion jälkeen alhaisin kuolleisuus oli kylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneilla kaloilla ja se erosi tilastollisesti merkitsevästi muut käsittelyt saaneiden kalojen kuolleisuuksista ( $P < 0,05$ ). Korkein kuolleisuus oli kylvetys- ja ruokinta-immunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneilla kaloilla ja se erosi tilastollisesti muiden paitsi varjokylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneiden kalojen kuolleisuudesta. Tilastollisesti merkitseviä eroja oli myös muiden käsittelyjen kalojen kuolleisuuksien välillä. Kokeessa IMM VI normaalissa kasvatusalustassa tuotetulla immunogeenillä (käsittely kylvetysimmunosointi + -tehoste) immunosoitujen kalojen vasta-ainevaste oli kohonnut kontrollikäsittelyn saaneiden kalojen vasteeseen verrattuna tehosteen jälkeen ennen infektiota (50 dpi, 24 dpb) ( $P = 0,022$ ) (Kuva 1 c). Rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetulla immunogeenillä (käsittely kylvetysimmunosointi–Fe + -tehoste) immunosoiduilla kaloilla vasta-ainevaste oli kohonnut sekä varjokylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneiden ( $P = 0,011$ ) että kontrollikäsittelyn saaneiden ( $P = 0,005$ ) kalojen vasteeseen verrattuna. Eri immunogeenillä immunosoitujen kalojen vasta-ainevasteiden välillä ei ollut eroja. Kokeessa jouduttiin tekemään kaksi infektiota, koska ensimmäinen (toteutuneet käsittelyt kuten Taulukossa 3) epäonnistui infektion edetessä liian nopeasti (infektioliuoksen bakteeripitoisuus  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml) ja kaikkien infektoidujen kalojen kuollessa yhtä aikaa. Ensimmäisen infektion tuloksia ei näin ollen huomioida. Toinen infektio alhaisemmalla bakteeripitoisuudella ( $1,5 \times 10^6$  CFU/ml) tehtiin kaloille, joille ei ollut annettu bakteeri-infektiota ensimmäisen infektion aikana (käsittelyt ... + ei infektiota + infektio Taulukossa 3). Infektion aikaansaama kuolleisuus oli kaikilla infektoiduilla käsittelyillä 100 %, mutta kuolleisuudet etenivät käsittelyjen välillä eri tahtia ja niiden välillä oli tilastollisesti merkitsevät erot ( $P < 0,05$ ). Kuolleisuus eteni hitaimmin kylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneilla, seuraavaksi nopeimmin kylvetysimmunosointi–Fe + -tehoste -käsittelyn saaneilla ja nopeimmin varjokylvetysimmunosointi + -tehoste -käsittelyn saaneilla kaloilla. Kontrollikäsittelyssä oli taustakuolleisuutta, mutta se erosi merkitsevästi ( $P = 0,000$ ) infektion saaneiden kalojen

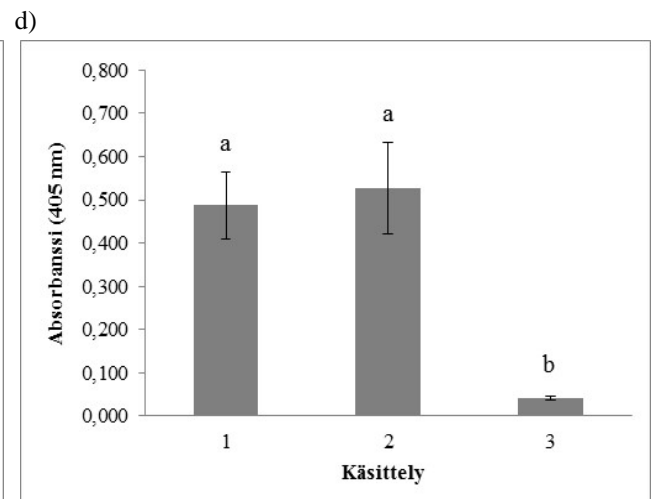
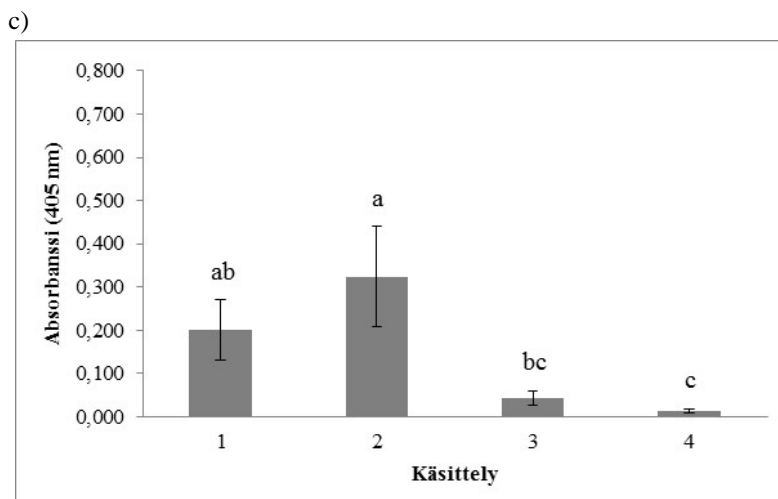
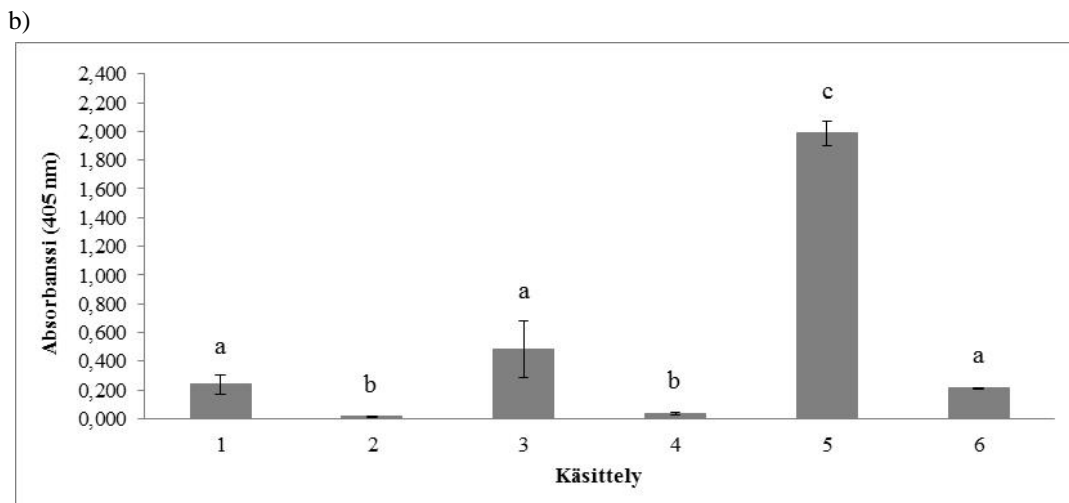
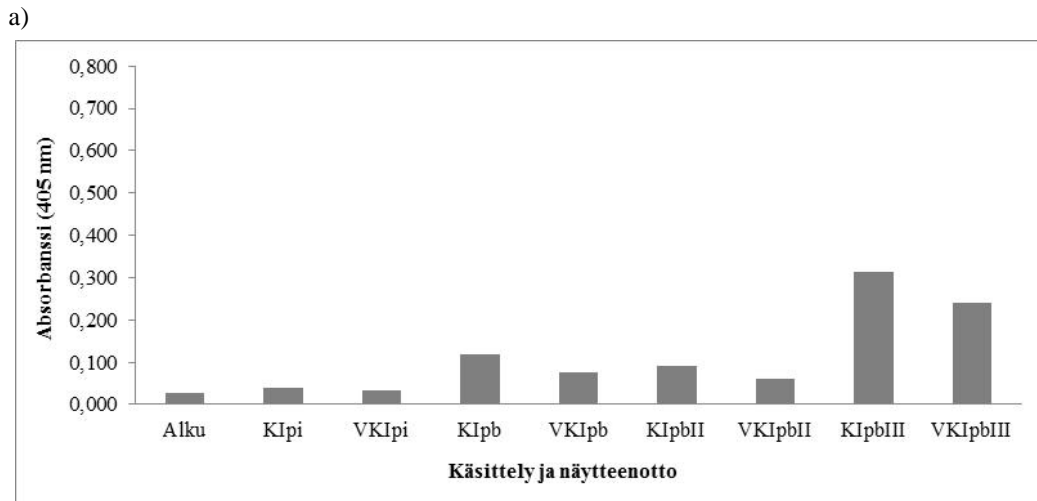


kuolleisuudesta. Kokeessa IMM VII sekä ennen (21 dpi) että jälkeen tehosteen (48 dpi, 23 dpb) vasta-ainevaste oli kohonnut molemmat immunisointikäsittelyt saaneilla kaloilla verrattuna varjoimmunisointikäsittelyyn (adjusted *P*-value < 0,05). Vaste oli korkeampi tehosteen jälkeen (Kuva 1 d). Eri immunogeenillä immunisoitujen kalojen vasta-ainevasteiden välillä ei ollut eroja. Kontrollikäsittelyjen ELISA-tuloksia ei huomioitu tämän kokeen yhteydessä. Kuolleisuus eteni kaikilla infektion saaneilla käsittelyillä samaa tahtia ja oli 98,67 % kylvetyssimmunisointi + -tehoste + infektio -käsittelyn saaneilla kaloilla ja 100 % kylvetyssimmunisointi-Fe + -tehoste + infektio ja varjokylvetyssimmunisointi + -tehoste + infektio -käsittelyn saaneilla kaloilla (ei tilastollisesti merkitseviä eroja). Taustakuolleisuutta ei kokeen aikana ilmennyt.

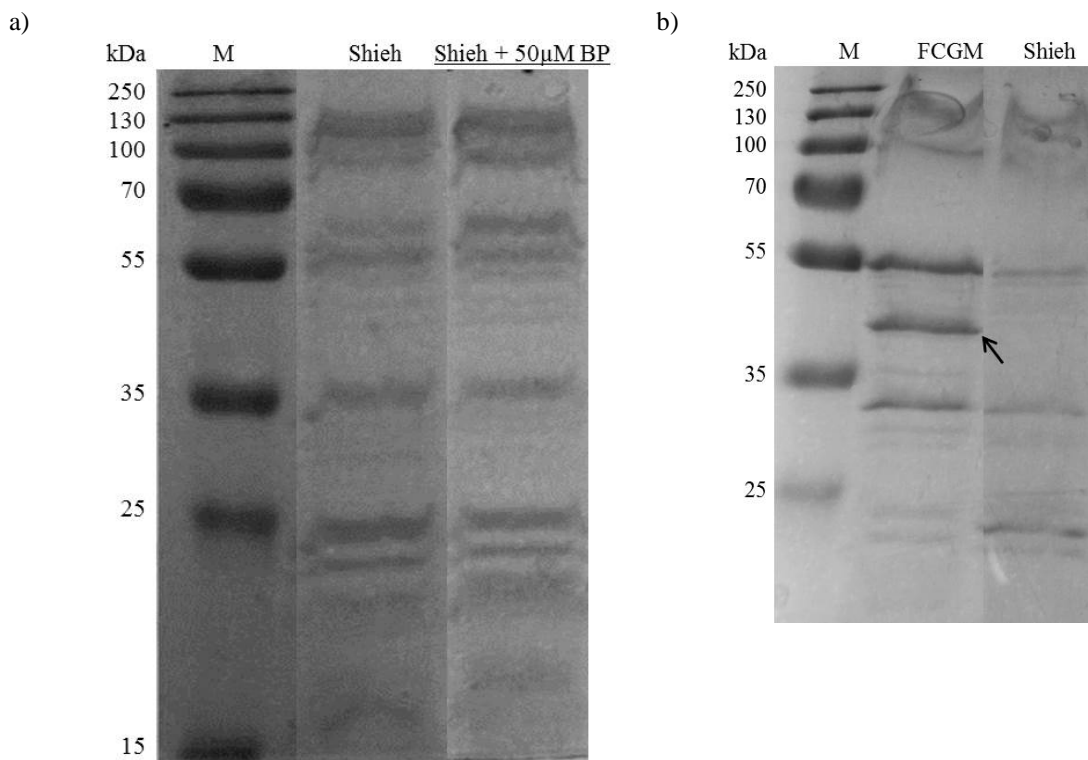
*Immunogeeni kokeissa IMM VI ja VII, OMP-eristys ja SDS-PAGE.* Kokeissa IMM VI ja IMM VII immunogeeninä käytetyn *F. columnare* -kannan B541 ei SDS-PAGE:ssa näkyvien proteiinifragmenttien perusteella havaittu muuttavan solun ulkokuoren proteiinien eli OMP:ien koostumusta rautaköyhässä Shieh-kasvatusalustassa ja 50 µM 2,2'-bipyridyylipitoisuudessa ("Bakteerit") kasvatettaessa verrattuna kasvatukseen normaalissa Shieh-kasvatusalustassa (Kuva 2 a). Bakteerin kasvatapa kuitenkin muuttui silmämääräisesti ja OD-mittauksilla tarkasteltuna huomattavasti rautaköyhässä, 50 µM 2,2'-bipyridyylipitoisuudessa Shieh-kasvatusalustassa: kasvu oli hitaampaa ja heikompaa sekä autoadherenssi (bakteerisolujen tarttuminen toisiinsa) ja biofilmin muodostus (tarttuminen kasvatuspullon sisäpintaan) voimakkaampaa kuin normaalissa kasvatusalustassa. OMP:eja ei bakteerien heikon kasvun tähden saatu eristettyä riittävästi OMP-erojen selvittämistä varten *F. columnare* -kannan B541 kasvatuksista (tyyppikanta ei kasvanut juuri lainkaan eli sille ei saatu tehtyä analyysyjä), jotka oli tuotettu 75 ja 100 µM 2,2'-bipyridyylä sisältävissä Shieh- tai 50, 75 ja 100 µM 2,2'-bipyridyylä sisältävissä FCGM-liuoksissa. Sen sijaan normaalien Shieh- ja FCGM-liuoksissa kasvatettujen bakteerien OMP-profiilit erosivat toisistaan: FCGM-lioksessa kasvatetuilla bakteereilla oli yksi, noin 45 kDa:n kokoinen proteiinifragmentti, joka puuttui Shieh-liuoksessa kasvatetuilta bakteereilta (Kuva 2 b). Myös sonikoidut ja sonikoimattomat näytteet saattoivat erota toisistaan siten, että sonikoiduilla bakteereilla mahdollisesti saatiin näkyviin yksi, noin 58 kDa:n kokoinen OMP-fragmentti, joka ei näkynyt sonikoimattomilla bakteereilla (ei kuvaa).

Taulukko 3. Kalojen kuolleisuus [kalojen lukumäärä taudinpurkauskauden alussa, kuolleiden lukumäärä sekä kumulatiivinen mortaliteetti (%),  $\pm$  95 % CI = confidence interval = luottamusväli] IMMUCOL-projektin aikana suoritetuissa kokeissa taudinpurkausten (kalanviljelylaitoskokeet KVL 2012–2014) ja kokeellisten infektioiden (laboratoriokokeet IMM I–VII) yhteydessä. –Fe = immunogeenin tuotto rautaköyhässä kasvatusalustassa; (+ infektio) = kalat infektoitiin kokeen toisen infektion aikana; eri kirjaimet kuolleisuuksien yläindeksinä: tilastollisesti merkitsevä ero ( $P < 0,05$ ) kuolleisuuden etenemisessä kokeen käsittelyjen välillä (Survival analysis, Kaplan-Meier, KVL: Overall Comparisons; IMM: Pairwise Comparisons Log Rank, Mantel-Cox).

Koe	Käsittely	Alussa lkm	Kuolleet lkm	Kuolleisuus (kum. mort. %)	$\pm$ 95 % CI
KVL 2012	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	5 418	250	4,6 <sup>a</sup>	4,1–5,2
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	9 114	395	4,3 <sup>a</sup>	3,9–4,8
KVL 2013	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	9 096	2 335	25,7 <sup>a</sup>	24,8–26,6
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	8 952	2 840	31,8 <sup>b</sup>	30,8–32,7
KVL 2014	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	9 448	4 287	45,4 <sup>a</sup>	44,4–46,4
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + taudinpurkauskausi	9 498	5 844	61,5 <sup>b</sup>	60,5–62,5
IMM I	Kylvetysimmunisointi + infektio	97	93	95,9 <sup>a</sup>	89,8–98,9
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	62	53	85,5 <sup>ab</sup>	74,2–93,1
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	97	81	83,5 <sup>b</sup>	74,6–90,3
	Kylvetysimmunisointi + ei infektiota	94	19	20,2 <sup>cd</sup>	12,6–29,8
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	98	21	21,4 <sup>cd</sup>	13,8–30,9
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	100	27	27,0 <sup>c</sup>	18,6–36,8
	Kontrolli	102	14	13,7 <sup>d</sup>	7,7–22,0
IMM II	Kylvetysimmunisointi + infektio	102	101	99,0 <sup>a</sup>	94,7–100,0
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	99	99	100,0 <sup>b</sup>	96,4–100,0
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	96	91	94,8 <sup>a</sup>	88,3–98,3
	Kylvetysimmunisointi + ei infektiota	96	18	18,8 <sup>c</sup>	11,5–28,0
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	99	13	13,1 <sup>c</sup>	7,2–21,4
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	99	20	20,2 <sup>c</sup>	12,8–29,5
	Kontrolli	103	13	12,6 <sup>c</sup>	6,9–20,6
IMM III	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	92	92	100,0 <sup>a</sup>	96,1–100,0
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	88	86	97,7 <sup>b</sup>	92,0–99,7
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	96	0	0,0 <sup>c</sup>	0,0–3,8
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	96	1	1,0 <sup>c</sup>	0,03–5,7
	Kontrolli	96	2	2,1 <sup>c</sup>	0,3–7,3
IMM IV	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	65	28	43,1 <sup>a</sup>	30,8–56,0
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	65	28	43,1 <sup>a</sup>	30,8–56,0
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	65	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–5,5
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	66	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–5,4
	Kontrolli	65	1	1,5 <sup>b</sup>	0,04–8,3
IMM V	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	87	43	49,4 <sup>a</sup>	38,5–60,4
	Ruokintaimmunisointi + infektio	86	60	69,8 <sup>bc</sup>	58,9–79,2
	Kylvetys- ja ruokintaimmunisointi + -tehoste + infektio	83	76	91,6 <sup>d</sup>	83,4–96,5
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	82	68	82,9 <sup>bd</sup>	73,0–90,3
	IP-immunisointi + -tehoste + infektio	89	56	62,9 <sup>e</sup>	52,0–72,9
	Varjo-IP-immunisointi + -tehoste + infektio	85	58	68,2 <sup>ce</sup>	57,2–77,9
	IP-immunisointi + -tehoste + ei infektiota	79	1	1,2 <sup>f</sup>	0,03–6,9
IMM VI	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio			inf. epäon.	
	Kylvetysimmunisointi–Fe + -tehoste + infektio			inf. epäon.	
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio			inf. epäon.	
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota + infektio	90	90	100,0 <sup>a</sup>	96,0–100,0
	Kylvetysimmunisointi–Fe + -tehoste + ei infektiota + infektio	96	96	100,0 <sup>b</sup>	96,2–100,0
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota + infektio	97	97	100,0 <sup>c</sup>	96,3–100,0
	Kontrolli	72	7	9,7 <sup>d</sup>	4,0–19,0
IMM VII	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	75	74	98,7 <sup>a</sup>	92,8–100,0
	Kylvetysimmunisointi–Fe + -tehoste + infektio	94	94	100,0 <sup>a</sup>	96,2–100,0
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + infektio	78	78	100,0 <sup>a</sup>	95,4–100,0
	Kylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	85	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–4,2
	Kylvetysimmunisointi–Fe + -tehoste + ei infektiota	79	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–4,6
	Varjokylvetysimmunisointi + -tehoste + ei infektiota	87	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–4,2
	Kontrolli	82	0	0,0 <sup>b</sup>	0,0–4,4



Kuva 1. *Flavobacterium columnare* -vasta-ainevaste (absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella,  $\pm$  SE kuvissa b-d) kokeen KVL 2014 jokaisen näytteenoton (a) ja kokeiden IMM V–VII tehosteimmunisoinnin jälkeisen näytteenoton yhteydessä (b-d). a) KVL 2014: KI = kylvetyssimmunisointi, VKI = varjokylvetyssimmunisointi, alku = alkunäyte, pi (post immunization = immunisoinnin jälkeen) = 14 dpi (= days post immunization = päivää immunisoinnin jälkeen), pb (post boost = tehosteen jälkeen) = 35 dpi/21 dpb (= days post boost = päivää tehosteen jälkeen), pbII = 56 dpi/42 dpb, pbIII = 84 dpi/70 dpb = taudinpurkauksen jälkeen; b) IMM V (55 dpi, 27 dpb): 1 = kylvetyssimmunisointi + -tehoste, 2 = ruokintaimmunisointi, 3 = kylvetyss- + ruokintaimmunisointi + -tehoste, 4 = varjokylvetyssimmunisointi + -tehoste, 5 = IP-immunisointi + -tehoste, 6 = varjo-IP-immunisointi + -tehoste; c) IMM VI (50 dpi, 24 dpb): 1 = kylvetyssimmunisointi + -tehoste, 2 = kylvetyssimmunisointi-Fe + -tehoste, 3 = varjokylvetyssimmunisointi + -tehoste, 4 = kontrolli; d) IMM VII (48 dpi, 23 dpb): 1 = kylvetyssimmunisointi + -tehoste, 2 = kylvetyssimmunisointi-Fe + -tehoste, 3 = varjokylvetyssimmunisointi + -tehoste. Eri kirjaimet pylväiden päällä: tilastollisesti merkitsevä ero ( $P < 0,05$ ; b ja c: Oneway ANOVA, Multiple Comparisons; d: Kruskal-Wallis, Multiple Comparisons, adjusted  $P$ -value) käsittelyjen välillä.



Kuva 2. FCGM- ja Shieh-kasvatusliuoksissa tuotetun *Flavobacterium columnare* -bakteerin outer membrane protein eli OMP-fragmentit eroteltuina SDS-PAGE -menetelmällä. M = kokomarkkeri; nuoli osoittaa FCGM-liuoksessa tuotetun bakteerin OMP-fragmentin, joka puuttuu Shieh-liuoksessa tuotetulta bakteerilta.

### 3.3 Tulosten tarkastelu

Maaailmanlaajuisesti ongelmia kalanviljelyssä aiheuttavan *F. columnare* -bakteerin infektiot, columnaris-tauti, ovat myös yksi Suomen poikaskalanviljelyn suurimpia haittoja ja tulevaisuuden uhkia. Vuosittain columnaris-tauti aiheuttaa merkittäviä tappioita kalanviljelyelinkeinolle. Infektiot puhkeavat yleensä veden lämpötilan ollessa yli 18 °C, ja poikasiin kohdistuvat stressitekijät edesauttavat taudinpurkausten alkamista.

Tässä hankkeessa selvitettiin ensimmäisen kerran lohikaloiden spesifiä immuunipuolustusta ja sen tehostamisen mahdollisuutta *F. columnare* -bakteerin aiheuttamassa columnaris-taudissa. Hankkeen tarkoituksena oli kehittää kirjolohen poikasia mallikaloina käyttäen columnaris-infektioita vastaan kylvetysimmunisointimenetelmä, joka olisi käytettävissä laajamittakaavaisissa immunisaatioissa Suomen kalanviljelylaitoksilla. Tutkimuksia tehtiin sekä kalanviljely- että laboratorioympäristössä. Kylvetysimmunisoinnin tehoa testattiin altistamalla eri-ikäisiä kalanpoikasia eri tavoin valmistetuille immunogeenille eripituisia aikoja ja mittaamalla tämän jälkeen kalojen iholiman ja plasman *F. columnare* -spesifistä vasta-ainetuotantoa sekä seuraamalla kalojen sairastumista luonnollisiin columnaris-taudinpurkauksiin kalanviljelylaitoksella sekä kokeellisiin columnaris-infektioihin laboratoriossa.

*Kalojen vointi kokeen aikana.* Kalat kestivät immunisointikäsitteilyt todella hyvin jokaisen kokeen yhteydessä. Immunogeenille altistuksen aikaista tai immunisoinnin ja tehosteen jälkeistä kuolleisuutta ei juuri ilmennyt lukuun ottamatta kalanviljelyolosuhteissa tapahtuvaa ja laboratoriokokeissa havaittua normaalia vähäistä taustakuolleisuutta. Poikkeuksena olivat kokeet KVL 2012, KVL 2014 ja IMM VI, joiden aikana kaloja jouduttiin lääkitsemään *F. psychrophilum* ja *Chilodonella*-infektioiden aiheuttaman kuolleisuuden takia (ks. Menetelmät: ”Kokeet KVL 2012–2014” ja ”Kokeet IMM I–VII”). *Trichodina*-loisen esiintyminen kokeen KVL 2014 aikana yhden varjokäsittelyn saaneen altaan kaloissa ei vaatinut lääkitystä. Kaikki kolme patogeeniä ovat yleisiä ja tyypillisiä kalanviljely-ympäristössä, ja myös kalanviljelylaitoksilta

laboratorioympäristöön tuotavat kalat voivat olla niiden kantajia, mikä selittää IMM VI -kokeen aikana havaitun *Chilodonella*-loisen aiheuttaman kuolleisuuden. Parasiitti-infektioiden esiintymisen samanaikaisesti isännän immunisaation kanssa on todettu heikentävän immunisaation tehoa sekä rottaeläinmallilla että Niilin tilapiialla (*Oreochromis niloticus*) (Su ym. 2006, Martins ym. 2011). Lisäksi on osoitettu, että loisinfektio altistaa kirjolohta *F. columnare* -infektioille (Bandilla ym. 2006, Xu ym. 2014). On siis mahdollista, että mainitut infektiot ovat vaikuttaneet kokeiden KVL 2012, KVL 2014 sekä IMM VI tuloksiin (ks. alla).

*Kalojen ikä/koko.* IMMUCOL-hankkeen kaikissa tutkimuksissa, lukuun ottamatta koetta KVL 2013, kalojen koot immunisointien aikana olivat suuremmat kuin esim. niiden kalojen, joita Shoemaker ym. (2007 ja 2011) sekä Bebak ym. (2009) käyttivät kehittäessään ja testatessaan AQUAVAC-COL<sup>TM</sup>-rokotetta columnaris-tautia vastaan. Tämä johtuu käytännön syistä, sillä immunisaatio tuli ajoittaa KVL-kokeissa taudinpurkauksia ja viljelykiertoa ajatellen (ks. alla), ja kalanpoikaset oli otettava laboratorioon kunkin vuoden kokeita varten pian kuoriutumisen jälkeen keväällä, jotta ne olisivat ehtineet kohdata mahdollisimman vähän patogeenejä ennen laboratoriokokeiden aloitusta, eivätkä näin olisi taudinkantajia. Kalojen vasta-aineisiin perustuvan, spesifin immuunipuolustuksen kehityksen kannalta on perusteltuakin immunisoida kalat myöhemmin kuin heti kuoriutumisen jälkeen, sillä vastakuoriutuneilla poikasilla kyseinen immuunipuolustuslinja ei vielä juurikaan toimi vaan kalojen immuunipuolustus on luontaisen eli epäspesifin immunitietin varassa (katsaus kalojen immunitietista: Iwama & Nakanishi 1996; esimerkki kirjolohen varhaisten kehitysvaiheiden immuunivasteista: Chettri ym. 2012). Spesifin immunitietin (lymfaattiset kudokset ja lymfosyytit eli mm. vasta-aineita tuottavat solut) kehitys, ja täten vähäinen toiminta, alkaa tosin jo heti kuoriutumisen jälkeen, mutta erään teorian mukaan tämä immuunipuolustuslinja on toiminnallisesti kypsä vasta kahdesta kolmeen kuukautta kuoriutumisesta. Lisäksi immuunipuolustuksen kehitysnopeus riippuu kalalajista, lämpötilasta ja etenkin kalan koosta, jolla lienee suurempi merkitys kehitykselle kuin kalan iällä kuukausissa. Esimerkiksi kirjolohella vasta-ainetuotantoa on tutkimuksesta riippuen havaittu viikosta kolmeen viikkoon kuoriutumisesta (Iwama & Nakanishi 1996). *F. columnare* ja *F. psychrophilum* -bakteerien immunisointitutkimuksissa onkin käytetty varsin erikokoisia kalanpoikasia 0,05 g painavista aina 66 g:n painoisiin kaloihin (Moore ym. 1990, LaFrentz ym. 2002, Kondo ym. 2003, Grabowski ym. 2004, LaFrentz ym. 2008, Leal ym. 2010, Lorenzen ym. 2010, Mohammed ym. 2013). Tutkimuksissamme käytettyjen kalojen iän ja koon voidaan siis todeta olleen soveliaat kylvetysimmunisointimenetelmän kehitystä varten.

*Immunisoinnin ja tehosteen ajoitus sekä lämpötila.* Kalanviljelylaitoksen kokeissa KVL 2012–2014 immunisointi ja tehoste pyrittiin ajoittamaan keväälle siten, että mahdollinen suojavaikutus olisi saavutettu kesän columnaris-taudinpurkauksen oletettuun alkamisajankohtaan mennessä. Koska taudinpurkauksen alkaminen riippuu veden lämpötilasta, voitiin nämä ajankohdat vain arvioida. Veden lämpötila voi pintavesilaitoksilla nousta ilman lämpötilan kohotessa hyvinkin nopeasti, mikä immunisointiaikataulun optimoimisen haasteelliseksi. Immuunivasteen kehittymiseen veden lämpötilalla on nykytiedon mukaan vaikutusta lähinnä kunkin kalalajin optimilämpötilan puitteissa (Lillehaug 2014). Toisin sanoen, mikäli immunisointi tehdään kalalajille sopivan luontaisen lämpötilavaihtelun sisällä, ei lämpötilalla ole suurta vaikutusta immuunipuolustuksen kehittymiseen. KVL-kokeissa immunisointi tehtiin kokeesta riippuen 3,0–11,0 °C:een ja tehoste 13,0–17,0 °C:een lämpötilassa (ks. Taulukko 1), mikä on kirjolohelle sovelias lämpötila. Laboratoriokokeissa IMM I–VII immunisointi ja tehoste tehtiin kokeesta riippuen hieman korkeammassa, 15,6–20,0 °C:een lämpötiloissa kalanviljelylaitoksilla ennen luonnollista infektiota tapahtuvan veden lämpötilan nousun simuloimiseksi, sekä korkeaa kokeellisen infektiön lämpötilaa silmällä pitäen (ks. alla). Columnaris-taudinpurkaukset alkoivat KVL 2013 ja 2014 -kokeissa aikaisintaan 22,1 °C:een lämpötilassa, mikä on lohikaloille korkea ja saattaa heikentää kalojen yleiskuntoa siinä määrin, että immuunipuolustuksen teho laskee (esim. Raida & Buchman 2008). IMM I–VII -kokeissa kokeellinen infektiio jouduttiin tekemään 23,0–25,0 °C:een lämpötiloissa, sillä käytössämme olevilla *F. columnare* -kannoilla ei pystytty samaan aikaan infektiota

alhaisemmissa lämpötiloissa (havaittu IMMUCOL-projektin aikana tehdyissä esikokeissa). Tässä on yksi syy lohikalojen columnaris-taudin vakavuuteen: *F. columnare* -bakteerin kasvun, ja sitä mukaa bakteeri-infektion, optimilämpötila (Suomalainen ym. 2006b) on korkeampi kuin isäntäkalan optimilämpötila. Tehosteimmunisointi annettiin kokeissa KVL 2012 ja 2014 sekä IMM I–VII kokeesta riippuen joko noin kahden, kolmen tai neljän viikon kuluttua ensimmäisestä immunisoinnista, mikä on normaali aikaväli esimerkiksi viljelykalojen rokotuksissa (Lillehaug 2014). KVL 2013 -kokeessa tehoste annettiin 0,69–0,80 g poikasille vasta noin kahdeksan viikkoa (54 dpi) silmäpistevaiheen mädille annetun ensimmäisen immunisoinnin jälkeen, jotta viljelykiertoa kalanviljelylaitoksella pystyttiin noudattamaan mahdollisimman optimaalisesti. Ensimmäiset taudinpurkaukset alkoivat KVL 2012 ja 2014 -kokeissa noin 10 viikkoa (69 ja 73 dpi) ensimmäisen immunisoinnin ja noin kuusi ja kahdeksan viikkoa (43 ja 59 dpb) tehosteimmunisoinnin jälkeen. Kokeissa IMM I–VII kokeellinen infektio tehtiin kokeesta riippuen viidestä kahdeksaan viikkoa (35–56 dpi) ensimmäisen immunisoinnin ja kahdesta neljään viikkoa (14–30 dpb) tehosteen jälkeen. Kokeen KVL 2013 ensimmäinen taudinpurkaus alkoi viisi vuorokautta tehosteen jälkeen (59 dpi), mikä on todennäköisesti immuunipuolustuksen kehitykselle liian lyhyt aika etenkin, kun kyseisessä kokeessa ensimmäinen immunisointi tehtiin kuoriutumassa (kuoriutuminen 1–2 dpi) olevalle silmäpistevaihemädille. Esimerkiksi Shoemaker ym. (2007) saivat aikaan tehostuneen suojavaikutuksen kokeellista columnaris-infektiota vastaan immunisoimalla pilkkupiikkimonnin silmäpistevaihemädin kylvettämällä heikennetyllä, elävällä *F. columnare* -bakteerilla (ks. myös ”Hankkeen tausta”), antamalla tehosteen kuoriutuneille poikasille (kuoriutuminen 12–48 h ensimmäisen immunisoinnin jälkeen) 34 dpi ja infektoimalla poikaset 109 ja 137 dpi (75 ja 103 dpb). Kyseisen tutkimuksen kokeelliseen infektiioon verrattuna myös kokeiden KVL 2012 ja 2014 taudinpurkaukset alkoivat ja kokeiden IMM I–VII infektiot tehtiin aikaisemmin, mutta toisaalta toisessa tutkimuksessa (Shoemaker ym. 2011) annettiin sekä pilkkupiikkimonnin että isobassin 7–48 vuorokauden ikäisille poikasille vain yksi immunisointi AQUAVAC-COL™-rokotteella (sama, mutta jo lisensoitu rokote kuin tutkimuksessa Shoemaker ym. 2007) ja tehostunut suojavaikutus saatiin aikaan 55, 57 ja 69 dpi tehdyissä kokeellisissa *F. columnare* -infektiossa. Suojavaikutus saatiin aikaan kalanviljely-ympäristössä AQUAVAC-COL™-rokotteella myös isobassin poikasille, jotka immunisoitiin kerran 7–9 vuorokauden ikäisinä ja joiden sairastumista columnaris-infektioon seurattiin 44 vuorokauden ajan alkaen ajankohdasta 45 dpi (Bebak ym. 2009). Samoin suojavaikutus columnaris-infektioissa oli tehostunut seeprakalalla (*Danio rerio*) Niilin tilapiialla ja pilkkupiikkimonnilla kokeessa, jossa poikaset immunisoitiin kerran heikennetyllä, elävällä *F. columnare* -bakteerilla vain 28 dpi tehdyissä infektioiden (Mohammed ym. 2013). Kokeiden KVL 2012 ja 2014 ja IMM I–VII osalta immunisointi ja luonnollinen/kokeellinen infektio ajoittuivat näin ollen immunitetin kehityksen kannalta oikeanlaisesti.

*Immunogeeni: valmistustapa.* Kokeissa KVL 2012 ja IMM I käytettiin immunogeeniä, joka oli valmistettu tuhoamalla *F. columnare* -solut kuumentamalla 60 °C:ssa. Kokeessa IMM II immunogeeni puolestaan valmistettiin tuhoamalla bakteeri formaldehydillä. Formaldehydillä tuhoamalla valmistettua immunogeeniä on käytetty yleisesti niin rokote- ja immunisointitutkimuksissa kuin kaupallisten rokotteiden valmistuksessa (esim. LaFrentz ym. 2002, Kondo ym. 2003, Leal ym. 2010, Raida ym. 2011, Brudeseth ym. 2013 ja Chettri ym. 2015). Formaldehydikäsittely kuitenkin saattaa muuttaa bakteerisolun pinnan, kuten glykyproteiinien rakenteita (Bader ym. 1997), minkä vuoksi se ei välttämättä sovellu tuhoamiskäsittelyksi kaikkien patogeenisten bakteerien tapauksessa. Myös kuumennus tunnetusti denaturoi proteiineja, minkä vuoksi korkea lämpötila immunogeenin valmistuksessa ei ole paras mahdollinen menetelmä. Nämä seikat huomioon ottaen kokeessa IMM III kokeiltiin immunogeenin valmistusta tuhoamalla *F. columnare* -bakteerisolut sonikoimalla. Menetelmällä ei kuitenkaan saatu tuhottua kaikkia immunogeeniliuoksessa olevia bakteereja, joten sonikoidut bakteerit piti vielä pakastaa ja sulattaa neljä kertaa kaikkien bakteerisolujen tuhoamiseksi. Suomalainen ym. (2006b) ovat todenneet, että *F. columnare* -bakteeri ei kestä peräkkäisiä pakastuksia –20 °C:ssa, vaan solut hajoavat vähitellen. Näiden seikkojen vuoksi kokeissa KVL 2013 ja 2014 sekä IMM IV–VII päädyttiin käyttämään

immunogeeniä, joka oli tuotettu hajottamalla bakteerisolut pakastamalla ja sulattamalla useita kertoja. Joissakin tutkimuksissa on selvitetty *F. columnare* -bakteerin yksittäisiä, immunogeenisiä proteiineja tai muita solurakenteita (Zhang ym. 2006, Liu ym. 2008, Olivares-Fuster ym. 2010, Olivares-Fuster & Arias 2011 ja Liu ym. 2012), mutta vain yhden, heat shock protein DnaJ -proteiinin, immunisaatiotehoa on tutkittu kalalla (pilkkupiikkimonna) (Olivares-Fuster ym. 2010). Tämän proteiini ei havaittu antavan suojaa columnaris-infektiossa vaikka se herättikin kalan vasta-ainevasteen. Sama ilmiö havaittiin, kun *F. psychrophilum* -bakteerin heat shock proteiinien 60 ja 70 immungeenisuutta testattiin kirjolohella (Plant ym. 2009). Myös Högfors ym. (2008) havaitsivat *F. psychrophilum* -bakteerin kokonaisten tai hajotettujen solujen olevan parempia rokotekandidaatteja kirjolohelle kuin yksittäisten proteiinifraktioiden. Toisaalta, toisissa *F. psychrophilum* -bakteerin tutkimuksissa myös yksittäisten proteiinien ja proteiinifraktioiden on havaittu tehostavan kalojen immunitettia *F. psychrophilum* -infektioita vastaan (Rahman ym. 2002, LaFrentz ym. 2004 ja Dumetz ym. 2006). *F. columnare* -bakteerille immuunivastetta tutkittaessa on kuitenkin käytetty lähinnä eläviä tai tuhottuja kokonaisia bakteerisoluja (ks. Menetelmät: ”*Immunogeeni: pitoisuus ja altistusaika*”). Näiden tutkimusten valossa IMMUCOL-projektin kokeissa käytetyn, hajotetuista soluista valmistetun immunogeenin, joka sisältää kaikki solukuoren rakenteet, voidaan todeta olleen sovelias immunisointimenetelmän kehitystä varten columnaris-taudille. Kokeissa IMM VI ja VII käytettyjen, normaalissa ja vähärautaisessa kasvatusalustassa tuotettujen immunogeenien OMP-koostumusten välillä ei havaittu eroja. Erojen puuttuminen voi johtua siitä, että kokeissa käyttämämme *F. columnare* -kanta B541 ei kasvanut 100 µM rautakelaattoripitoisuudessa, jossa kasvatettuna *F. columnare* -tyyppikannalla (ATCC 23463) on havaittu OMP-muutoksia (Guan ym. 2013). Kanta B541 kasvoi riittävän hyvin immunogeenin valmistusta varten korkeintaan 50 µM rautakelaattoripitoisuudessa. Guan ym. käyttivät kokeissaan lisäksi FCGM-kasvatusliuosta (Farmer 2004), kun me käytimme tutkimuksissamme Shieh-kasvatusliuosta. Shieh-kasvatusliuos valittiin, koska totesimme esikokeissamme, ettei kanta B541 kasva myöskään FCGM-liuoksessa, jossa oli 100 µM rautakelaattoria, eikä yhtä hyvin 50 µM rautakelaattoria sisältävässä FCGM-liuoksessa kuin 50 µM rautakelaattoria sisältävässä Shieh-liuoksessa. Käytössämme oleva *F. columnare* -tyyppikanta ATCC 23463 kasvoi mainituissa liuoksissa liian heikosti, jotta sitä olisi voitu käyttää immunogeenin valmistukseen. Tämä johtui todennäköisesti kannan heikkenemisestä pitkän laboratorioissa säilytyksen seurauksena. Muiden *F. columnare* -kantojen kasvuominaisuuksia ei testattu, sillä kanta B541 oli ainoa kokeita IMM VI ja VII edeltävänä kesänä 2013 eristetyistä kannoista, jonka taudinaiheutuskyky oli varmuudella saatu testattua ja joka sen tähden oli valittu myös immunogeenin valmistukseen. Koska käyttämämme bakteerikanta kuitenkin kasvoi eri tavoin vähärautaisessa kuin normaalissa kasvatusalustassa (ks. Tulokset: ”*OMP-eristys ja SDS-PAGE*”), päätettiin näissä liuoksissa tuotettujen immunogeenien eroja testata kokeissa IMM VI ja VII.

*Immunisointi: immunogeenipitoisuus, immunisointireitti ja immunogeenille altistusaika.* Käytetyt immunogeeniannokset kokeissa KVL 2012 sekä IMM I–IV olivat hiukan alhaisempia tai samaa suuruusluokkaa kuin tutkimuksissa, joissa elävillä, heikennetyillä *F. columnare* -bakteerilla kylvetysimmunisoimalla on saatu seeprakalalle (*Danio rerio*), Niilin tilapialle ja pilkkupiikkimonnille aikaan tehostunut taudinvastuskyky columnaris-infektioita vastaan (Shoemaker ym. 2007, Shoemaker ym. 2011, Mohammed ym. 2013). Toisaalta, saman suuruusluokan kylvetysimmunisointiannoksilla ei onnistuttu saamaan suojaa Niilin tilapian columnaris-infektiossa (Grabowski ym. 2004) eikä kirjolohen *F. psychrophilum* -infektiossa (LaFrentz ym. 2002). IMMUCOL-hankkeen kokeisiin KVL 2012 sekä IMM I–IV valittiin immunogeenipitoisuus kokeellisissa *F. columnare* -infektioissa käyttämämme infektiopitoisuuden perusteella (Kunttu ym. 2009b ja 2009c), sillä hankkeen ensimmäisissä kokeissa haluttiin varmistua, että kalat sietäisivät käyttämällämme *F. columnare* -kannalla immunisoinnin, eikä immunogeenipitoisuutta näin ollen haluttu nostaa paljon infektiivistä bakteeriannosta korkeammaksi. Immunogeenille altistusaika oli näissä kokeissa, lukuun ottamatta koetta IMM IV, yksi minuutti, mikä on lyhyempi kuin yllä mainituissa tutkimuksissa, mutta mikä on kalanviljelyssä käytössä kaupallisilla rokotteilla immunisoitaessa (Brudeseth ym. 2013). Kokeessa IMM IV immunisointiaika oli kaksi tuntia, mikä on kahdesta neljään kertaan pidempi kuin esimerkiksi

kahdessa heikennetyllä *F. psychrophilum* -bakteerilla tehdyssä immunisointitutkimuksessa, joissa immunogeeniannos toisaalta oli noin kaksisataakertainen verrattuna kokeessa IMM IV käytettyyn pitoisuuteen (LaFrentz ym. 2008, Lorenzen ym. 2010). Joissakin rokote- ja immunisointikokeissa on kuitenkin osoitettu, että alhainen immunogeeniannos pitkällä kylvetysaltistusajalla tehostaa kalojen immuunipuolustusta paremmin kuin lyhykestoinen kylvetys suurella immunogeeniannoksella (Moore ym. 1998, Chettri ym. 2015). Kokeessa KVL 2013 immunisointiannosta mädille ja kaloille sekä immunisointiaikaa mädille kasvatettiin hiukan vastaamaan paremmin tutkimuksissa Shoemaker ym. 2007 ja 2011 käytettyjä suurimpia annoksia ja aikoja. Näin päästiin myös lähemmäs menetelmää, jossa karpille on saatu aikaan tehostunut columnaris-taudin vastustuskyky yhden minuutin immunisointiajalla, joskin puolitoistakertaisella annoksella verrattuna kokeessa KVL 2013 käytettyyn annokseen (Moore ym. 1990). Kokeissa KVL 2014 ja IMM V–VII immunogeenille altistusajat olivat aikaisemmissa kokeissamme käytettyjä pidempiä (viisi tai 15 minuuttia) ja immunogeeniannos kylvetysimmunisaatioissa oli korkea,  $5,0 \times 10^8$  CFU/ml. Tämä on 2,5–3,5 kertaa suurempi annos kuin yllä mainituissa tutkimuksissa, joissa saatiin aikaan tehostunut vastustuskyky tai sekä tehostunut vastustuskyky (LaFrentz ym. 2008) että vasta-ainetuotanto *F. psychrophilum* -infektiossa (Lorenzen ym. 2010). Toisaalta, eräässä tuhotulla *F. columnare* -bakteerilla tehdyssä kylvetysimmunisaatiokokeessa ei saatu Niilin tilapialle aikaan vasta-ainevastetta tai vastustuskyvyn tehostumista vaikka immunogeeniannos oli yli 1000-kertainen verrattuna kokeissa KVL 2014 sekä IMM V–VII käytettyyn kylvetysimmunisointiannokseen ja immunisointiaika 30 minuuttia (Leal ym. 2010). Samassa kokeessa saatiin kuitenkin vasta-ainevaste IP- ja lihaksen sisäisellä immunisoinnilla, mutta nämäkään eivät suojanneet kaloja columnaris-infektioilta. Myöskään ruokintaimmunisoinnilla ei saatu aikaan vasta-ainevastetta tai vastustuskyvyn tehostumista. Samansuuntaiset tulokset saatiin *F. psychrophilum* -bakteerin tutkimuksessa, jossa kirjolohella saatiin aikaan vasta-ainevaste sekä iholimassa että plasmassa, kun kalat immunisoitiin heikennetyllä bakteerilla IP-reittiä, mutta vastetta ei syntynyt kylvetysimmunisoinnilla (Makesh ym. 2015). Grabowski ym. (2004) saivat niin ikään Niilin tilapialle aikaan kohonneen columnare-vasta-ainevasteen sekä iholimassa että plasmassa IP-immunisoinnilla. IP-immunisoinnilla on saatu aikaan iholiman ja plasman vasta-ainevaste myös *F. psychrophilum* -bakteerille käytettäessä formaliinilla tuhottuja *F. psychrophilum* -soluja (LaFrentz ym. 2002) ja plasman vasta-ainevaste sekä *F. psychrophilum* -infektioille tehostunut suojavaikutus käytettäessä heikennettyjä *F. psychrophilum* -soluja immunogeeninä (LaFrentz ym. 2008). Lisäksi ruokintaimmunisoinnilla on saatu aikaan ajulla (*Plecoglossus altivelis*) suojavaikutus *F. psychrophilum* -infektiossa, kun immunogeeninä on käytetty formaliinilla tuhottuja bakteerisoluja (Kondo ym. 2003). IMMUCOL-projektin kokeessa IMM V käytettiin IP-immunisoinnissa immunogeeniannosta  $1,0 \times 10^8$  CFU/ml, joka oli kahdesta kahdeksaan kertaa alhaisempi kuin tutkimuksissa LaFrentz ym. (2002), Grabowski ym. (2004) ja Leal ym. (2010), mutta lähes 100 kertaa korkeampi kuin tutkimuksessa LaFrentz ym. (2008). Ruokintaimmunisointiannos kokeessa IMM V oli  $2,0 \times 10^5$  CFU/ml/päivä, mikä on sama annos kuin kirjolohen rokotetutkimuksessa Raida ym. (2011) *Yersinia ruckeri* -bakteerin aiheuttamia infektioita vastaan. Tutkimuksessa kirjolohet saivat ensin kylvetysrokotuksen (annos  $5,0 \times 10^8$  CFU/ml ja aika 5 min) kaupallisella AquavaVac™ ERM vet -rokotteella ja tehosteena kaupallisen ruokintarokotteen AquavaVac™ ERM Oral vet. Tällä käsittelyllä saatiin aikaan suojavaste *Y. ruckeri* -infektiossa, mutta ei vasta-ainevasteen kohoamista. Suojavasteen lisäksi plasman vasta-ainevaste saatiin aikaan, kun sekä ensimmäinen että tehosteimmunisointi tehtiin kylvetysmenetelmällä. Kokeessa IMM V kaloja ruokittiin immuunirehulla koko kokeen ajan ja ensimmäinen immunisointi ja tehoste annettiin kylvetyksenä (Taulukko 1), jossa annos ja aika olivat samat kuin tutkimuksessa Raida ym. (2011).

*Kokeet KVL 2012–2014.* Kalanviljelylaitoksen kokeissa KVL 2012 ja 2013 kylvetysimmunisoinnilla ei saatu aikaan *F. columnare* -spesifiä vasta-ainevasteen nousua immunisoitujen kalojen iholimassa tai plasmassa verrattuna varjoimmunisoitujen kalojen vasta-ainevasteeseen. Kokeessa KVL 2014 immunisoitujen kalojen plasman vasta-ainevaste oli heikosti kohonnut verrattuna varjoimmunisoitujen kalojen vasteeseen, mutta tilastollisen käsittelyn puuttumisen vuoksi ei voida sanoa oliko tämä kohoaminen merkitsevää. Joka tapauksessa myös



varjokylvetysimmunisoitujen kalojen vasta-ainevaste oli huomattavasti kohonnut näytteissä, jotka otettiin taudinpurkauksen jälkeen. Tämä johtunee joko kalojen yleisen immuunipuolustuksen tason kohoamisesta koon kasvaessa tai taudinpurkauksen immunitettä tehostavasta vaikutuksesta infektiosta selvinneillä kaloilla. Kokeissa KVL 2012 ja KVL 2013 immunogeeniannos oli alhainen ( $6,5 \times 10^6 - 1,0 \times 10^8$  CFU/ml) ja/tai immunogeenille altistus aika lyhyt (yhdestä viiteentoista minuuttia), mikä voi osaltaan selittää vasta-ainevasteen puuttumisen. Toisaalta laboratoriokokeessa IMM VI immunisoiduille 0,45 g kaloille saatiin aikaan heikko vasta-ainevaste immunogeenistä riippuen joko varjoimmunisoituihin tai kontrollikaloihin verrattuna (ks. alla) samalla immunisointimenetelmällä kuin mitä käytettiin kokeessa KVL 2014 2,3 g kaloille. Kalanviljelylaitoksen kokeissa saatiin kuitenkin viitteitä immunisoinnin suojavaikutuksesta. Kokeessa KVL 2013 ja KVL 2014 varjoimmunisoitujen kalojen kokonaiskuolleisuus taudinpurkausaikana oli immunisoitujen kalojen kuolleisuutta korkeampi (tilastollisesti merkitsevä tulos). Lisäksi se, että kokeessa KVL 2012 immunisoitujen kalojen varjoimmunisoituja korkeampi kuolleisuus ei ollut tilastollisesti merkitsevä, johtui yhden immunisointikäsittelyn saaneen altaan kalojen kaikkien varjoimmunisoitukäsittelyn saaneiden altaiden kalojen kuolleisuutta korkeammasta kuolleisuudesta. Tämä viittaisi siihen, että kylvetysimmunisointi on tehostanut kalojen immuunipuolustusta, mutta se ei ole määritettävissä, lukuun ottamatta kokeessa KVL 2014 havaittua erittäin vähäistä vasta-ainevasteen nousua, tässä tutkimuksessa käytetyllä vasta-ainemääritys- eli ELISA-menetelmällä. On mahdollista, että pienten kalojen luonnollinen immuunivaste (ks. ”Hankeen tausta”) on tehostunut ja edesauttanut kalojen selviämistä columnaris-taudinpurkauksista. Tämän immuunipuolustuslinjan vasteita emme kuitenkaan mitanneet tässä tutkimuksessa, sillä viimeisimmät tuloksemme puhuvat niiden tehottomuuden puolesta *F. columnare* -infektioissa (Kunttu ym. 2009b), ja tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää vasta-ainevälitteisen immuunipuolustuslinjan tehostamismahdollisuutta columnaris-tautia vastaan. Toisaalta kokeiden KVL 2012 ja 2014 yhteydessä ilmenneet loisinfektiot ovat voineet heikentää kalojen yleiskuntoa ja vasta-ainevasteen tehostumista kylvetysimmunisoituilla kaloilla (ks. yllä). Koska kokeessa KVL 2013 ei kuitenkaan havaittu loisinfektioita, on myös mahdollista, että eritoten pintavettä käytävillä kalanviljelylaitoksilla luonnostaan vähäisessä määrin läsnä olevien, veden mukana laitoksille tulevien kalojen elimistölle vieraiden tekijöiden (esim. loiset ja bakteerit, jotka eivät aiheuta infektiota) aikaansaama yleisen immuunipuolustuksen tehostuminen on ”peittänyt alleen” kylvetysimmunisoinnilla aikaansaadun, laboratoriokokeissa IMM V–VII havaitun suuruisen vähäisen vasta-ainevasteen kohoamisen. Kalojen yleisen vasta-ainetason kohoamisen olikin havaittavissa kokeessa KVL 2014 taudinpurkauksen jälkeen otetuista näytteistä. Kylvetysimmunisoinnin suojavaikutus KVL-kokeissa ei kuitenkaan ollut riittävä, sillä joka kokeessa myös immunisoituja kaloja sairastui columnaris-tautiin. Tämä oli havaittavissa myös yllä mainituissa tutkimuksissa Shoemaker ym 2007 ja 2011 sekä Bebak ym. 2009, mikä osoittaa pienten kalojen immunisaation columnaris-tautia vastaan oleva haasteellista. Kokeissa KVL 2013 ja KVL 2014 kalat jouduttiin lääkitsemään antibiooteilla taudinpurkausten yhteydessä, sillä näissä tapauksissa columnaris-taudinpurkausten etenemistä ei voitu seurata kahta (KVL 2013) tai viittä (KVL 2014) päivää pidempään eettisistä syistä. Riittävä tieto immunisoinnin toimivuudesta kalanviljely-ympäristössä kuitenkin saatiin, ja voitiin todeta, että vaikka viitteitä kylvetysimmunisoinnin antamasta suojavaikutuksesta columnaris-infektioissa oli havaittavissa, ei kalanviljelijöitä hyödyttävään tulokseen päästy.

*Kokeet IMM I–VII.* Laboratoriokokeissa IMM I–IV kylvetysimmunisoinnilla ei saatu aikaan *F. columnare* -spesifiä vasta-ainevasteen nousua immunisoitujen kalojen iholimassa tai plasmassa verrattuna varjoimmunisoitujen kalojen vasta-ainevasteeseen. Tämä voi selittyä kyseisissä kokeissa käytetyllä alhaisella immunogeeniannoksella ( $1,0 \times 10^6 - 8,17 \times 10^6$  CFU/ml) ja/tai lyhyellä immunogeenille altistusajalla (yksi minuutti kokeissa IMM I–III). Vaikka kokeessa IMM IV altistus aika oli pitkä (kaksi tuntia) ja kalat suuria (19,26 g), ei vasta-ainevasteen nousua kaloilla havaittu, mikä johtunee yksinomaan liian alhaisesta immunogeeniannoksesta ( $1,0 \times 10^6$  CFU/ml). Tässä kokeessa ei myöskään saatu aikaan suojavaikutusta kokeellisessa *F. columnare* -infektiossa. Kokeissa IMM I–III kylvetysimmunisoitujen (IMM I) tai kylvetysimmunisointi + -tehoste -

käsittelyn (IMM II ja III) saaneiden kalojen kuolleisuus puolestaan oli tilastollisesti merkitsevästi korkeampi kuin varjokäsittelyn saaneiden kalojen. Koska Survival analysis -tilastoanalyysi ottaa huomioon myös infektion etenemisen, vaikutti myös etenemisnopeus kokeissa kuolleisuuserojen merkitsevyyteen käsittelyjen väillä. Immunisoitujen kalojen korkeampi/nopeampi kuolleisuus johtuu todennäköisesti immunisointikäsittelyn aiheuttamasta stressistä. Vaikka vasta-ainevastetta ei saatu aikaan kyseisten kokeiden kaloille, on mahdollista, että immunisointikäsittelyt ovat kuitenkin vaikuttaneet kalojen puolustusjärjestelmää tehostavasti jollain tasolla, mutta ei riittävästi. Kalat ovat käyttäneet resurssejaan immuunipuolustuksen tehostamiseen, mikä on heikentänyt pienten kalojen yleiskuntoa siinä määrin, että heikosti tehostunut immuunipuolustus ei ollut riittävän tehokas suojaamaan kaloja columnaris-infektiolta. Aikaisempien immunostimulaatiokokeittemme tulokset tukevat tätä päätelmää (Kunttu ym. 2009b). Kokeen IMM IV kalat olivat isoja, mikä voi selittää sen, ettei niiden kuolleisuus ollut kohonnut verrattuna varjoimmunisoituihin kaloihin. Kokeiden IMM I ja II perusteella ei voitu sanoa onko tehosteimmunisointi tarpeellinen, tarpeeton vai kenties haitallinen kylvetysimmunisoinnin suojavaikutuksen kannalta. Myös muiden tutkimusten perusteella on vaikea arvioida tehosteen tarpeellisuutta, sillä joissakin kylvetysimmunisointitutkimuksissa tehostetta käytettäessä on saatu aikaan vasta-ainevaste tai sekä vasta-ainevaste että suojavaikutus *F. columnare* tai *F. psychrophilum* -infektioita vastaan (Shoemaker ym. 2007, LaFrentz ym. 2008), mutta joissakin sitä vastoin ei (LaFrentz ym. 2002, Grabowski ym. 2004). Toisaalta, myös ilman tehostetta on joko saatu (Lorenzen ym. 2010, Mohammed 2013) tai ei saatu (Leal ym. 2010, Makesh 2015) aikaan vasta-ainevaste tai vasta-ainevaste ja suojavaikutus. Kokeita IMM I ja II seuraavissa kokeissa (KVL 2012–2014 ja IMM III–VII) päädyttiinkin tekemään kaikille immunisoiduille kaloille myös tehosteimmunisointikäsittely mahdollisimman korkean vasta-ainevasteen aikaansaamiseksi. Kokeessa IMM V saatiin voimakas vasta-ainevaste immunogeenin toimivuuden kontrollikäsittelynä olleille IP-immunisoiduille kaloille, mikä osoitti sulattamalla ja pakastamalla tuhotun bakteerin olevan käyttökelpoinen immunogeeni kylvetysimmunisointimenetelmän kehitystä varten. Kylvetysimmunisoitujen sekä kylvetys- ja ruokintaimmunisoitujen kalojen vasta-ainevaste oli hieman, tosin tilastollisesti merkitsevästi, kohonnut verrattuna ruokinta- sekä varjokylvetys- ja varjoruokintaimmunisointi -käsittelyn saaneisiin kaloihin. Tämä taso vastasi varjo-IP-immunisoidujen kalojen vasta-ainevastetta, mikä osoittaa, että pelkällä adjuvantilla tehty IP-immunisointi nostaa kalojen yleistä vasta-ainetasoa lähes saman verran kuin spesifillä immunogeenillä tehty kylvetysimmunisointi. Kokeessa havaittu heikko vasta-ainevasteen nousu tehosti sekä kylvetysimmunisoinnin että IP- ja varjo-IP-immunisoinnin saaneiden kalojen vastustuskykyä kokeellista columnaris-infektiota vastaan. Kylvetysimmunisoitujen kalojen kuolleisuus kuitenkin oli alhaisin ja erosi tilastollisesti niin IP- kuin varjo-IP-immunisoinnin saaneitten kalojen kuolleisuudesta. Ruokinta- sekä kylvetys- ja ruokintaimmunisoitujen kalojen kuolleisuudet eivät eronneet varjokylvetyskäsittelyn saaneiden kalojen kuolleisuudesta, joskin kylvetys- ja ruokintaimmunisoitujen kalojen kuolleisuus oli korkein ja erosi tilastollisesti merkitsevästi kylvetysimmunisoitujen kalojen kuolleisuudesta. Kylvetys- ja ruokintaimmunisoitujen kalojen vasta-ainevaste oli kuitenkin seuraavaksi korkein IP-immunisoidujen kalojen vasteen jälkeen vaikka se ei eronnutkaan tilastollisesti kylvetysimmunisoitujen kalojen vasta-ainevasteesta. Vaikka IP-immunisoidujen kalojen vasta-ainevaste oli huomattavasti korkeampi kuin kylvetysimmunisoitujen kalojen, oli niiden kuolleisuus kuitenkin tilastollisesti merkitsevästi kylvetysimmunisoitujen kalojen kuolleisuutta korkeampi, joskin alhaisempi kuin varjokylvetysimmunisoitujen kalojen. Toisaalta, IP-immunisoidujen kalojen kuolleisuus ei poikennut varjo-IP-immunisoidujen kalojen kuolleisuudesta, joiden vasta-ainepitoisuus oli siis samaa luokkaa kuin kylvetysimmunisoitujen vasta-ainepitoisuus. On kuitenkin huomattava, että myös varjo-IP-immunisoidujen kalojen kuolleisuus merkitsevästi korkeampi kuin kylvetysimmunisoitujen kalojen. Tämä voi kertoa *F. columnare*-spesifin vasta-ainevasteen tärkeydestä columnarsi-taudin immunitetissa. Tulokset ovat samansuuntaisia kuin kokeiden IMM I–III tulokset ja voivat niin ikään tarkoittaa, että immuunipuolustuksen tehostuminen pikemminkin heikentää kuin lisää pienten kalojen vastustuskykyä. Tämän päätelmän valossa on kuitenkin vaikea

arvioida miksi samassa kokeessa kylvetyssimmunisoitujen kalojen vastustuskyky oli tehostunut. Yksi mahdollisuus voisi olla se, että kylvetyssimmunisoinnin aikaansaama vasta-ainetuotanto oli riittävän korkea tehostamaan kalojen suojavaistetta kokeellisessa infektiossa, mutta liian alhainen kuluttamaan kalojen resursseja liikaa ja näin ollen stressaamaan niitä. Kokeissa IMM VI ja VII havaittiin vähäinen, mutta tilastollisesti merkitsevä vasta-ainevasteen nousu sekä normaalissa (IMM VII) että rautaköyhässä (IMM VI ja VII) kasvatusliuoksessa tuotetuilla immunogeenillä kylvetyssimmunisoituilla kaloilla. Kokeissa IMM VI *Chilodonella*-infektio saattoi vaikuttaa kalojen immuunipuolustuksen tehostumista hidastavasti samoista syistä kuin kokeiden KVL 2012 ja 2014 tapauksessa. IMM VI -kokeessa vasta-ainevaste saatiin kuitenkin aikaan kaloille, joille ensimmäinen immunisointi tehtiin 0,45 g painoisina. Lisäksi kokeellisessa infektiossa saatiin aikaan suojavaikutus, mitä ei saatu aikaan isommilla kaloilla kokeessa IMM VII huolimatta vasta-ainevasteen tehostumisesta. Tämän perusteella voi päätellä, että *Chilodonella*-infektio vaikutus kylvetyssimmunisoinnin tehoon oli vähäistä. Vain kokeessa IMM VI oli kuolleisuudessa tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyjen välillä kokeellisessa infektiossa, jossa normaalissa kasvatusliuoksessa tuotetulla immunogeenillä immunisoiduilla kaloilla kuolleisuus eteni hitaimmin, seuraavaksi nopeimmin rautaköyhässä kasvatusliuoksessa tuotetulla immunogeenillä immunisoiduilla ja nopeimmin varjoimmunisoinnin saaneilla kaloilla. Kokeessa IMM VII kuolleisuuden etenemisessä ei ollut eroja käsittelyjen välillä. Sekä kokeessa IMM VI että VII kokonaiskuolleisuus oli 100 % kaikissa infektion saaneissa käsittelyissä. Vähäiset erot käsittelyjen välillä tai erojen puuttuminen kuolleisuudessa johtunee liian alhaisesta vasta-ainevasteesta. Se, että kokeiden IMM VI ja VII kuolleisuustulokset poikkeavat toisistaan, voi selittyä samalla asialla. Laboratoriossa käytettävä infektiannon on oltava suuri ja infektiolämpötila korkea, jotta kokeellinen infektio saadaan aikaan. Tämän vuoksi alhainen vasta-ainevaste ei välttämättä suojaa kaloja kokeelliselta infektiolta. Kokeissa IMM VI ja VII eri immunogeenillä immunisoitujen kalojen vasta-ainevasteiden välillä ei ollut eroja. Vähäiset erot tai erojen puuttuminen normaalissa ja rautaköyhässä kasvatusalustassa tuotetulla immunogeenillä immunisoitujen kalojen vasta-ainevasteessa ja kuolleisuudessa voivat johtua siitä, että eroja OMP-koostumuksissa ei ollut riittävästi – OMP:ien SDS-PAGE-ajon perusteella ei lainkaan (ks. Tulosten tarkastelu: ”Immunogeeni: valmistustapa”).

*OMP-eristys ja SDS-PAGE.* Testattaessa *F. columnare* -tyyppikannan ATCC 23463 ja kannan B541 OMP-eroja kasvatettuina normaalissa ja eri rautakelaattoripitoisuuksia sisältävissä Shieh- ja FCGM-liuoksissa havaittiin, että tyyppikanta ei kasva liuoksissa juuri lainkaan ja B541 kasvaa liian heikosti 75 ja 100  $\mu\text{M}$  2,2'-bipyridyyliä sisältävissä Shieh- ja 50, 75 ja 100  $\mu\text{M}$  2,2'-bipyridyyliä sisältävissä FCGM-liuoksissa. Rauta on bakteereille tärkeä kasvutekijä, minkä vuoksi vähärautainen kasvatusalusta todennäköisesti rajoitti *F. columnare* -kannan B541 kasvua. Tyyppikannan heikko kasvu johtui todennäköisesti kannan heikkoudesta pitkän laboratoriossa säilytyksen seurauksena, kuten yllä jo todettiin. Normaleissa Shieh- ja FCGM-liuoksissa kasvatettujen *F. columnare* -bakteerien OMP-eristyksissä havaittiin kuitenkin eroja. Erot voivat johtua siitä, että FCGM on jo itsessään *F. columnare* -bakteerille rautaköyhä kasvatusalusta (Guan ym. 2013), jolloin on mahdollista, että bakteeri tuottaa ravinnonottoon tarvittavia OMP:eja eri tavoin Shieh- ja FCGM-kasvatusalustoissa. Tämä on tärkeä löytö ja antaa pohjaa mahdollisille jatkotutkimuksille tulevaisuudessa. Koska *F. columnare* kasvoi heikommin FCGM- kuin Shieh-kasvatusliuoksessa, ei FCGM-liuosta käytetty IMMUCOL-projektin aikana immunogeenien valmistukseen eikä *F. columnare* -bakteerin kasvua FCGM-kasvatusliuoksessa täten ehditty optimoida ja FCGM-liuoksessa tuotetun immunogeenin tehoa testata kylvetyssimmunisoitukokeissa. Havaittu ero sonikoitujen ja sonikoimattomien bakteerien välillä perustuu vain yhteen näytepariin, joiden proteiinipitoisuus oli erittäin alhainen eivätkä näytteet näkyneen selkeästi SDS-PAGE-ajossa. Tämän vuoksi tuloksen luotettavuudesta ei ole varmuutta. Sonikointi ei kuitenkaan vaikuta OMP:ien eli immunogeenisten komponenttien läsnäoloon bakteerisolussa vaan ainoastaan siihen kuinka bakteerisoluhajoaa ja täten siihen kuinka OMP:t saadaan analyyseissä näkyville. Ylimääräisen OMP-fragmentin näkyminen ei siis välttämättä kerro sonikoimalla ja pakastamalla hajotettujen bakteerien immunogeenikoostumuksen eroista.

*Yhteenvedo tuloksista ja niiden arviointi.* IMMUCOL-projektin laboratoriotuloksissa saatiin kaloilla aikaan vasta-ainevasteen heikko kohoaminen immunisoidessa kalat kylvettämällä pakastamalla tuhotulla *F. columnare* -bakteerilla, kun immunogeenin annos oli suuri ( $5,0 \times 10^8$  CFU/ml) ja immunogeenille altistus aika 5 minuuttia tai enemmän. Sillä, oliko immunogeeni tuotettu normaalissa vai vähärautaisessa kasvatusalustassa, ei ollut selkeää vaikutusta vasta-aine- tai suojavasteeseen. Kohonnut vasta-aine ei kuitenkaan antanut riittävää suojaa kokeellista columnaris-infektiota vastaan. Kalanviljelylaitoksen kokeissa vasta-ainevastetta ei havaittu kaloilla, mutta kylvetyksimmunisoitujen kalojen kuolleisuus oli varjoimmunisoitujen kalojen kuolleisuutta alhaisempi. Kuolleisuus oli kuitenkin suurta myös immunisoiduilla kaloilla ja kaloja jouduttiin lääkitsemään antibiooteilla, joiden käytön pois jättämiseen columnaris-infektioiden yhteydessä menetelmän kehityksellä pyrittiin. Heikko immuunipuolustuksen tehostuminen voi johtua tuhotun immunogeenin käyttämisestä. Monissa *F. columnare* ja *F. psychrophilum* -bakteereilla tehdyissä immunisointi-/rokotetutkimuksissa on käytetty heikennettyä elävää bakteerikantaa immunogeenina (kuten Shoemaker ym. 2007, LaFrenz ym. 2008, Shoemaker 2011, Long ym. 2013, Mohammed ym. 2013, Makesh 2015). Toisin kuin tuhottu bakteeri tai sen osat, heikennetty bakteeri jää rokotereitistä riippuen elämään kalan pintaan tai sisään, jolloin sen immuunipuolustusta tehostava vaikutus säilyy paljon kauemmin kuin tuhotun bakteerin, joka kylvetyksimmunisoinnin tapauksessa huuhtoutuu nopeasti pois kalan pinnalta. Heikennetyissä bakteereissa on myös todennäköisesti tallella suurin osa immunogeenisistä komponenteista, jotka voivat tuhoutua tai muuttaa muotoaan bakteeria tuhottaessa. Elävää bakteeria ei kuitenkaan voitu käyttää immunogeenin valmistamiseen IMMUCOL-projektissa, sillä se on riskialtis taudin mahdollisen leviämisen kannalta kalanviljelyolosuhteissa. Toinen selitys kokeissamme havaitulle kylvetyksimmunisoinnin heikolle teholla voi olla pieni kalakoko, jossa immunisointi tulee columnaris-tautia vastaan tehdä. Vastakuoriutuneiden poikasten immuunipuolustus on vielä varsin kehittymätön ja perustuu pääasiassa primääriin, vasta-aineista riippumattomaan puolustusjärjestelmään. Sen toiminta on niin tehokas kuin sekundaarisen, vasta-aineisiin perustuvan puolustusjärjestelmän, joka alkaa toimia vähitellen vastaa kalan koon kasvaessa kalalajista riippuen viikkojen tai kuukausien päästä kuoriutumisesta. Vasta-aineiden tuotto on heikkoa pienillä kaloilla, minkä vuoksi immunisoinnilla ei välttämättä saada aikaan riittävän tehokasta vasta-ainevastetta taudinaiheuttajia vastaan. On myös mahdollista, että käyttämämme Shieh-kasvatusalusta immunogeenintuottoliuksena ei ollut optimaalinen. FCGM-liuoksessa tuotettu immunogeeni olisi saattanut aikaansaada kaloille voimakkaamman immuuni- ja suojavasteen, mutta tämän testaaminen vaatii tutkimuksia tulevaisuudessa.

#### **4. Johtopäätökset ja hankkeen vaikuttavuus**

IMMUCOL-projektissa ei saatu kehitettyä kalanviljely-ympäristössä toimivaa kylvetyksimmunisointimenetelmää, joka olisi käytettävissä välittömästi ja rutiininomaisesti ja joka mahdollistaisi antibioottien käytön vähentämisen columnaris-taudin hoidossa. Sekä kalanviljelylaitoksella että laboratoriossa suoritettujen kokeiden antoivat kuitenkin viitteitä kylvetyksimmunisoinnin toimivuudesta, mikäli menetelmää pystytään tulevaisuudessa optimoimaan riittävästi. Tulokset ovat siis lupaavia ja antavat erinomaisen pohjan tulevaisuuden jatkotutkimuksille immunisointimenetelmän jatkokehitystä varten columnaris-tautia vastaan. Erityisen tärkeää olisi selvittää immunogeenin tuottotavan vaikutusta immunogeenin laatuun ja tehoon, sillä tämän hankkeen aikana ei saatu riittävää selvyyttä normaalin ja vähärautaisen kasvatusalustan eroista ja vähärautaisen kasvatusalustan vaikutuksista immunogeenin toimivuuteen. Lisäksi tulisi selvittää FCGM-kasvatusliuoksen soveltuvuus tehokkaamman immunogeenin tuottoliuksena.

#### **5. Hankkeen tuloksista tiedottaminen**

Hankkeen tuloksista on tiedotettu kahdessa kansainvälisessä kokouksessa, joissa Heidi Kuntulla oli posterisitelmä: (Zebra)Fish Immunology Workshop 22.–25.4.2013, Wageningen, Hollanti, ja

EAFP:n (European Association of Fish Pathologists) 16. kansainvälinen konferenssi (16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish) 2.–6.9.2013, Tampere. Eviran kutsumana Kunttu on myös pitänyt suullisen esitelmän Eviran ja Suomen kalankasvattajaliitto ry:n järjestämällä Kalaterveyspäivillä 14.3.2013 Jyväskylässä ja 26.3.2015 Tampereella. Lisäksi Kunttu on tiedottanut tuloksista EAFP:n Suomen osaston ja Suomen Kalatautitutkijat ry:n kokouksissa 30.1.2014 Evirassa, Helsingissä, ja 11.3.2015 Evirassa, Kuopiossa. lisäksi Jounin Taskisen on tarkoitus pitää posteriesitelmä projektin tuloksista neljännessä kansainvälisessä *Flavobacterium*-konferenssissa, joka järjestetään Auburnissa, Alabamassa (USA) 27.–29.10.2015. IMMUCOL-hankkeesta on myös kirjoitettu (Mika Remes) Kalankasvattaja-lehden numeroissa 2/2013 ja 2/2015 Kalaterveyspäivien artikkelien yhteydessä.

## 6. Kiitokset

Haluamme kiittää Keski-Suomen ELY-keskusta projektin rahoituksesta ja Suomen kalankasvattajaliitto ry:tä sekä Voimalohi Oy:tä rauhoituksen myöntämisen suosittelusta. Kiitämme myös dosentti Lotta-Riina Sundbergia Jyväskylän yliopistosta yhteistyöstä projektin aikana. Suuri kiitoksemme kuuluu Hanka-Taimen Oy:lle, joka osallistui projektin toteuttamiseen suunnittelu-, materiaali- ja työpanostuksella. Projektin aikaisesta tuesta ja ohjauksesta kiitämme projektin seurantaryhmän jäseniä: Mari Nykänen, Keski-Suomen ELY-keskus; Yrjö Lankinen, Savon Taimen Oy; Pia Vennerström, Evira; Risto Kannel, Luke. Lopuksi haluamme kiittää niitä henkilöitä Jyväskylän yliopistosta, jotka ovat avustaneet projektin käytännön toteutuksessa: dosentti Katja Pulkkinen, FT Nina Pekkala, FM Sari Aaltonen, FM Marjo Aaltonen, LuK Liisa Alaoutinen, LuK Johanna Kantanen, laboratoriomestari Nina Honkanen ja harjoittelija Hanna Suonia.

## 7. Kirjallisuus

- Bader JA, Klesius PH & Vinitnantharat S (1997). Comparison of whole-cell antigens of pressure- and formalin-killed *Flexibacter columnaris* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Am J Vet Res* 58: 985-988.
- Bandilla M, Valtonen ET, Suomalainen L, Aphalo PJ & Hakalahti Teija (2006). A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *Int J Parasitol* 36: 987-991.
- Bebak J, Matthews M & Shoemaker C (2009). Survival of vaccinated, feed-trained largemouth bass fry (*Micropterus salmoides floridanus*) during natural exposure to *Flavobacterium columnare*. *Vaccine* 27: 4297-4301.
- Becker CD & Fujihara MP (1978). The bacterial pathogen *Flexibacter columnaris* and its epizootiology among Columbia River fish. American Fisheries Society Monograph No. 2: 1-92
- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bravo S & Midtlyng PJ (2007). The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 270: 36-42.
- Brudeseth BE, Wiulsrød R, Fredriksen BN, Lindmo K, Løkling K-E, Bordevik M, Steine N, Klevan A & Gravningen K (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol* 35: 1759-1768.
- Chettri JK, Jaafar RM, Skov J & Kania PW (2015). Booster immersion vaccination using diluted *Yersinia ruckeri* bacterin confers protection against ERM in rainbow trout. *Aquaculture* 440: 1-5.
- Chettri JK, Jaafar RM, Skov J, Kania PW, Daalsgaard I & Buchmann K (2015). Booster immersion vaccination using diluted *Yersinia ruckeri* bacterin confers protection against ERM in rainbow trout. *Aquaculture* 440: 1-5.

- Chettri, JK, Raida MK, Kania PW & Buchmann K (2012). Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Dev Comp Immunol* 36: 463-474.
- Dumetz F, Duchaud E, LaPatra SE, Marrec CL, Claverol S, Urdaci M-C & Le Hénaff M (2006). A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 72: 4845-4852.
- Dumetz F, LaPatra SE, Duchaud E, Claverol S & Le Hénaff M (2007). The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *J Appl Microbiol* 103: 1461-1470.
- Durbin M, McIntosh D, Smith PD, Wardle R & Austin B (1999). Immunization against furunculosis in rainbow trout with outer membrane protein vaccines relative efficacy of immersion, oral and injection delivery. *J Aquat Anim Health* 11: 68-75.
- Eskelinen U (2009). Kalaterveys 2008 – Strategian toimeenpanon arviointi. 19 p., Riistan- ja kalantutkimus. <http://www.rktl.fi/julkaisut/j/458.html>.
- Farmer B (2004). Improved methods for the isolation and characterization of *Flavobacterium columnare*. Master's thesis, Louisiana State University, Baton Rouge LA, USA
- Fujihara MP & Nakatani RE (1971). Antibody production and immune responses of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. *J Fish Res B Can* 28: 1253-1258.
- Grabowski LD, LaPatra SE & Cain KD (2004). Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *J Fish Dis* 27: 573-581.
- Guan L, Santander J, Mellata M, Zhang Y & Curtiss R 3<sup>rd</sup> (2013). Identification of iron acquisition machinery in *Flavobacterium columnare*. *Dis Aquat Org* 106: 129-138.
- Hirst ID & Ellis AE (1994) Iron regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol* 4: 29-45.
- Högfors E, Pullinen K-R, Madetoja J & Wiklund T (2008). Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 31: 899-911.
- Högfors-Rönholm E & Wilund T (2010). Phase variation in *Flavobacterium psychrophilum*: characterization of two distinct colony types. *Dis Aquat Org* 90: 43-53.
- Iwama & Nakanish (ed.) (1996). The fish immune system: organism, pathogen and environment. Academic Press, San Diego, USA.
- Kondo M, Kawai K, Okabe M, Nakano N & Oshima S (2003) Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Org* 55: 261-264.
- Kunttu (2010). Characterizing bacterial fish pathogen *Flavobacterium columnare*, and some factors affecting its pathogenicity. Väitöskirja. Marjomäki & Olsbo (ed.), Jyväskylän Yliopistopaino, Jyväskylä.
- Kunttu HMT, Sundberg L-R & Valtonen ET (2012). Natural waters are the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. *Environ Microbiol Rep* 4: 398-402.
- Kunttu HMT, Suomalainen L-R, Jokinen EI & Valtonen ET (2009c). *Flavobacterium columnare* colony types: Connection to adhesion and virulence? *Microb Pathog* 46: 21-27.
- Kunttu HMT, Valtonen ET, Jokinen EI & Suomalainen L-R (2009a). Saprophytism of a fish pathogen as a transmission strategy. *Epidemics* 1: 96-100.
- Kunttu HMT, Valtonen ET, Suomalainen LR, Vielma J & Jokinen EI (2009b). The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 26: 850-857.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Call DR & Cain KD (2008). Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* 26: 5582-5589.

- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR & Cain KD (2004). Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis Aquat Org* 59: 17-26.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR, Congleton JL, Sun B & Cain KD (2002). Characterization of serum and mucosal antibody response and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 25: 703-713.
- Leal CAG, Carvalho-Castro GA, Sacchetin PSC, Lopes CO, Moraes AM & Figueiredo HCP (2010). Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and in vivo efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult Int* 18: 657-666.
- Lillehaug A (2014). Vaccination strategies and procedures. Kirjassa: Gudding, Lillehaug & Evensen (editorit), Fish Vaccination. Wiley Blackwell, UK.
- Liu XZ, Liu GY, Li N, Xiao FS, Xie HX & Nie P (2012). Identification of immunogenic proteins of *Flavobacterium columnare* by two-dimensional electrophoresis immunoblotting with antibacterial sera from grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J Fish Dis* 35: 255-263.
- Liu GY, Nie P, Zhang J & Li N (2008). Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Flavobacterium columnare*. *J Fish Dis* 31: 269-276.
- Long A, Fehring TR, Swain MA, LaFrentz BR, Douglas RC & Cain KD (2013). Enhanced efficacy of an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* strain cultured in iron limited conditions. *Fish Shellfish Immunol* 35: 1477-1482.
- Lorenzen E, Brudeseth BE, Wiklund T & Lorenzen N (2010). Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge. *Fish Shellfish Immunol* 28: 440-444.
- Makesh M, Sudheesh PS & Cain KD (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish Shellfish Immunol* 44: 156-163.
- Martins ML, Shoemaker CA, Xu D & Klesius PH (2011). Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. *Aquaculture* 314: 18-23.
- Mohammed H, Olivares-Fuster O, LaFrentz S & Arias CR (2013). New attenuated vaccine against columnaris disease in fish: choosing the right parental strain is critical for vaccine delivery. *Vaccine* 31: 5276-5280.
- Moore AA, Eimers ME & Cardella MA (1990). Attempts to control *Flexibacter columnaris* epizootics in pond-reared channel catfish by vaccination. *J Aquat Anim Health* 2: 109-111.
- Moore JD, Ototake M & Nakanishi T (1998). Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol* 8: 393-407.
- Olivares-Fuster O & Arias CR (2011). Development and characterization of rifampicin-resistant mutants from high virulent strains of *Flavobacterium columnare*. *J Fish Dis* 34: 385-394.
- Olivares-Fuster O, Terhune JS, Shoemaker CA & Arias CR (2010). Cloning, expression and immunogenicity of *Flavobacterium columnare* heat shock protein DnaJ. *J Aquat Anim Health* 22: 78-86.
- Plant KP, LaPatra SE & Cain KD (2009). Vaccination for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *J Fish Dis* 32: 521-534.
- Pulkkinen K, Suomalainen L-R, Read AF, Ebert D, Rintamäki P & Valtonen ET (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proc R Soc B* 277: 593-600.

- Rahman MH, Kuroda A, Dijkstra JM, Kiryu I, Nakanishi T & Ototake M (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunol* 12: 169-179.
- Raida MK & Buchmann K (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* 26: 1050-1062.
- Raida MK, Nylén J, Holten-Andersen L & Buchman K (2011). Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *PLoS One* 6: e18832.
- Ransom DP (1975). Immune responses of salmonids: A) Oral immunization against *Flexibacter columnaris*, B) Effects of combining antigens in parenterally administered polyvalent vaccines. Master's thesis, 58 p., Oregon state University.
- Shoemaker CA, Klesius, PH, Drennan JD & Evans JJ (2011). Efficacy of modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish Shellfish Immunol* 30: 304-308.
- Shoemaker CA, Klesius, PH & Evans JJ (2007). Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Vaccine* 25: 1126-1131.
- Song YL, Fryer JL ja Rohovec JS (1988). Comparison of six media for the cultivation of *Flexibacter columnaris*. *Fish Pathol* 23: 91-94.
- Su Z, Segura M & Stevenson MM (2006) Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infect Immun* 74: 2138-2144.
- Suomalainen L-R, Bandilla M & Valtonen ET (2009). Immunostimulants in prevention of columnaris disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Fish Dis* 32: 723-726.
- Suomalainen L-R, Kunttu H, Valtonen ET, Hirvelä-Koski V & Tirola M (2006a). Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland. *Dis Aquat Org* 70: 55-61.
- Suomalainen L-R, Reunanen H, Ijäs R, Valtonen ET & Tirola M (2006b). Freezing induces biased results in the molecular detection of *Flavobacterium columnare*. *Appl Environ Microbiol* 72: 1702-1704.
- Vennerström P (2014). Kalatautikatsaus ja lääkintäasioita. Kalaterveyspäivän 2014 luentokokonaisuus: 2-5, Evira; Erweko, Helsinki.
- Wang N, Zhao Y, Zhang M, Liu Y & Lu C (2013). Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese bream. *Fish Shellfish Immunol* 34: 74-81.
- Xiong X-P, Zhang B-W, Yang M-J, Ye M-Z, Peng X-X & Li H (2010). Identification of vaccine candidates from differentially expressed outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* in response to NaCl and iron limitation. *Fish Shellfish Immunol* 29: 810-816.
- Xu D-H, Shoemaker CA & LaFrentz BR (2014). Enhanced susceptibility of hybrid tilapia to *Flavobacterium columnare* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture* 430: 44-49.
- Zhang Y, Arias CR, Shoemaker CA & Klesius PH (2006). Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between *Flavobacterium columnare* strains from different genomovars. *J Fish Diseases* 29: 657-663.