



VAKSINE MOT LAKSELUS: FREMSTILLING OG TEST AV NYE VAKSINEKANDIDATER I SMÅSKALA FORSØK

FHF-901510 CHRISTIANE EICHNER

UNIVERSITETET I BERGEN



1	SAMMENDRAG	3
	SUMMARY	3
2	INNLEDNING	4
2.1	BAKGRUNN	4
2.2	PROSJEKTETS OMFANG	4
2.3	PROSJEKTORGANISERING	5
3	PROBLEMSTILLING OG FORMÅL.....	5
3.1	EFFEKTMÅL	5
3.2	PROSJEKTETS RESULTATMÅL.....	5
4	PROSJEKTGJENNOMFØRING.....	6
4.1	METODIKK.....	6
4.1.1	VALG AV KANDIDATPROTEINER	6
4.1.2	FREMSTILLING AV FORSKJELLIGE TESTVAKSINE.....	6
4.1.3	VAKSINERING AV LAKSESMOLT MED TESTVAKSINENE	6
4.1.4	TEST AV VAKSINEKANDIDATER I SMITTEFORSØK	6
4.1.5	UNDERSØKELSE AV LUSENS UTVIKLING OG REPRODUKSJONS- PROSESS	6
4.1.6	FISKENS ANTISTOFFPRODUKSJON.....	7
4.1.7	VALG AV OPPSETTET	7
4.1.8	GJENNOMFØRING AV PROSJEKTET.....	7
5	OPPNÅDDE RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON.....	8
5.1	UTTRYKNING AV REKOMBINANTE PROTEINER I BAKTERIECELLER.....	8
5.2	LUSETAP AV MOBILE STADIER.....	8
5.3	ANTALL OG TETTHET AV LUS PÅ FISKEN	9
5.4	EGGSTRENGLENGDE, BLODOPPTAK OG KLEKKESUKSESS AV LUS..	10
5.5	FISKENS ANTISTOFFPRODUKSJON.....	12
5.6	INNVIRKNING AV VAKSINE PÅ FISKEN	12
5.7	VURDERING AV FUNNENE	13
6	HOVEDFUNN.....	13
7	LEVERANSER	14
7.1	MØTER MED REFERANSEGRUPPEN	14
7.2	KOMMUNIKASJON AV RESULTATER	14

1 SAMMENDRAG

I dag brukes både kjemiske og mekaniske metoder mot lakselus på oppdrettsfisk, som har ført både til resistensutvikling og kan vise negativ påvirkning på fiskevelferd og miljø. En virksom vaksine mot lakselus ville være et forebyggende tiltak som kunne begrense behandlingen mot lus i merden. Ved vaksinerer man simulerer kontakt med patogener, her med lakselusen, ved å injisere et spesifikk lakselusprotein i laksen som utløser antistoffdannelse mot dette proteinet, som skal trigger fiskens adaptive immunforsvar. En virksom vaksine må gi beskyttelse mot lakselus enten i form av reduksjon av lusepåslag eller i form av reduksjon av overlevelse eller reproduksjonsraten. Til dette formålet ble rekombinante proteiner av åtte utvalgte kandidatgener produsert. Tilsatt adjuvant ble disse testvaksinene injisert i fisken og effekten mot lakselus ble testet i smitteforsøk. Påslag, utvikling og reproduksjonssuksess av lakselusen ble dokumentert og fiskens immunforsvar og eventuelle bivirkninger ble undersøkt. Det var stor variasjon i lusepåslag mellom fisk fra alle grupper. Ingen av testvaksinene viste en signifikant beskyttende effekt. Innvirkning på lusens utvikling ble ikke funnet. Ingen av testvaksinene førte til hemning av vekst eller bivirkninger i fisken. Styrken av fiskens immunforsvar varierte mellom testvaksiner.

Summary

Today, both chemical and mechanical methods are used against salmon lice on farmed fish, which have led to both, development of resistance and negative effects on fish welfare and the environment. An effective vaccine against salmon lice would be a preventive measure that could limit the treatment against lice in the cage. Vaccination simulates contact with pathogens, here with the salmon lice, by injecting a specific salmon louse protein into the salmon that induces antibody formation against this protein, which will trigger the fish's adaptive immune system. An effective vaccine must provide protection against salmon lice either in form of a reduction in lice infestation or in the form of a reduction in survival or reproduction rate. To this purpose, recombinant proteins of eight selected candidate genes were produced. With added adjuvant, these test vaccines were injected into the fish and the effect on salmon lice was tested in infection studies. Infestation, development and reproductive success of the salmon lice were documented, and the fish's immune answer and any side effects were investigated. There were large variations in lice infestation between fish from all groups. None of the test vaccines showed a significant protective effect. No effect on lice development was found. None of the test vaccines caused inhibition of growth or led to strong side effects in the fish. The strength of the fish's immune system varied between test vaccines.

2 INNLEDNING

2.1 Bakgrunn

Behandling mot lakselus er svært kostnadskrevenende for oppdrettsnæringen, både på grunn av de direkte kostnadene knyttet til behandling mot lakselus og indirekte kostnader knyttet til redusert vekst og forhøyet dødelighet hos laks som følge av lusebehandling. For i dag brukes både kjemiske og mekaniske avlusningsmetoder. Bruken av kjemikalier mot lakselus har ført til arvelig resistens [1] og utslippene gir negativ påvirkning på miljøet [2], mens flere av de mekaniske metoder viser seg å ha negativ innvirkning på fiskehelse. Fiskevaksiner har i stor grad bidratt til å senke bruk av medikamenter mot fiskesykdommer og har vist seg å være den mest forebyggende tiltak i fiskeoppdrett når det gjelder bakterie og virus sykdommer. Tilsvarende ville en vaksine mot lakselus begrense behandlingen mot lus i merden. Hovedformål med vaksine er det å danne beskyttelse mot patogener med å utløse en immunreaksjon i laksen ved kontakten med denne patogen. Fisk har både et medfødt og ervervet immunsystem. Det medfødte virker rask og er ganske uspesifikt mens det adaptive immunforsvaret tar lengre tid å sette inn ved første kontakt med patogenen, men er veldig spesifikt og effektivt. Det er det adaptive immunforsvaret til fisken som skal stimuleres med vaksiner. Ved vaksinerer simulerer man kontakt med en patogen, i dette tilfelle lakselusen, ved å injisere et spesifikt protein fra lusen i laksen som utløser antistoffdannelse mot dette proteinet. Det er avgjørende at man finner et protein som utløser denne reaksjonen og som i tillegg fører til redusert overlevelse eller reproduksjonsraten av lakselus etter vaksinerer. Grunnlag for valg av nye vaksine kandidater danner undersøkelser av lakselusens biologi på molekylært nivå gjennomført de siste årene. Lakselusens komplette genom er sekvensert og også genuttrykningsdata fra alle stadier og forskjellige vev kan bidra til å finne en egnet kandidat. Behandling mot lakselus er svært kostnadskrevenende for oppdrettsnæringen, både på grunn av de direkte kostnadene knyttet til behandling mot lakselus og indirekte kostnader knyttet til redusert vekst og forhøyet dødelighet hos laks som følge av lusebehandling. For i dag brukes både kjemiske og mekaniske avlusningsmetoder. Bruken av kjemikalier mot lakselus har ført til arvelig resistens og utslippene gir negativ påvirkning på miljøet, mens flere av de mekaniske metoder viser seg å ha negativ innvirkning på fiskehelse. Fiskevaksiner har i stor grad bidratt til å senke bruk av medikamenter mot fiskesykdommer og har vist seg å være den mest forebyggende tiltak i fiskeoppdrett når det gjelder bakterie og virus sykdommer. Tilsvarende ville en vaksine mot lakselus begrense behandlingen mot lus i merden. Hovedformål med vaksine er det å danne beskyttelse mot patogener med å utløse en immunreaksjon i laksen ved kontakten med denne patogen. Fisk har både et medfødt og ervervet immunsystem. Det medfødte virker rask og er ganske uspesifikt mens det adaptive immunforsvaret tar lengre tid å sette inn ved første kontakt med patogenen, men er veldig spesifikt og effektivt. Det er det adaptive immunforsvaret til fisken som skal stimuleres med vaksiner. Ved vaksinerer simulerer man kontakt med en patogen, i dette tilfelle lakselusen, ved å injisere et spesifikt protein fra lusen i laksen som utløser antistoffdannelse mot dette proteinet. Det er avgjørende at man finner et protein som utløser denne reaksjonen og som i tillegg fører til redusert overlevelse eller reproduksjonsraten av lakselus etter vaksinerer. Grunnlag for valg av nye vaksine kandidater danner undersøkelser av lakselusens biologi på molekylært nivå gjennomført de siste årene. Lakselusens komplette genom er sekvensert og også genuttrykningsdata fra alle stadier og forskjellige vev kan bidra til å finne en egnet kandidat.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet ble gjennomført i tre delforsøk i to omganger. Den første delforsøk innebar fremstilling av testvaksinene ved å uttrykke rekombinant protein i bakterieceller. Det uttrykte rekombinante protein ble så blandet i adjuvant og brukt som testvaksine (andre delforsøk). I smitteforsøk testes virkningen av

vaksine mot lusepåslag og utvikling og eventuelle bivirkninger evalueres. I den tredje delforsøk ble fiskens antistoffdannelse mot det spesifikke protein undersøkt så vel som reproduksjonssuksessen av lusen. I første omgang ble tre forskjellige testvaksiner undersøkt, i andre omgang fem forskjellige.

2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet ble gjennomført ved UiB, institutt for biovitenskap i tilknytning til Sea Lice Research Centre (SLRC).

Prosjektgruppe: Christiane Eichner (prosjektleder), Ingunn Anita Wergeland og Anna Gradomska (økonomiforvaltning), Frank Nilsen, Heidi Kongshaug, Aina-Catherine Øvergård, Per Gunnar Espeland

Referansegruppe: Vidar Aamo Nikolaisen (Grieg Seafood Finnmark AS), Bjarne Reinert (Lerøy Seafood Group ASA), Henrik Duesund (Cermaq Group AS)

FHF-ansvarlig: Kjell Maroni

3 PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

3.1 Effektmål

Nytteverdien til næringen ved vellykket eksperiment ville være veldig høyt. Om en av testvaksinene viste effekt ville dette videre utviklet som en kommersiell vaksine gi oppdrettsnæringen et nytt verktøy til å redusere mengden av lakselus på oppdrettsfisken uten behandling i merdene.

I forhold til kostnader som påløper ved behandling mot lakselus i merdene er ressursbruk av dette prosjekt ubetydelig. Hvis resultatet bare førte til reduksjon av avlusningsfrekvensen ville dette være en gevinst til oppdrettsnæringen. Generelt er det en stor utfordring å utvikle vaksine mot ytre parasitter, siden disse er i lite kontakt med- og har utviklet mekanismer å gjemme seg for vertens immunforsvar [3]. Det er veldig vanskelig å finne den riktige vaksine kandidat, men forutsetningene for å lykkes er på grunn av den oppbyggede kunnskap som har vært skapt de siste årene høyere enn før.

3.2 Prosjektets resultatmål

Målet var å identifisere et eller flere proteiner, som injisert i laksen som vaksine, gir beskyttelse mot lakselus. Dette kan være enten i form av reduksjon av lusepåslag eller i form av reduksjon av overlevelse eller reproduksjonsraten. Til dette formål måtte der:

- Velges kandidatproteiner og uttrykke disse rekombinant i bakterieceller
- Vaksinere laksesmolt med disse proteiner tilsatt i adjuvant
 - Fiskens antistoffdannelse måles
 - Eventuelle bivirkninger evalueres
- Utføre smitteforsøk til å teste virkning av testvaksinene
 - Lusetap av mobile stadier i løpet av forsøket måles
 - Lusemengden på fisk i slutten av forsøket bestemmes
 - Eggstrenglengden og klekkesuksess investigeres

4 PROSJEKTGJENNOMFØRING

4.1 Metodikk

4.1.1 Valg av kandidatproteiner

Basert på tidligere akkumulert kunnskap (tidsmessig og lokale gen-uttrykningsmønstre og gen knock-down eksperimenter) ble forskjellige proteiner valgt, som er uttrykket i lusens tarm og danner dermed en kontaktflate med laksens blod. Det er også av betydning at genene er uttrykket i parasittiske stadiene. Relevansen av disse proteiner var bekreftet med tidligere gjennomførte gen knock-down eksperimenter, som førte til redusert overlevelse eller reproduksjon. Syv forskjellige proteiner ble rekombinant uttrykket. To ferritiner [4] (testvaksine 1), en scavenger receptor [5] (testvaksine 2), en chitin synthase [6] (testvaksine 4), en protein som ligner en V-type proton ATPase subunit (testvaksine 5), og 3 forskjellige proteiner, som ligner Sodium/potassium-transporting ATPase subunits (testvaksine 6-8). I tillegg ble en blanding av isolerte lakselusproteiner brukt (testvaksine 3).

4.1.2 Fremstilling av forskjellige testvaksine

Til fremstilling av testvaksinene ble det valgte lakselusproteinet rekombinant uttrykket i bakterieceller. For dette formål ble et konstrukt av hvert valgte kandidatgen med optimaliserte kodonbruk passende til uttrykning i bakterieceller bestilt, klonet i en vektor, som så blir transformert i bakterieceller. Den uttrykte rekombinante protein ble rensset og blandet i adjuvant (Montanide™ ISA 763 A VG).

4.1.3 Vaksinerings av laksesmolt med testvaksinene

Testvaksinene og kontrollvaksine (bare adjuvant) ble injisert i individmerket laksesmolt i felles kar. I smitteforsøk A blir i tillegg en gruppe uvaksinert. Etter smoltifisering ble fiskene randomisert fordelt i 60 enkel-kar.

4.1.4 Test av vaksinekandidater i smitteforsøk

Hver fisk i enkel-kar blir smittet med 60 kopepoditter ved å senke vannstanden og tilsette kopepodittene under rolig blanding av vannet. Lusetap i løpet av eksperimentet ble fulgt opp for de bevegelige stadier ved å filtrere utløpsvannet, som blir kontinuerlig sjekket for lus. Lusetall og utviklingen av lusene fra hver fisk ble dokumentert med et foto ved avslutning. Eventuelle egg-strenger ble lagt til klekking i klekkebrønner. Fisken ble veid og visuell undersøkt etter eventuelle skader eller vaksinebivirkninger i form av sammenvoksinger. Blodprøver av fisken ble tatt. Forsøkene ble gjennomført ved 12 grader.

4.1.5 Undersøkelse av lusens utvikling og reproduksjonsprosess

Til å observere reproduksjonssuksessen ble eggstrenglengden målt og klekking av eggene observert. Fotos av lus tatt ved avslutning ble analysert for forandringer i utviklingen. I tillegg fikseres lus fra hver gruppe for en eventuell histologisk undersøkelse.

4.1.6 Fiskens antistoffproduksjon

Fiskens antistoffdannelse mot den injiserte protein ble undersøkt i en såkalt enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hvor det spesifikke antistoffet i fiskeblod av den vaksinerte fisken kan vises i en fargereaksjon. Til nå er bare vaksineforsøk A analysert.

4.1.7 Valg av oppsettet

En enkel-kar oppsett, hvor en og en fisk blir smittet i eget kar ble valgt. Dette ble gjort av følgende betraktninger:

- Proteiner lokalisert i lusens tarm ble valgt som testvaksine siden disse er på kontaktflaten med laksens blod og dermed også med fiskens antistoffer mot disse proteinene. Det er de mobile stadiene, som spiser større mengder blod og det er ønskelig å dekke denne perioden i smitteforsøkene. Men vertsveksel av bevegelige lusestadier er vanlig. Til å undersøke virkningen av vaksinen på lusen uten at lusen kan veksle vaksinegruppe må fisk fra de forskjellige gruppene avskilles.
- Kar-effekter, som utvirker seg på luseantall er vanlig også i identiske kar. Dette kan blant annet skyldes adferd av individuelle fisk (svømmemønster, enkelte lusespisere) eller fordelingsmønsteret av kopepoditter ved smitte. Flere kar for hver gruppe kan overveie dette problemet, men er ressurskrevende. Ved smitte i enkel-kar må også kar-effekter forventes, men hver fisk kan betraktes som biologisk parallell og kar-effektene blir dermed statistisk mindre relevant. Også fordeling av kopepoditter er et mindre problem i enkel-kar, hvor fisken kommer i et mindre volum i nær kontakt med et talt antall kopepoditter.

4.1.8 Gjennomføring av prosjektet

Alle forsøk ble gjennomført ved Universitet i Bergen ved fasilitetene av Sea Lice Research Centre og ILab.

Testvaksinene ble testet i to grupper (vaksineforsøk A og vaksineforsøk B). I første forsøk ble 3 forskjellige testvaksiner mot en kontrollgruppe testet, i andre forsøk fem. I tillegg ble en gruppe med ubehandlede fisk undersøkt i vaksineforsøk A. Der var 15 fisk per gruppe i forsøk A og 10 fisk per gruppe i forsøk B.

Forsøkene ble gjennomført ved 12 grader og avsluttet når lusene i kontrollgruppen hadde dannet eggstrenger (40 og 43 dager). Ved synlige virkninger av en vaksinegruppe skal smitteforsøket gjentas. Ved eventuelle synlige forandringer av lusen skal også den fikserte lus histologisk analyseres.

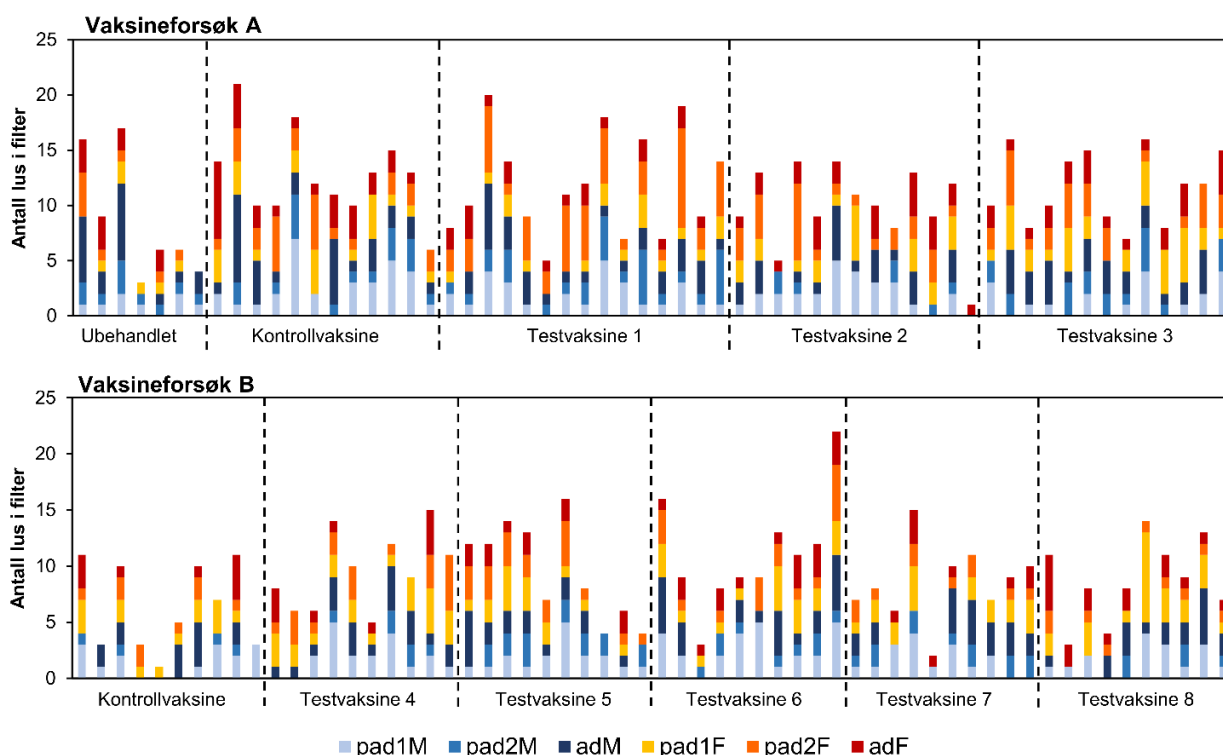
5 OPPNÅDDE RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON

5.1 Uttrykning av rekombinante proteiner i bakterieceller

Ikke alle proteinene la seg uttrykke i bakterieceller under valgte betingelser. I første omgang ble tre forskjellige testvaksiner produsert, mens 3 videre kunne ikke uttrykkes. I andre omgang ble som tiltenkt fem forskjellige testvaksiner produsert (av de åtte forskjellige konstrukter, vi startet med).

5.2 Lusetap av mobile stadier

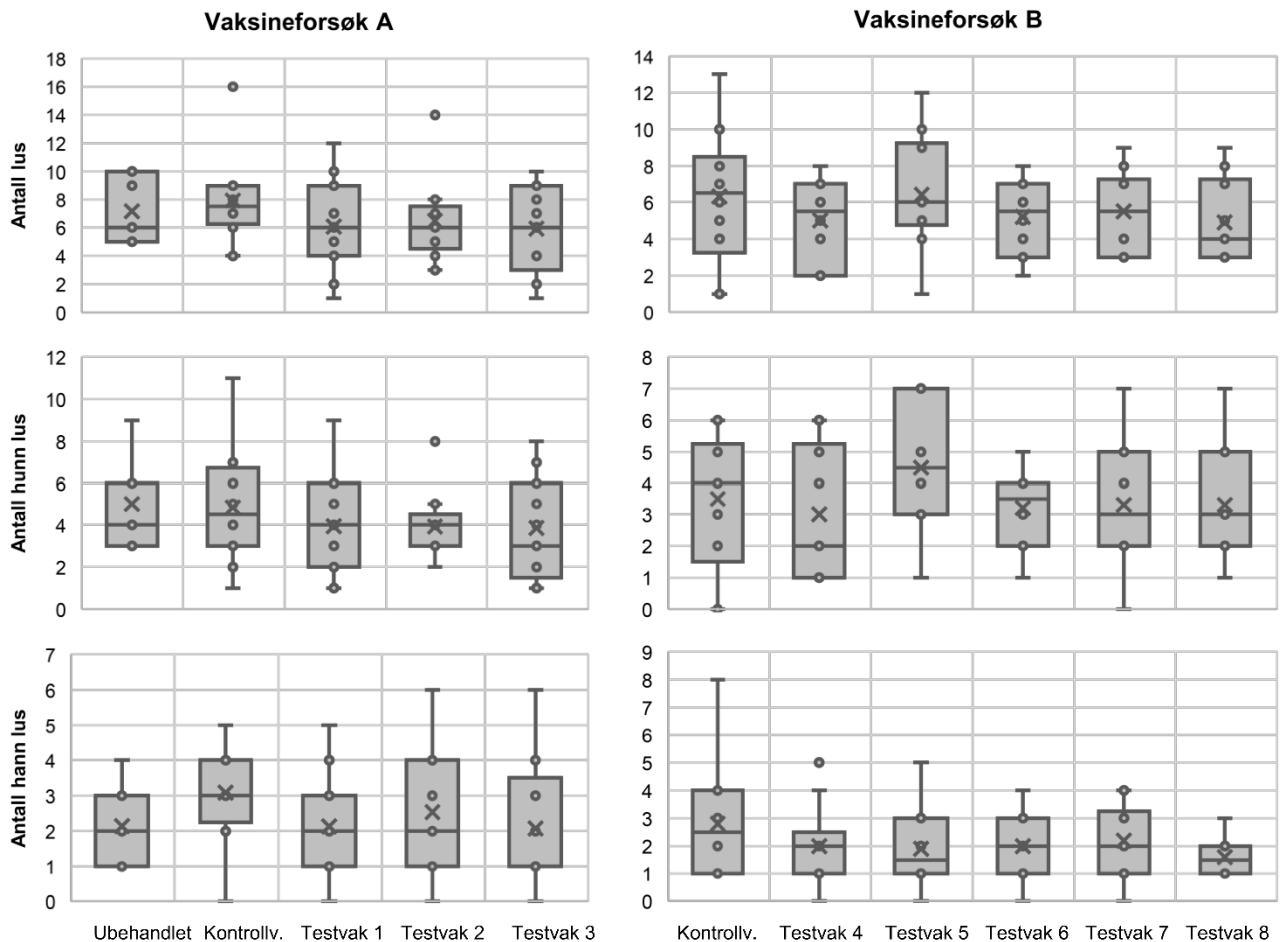
Lusetap av mobile stadier i løpet av smitteforsøket ble målt ved å telle og stadietbestemme kontinuerlig lus samlet i filterene av avløpsvannet av hvert enkel-tank. Ingen signifikante forskjeller i lusetap mellom kontroll- og testvaksinegruppene kunne påvises. I vaksineforsøk A falt gjennomsnittlig 11,2 lus fra fisken, i vaksineforsøk B gjennomsnittlig 9,3 lus. Andel mellom hann- og hunn lus var omtrent lik (gjennomsnittlig 5,5 hann lus og 5,7 hunn lus i vaksineforsøk A og gjennomsnittlig 4,6 hann lus og 4,5 hunn lus i vaksineforsøk B). Der er store variasjoner i antall lus mellom enkelte fisk (standardavvik i begge forsøk var 4,3 lus). I figur 1 er tall og stadium av de tapte lus i hvert enkel-kan vist.



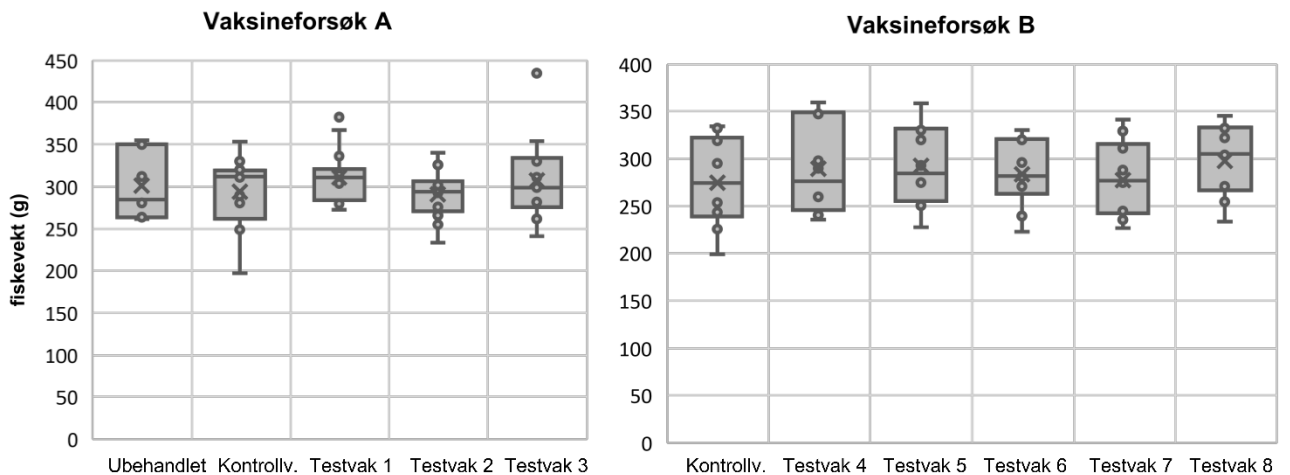
Figur 1. Lusetap av mobile stadier i løpet av smitteforsøket. Hver kolonne viser antall og stadiet av lus, funnet i filterene av avløpsvannet fra en fisk holdt i enkelkar. Hann lus er vist i blåfarger, hunn lus i rødfarger. Pad1M=preadult 1 hann lus, pad2M= preadult 2 hann lus, adM= voksen hann lus, pad1F= preadult 1 hunn lus, pad2F= preadult 2 hunn lus, adF= voksen hunn lus. Der er stor variasjon i lusetap per fisk både når det gjelder antall og stadiet.

5.3 Antall og tetthet av lus på fisken

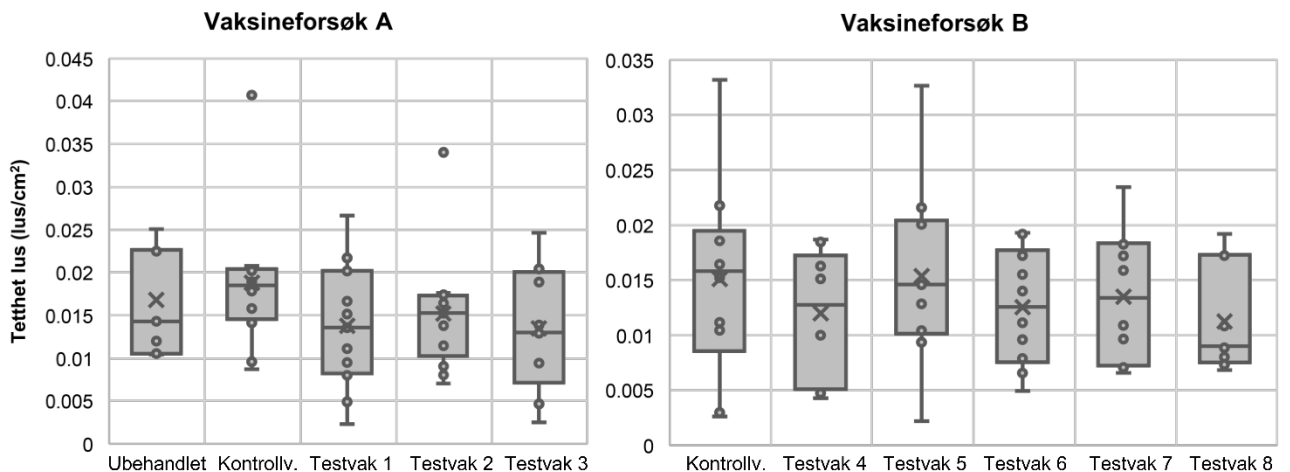
I gjennomsnitt ble der funnet 6,6 +/- 3,0 lus per fisk i vaksineforsøk A og 5,6 +/-2,7 i vaksineforsøk B. Variasjon i antall lus mellom fiskene var høy. Der fantes ingen signifikante forskjeller i antall lus mellom de forskjellige vaksinegruppene. Summen av alle lus, antall hunn lus og antall hann lus på de enkelte fisk fra de forskjellige vaksinegrupper er vist i figur 2. Fiskens vekt varierte mellom 197 og 435 gram (gjennomsnittlig 301 gram) i vaksineforsøk A og mellom 199 og 359 gram (gjennomsnittlig 286 gram) i vaksineforsøk B (figur 3). Til å kompensere for fiskevekten ble i tillegg lusetettheten beregnet (figur 4). Ved sammenligning av lusetetthet i de forskjellige testvaksinegruppene med kontrollgruppen viste testvaksine 2 en svak (19%) men signifikant (p-value=0.026) nedgang (MannWhitney, right-tailed test) i forhold til kontrollgruppen, men ikke sammenlignet med uvaksinert fisk.



Figur 2. Antall lus (summen av alle lus, antall hunn lus og antall hann lus) funnet på fisk av de forskjellige vaksinegrupper i vaksineforsøk A og vaksineforsøk B ved forsøksavslutning. Alle lus var voksne.



Figur 3. Vekten av fisk ved forsøksavslutning i de forskjellige vaksinegrupper i vaksineforsøk A og vaksineforsøk B. Fiskens vekt varierer, men det er ingen signifikante forskjeller mellom fisk fra de enkelte gruppene.



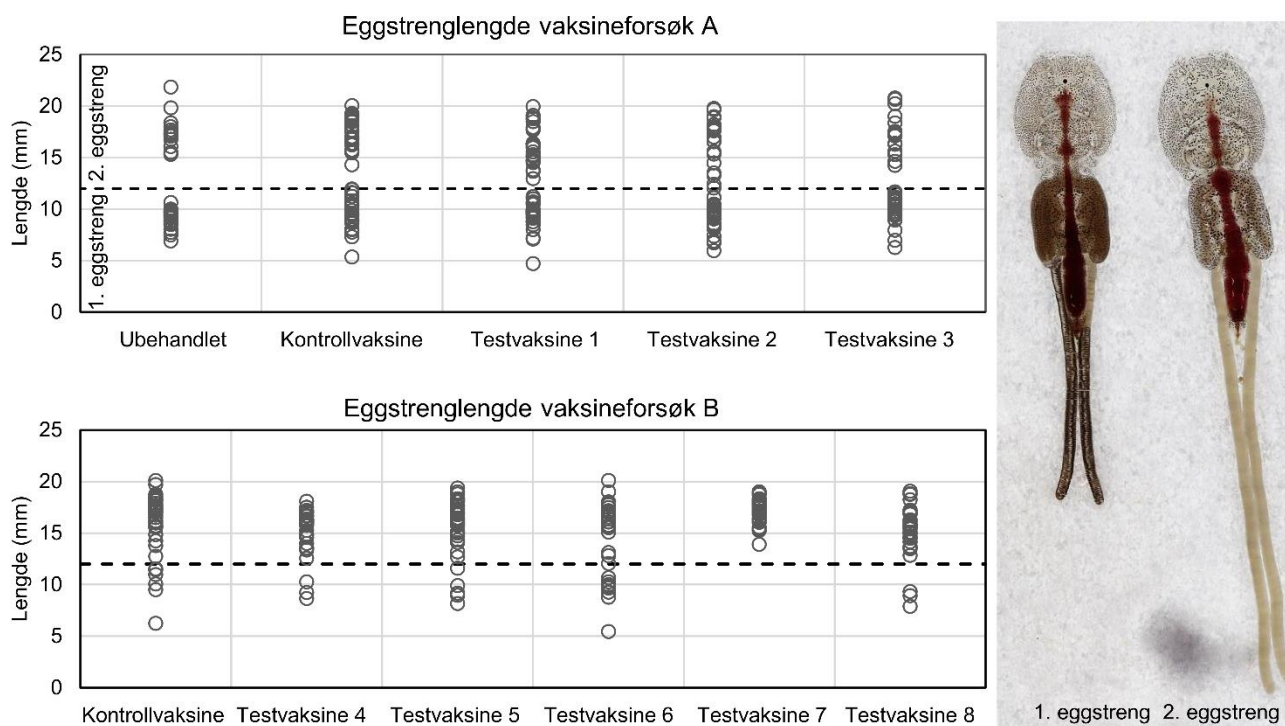
Figur 4. Tetthet av lus i de forskjellige vaksinegrupper i vaksineforsøk A og vaksineforsøk B.

5.4 Eggstrenglengde, blodopptak og klekkesuksess av lus

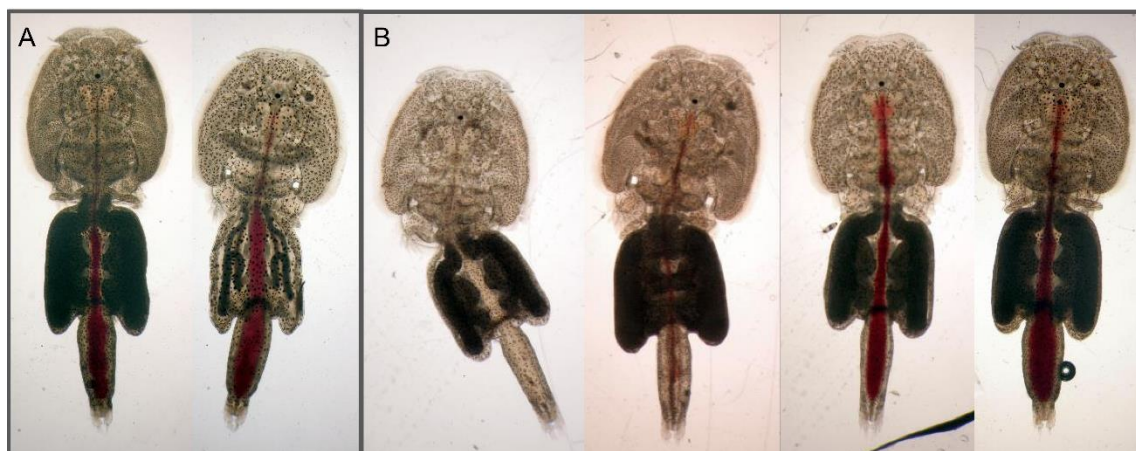
På fotografiene tatt ved forsøksavslutning ble eggstrenglengden målt og mengde blod i tarmen evaluert. Lengden av eggstrengene til lusene varierer generelt mellom første og følgende eggstrengpar med kortere eggstrenger ved første legging. Forsøkene ble avsluttet til et tidspunkt hvor en stor del av lusene allerede hadde sitt andre eggstrengpar, men noen fortsatt hadde sitt første. Forsinkelser i utviklingen kunne dermed evalueres ved å sammenligne status av lusene (første eller andre eggstrengpar). Ved å sammenligne pigmentering av egg og tilstanden av ubefruktete egg i gonadesegmentet til en kjent utviklingsstatus av lusene (tidspunkt etter smitte ved kjent temperatur), er det mulig å dele eggstrengene i første og andre eggstrengpar (se foto figur 5 og figur 6A). Lengden av eggstrengene for de forskjellige vaksinegrupper er vist i figur 5. Der er ingen signifikant forskjell mellom eggstrenglengde eller status (første eller andre eggstrengpar) for vaksineforsøk A. Veldig små men signifikante (T-test) forskjeller i eggstrenglengden av den andre eggstrengpar ble funnet for testvaksinegruppe 4 og 8 (15,6 +/-1,4 og 15,9 +/-1,6 mm versus 16,9 +/- 1,7 mm i kontrollgruppen). Der er heller ingen signifikante forskjeller (chi²-test) i fordeling av lus med første og andre eggstrengpar i de forskjellige gruppene av vaksineforsøk B.

Til å vurdere, om vaksinene hadde innvirkning på lusens næringsopptak, ble mengde av blod i tarmen undersøkt. De fleste av lusene hadde ved samplingstidspunkt blod i tarmen. Mengden av blod ble registrert på en skala fra en til 4 (se figur 6 B). Ingen av gruppene viste en tydelig forskjell i fordeling av lus med forskjellig mengde blod i tarmen.

Eggstrengene ble ved forsøksavslutning lagt i klekkebrønner og observert. Med enkelte få unntak klekket alle eggene. Der var ingen forskjell mellom gruppene.



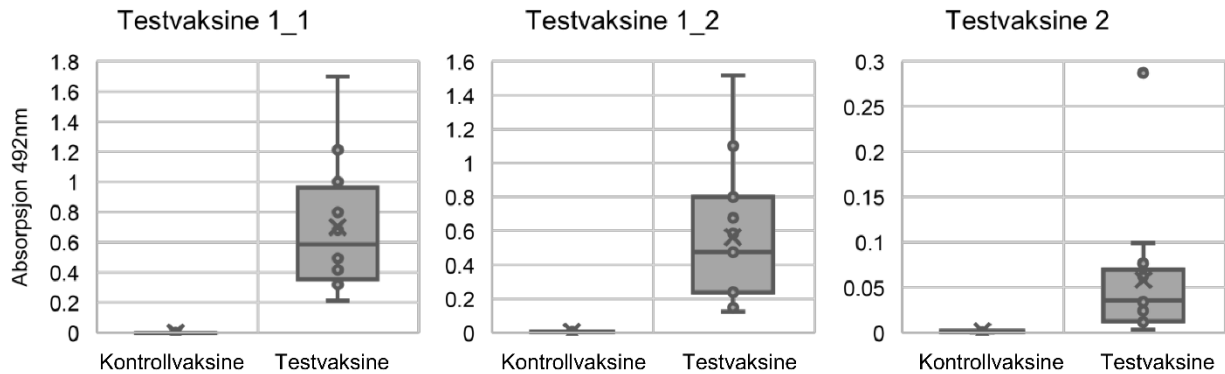
Figur 5. Eggstrenglengde målt fra eggbærende lus samlet fra fisk fra forskjellige vaksinegrupper. Fotografiet viser typiske lus med første og andre eggstrengpar. Den første eggstrengpar er kortere og til samplingstidspunkt moden for klekking (sterkt pigmentert) og gonadesegmentet til lusene er fylt med nye egg klar til utpressing. Den andre eggstrengpar er lengre og til samplingstidspunkt umoden (lys). Eggene i gonadesegmentet til lusene vises bare som tynne tråder.



Figur 6. Lakselus med forskjellig langt utviklede egg i gonade segment (A) og med forskjellig mengde blod i tarmen (B). Lusene ble evaluert etter mengde blod i tarmen og hver lus ble tildelt en verdi mellom 1 (intet blod) og 4 (mye blod).

5.5 Fiskens antistoffproduksjon

Fiskens antistoffdannelse mot den injiserte protein ble undersøkt. Til nå er bare vaksineforsøk A analysert. Immunreaksjon mot Testvaksine 1 og 2 kunne påvises. Alle fiskene i vaksinegruppene, bortsett en fisk i testvaksine 2 gruppen, viser antistoffproduksjon i forhold til fisk vaksinert med kontrollvaksine både for testvaksine 1 bestående av to forskjellige proteiner og testvaksine 2, bestående av et protein (figur 7). Reaksjonen mot vaksine 1 var mye sterkere.

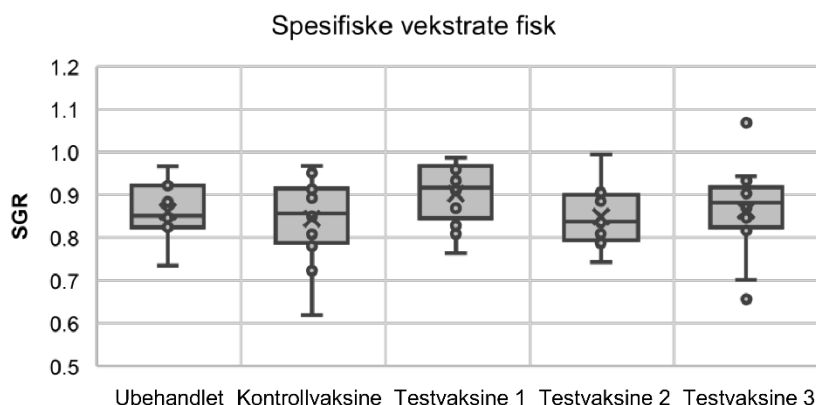


Figur 7. Fiskens antistoffproduksjon. Måling av fiskens antistoffproduksjon mot de spesifikke proteiner injisert som testvaksine. En immunreaksjon kunne vises for både testvaksine 1 bestående av to forskjellige proteiner og testvaksine 2, bestående av et protein.

5.6 Innvirkning av vaksine på fisken

Vaksinering hadde ingen effekt på fiskens vekst. Den spesifikke vekstraten av fisken i de forskjellige grupper mellom vaksinerings- og samplingstidspunkt i vaksineforsøk A er vist i figur 8. Der er ingen signifikante forskjeller i vekstraten mellom uvaksinert fisk og kontrollgruppen eller testvaksinegruppene.

Bivirkninger av vaksine i form av eventuelle sammenvoksinger mellom fiskens bukvegg og organer etter Speilberg skala (en til seks, med en som laveste verdi) ble evaluert. Generelt ble der veldig lite sammenvoksing oppdaget (gjennomsnittlig verdi 1,4 på Speilberg skala). Testvaksine 2 hadde med en gjennomsnittsverdi av 2,0 en signifikant høyere grad av sammenvoksinger. Det er samme vaksine, som god antistoffdannelse (se figur 7).



Figur 8. Spesifikk vekstrate av fisken i de forskjellige gruppene i vaksineforsøk A i tidsrommet mellom vaksinerings og forsøksavslutning (154 dager).

5.7 Vurdering av funnene

Variasjonen i luseantall var tross jevne betingelser for alle fiskene veldig høy (41%). Fiskene ble behandlet på mest mulig lik måte. Ved vaksinasjonstidspunktet varierte smoltvekten med 7,5%. Fisken var samlet randomisert i to kar med samme vannforsyning til omtrent to uker før smitte, hvor fiskene ble flyttet til 60 enkel-kar (randomisert). Lusene ble talt manuelt dagen før smitte og lagt i brønner forsynt med gjennomstrømsvann. Selv om fisken blir smittet på samme måte ved å senke vannstanden og tilsette kopepodittene manuelt under rolig blanding av vannet og så la vannet stige langsomt til normalen igjen, varierer fiskens oppførsel under smitte, hva som i tillegg til fiskestørrelsen og andre ukjente faktorer kan bidra til variasjon i lusetall. Ved forsøksavslutning varierte fiskevekten med 12,6 og 14,3% (forsøk A og B). Forskjell i fiskestørrelse har generelt innvirkning på luseantall. Om effekten av størrelsen på lusetall er like høy i enkelkar som i felleskar er ikke kjent. Den høye variasjonen i luseantall mellom fiskene fører til redusert statistisk styrke. Dermed var antall fiskene per gruppe for lavt til å se mindre effekter og en nedgang i lusetall mellom gruppene av omtrent 50-60% er nødvendig, til å se forskjellene. Til å oppnå høyere statistisk styrke for mindre forskjeller, trengte man under disse omstendigheter minst 30 fisk per gruppe. Vi valgte enkel-kar oppsett, siden tidligere forsøk viste sterke kareffekter med høy variabilitet i lusetall mellom parallelle grupper i forskjellige kar. Til å kompensere for kareffekter er et høyt antall parallelle grupper nødvendig, som er resurskrevende. For en første skanning av kandidater ble derfor dette enkel-kar system valgt, siden hvert kar har sin egen kareffekt og hver fisk kan dermed ses som parallelle. Å bruke en common garden oppsett med alle fiskene i samme kar ble i dette tilfelle utelukket, siden vi var spesielt interessert i effekten av testvaksinene på de blodspisende mobile stadiene. Men disse kan veksle verten sin, i en common garden oppsett også mellom gruppene. Lusetetthet i testvaksine 2 gruppen var veldig svak, men signifikant redusert i forhold til kontrollgruppen. Fiskens immunforsvar mot dette proteinet kunne påvises, men var relativt svak. En mulighet for å øke dens virksomhet ligger i utvikling av en bedre adjuvans, mer avanserte syntetiske antigener (f.eks. virus-lignende partikler) også i kombinasjon med flere andre proteiner.

Vi fant ingen signifikant virkning på utviklingen i lusene. Eggstrenglengde av andre eggstrengpar var svak (under 10%) men signifikant kortere i testvaksinegruppe 4 og 8. Samplingen fant sted til et tidspunkt, hvor lusene nettopp fikk andre eggstrengpar. Det kan ikke utelukkes, at noen av lusene holdt på å presse ut eggstrengene, som dermed var kortere enn forventet.

6 HOVEDFUNN

- Der er store variasjoner i antall lus per fisk i alle grupper, som gjør det vanskelig å finne signifikante forskjeller. Til å se mindre effekter av testvaksinen i form av reduksjon i lusepåslag trengtes det under disse omstendigheter et større antall fisk per gruppe.
- Ingen av testvaksine viste en relevant innvirkning på lusens utvikling, blodopptak eller reproduksjon
- Testvaksinene viste ingen redusert vekst av fisken eller relevante bivirkninger i form av sammenvoksinger mellom fiskens bukvegg og organer.

7 LEVERANSER

7.1 - Møter med referansegruppen

To skype-møter ble avholdt med referansegruppen

7.2 - Kommunikasjon av resultater

Til nå ble resultatene vist på gruppemøtene til SLRC. En plakat med resultatene skal bli vist ved Norsk Biokjemisk Selskap sitt «56. contact meeting 2020»

Referanser

1. Aaen SM, Helgesen KO, Bakke MJ, Kaur K, Horsberg TE. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*. 2015;31 2:72-81; doi: 10.1016/j.pt.2014.12.006.
2. Grefsrud ES, Svåsand T, Glover K, Husa V, Hansen PK, Samuelsen O, et al: Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2019- Miljøeffekter av lakseoppdrett. In: *Fisken og havet* vol. 2019-5: Havforskningsinstituttet; 2019.
3. Maizels RM. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *Journal of Biology*. 2009;8 7:62; doi: 10.1186/jbiol166.
4. Heggland EI, Trøse C, Eichner C, Nilsen F. Heavy and light chain homologs of ferritin are essential for blood-feeding and egg production of the ectoparasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2019;232:111197; doi: 10.1016/j.molbiopara.2019.111197.
5. Heggland EI, Eichner C, Stove SI, Martinez A, Nilsen F, Dondrup M. A scavenger receptor B (CD36)-like protein is a potential mediator of intestinal heme absorption in the hematophagous ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Sci Rep*. 2019;9 1:4218; doi: 10.1038/s41598-019-40590-x.
6. Harðardóttir HM, Male R, Nilsen F, Eichner C, Dondrup M, Dalvin S. Chitin synthesis and degradation in *Lepeophtheirus salmonis*: Molecular characterization and gene expression profile during synthesis of a new exoskeleton. *Comp Biochem Phys A*. 2019;227:123-33; doi: 10.1016/j.cbpa.2018.10.008.

