
Felles sluttrapport for prosjektene:

*Immunoglobulin Y (IgY)-immunisering av laks mot
lakselus (901511)*

*Kontroll med luseinfeksjonen hos atlantisk laks med IgY-
baserte intervensjoner (901569)*

Forfattere av sluttrapport: Øystein Evensen og Per Olav Skjervold (NoriFish AS)

Prosjektleder: FKF (Hallgeir Sterten og Stine G. While)

FKF – Felleskjøpet Fôrutvikling AS

28. mars 2023

Finansiert av:



Innhold

1. Sammendrag (Norsk og engelsk)	3
2. Summary in English	3
3. Bakgrunn for prosjektet	4
4. Prosjektenes omfang og organisering	4
5. Problemstilling og formål.....	5
6. Prosjektgjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon	5
Arbeidspakke 1: Produksjon av IgY.....	5
Tillaging av antigener og karakterisering av disse	5
Opprensing av IgY	7
Arbeidspakke 2. Varighet av immunitet etter parenteral og peroral administrasjon	9
Arbeidspakke 3: Prime-boost immunisering med IgY	11
Arbeidspakke 4: Feltstudier for dokumentasjon av vaksinasjons-programmet	12
7. Oppsummering	13
8. Referanser.....	13

1. Sammendrag (norsk)

I disse prosjektene har vi produsert IgY i eggleggende høner som har blitt immunisert med lakselusantigener. IgY er isolert fra plomme, konsentrert og injisert intraperitonealt til laks i en slow-release formulering (oljebasert) eller gitt via fôret. Det er etablert en metode for tillaging av antigener av lakselus som benyttes for immunisering av eggleggende høner. Etter immunisering av hønene har IgY blitt rensset opp fra eggeplomme og benyttet for passive immunisering av laks mot lakselusinfestasjon.

Hos laks som har blitt immunisert med IgY, både via injeksjon og via fôret, har vi vist at lusetall etter eksperimentell laboratoriesmitte med kopepoditter gir et signifikant redusert påslag sammenlignet med ubehandla kontroller. Det er også vist effekt i feltforsøk hvor det ses en reduksjon i lusetallet inntil 8 måneder etter første administrasjon av IgY. Fisk som allerede er smittet med lus og som gis IgY via fôret, får også en reduksjon i lusetallet.

Videre er det vist at IgY tilført ved intraperitoneal injeksjon gjenfinnes i plasma hos fisken. Det er også påvist en sammenheng mellom nivå av sirkulerende IgY og grad av reduksjon av lusepåslag etter eksperimentell smitte, 70% reduksjon i de gruppene som har fått tilført mest IgY ved injeksjon. IgY gitt peroralt, som en overflate-coat på fôrpellet gir en reduksjon i lusepåslaget på 50 - 60%.

Samlet gir studiene indikasjoner for at dette kan være en måte å forebygge luseinfestasjon på.

2. Summary in English

In these projects, we have produced IgY in egg-laying hens that have been immunized with salmon louse antigens. IgY is isolated from yolk, concentrated and injected intraperitoneally into salmon in a slow-release formulation (oil-based) or given via feed. A method has been established for the preparation of salmon lice antigens that are used for immunization of egg-laying hens. After immunization of the hens, IgY has been purified from egg yolk and used for passive immunization of salmon against lice infestation.

In salmon that have been immunized with IgY, both via injection and via the feed, we have shown that the number of lice after experimental laboratory infection with copepodites results in a significantly reduced lice number compared to untreated controls. An effect has also been shown in field trials where a reduction in the number of lice is seen up to 8 months after the first administration of IgY. Fish that are already infected with lice and that are given IgY via the feed also experience a reduction in the number of lice.

Furthermore, it has been shown that IgY administered by intraperitoneal injection is found in the plasma of the fish. A correlation has also been demonstrated between the level of circulating IgY and the degree of reduction in lice infestation after experimental infection, a 70% reduction in the groups that have received the highest IgY by injection. IgY given orally, as a surface coat on the feed pellet, gives a reduction in the lice infestation of 50 - 60%.

Collectively, the studies give indications that this can be a way of preventing lice infestation.

3. Bakgrunn for prosjektet

Lakselusinfestasjon har tradisjonelt vært behandlet med legemidler (hovedsakelig bademidler) og de siste 6 årene har man sett en økende resistensutvikling mot de vanligst brukte legemidlene med etterfølgende nedgang i bruk. Dette har medført en økning i antall mekaniske avlusninger. Det er blitt påpekt at de strenge kravene om <0.5 kjønnsmodne hunnlus/fisk har ført til dagens resistensproblematikk p.g.a. intensiv/frekvent behandling. I dag brukes også mange metoder som rettes inn mot og forhindre at laks blir infisert (mekaniske barrierer) som luseskjørt, snorkelmerd, kombinasjoner av luseskjørt og bobling av luft inn i merda.

Gjennom lakselusas parasittiske livsstadier ser man en bifasisk betennelsesrespons/tidlig immunrespons. Først observeres en innledende pro-inflammatorisk respons som etterfølges av en nedregulering av inflammasjon gjennom chalimus stadiene [1, 2]. Ulike laksearter reagerer veldig ulikt mot *L. salmonis*, men generelt vil atlantisk laks nedregulere betennelsesresponsen [2] mens stillehavslaks reagerer med en kraftig betennelsesreaksjon.

Tidligere forsøk på å utvikle en vaksine mot lakselus har ikke gitt tilfredsstillende resultater. Det er vanskelig eller kanskje umulig å finne de antigenene som gir den beskyttende immunreaksjonen etter vaksinasjon og hvor sirkulerende antistoffer i laksens blod/serum tas opp i forbindelse med at lusa suger blod (blodmåltid), eventuelt skilles ut i slim på hud/gjeller. Vaksinene har vært rettet mot antigener som finnes i lusas tarm/fordøyelsesorganer og hvor opptak av blod og antistoffer vil påvirke/ødelegge tarmenzymenes funksjon og/eller føre til skade på tarmens celler hos lusa. Det har vært forsøkt å immunisere laks med antigener fra ekstrakter av hele lakselus, og det er påvist produksjon av antistoffer mot lusas antigener, men disse har ikke vært beskyttende ved smitte med adulte og pre-adult lakselus [3].

Felleskjøpet gjennom selskapet Norifish AS har de siste 6 årene jobbet med å utvikle en immuniseringsprotokoll basert på passiv immunisering med IgY. Det patenterte prinsippet som benyttes er immunisering av høner før egglegging med definerte mengder av lakselus-ekstrakter hvor antigenene er en sammensetning av ulike utviklingsstadier av lusa og i et definert mengdeforhold.

IgY leveres i en formulering for injeksjon for langsom frigivelse av IgY over tid etter injeksjon eller via fôr.

4. Prosjektens omfang og organisering

Prosjektet 901511 ble satt i gang 01.06.2018, og avsluttet 31.12.2019 og prosjekt 901569 ble satt i gang 01.05.2019 og avsluttet 31.03.22.

Prosjektene var organisert i arbeidspakker og funnene summeres nedenfor.

- Referansegruppen for prosjektene har vært:
 - Vidar Aamo Nikolaisen, Grieg Seafood
 - Henrik Duesund, Cermaq
 - Bjarne Reinert, Lerøy Seafood
- Prosjektgruppe
 - Rune Fylkesnes, Fylkesnes Fisk AS
 - Margareth Opheim, FKF

- Gorm Sanson, FKF
- Per Olav Skjervold, Norifish AS
- Franciska Steinhoff, FKF
- Øystein Evensen, NMBU

Fra FHF (observatører):

- Kjell Maroni og Sven Martin Jørgensen

5. Problemstilling og formål

Prosjektene hovedmål var å beskytte laks mot lakselus-infestasjon i hele produksjonssyklus ved en kombinasjon av primærimmunisering via intraperitoneal injeksjon før utsett i sjø og en oral boost-immunisering etter sjøsetting. Aktivitetene har omfattet:

- 1) Produsere IgY for å dokumentere forebyggende og «terapeutisk» effekt mot lakseluseinfestasjon
- 2) Teste ut oral levering av IgY som profylaktisk og «terapeutisk» prinsipp i tidlig stadium av infeksjonssyklus
- 3) Dokumentere varighet av effekt av injeksjon eller oral immunisering
- 4) Teste og dokumentere kombinasjonseffekter av injeksjon- og oral immunisering i kontrollert feltforsøk

Arbeidet i de to prosjektene har vært delt inn i arbeidspakker og funnene er samlet og presentert i fire ulike arbeidspakker under punktet *Prosjektgjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon*.

AP1: Produksjon av IgY

AP2. Varighet av immunitet etter peroral og parenteral administrasjon

AP3. Prime-boost immunisering med IgY i kontrollerte laboratorieforsøk

AP4. Feltstudier for dokumentasjon av immuniseringsprogrammet (prime-boost)

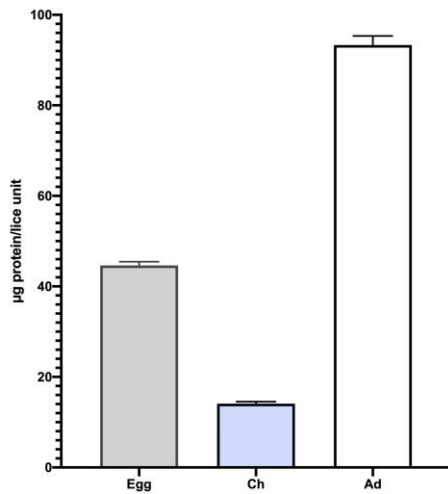
6. Prosjektgjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon

Arbeidspakke 1: Produksjon av IgY

Det er produsert IgY basert på immunisering av eggleggende høner hvor immunisering har vært gjennomført før selve eggleggingen startet. Det har vært arbeidet med en optimalisert og forenklet metode for isolering av standard mengde med luseantigener benyttet for immunisering av hønene, og lus har blitt samlet inn i forbindelse med mekanisk avlusing (ikke-kjemisk).

Tillaging av antigener og karakterisering av disse

Lus ble samlet inn under avlusing og i etterkant har de ulike stadiene blitt sortert som egg, chalimus og voksen lus, eller eggstrenger. Etter sortering i fire kategorier har disse blitt vasket i steril PBS, homogenisert og frysetørket. Proteinkonsentrasjonen i de ulike stadiene har blitt bestemt (Figur 1).



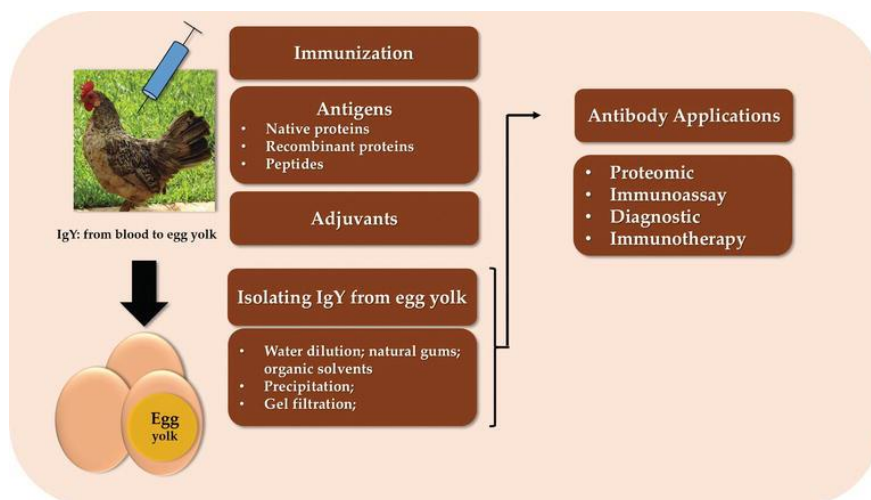
Figur 1. Microgram protein/luseenhet for egg, chalimus og voksne (ad)

Etter homogenisering og frysetørking har antigene blitt lagret inntil bruk. Frysetørkede luseantigener har et homogent utseende (Figur 2).



Figur 2. Frysetørka luseantigener

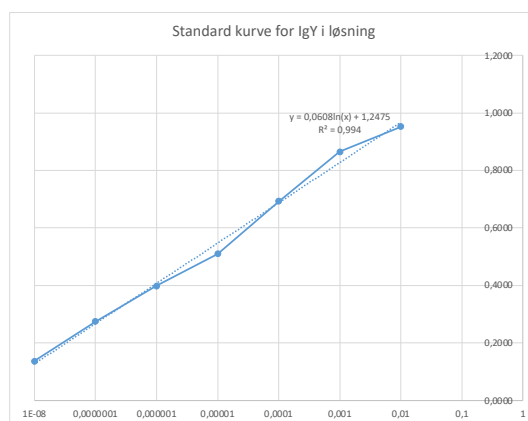
De ulike stadiene (frysetørket) har blitt veid inn og løst i sterilt vann før formulering i vann-i-olje emulsjon for immunisering av høner. Prosessen er enkelt skissert nedenfor (Figur 3).



Figur 3. Skjematisk metode for immunisering av høner

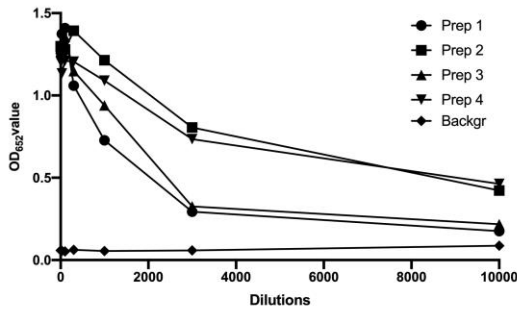
Opprensing av IgY

Opprensing av IgY fra eggeplomme har vært gjort ved standard metoder og det er også etablert en metode for å måle IgY-antigen i opprenset, oppløst IgY fra eggeplomme. Dette er basert på en ELISA-metode hvor ulike fortyngninger er testet ut for å se på nivåer av IgY i ulike batcher (Figur 4).

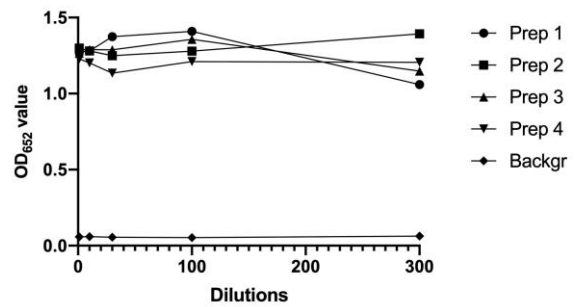


Figur 4. Standardkurve for beregning av IgY ut fra ulike fortyngninger. Målt nivå av IgY (x-akse) plottet mot oppnådd OD₄₉₀ (y-akse). Grunnlag for beregning av nivå av IgY i isolert eggeplommepulver og standardisering av mengde IgY tilsatt en injeksjonsformulering eller coatet på fôrpellet

En endepunktfortyning er vist i Figur 5, mens forskjeller på batcher ved typiske arbeidskonsentrasjoner er vist i Figur 6.



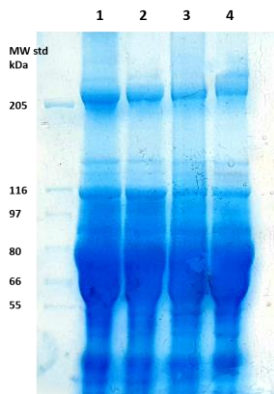
Figur 5. Nivå av IgY i ulike batcher av IgY opprenset fra eggeplomme



Figur 6. IgY-nivå over bruksfortynninger (testet i ulike in vivo forsøk).

I tillegg har kvaliteten på frysetørket IgY vært vurdert på en protein-gel (

Figur 7) som viser lik separering av de ulike proteinfraksjonen i ulike batcher.



Figur 7. Ulike batcher med opprenset IgY viser samme mønster på en proteingel

Ulike tørkemetoder påvirker utseende og i noen grad egenskapene til det tørkede produktet (Figur 8). Siden frysetørrking er standard metode innenfor en farmasøytisk produksjon, valgte vi å anvende på frysetørrking som metode i det videre arbeidet.

Figur 8. Ulike metoder for tørking av IgY



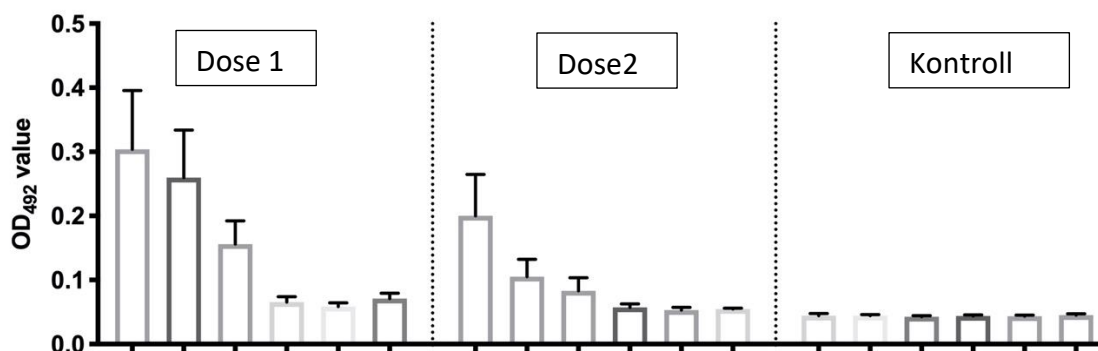
Spray-tørket IgY

Fryse-tørket IgY

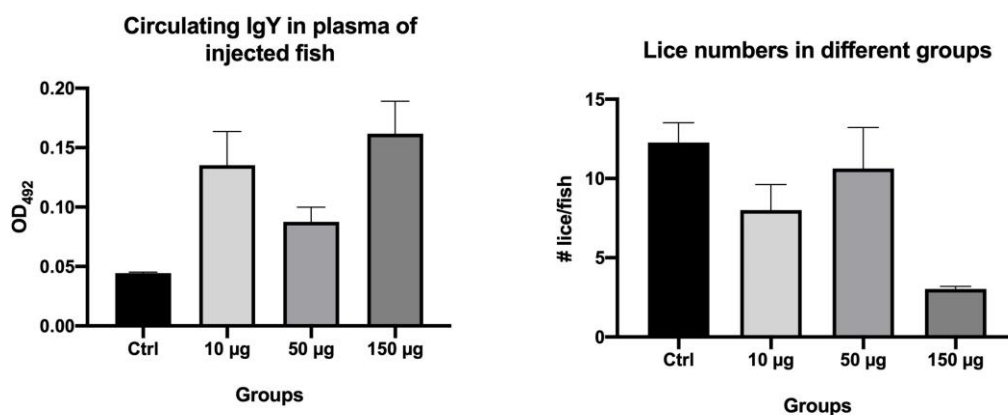
Spray-tørket IgY

Som en siste del av denne arbeidspakken ble plasma fra immunisert laks analysert for nivå av sirkulerende IgY, vist i

Figur 9. I første studie er det ikke påvist direkte sammenheng mellom nivå av IgY i plasma og mengde inkorporert i de ulike injeksjonspreparater, men dette kan skyldes ulik frigivelse fra injeksjonssted (peritoneal-hulen). Det ble også gjennomført et smitteforsøk med det samme oppsettet og lusetallet viser samvariasjon med nivå av IgY i plasma (Figur 10).



Figur 9. Nivå av sirkulerende IgY i lakseserum ved tidspunkt 1-6 etter injeksjon. Det er benyttet 2 doser ved injeksjon

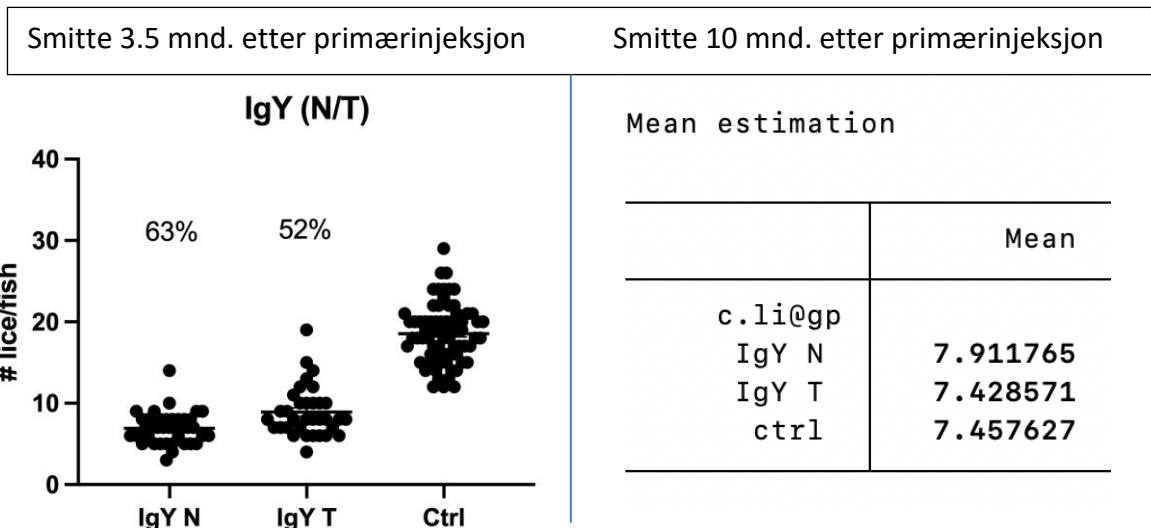


Figur 10. Nivå av sirkulerende IgY samt korresponderende lusetall hos immunisert fisk etter smitte.

Arbeidspakke 2. Varighet av immunitet etter parenteral og peroral administrasjon

Varighet av beskyttelse mot lakselus-smitte har blitt studert hos grupper av fisk hvor IgY har blitt administrert ved intraperitoneal injeksjon (formulert som vann-i-olje emulsjon) og etter oral administrasjon.

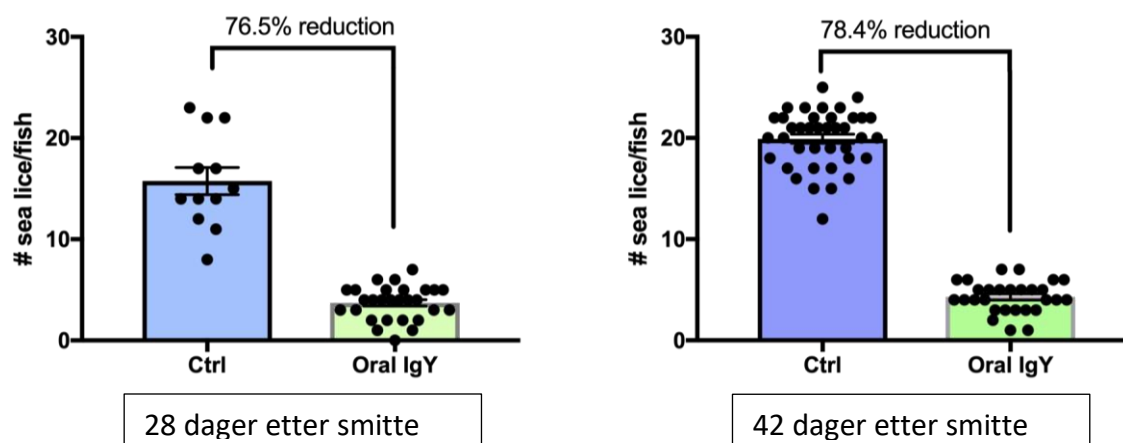
Injiserte fisk har høy beskyttelse mot infestasjon i minimum 3.5 måneder etter primær administrasjon. Smitte av samme gruppe fisk 10 mnd. etter injeksjon gir ikke forskjeller mellom injisert fisk (IgY) og kontroller (PBS), Figur 11.



Figur 11. Reduksjon i lusetall for to ulike batcher av IgY, 3.5 (venstre) og 10 mnd. (høyre) etter injeksjon. Ingen forskjell mellom behandlede grupper og kontroll (ctrl) 10 mnd. etter injeksjon, ca. 7 lus i gjennomsnitt for begge IgY-gruppene og kontroll.

Gruppen gitt IgY med fôret ble gjennomført ved at fôrpellet ble top-coated med IgY. Frysetørket IgY, produsert som beskrevet ovenfor, ble løst opp til en konsentrasjon justert for fiskens vekt og daglig utfôringsgrad. IgY ble sprayet ut på en på forhånd oppveid mengde fôr-pellet, etterfulgt av tørking.

Etter gjennomført fôringsperiode, ble laksen smittet med copepoditter ved bruk av standard smitte metode/30 min i stillestående vann, oksygenert, 11 °C vanntemperatur, 30 copepoditter/fisk. Antall lus/fisk ble så talt opp 28 og 42 dager etter smitte og effekt (reduksjon av antall lus) ble så beregnet med utgangspunkt i ubehandlet kontrollfisk og er vist nedenfor (Figur 12), mer enn 75% reduksjon i lusepåslag (lusetall) ved begge talletidspunkt.



Figur 12. Det ble oppnådd en reduksjon i antall lus på fisken på mellom 76 og 78%, reduksjonen er signifikant ($p < 0.0000$).

Arbeidspakke 3: Prime-boost immunisering med IgY

Metoden som benyttes for å spraye IgY på fôret er beskrevet i AP2 og samme metode har vært anvendt her. En emulsjon (vann/olje) av IgY sprayeres på overflaten av fôrpelleten. Pelleten oppbevares mørkt og fôres ut over en periode på 7 dager (fôring morgen og kveld) etter standard fôringsrutiner som beskrevet ovenfor og med de modifikasjoner som gjelder fisk og miljø (temperatur etc.). Her har profylaktisk effekt kort tid etter fôring samt varighet av effekt av oral administrasjon blitt studert. I tillegg ble IgY administrert oralt til fisk som allerede var smittet, en form for terapeutisk effekt. Varighet av oral administrasjon og effekt av en oral boost inngikk også i studien.

Profylaktisk og terapeutisk effekt. Atlantisk laks (ca. 250g) ble gitt IgY coatet på fôrpellet 7 dager i forkant av smitte med lakselus. I tillegg ble parallelle grupper gitt IgY coatet på fôrpellet (i 7 dager) ved ulike tidspunkt etter at fisken var smittet, 7, 14 og 21 dager etter smitte. Dagene angir tidspunktene når fôring startet etter at smitte var igangsatt. Målet var å studere om «behandling» med IgY har effekt på allerede infisert fisk. Telling ble foretatt 28 og 41 dager etter smitte.

Resultatene framkommer av tabellen nedenfor.

Tabell 1. Profylaktisk og terapeutisk effekt av IgY mot lakselusinfestasjon hos atlantisk laks

Tidspunkt for behandling før eller etter smitte	# lus (alle stadier)	% reduksjon
Kontroll (gr. 1) – ikke gitt IgY, smittet	20.1	-
Gitt IgY 7 dager før smitte (gr. 2)	6.5	68%*
Gitt IgY 7 dager etter smitte (gr. 3)	4.6	77%*
Gitt IgY 14 dager etter smitte (gr. 4)	4.5	78%*
Gitt IgY 21 dager etter smitte (gr. 5)	9.2	54%*

*signifikant reduksjon, $p < 0.001$.

Administrasjon av IgY gitt både før og etter smitte fører til en reduksjon i lusetallet. «Behandling» 21 dager etter smitte har lavere effekt sammenlignet med administrasjon av IgY kortere tid etter smitte. Best (terapeutisk) effekt har vi ved å igangsette behandling 7-14 dager etter smitte.

Fisken ble avluset 45 dager etter smitte, og 3 av gruppene i tabell 1 ble videreført, gr. 1, 2 og 4 (Tabell 2). Gruppe 2 ble gitt en boost 2.5 mnd. etter første «behandling», og gr. 4 ble beholdt ubehandlet (ingen boost). Kontrollene ble kun avluset og inngikk også i neste forsøk som kontrollgruppe.

Fisken ble smittet 3 mndr. etter første behandling, ½ måned etter boost. I dette forsøket var det et lavere smittepress, kontrollfisken endte opp med 2.8 lus/fisk i gjennomsnitt ved telling 18 dager etter smitte (Tabell 2). Resultatene av 2 gangs smitte framkommer i Tabell 2.

Tabell 2. Varighet av profylaktisk og terapeutisk effekt av IgY mot lakselusinfestasjon hos atlantisk laks

Tidspunkt for første behandling	2. gangs behandling	# lus etter smitte	% reduksjon
Kontroll (gr. 1)	-	2.8	-
7 dager før smitte (gr. 2)	7 dagers boost (2.5 mndr. etter første behandling)	0.5	82%*
14 dager etter smitte (gr. 4)	Ingen boost	0.9	68%*

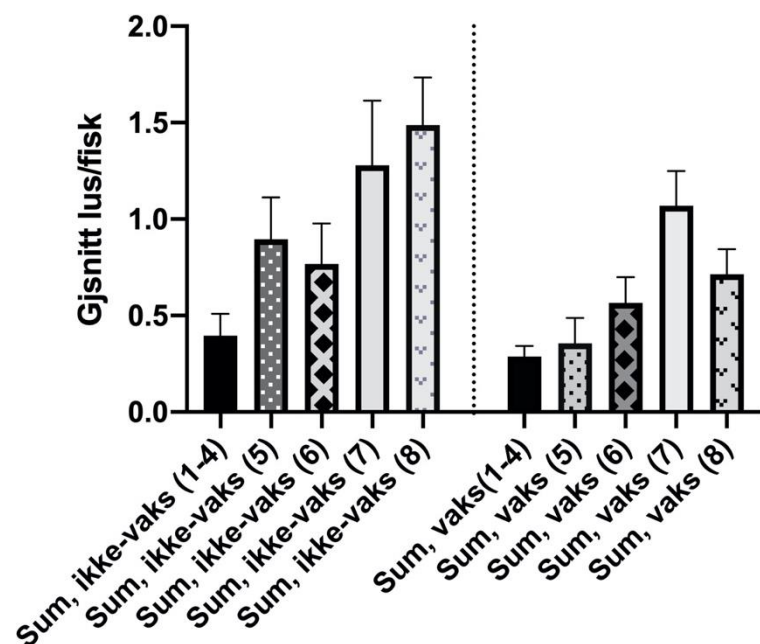
*signifikant reduksjon, $p < 0.001$.

Dette gir indikasjoner for at en IgY boost gir en bedring av effekt mot lakselusinfeksjon sammenlignet med en administrasjon. Samtidig har oral levering av IgY en varighet av effekt på inntil 3 mndr, som samsvarer med funnene beskrevet i AP2.

Arbeidspakke 4: Feltstudier for dokumentasjon av vaksinasjonsprogrammet

I denne studien ble atlantisk laks, gjennomsnittsvekt 100g, immunisert med en intraperitoneal injeksjon med IgY formulert som en vann-i-olje emulsjon, 0.1 ml/fisk. Fisken ble satt i sjøen i begynnelsen av november, i en merd på 12x12m og med immunisert fisk og kontrollfisk i samme merd (common-garden forsøk).

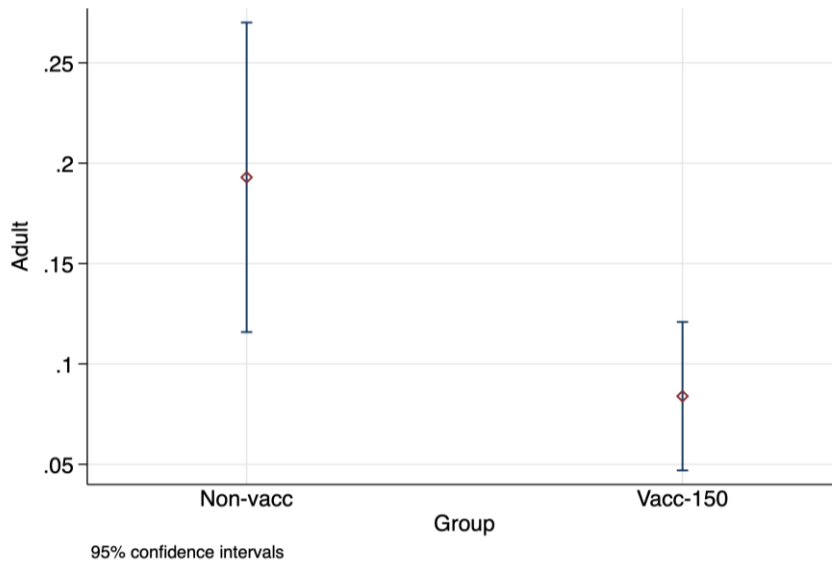
Antall lus ble talt på 30 fisk i vaksinert gruppe og kontrollgruppen hver måned fra sjøsetting fra november til juli, dvs. over en periode på 9 måneder etter opprinnelig injeksjon. Resultatene er vist i figur 4 og det gis en oppsummering av antall lus over perioden på 9 måneder. Som det framgår er lusetallene relativt lave gjennom vinteren og telling 1-4 (november–mars) er slått sammen, mens de etterfølgende tellinger er vist hver for seg. Etter telling nr. 7 (juni) ble all fisken i merden gitt en oral boost med IgY og dette medførte et fall i lusetallet for både kontroll og immunisert fisk.



Figur 13. Totalt antall lus opp til 9 mndr. etter vaksinasjon (8 mndr etter sjøsetting). Mellom pkt. 7 og 8 ble det gitt en oral immunisering (boost) av all fisk i merda. Dette gav en reduksjon i totalt lusetall i merda både for gruppen som ikke var gitt en primærinjeksjon (benevnt ikke-vaksinert) og gruppen gitt en primær injeksjon (benevnt vaks 8, $p < 0.001$).

Antall kjønnsmodne lus over den samme perioden inngikk i tellingen, og her var tallene generelt veldig lave, fra 0.05/fisk til 0.3/fisk fram til juni 2019 i kontrollgruppen. I vaksinert gruppen var det fra 45-100% lavere tall, med noe variasjon mellom tellingene. Antall kjønnsmodne hunnlus i vaksinert gruppe var fra 0 til 0.08. Ved siste telling i juni før boost, var antall kjønnsmodne lus 70% lavere i vaksinert enn i

uvaksinert kontrollgruppe. Voksne lus over hele forsøksperioden fram til juli (9 mnd. etter immunsering er samlet i Figur 14.



Figur 14. Voksne lus summert for alle tellinger over 9 måneder; non-vacc er kontroll og vacc-150 er vaksinert gruppe.

7. Oppsummering

- Det er vist at IgY administrert til atlantisk laks ved injeksjon gir reduksjon i lusepåslag i flere laboratorieforsøk og i småskala feltforsøk
- Varighet av effekt er vist som signifikant lavere lusetall i vaksinert gruppe opp til 8 måneder etter injeksjon
- IgY kan administreres sprayet på fôrpellet (top-coating) og dette gir en reduksjon i lusetallet i laboratorieforsøk med en varighet på inntil 3 måneder.
- IgY kan gis som «påfyll» eller boost i fôret til laks og bedre langtidseffekten
- IgY gitt med fôret gir en reduksjon i lusetall hos allerede infisert fisk, vist både i laboratorieforsøk og i feltforsøk
- Felleskjøpet og Norifish AS arbeider for mulig kommersiell utvikling av den patenterte teknologien.

8. Referanser

1. Fast, M.D., Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Dev Comp Immunol*, 2014. 43(2): p. 300-12.
2. Holm, H., et al., Difference in skin immune responses to infection with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of families selected for resistance and susceptibility. *Fish Shellfish Immunol*, 2015. 42(2): p. 384-94.
3. Raynard, R.S., et al., Development of vaccines against sea lice. *Pest Manag Sci*, 2002. 58(6): p. 569-75.