

SLUTTRAPPORT FOR «HOST IMMUNITY AND SKIN MICROBIOME INTERPLAY – IMPORTANCE FOR PROTECTION AGAINST SEA LICE INFECTION IN ATLANTIC SALMON» (SLIMY)

RAPPORTDATO

FHF-PROSJEKTNUMMER

UTFYLT AV

1. desember 2023

901566

Øystein Evensen

1. SAMMENDRAG

I dette prosjektet har vi studert effekt av vaksinasjon/aktiv immunisering mot lakselusinfestasjon hos atlantisk laks. Alle forsøk har vært gjennomført som karforsøk og vaksinert fisk har blitt smittet eksperimentell med kopepoditter. Vi har også gjort noen studier av fiskens hudmikrobiom etter smitte med spesiell vekt på mykobiomet. Det har også vært gjennomført smittestudier med kopepoditter etter kondisjonering med probiotiske bakterier. Vi har vaksinert laks med antigener fra hele lakselus som har bestått av chalimus, voksne hunn- og hannlus samt eggstrenger. Antigenene har vært laget ved at de ulike stadiene har vært homogenisert og så frysetørket.

Vaksinene har vært tillaget ved å veie frysetørket pulver inn i en vannløsning, dernest formulert som en vann-i-olje emulsjon. Emulsjonsvaksinene har vært levert intraperitonealt (IP) eller subcutant (SC). Videre har vi valgt ut proteiner fra lakselus som har blitt uttrykt rekombinant, antigenene har blitt rensert opp og blitt formulert i en emulsjonsvaksine. På samme måte har vi også benyttet DNA vaksiner som koder for definerte luse-proteiner som intramuskulær vaksinasjon. Vaksinasjon med hel-lus antigener gir et redusert påslag etter eksperimentell smitte i karforsøk.

Reduksjonen i lusepåslag varierer, i noen av forsøk helt opp mot 90% relativ reduksjon og funnene er konsistente gjennom flere forsøk. Det er vist at vaksinen gir en dose-respons effekt, samt at fisk som er vaksinert med ulike doser og som holdes i samme kar også gir en dose-respons effekt. På samme måte har vi vist at vaksiner basert på rekombinante proteiner gir en meget god relativ beskyttelse, mens DNA vaksiner så langt ikke har gitt signifikant reduksjon i lusepåslag. På basis av disse forsøkene er det gode indikasjoner for at vaksinasjon med hele lakselus eller definerte rekombinante proteiner reduserer lusepåslaget ved eksperimentell smitte. Alle resultatene er basert på karforsøk. Videre er det vist i flere forsøk at det er en sammenheng mellom målte nivåer av sirkulerende antistoffer mot lakselus-antigener og lusetall etter eksperimentell smitte. Det aktive prinsipp er sannsynligvis ikke knyttet til antistoffer per se, men det gir indikasjoner om at måling av antistoffer med ELISA etter vaksinasjon mot lakselus kan være et *in vitro* mål på endringer i det immunlandskapet som gir redusert lusepåslag. De underliggende mekanismene er ikke kjent.

Et annet funn, som også er vist i flere forsøk, er at måten vaksinene leveres på betyr mye. Generelt så gir en IP-vaksinasjon eller en SC-vaksinasjon hver for seg, den beste effekten. Hvis det gis en kombinasjon av de to administrasjonsveiene, så reduseres effekten av begge, selv om dosen doubles. Det er ikke enkelt å forklare de underliggende mekanismene; en mulig forklaring kan ligge i de «pre-programmerte» immunlandskapet hos laks ved eksponering for lus over/på eller i nærheten av slimhinner. Vi finner at immunresponsen nulles ut og dette avleses som redusert effekt og redusert antistoffnivå både for høy og lav antigendose.

På samme måte som en IP-SC kombinasjon reduserer effekten så har vi også vist at en IP – oral boost kombinasjon kommer dårligere ut en IP alene. Hvorvidt laks har en samordnet systemisk og lokal respons som har en effekt på tvers av ulike slimhinner er ikke kjent.

Samlet sett er vi mer håpefulle for at det skal være mulig å utvikle en vaksine mot lakselus-infestasjon nå enn når vi startet prosjektet. Det er vist i flere av våre studier at man oppnår et redusert lusepåslag etter vaksinasjon.

ENGLISH SUMMARY

In this project, we have studied the effect of vaccination/active immunization against salmon lice infestation in Atlantic salmon. All trials have been carried out as tank trials and vaccinated fish have been experimentally infected with copepodites. We have done studies of the fish skin microbiome after infection, with particular emphasis on the mycobiome. Challenge studies have been carried out with copepodites after conditioning with probiotic bacteria.

We have vaccinated salmon with antigens from whole lice that have consisted of chalimus, adult female and male lice as well as egg strings. The antigens have been made by homogenizing the various stages and then freeze-drying them. The vaccines have been prepared by weighing freeze-dried powder into a water solution, then formulated as a water-in-oil emulsion. The emulsion vaccines have been delivered intraperitoneally (IP) or subcutaneously (SC). Furthermore, we have selected proteins from salmon lice that have been expressed recombinantly, the antigens have been purified and formulated in an emulsion vaccine. In the same way, we have also used DNA vaccines that code for defined louse proteins as intramuscular vaccination.

Vaccination with whole louse antigens results in a reduced infestation after experimental infection in tank trials. The reduction in lice infestation varies, in some trials up to a 90% relative reduction and the findings are consistent across several trials. It has been shown that the vaccine produces a dose-response effect, and that vaccines given to fish at different doses and where the fish are cohabited, give a dose-response effect. In the same way, we have shown that vaccines based on recombinant proteins provide very good relative protection, while DNA vaccines have so far not provided a significant reduction in lice infestation. On the basis of these experiments, there are good indications that vaccination with whole salmon lice or defined recombinant proteins reduces the burden of lice during experimental infection. All results are based on tank tests.

Furthermore, it has been shown in several experiments that there is a correlation between measured levels of circulating antibodies against salmon lice antigens and lice numbers after experimental infection. The active principle is probably not linked to antibodies per se, but it gives indications that measuring antibodies with ELISA after vaccination against salmon lice can be an *in vitro* measure of changes in the immune landscape that results in reduced lice infestation. The underlying mechanisms are not known.

Another finding, which has also been shown in several trials, is that the mode of delivery matters. In general, an IP vaccination or an SC vaccination separately gives the best effect. If a combination of the two routes of administration is given, the effect of both is reduced, even if the dose is doubled. It is not easy to explain the underlying mechanisms; a possible explanation may lie in the "pre-programmed" immune landscape of salmon when exposed to lice on/on or near mucous membranes. We find that the immune response is zeroed out when combined delivery methods are used, read as a reduced effect and reduced antibody levels for both high and low antigen doses.

In the same way that an IP-SC combination reduces the effect, we have also shown that an IP - oral boost combination comes out worse than IP alone. Whether salmon has a coordinated systemic and local response that has an effect across different mucous membranes is not known.

Overall, we are more hopeful that it will be possible to develop a vaccine against salmon lice infestation now than when we started the project. It has been shown in several of our studies that a reduced lice infestation is achieved after vaccination.

2. INNLEDNING

Faglig bakgrunn og prosjektets omfang

Det finnes i dag ingen vaksiner mot lakselusinfestasjon hos laks. Det er vanskelig å finne fram til antigener fra lusa som kan være egnet for å framkalle beskyttende immunresponser. Flere studier har brukt en skjult antigenstrategi (overført fra *Boophilus microplus*-vaksinen hos storfe), og resultatene som i utgangspunktet var lovende har vært vanskelige å reproducere. NMBU/Aqua har deltatt i Sea Lice Research Center (SLRC) med fokus på immunmodulering av verten, blant annet for å utvikle immunprofylaktiske prinsipper mot infeksjon uten at man har lyktes med å komme fram til et vaksinekonsept som virker. Dette kan det være flere grunner til; antigenenes egenskaper, vaksinedose (antigenmengde), vaksinasjonsmåte, smitte modeller og så langt ukjente forhold.

Behovet for alternative metoder for lusekontroll er presserende og profylaktiske tilnærminger er langt å foretrekke framfor dagens mekaniske metoder basert på uttalt håndtering av fisken flere ganger gjennom produksjonsfasen.

Prosjektet har inkludert ulike vaksinetilnærminger fra DNA/plasmid-vaksinasjon, ulike leveringsmåter (modaliteter), kombinasjoner av injeksjon og oral boost, prime-boost vaksinasjon med rekombinante antigener formulert i ulike adjuvansvaksiner levert som intraperitoneal injeksjonsvaksiner, betydningen av vaksinens injeksjonssted samt at prosjektgruppen har vært involvert i uttesting av mikrobiom kondisjonering med etterfølgende smitte med kopepoditter. Det har også vært gjennomført analyser av mykobiommet i forbindelse med luseinfestasjon.

3. PROBLEMSTILLING OG FORMAL

Hovedmålet med dette prosjektet har vært å få en bedre forståelse for potensialet for bruk av vaksinasjon mot lakselusinfestasjoner hos atlantisk laks.

I løpet av prosjektperioden har følgende problemstillinger vært studert:

FORSØK I:

- 1) Effekt av bruk av hel-lus antigener som grunnlag for å beskytte mot eksperimentell infestasjon med kopepoditter under eksperimentelle betingelser i karforsøk
- 2) Betydningen av vaksinemodalitet og kombinasjoner av disse ved bruk av luseantigener, dvs. vil intraperitoneal injeksjon gi et annet resultat enn vaksinen leveres subkutan og hva hvis de kombineres
- 3) Betydningen av en kombinert injeksjon som primærvaksinasjon kombinert med en oral boost eller en oral immunisering alene, igjen basert på hele lus-antigener

FORSØK II:

- 4) Effekt av vaksinedose ved bruk av luse-antigener fra alle utviklingsstadier

FORSØK III:

- 5) Effekt av vaksinerings via ulike administrasjonsveier og antigen doser og effekt på tilhefting og utvikling av lakselus

FORSØK IV:

- 6) Effekt av DNA vaksinasjon og kombinasjonen av DNA vaksine som primærvaksinasjon og en boost-vaksine med definerte, rekombinante luseantigener

FORSØK V:

- 7) Effekt av definerte rekombinante antigener fra lus gitt som olje-basert emulsjonsvaksiner som en engangsvaksine eller som en prime-boost vaksine

FORSØK VI:

- 8) Sammenhengen mellom sirkulerende antistoffer mot hele luse-antigener og beskyttelse mot infestasjon, dvs. kan antistoffnivå benyttes som en proxy for å vurdere beskyttelse mot infestasjon

FORSØK VII

- 9) Effekt av kondisjonering av hudens mikrobiota med probiotiske bakterier før infestasjon med kopepoditter og effekt av infestasjon på hudens mikrobiota etter infeksjon

Prosjektet har vært koordinert av Øystein Evensen. Samarbeidspartnere har vært Veterinærinstituttet (Prof. Ida Skaar) og University of Berkeley, California (i deler av prosjektet, Professor John Taylor). Vi har også hatt samarbeid med Previwo knyttet til mikrobiom-kondisjonering (PhD student Marius Dobloug, og Kira Salonijs).

Prosjektgruppen har bestått av Vidar Aamo Nikolaisen, Grieg Seafood, Henrik Duesund, Cermaq and Bjarne Reinert, Lerøy SFG. Kjell Maroni og Sven-Martin Jørgensen har deltatt på møtene fra FHF.

4. PROSJEKTJENNOMFØRING

FORSØK I: EFFEKT AV BRUK AV HEL-LUS ANTIGENER SOM GRUNNLAG FOR Å BESKYTTE MOT EKSPERIMENTELL INFESTASJON MED KOPEPODITTER UNDER EKSPERIMENTELLE BETINGELSER I KARFORSØK (1) ¹, EFFEKT AV ULIKE VAKSINASJONSMODALITETER (2) OG EFFEKT AV IMMUNSERING VIA ORAL RUTE (MED FØR) (3)

Antigentillaging

Studiene startet med å etablere metoder for tillaging av antigener fra luseegg, chalimus og voksne lus-stadier (hunn- og hannlus) og eggstrenger. Lus var innsamlet fra felt i forbindelse med mekanisk avlusing og innsamlet lus ble overført til 10% bufret formalin, vasket og sortert. Deretter ble de ulike stadiene homogenisert hver for seg og så frysetørket (<3-4% vann etter tørking). Antigenene blandes sammen i like forhold (vektbasert) i sterilt vann for formulering eller levering (avhengig av metode som anvendes). Vaksinen er steril og gis intraperitonealt (0.1 ml/fisk) under anestesi eller via ytre slimhinner.

Oppsett/vaksineformuleringer

Atlantisk laks (≈75g gjennomsnittlig levende vekt, smolt) ble vaksinert med hel-lus antigener som beskrevet ovenfor. Det er benyttet ulike leveringsmåter og ulike formuleringer som også inkluderte immunmodulatorer, tabell 1.

¹ Tallene refererer seg til de ulike problemstillingene listet under *Problemstilling og formål*

Tabell 1. Oversikt over vaksiner/leveringsmåter og antall fisk inkludert i de ulike gruppene. Oral boost ble gitt ca. 350 døgngader etter primærinjeksjon. Smitte for alle gruppene ble gjennomført 450 døgngader etter primærvaksinasjon.

Vaksiner / antigen kombinasjoner	Leveringsmåte (modalitet)	Antall fisk/antall kar
Hele luse-antigener	Intraperitoneal	15 x 2
Hele luse-antigener	Oralt	15 x 2
Hele luse-antigener	Intraperitonealt + oral boost	15 x 2
Hele luse-antigener	Intraperitonealt + injeksjon i hud (samtidig)	15 x 2
Hele luse-antigener + LPS + recCCL4	Intraperitonealt	15 x 2
Kontroll – injisert med PBS	Intraperitonealt	15 x 2

Vaksinasjonsmåte/modalitet

Frysetørkede luseantigener ble oppløst i sterilt vann og formulert i en vann-i-olje emulsjon (70:30 olje/vann w/w, ISA 763 VGA, Seppic), blandet ved homogenisering og benyttet for intraperitoneal eller subcutan injeksjon (0.1 ml/fisk for begge leveringsmåter). LPS er lipopolysakkarid fra *E. coli* og CCL4 er et chemokin (fra laks) som er inflammasjonsfremmende. Hensikten er å øke/modulere inflammasjon i etterkant av vaksinasjon for å fremme dannelsen av antistoffer (immunmodulering/immunologisk adjuvans).

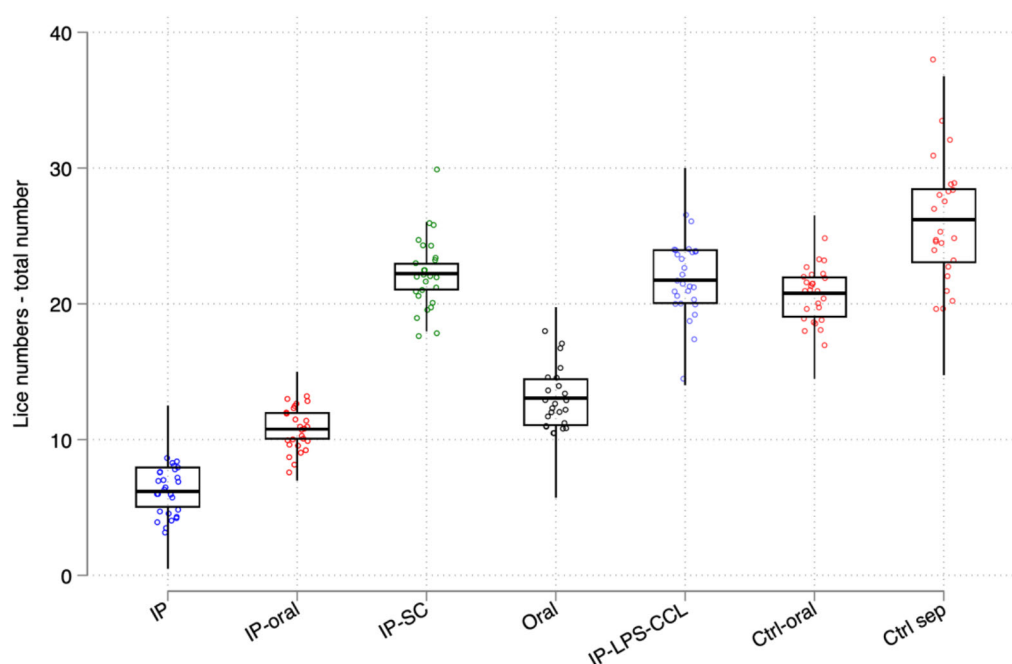
For de gruppene som ble gitt vaksinene oralt så ble fôret coatet med luseantigener som var løst i sterilt vann, emulgert med Miglyol 840, og sprayet på overflaten av fôrpelleten. Deretter ble coatet fôr oppbevart i romtemperatur i 24 timer for tørking og så lagret kjølig (4 °C). Daglig utfôring var 1.5% av fiskens vekt i 7 dager (som primærimmunisering eller oral boost, Tabell 1). Oral boost ble gitt ca. 300 døgngader etter primærimmunisering og fisken ble smittet 450 døgngader etter primærimmunisering.

Smitte

Smitte ble gjennomført ved bading i stillestående vann (i karene) i 30 minutter og hvor det ble tilført 30 kopepoditter/fisk i karet. Etter 30 min ble vannstrømmen satt på. Telling av lus ble gjennomført 29 dager etter smitte.

Resultater

Gjennomsnittlig antall lus i kontrollgruppen var 26.2 (gjennomsnitt for 2 tanker), bestående av noen chalimus II, preadulte og noen adulte lus (begge kjønn). Lusetallet i de immuniserte gruppene framgår av Figur 1.



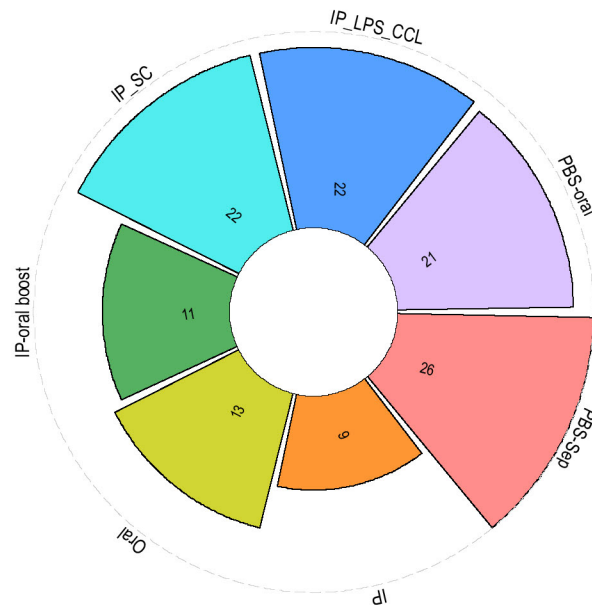
Figur 1. Antall lus i ulike vaksinegrupper og kontroller. Ctrl-sep er kontrollgruppen (holdt alene i eget kar) og Ctrl-oral er en kontrollgruppe som ble holdt sammen med oral-gruppen. Gjennomsnitt $\pm$ 25/75 percentiler samt 95% konfidensintervall vist ved spikene over/under boksene.

Antall lus er også gjengitt i Tabell 2 og viser lusetall i kontrollgruppen og de ulike vaksinerte gruppene som den relative reduksjonen lusetall relativt til kontrollgruppen (Ctrl-sep), og framstilt figurlig (Figur 2).

Tabell 2. Antall lus og reduksjonen i antall lus i de ulike vaksinerte gruppene.

Vaksiner / antigen kombinasjoner	Leveringsmåte (modalitet)	Lusetall (gjennomsnitt) $\pm$ SEM	Prosent reduksjon relativt til Ctrl-sep
Hele luse-antigener	Intraperitoneal (IP)	6.2 ($\pm$ 0.31)	76.3
Hele luse-antigener	Oralt	13.0 ($\pm$ 0.44)	50.4
Hele luse-antigener	Intraperitonealt + oral boost	10.8 ($\pm$ 0.30)	58.8
Hele luse-antigener	Intraperitonealt + injeksjon subkutan (SC, samtidig)	22.2 ($\pm$ 0.52)	14.9
Hele luse-antigener + LPS + recCCL4	Intraperitonealt	21.7($\pm$ 0.51)	17.2
Kontroll (Ctrl-oral)	Intraperitonealt (PBS) gruppe holdt sammen med oral gruppe (i samme kar)	20.8 ($\pm$ 0.38)	20.6
Kontroll (Ctrl-sep)	Intraperitonealt (PBS), fisken er holdt i et separat kar	26.2 ($\pm$ 0.94)	-

Lusetall i ulike vaksinegrupper - og kontroll



Figur 2. Oppsummering av lusetall i de ulike vaksinegruppene og PBS-kontrollene.

Diskusjon/konklusjon

Det er flere resultater i denne studien som er overraskende. For det første er effekt av IP vaksinasjon veldig god, under relativt høyt smittepress oppnås mer enn 75% reduksjon i lusepåslag. Når ip injeksjon kombineres med en injeksjon av samme formulering/antigenmengde subkutan får man en markant redusert effekt, relativ beskyttelse på 15%. Vi har ingen forståelse av de underliggende mekanismene.

På samme måte så gir kombinasjonen av intraperitoneal og oral boost en redusert effekt sammenlignet med ip injeksjon alene. Oral immunisering alene gir igjen noe lavere beskyttelse, men likevel en relativ beskyttelse på 50%.

LPS/CCL4 vil gi en styrket inflammasjon med vekt på makrofager og vil gi økt produksjon av pro-inflammatoriske cytokiner. Det er tidligere vist at proinflammatoriske responser kan settes i sammenheng med redusert lusepåslag¹ og ideen var at økning av den inflammatoriske responsen vil forsterke effekten av vaksinasjon med luse-antigener.

FORSØK II: EFFEKT AV VAKSINEDOSE VED BRUK AV LUSE-ANTIGENER FRA ALLE UTVIKLINGSSTADIER

Oppsett/vaksineformuleringer

Atlantisk laks (≈ 150 g gjennomsnittlig levende vekt, smolt) ble vaksinert med hel-lus antigener som beskrevet ovenfor. Målsettingen var å foreta en studie basert på ulike doser med luse-antigener inkludert i vaksineformuleringen. Det ble benyttet en vann-i-olje emulsjon, ISA763 VGA (Seppic, Frankrike), som ble gitt intraperitonealt, 100 μ l/fisk under bedøvelse. Det ble benyttet et common-garden oppsett hvor begge de vaksinerte grupper (0.5 og 2.0 μ g/g, $n=15$ /dose) ble satt sammen i 2 parallelle kar sammen med et likt antall PBS-injisert fisk, dvs. 15 fisk pr gruppe, 45 fisk pr kar i to paralleller. I tillegg inngikk 2 kar hver med 45 fisk som var ubehandlet, Tabell 3. Oppsettet er vist i Figur 3.

Tabell 3. Ulike grupper og doser, leveringsmåte og sammensetning av gruppene pr kar.

Vaksiner / antigen kombinasjoner	Leveringsmåte (modalitet)	Dose	Antall fisk pr kar	Kar nr.
H e l e l u s e - antigener	Intraperitoneal	2 μ g/g levende vekt	15	1 og 2
H e l e l u s e - antigener	Intraperitoneal	0.5 μ g/g levende vekt	15	1 og 2
Kontroll	Intraperitonealt	PBS (saltvann)	15	1 og 2
U b e h a n d l e t kontroll	-	-	45	3 og 4



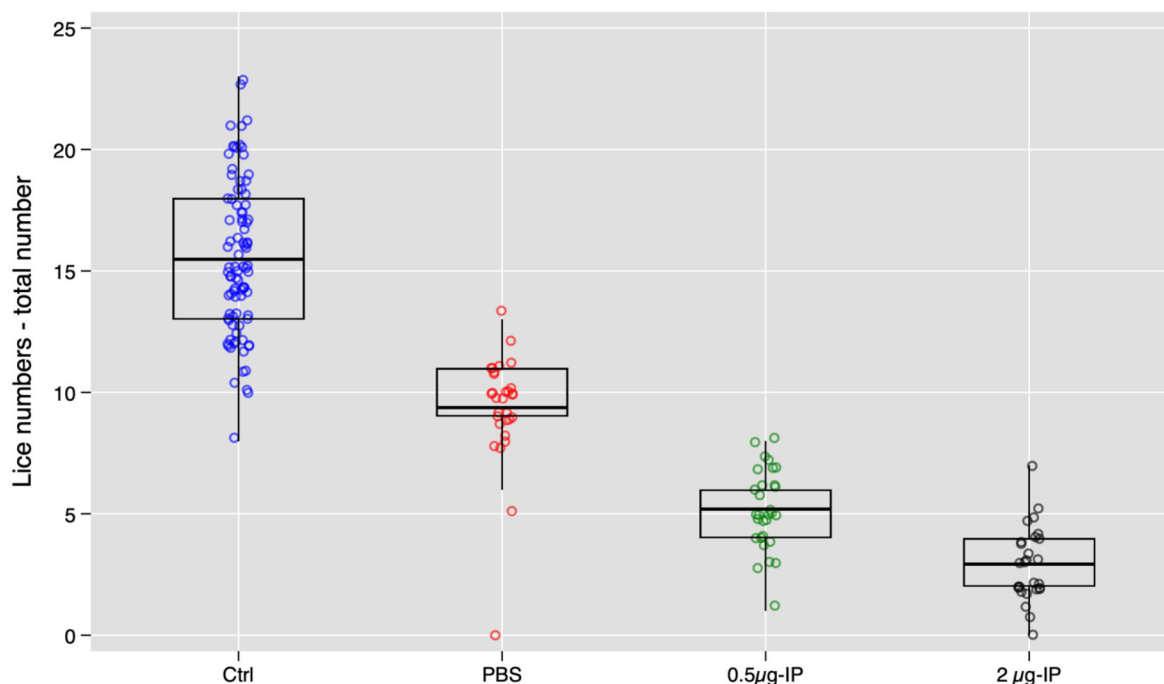
Figur 3. Common-garden oppsett og smitte med copepoditter; alle grupper går sammen i et kar (duplikat) samt ubehandla kontroll i 2 separate kar, $n=45$ i hvert kar.

Smitte

Smitte ble gjennomført ved bading i stillestående vann (i karene) i 30 minutter og hvor det ble tilført 20 copepoditter/fisk i karet. Etter 30 min ble vannstrømmen satt på. Telling av lus ble gjennomført 28 dager etter smitte.

Resultater

Lusetall i vaksinerte grupper (0.5 og 2 µg/g levende vekt) ble sammenlignet med ubehandlet fisk som gikk i separate kar. Lusetallene i ubehandlet gruppe var 15.5 ± 0.3 / fisk, mens tilsvarende tall i 2.0 µg gruppen var 2.9 ± 0.29 og i 0.5 µg gruppen 5.2 ± 0.29 (gjennomsnitt $\pm$ SEM for alle). I PBS-injisert fisk som gikk sammen med de vaksinerte gruppene, var gjennomsnittlig lusetall 9.4 ± 0.42 . Dette framkommer av Figur 4. Ved telletidspunktet var hoveddelen av lusepopulasjonen i alle kar preadulte, med noe variasjon (noe chalimus II og noen adulte hunn- og hannlus).



Figur 4. Lusetall vist som boxplot $\pm$ 25/75 percentiler og 95% CI for alle grupper.

Den relative reduksjonen i lusetall er 81% for 2 µg-gruppen og 66.4% for 0.5 µg-gruppen. Det er også en markant reduksjon i lusetall for PBS-gruppen som kohabiterer med de vaksinerte gruppene, 39.3% reduksjon sammenlignet med ubehandla kontroll (Ctrl). Sammenlignet med «intern» PBS-gruppe er den relative reduksjonen henholdsvis 69% og 45%.

Diskusjon/konklusjon

For sammenlignbare grupper så samsvarer resultatene med Forsøk I. I tillegg ser vi en dose-respons effekt for fiskegrupper som har blitt vaksinert med ulike antigendoser og som holdes i samme kar. Det styrker validiteten til resultatene. Det faktum at PBS-injisert fisk som holdes sammen med vaksiner fisk har lavere nivå av lus tilskrives en type flokk-immunitet. Det er også tatt blodprøver at de vaksinerte fiskene og resultatene fra dette forsøket og et senere forsøk er summert opp i rapport V.

‘Commen garden’ forsøk hvor vaksinerte og uvaksinerte fisk settes sammen i et kar og smittes gir gode indikasjoner for at immunseringen har innvirkning på tilhefting av kopepoditten og/eller utvikling av lakselusa fram til pre-adult/adult stadium. I neste forsøk er det foretatt telling ved tilhefting og 28 dager etter smitte for å belyse hvorvidt det er selve tilheftingen som forstyrres eller om det er utviklingen som stanser opp hos vaksinerte fisk.

FORSØK III: EFFEKT AV VAKSINERING VIA ULIKE ADMINISTRASJONSVEIER OG ANTIGENDOSER OG EFFEKT PÅ TILHEFTING OG UTVIKLING AV LAKSELUS

Oppsett/vaksineformuleringer

Atlantisk laks (60g, parr ved vaksinasjonstidspunkt) ble vaksinert med ulike vaksineformuleringer, alle vann-i-olje baserte emulsjoner med to ulike doser og i ulike kombinasjoner som vist i Tabell 4.

Tabell 4. Ulike vaksinegrupper som inngikk i forsøket, leveringsmåte av vaksinene, dose og antall fisk pr gruppe.

Vaksiner / antigen kombinasjoner	L e v e r i n g s m å t e (modalitet)	Dose	Antall fisk pr gruppe
Gr 1	Intraperitoneal (IP)	2.0 µg/g levende vekt (lv)	60
Gr 2	Subcutant (SC)	2.0 µg/g lv	60
Gr 3	IP + SC	2.0 µg/g lv (4 µg/g totalt)	60
Gr 4	IP	0.2 µg/g lv	60
Gr 5	SC	0.2 µg/g lv	60
Gr 6	IP+SC	0.2 µg/g lv (0.4 µg/g totalt)	60
Gr 7	IP	PBS	60
Gr 8	SC	PBS	60

Emulsjonene ble tillaget med ISA763 VGA (Seppic, Frankrike), og ferdige vaksiner ble gitt intraperitonealt, 100 µl/fisk under bedøvelse. Det ble benyttet et ikke fullstendig common-garden oppsett; Gr 1 var i samme kar som Gr 3, likeledes Gr 4 og Gr 6, Gr 2 med Gr 5 og Gr 7 med Gr 8 satt sammen.

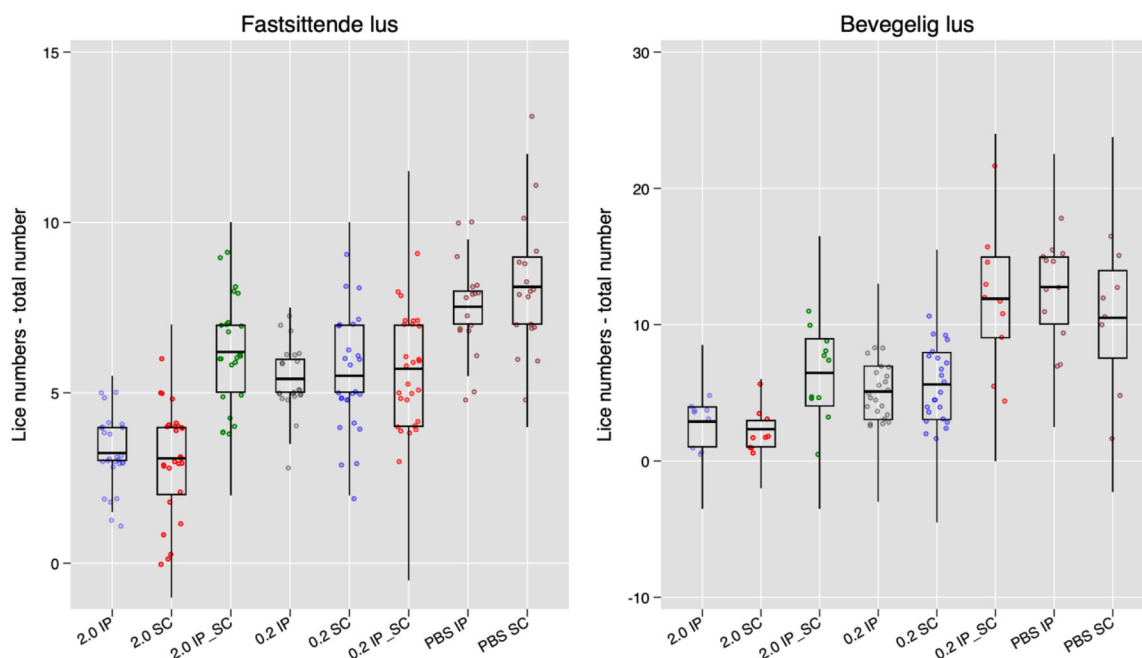
Prøvetaking med telling av lus ble gjort 2, 7, 14 og 28 dager etter smitte. For tidspunktene 2, 7 og 14 dager etter smitte ble det tatt ut 3 fisk/kar (9 fisk totalt pr. tidspunkt) for de ulike gruppene for lusetelling. Dette ble gjort ved å undersøke hver finne, hudoverflaten samt gjellene. Lusetallet for de ulike gruppene ble summert for de tre tidspunktene.

Resultater

I denne studien var vi spesielt interessert i å avklare om mønsteret i lusetall pr gruppe var det samme på tidlig tidspunkt etter smitte sammenlignet med 28 dager etter smitte. Som det framgår av Figure 5 så er det samme forhold mellom de ulike vaksinerte gruppene og kontrollene kort tid etter smitte med fastsittende kopepoditter/chalimus som ved siste tellepunkt. Det er et lite avvik for Gr 6 som er noe høyere kort tid etter smitte sammenlignet med 28 dager etter smitte. Infeksjonsgraden er som i tidligere forsøk for kontrollene og ikke forskjellig for fisk som har blitt injisert med PBS intraperitonealt og subcutant.

I denne studien har vi også adressert funnene fra Forsøk II hvor det ble påvist at en samtidig vaksinerings IP og SC gav redusert effekt sammenlignet med ip alene. Her ser vi at Gr 2 som kun har blitt vaksinert SC har like lavt lusetall som IP vaksinert gruppe. Det interessante er at vi repeterer

resultatene fra Forsøk II når det gjelder effekt av samtidig injeksjon IP og SC, effekten av vaksinasjon reduseres sammenlignet med enkel injeksjon IP eller SC. I tillegg ser vi igjen en dose-effekt både for enkel vaksinasjon IP og SC, en dose på 0.2 $\mu\text{g/g}$ dårligere relativ beskyttelse sammenlignet med 2.0 $\mu\text{g/g}$ (Figur 5).



Figur 5. a) Fastsittende lus. Lusetall i tidlig fase av infeksjonen, 2, 7 og 14 dager etter smitte. Lusetallene er summert for de tre tidspunktene (pr gruppe). b) Bevegelig lus. Lusetall 28 dager etter smitte. Boxplott med gjennomsnitt og 25/75% percentiler, $\pm$ 95% konfidensintervall.

Diskusjon/konklusjon

Det er flere interessante funn i denne studien. Først og fremst så synes vaksinasjon og den immunrespons som vaksinene gir å innvirke på antall lus som fester seg i tidlig stadium av infeksjonen. Derne st så gir vaksinasjonsmodaliteter basert på IP og SC likeverdig effekt mens en kombinasjon igjen viser seg å «nulle ut» effekten av enkeltvaksinasjon. Igjen så er de underliggende mekanismer ikke avklart, men studier pågår for å karakterisere de underliggende medfødte og adaptive immunresponser samt at vi foretar proteom og metabolom studier av ulike grupper av fisk i dette forsøket. Disse studiene er ikke avsluttet.

FORSØK IV: EFFEKT AV DNA VAKSINASJON OG KOMBINASJONEN AV DNA VAKSINE SOM PRIMÆRVAKSINASJON OG EN BOOST-VAKSINE MED DEFINERTE, REKOMBINANTE LUSEANTIGENER

Oppsett/vaksineformuleringer

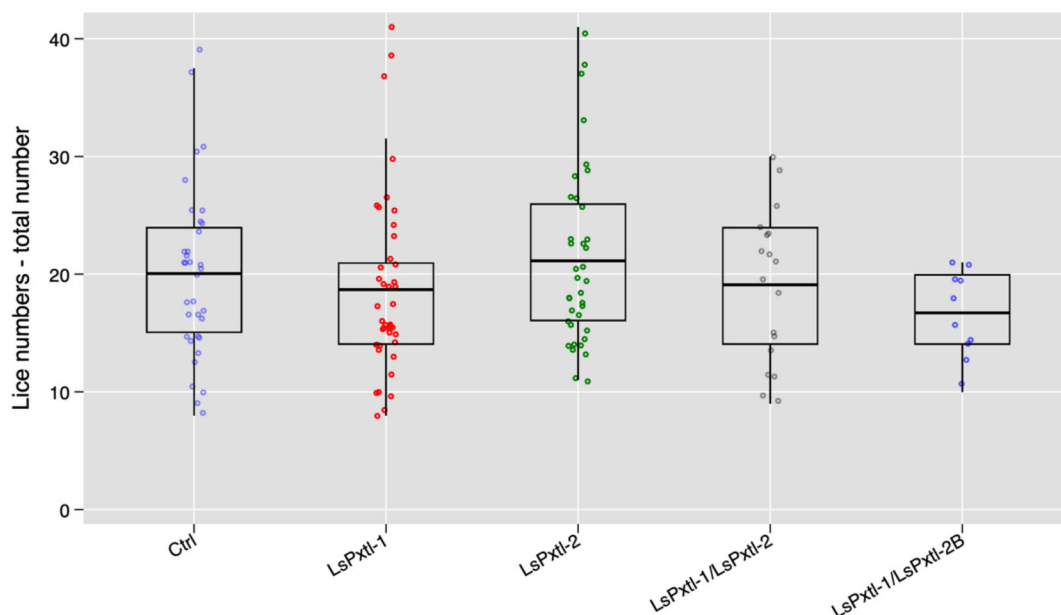
Denne studien er publisert (iScience i 2023)² og det gis en kort oppsummering her. Studien er basert på en identifisering og karakterisering av to varianter av heme-peroxidaser hos lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*), LsPtxl-1 og LsPtxl-2, og disse ble benyttet som utgangspunkt for tillaging av to ulike DNA vaksiner som ble gitt for primærimmunisering alene eller i kombinasjon, og en rekombinant vaksine (protein) for LsPtxl-2 som ble gitt som boost til gruppen som hadde fått DNA LsPtxl-1/LsPtxl-2 (kombinert) som primærvaksinasjon.

Atlantisk laks (gjennomsnitt 68g) ble vaksinert med intramuskulær injeksjon med 20 µg/fisk med DNA (enkel injeksjon) og 10 µg/fisk for den gruppen som ble gitt en kombinasjon med plasmid som koder for LsPtxl-1 og LsPtxl-2. Gruppen gitt protein boost ble injisert intraperitonealt med en ISA 763 VGA formulert vaksine, 50 µg/fisk.

Fisken ble smittet 60 dager etter primærvaksinasjon med 60 kopepoditter og med bruk av en metode som angitt ovenfor. Fisken ble avlivet med en overdose med anestesimiddel 19 dager etter smitte fulgt av ordinær lusetelling.

Resultater

Det ble påvist 20 lus/fisk i kontrollen. I vaksinerte grupper var det ingen reduksjon i lusetall sammenlignet med kontrollgruppen (Figur 6). Lavest lusetall på påvist i gruppen gitt en kombinert DNA-vaksine og en protein-boost vaksine.



Figur 6. Lusetall i de ulike gruppene etter vaksinasjon, lavest i gruppen gitt en kombinert DNA vaksine som primærimmunisering og med LsPtx-2 protein som boost, $p > 0.05$ for alle grupper sammenlignet med kontrollgruppen. Box-plott med gjennomsnitt, 25%/75% percentiler samt 95% konfidensintervall i spikene.

Diskusjon/konklusjon

Det er ikke vist signifikant effekt av vaksinasjon basert på DNA vaksiner som koder for to ulike heme-peroksydaser hos lakselus. En kombinasjon av DNA/protein vaksinasjon viser noe bedre effekt enn DNA-vaksinering alene. Vaksine-dosen som ble gitt som primærimmunisering er på et nivå eller over det som benyttes for kommersielle vaksiner mot virusinfeksjoner hos laks, og den dose som ble gitt som protein-boost er $<1 \mu\text{g/g}$ levende vekt, noe i underkant av det som har vært benyttet for vaksinasjon mot virusinfeksjoner. Det er en mulighet for at en optimalisering av vaksineregimet / dosering kan gi en bedre effekt.

DNA vaksiner gir generelt lave sirkulerende antistoff-nivåer noe som også ble dokumentert i denne studien² og en kombinasjon av DNA og protein-boost vil generelt gi bedre antistoffresponser, som også vist i denne studien.

I Forsøk V er det gjennomført en studie hvor vi kombinerer en primær- og boost immunisering med en proteinvaksine rettet mot definerte proteiner hos lakselus.

FORSØK V: EFFEKT AV DEFINERTE REKOMBINANTE ANTIGENER FRA LUS GITT SOM OLJE-BASERT EMULSJONSVAKSINER SOM EN ENGANGSVAKSINE ELLER SOM EN PRIME-BOOST VAKSINE

Oppsett/vaksineformuleringer

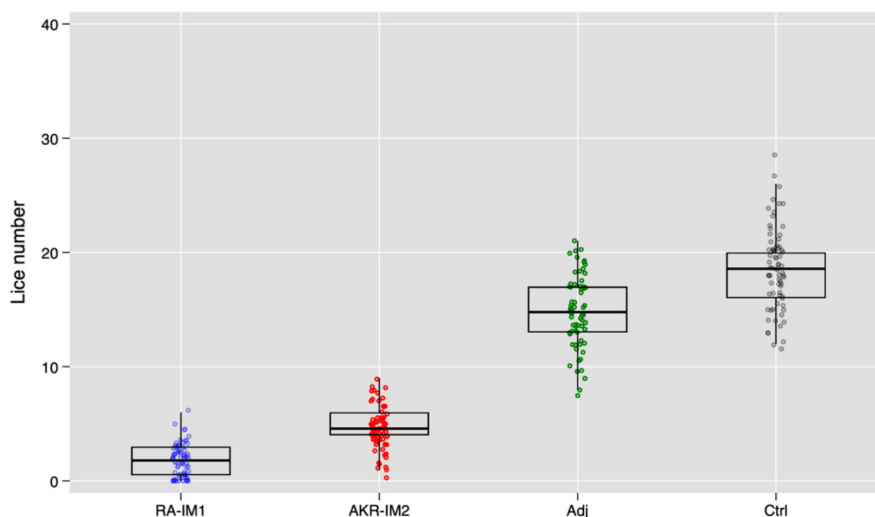
Forsøket er basert på to ulike luseantigener som er beskrevet i tidligere forsøk^{3, 4} ; et ribosomalt antigen (RA) og akirin (AKR) som regulerer signal-overføring og medfødte immune responser hos evertebrater. Det er også benyttet immunmodulatorer (IM1 og IM2) i disse studiene eller molekulære adjuvans⁵. Vaksinene ble gitt som prime-boost injeksjon (300 døgngader mellom prime og boost) til atlantisk laks, 55g ved første vaksinasjon. Tre parallelle tanker for hver vaksine, adjuvans-kontroll og uvaksinerte kontroller. Det ble benyttet en vann-i-olje, mineral-adjuvans (Seppic) ved både prime- og boost-vaksinasjon.

Smitte med *Lepeophtheirus salmonis* kopepoditter (30 copepoditter/fisk) ble gjennomført 15 uker etter primær-immunsering, og telling av lus ble gjennomført 30 dager etter smitte.

Resultater

Det ble påvist 18.6 ± 0.4 (SEM) lus i gjennomsnitt i kontrollgruppen og et meget lavt antall i de to vaksinerte gruppene, 1.8 ± 0.16 lus/fisk i gjennomsnitt for RA-IM1 gruppen og 4.6 ± 0.22 lus/fisk for AKR-M2 gruppen (Figur 7). Fisk gitt kun adjuvans hadde et lusetall på 14.7 ± 0.38 .

Den relative reduksjon i lusetall for RA-IM1 vaksinert fisk er 91% og for AKR-M2 gruppen 75%. Infeksjonseffektiviteten var relativt høy (62%).



Figur 7. Lusetall etter smitte 6 måneder etter prime-/boost-vaksinasjon. Box-plott med gjennomsnitt samt 25/75% percentiler og 95% konfidensintervaller (spikes).

Diskusjon/konklusjon

Disse studiene gir gode indikasjoner for at definerte, rekombinante proteiner som gis formulert som vann-i-olje adjuvans kan gi gode immunresponser etter vaksinasjon. Det er godt kjent at olje-adjuvans vil gi en betydelig humoral respons med høye nivåer av sirkulerende antistoffer. Utfordringen ligger i å dokumentere at det er god sammenheng mellom antistoffnivå og reduserende effekt på lakselusinfestasjon. Det er ikke gitt at det primært er antistoffer som er det «aktive prinsipp», men nivå av sirkulerende antistoffer kan gi være en proxy for de immunresponser som faktisk gir en beskyttelse mot tilhefting og utvikling av lusa. I Forsøk VI oppsummerer vi resultatene fra måling av antistoffer for flere av de forsøkene som er beskrevet i Forsøk I – Forsøk V.

FORSØK VI: SAMMENHENGEN MELLOM SIRKULERENDE ANTISTOFFER MOT HELE LUSE-ANTIGENER OG BESKYTTELSE MOT INFESTASJON

Oppsett/metoder

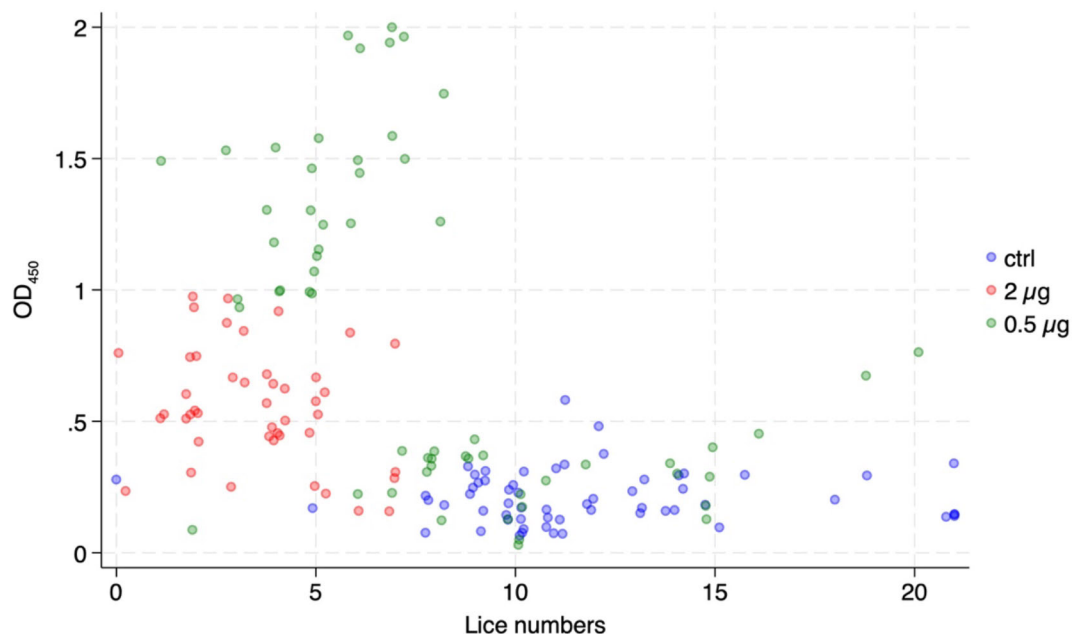
Måling av antistoffer er gjort ved bruk av ELISA-metoder hvor vi enten coater bunnen av ELISA-platene med antigener fra homogenat av lakselus (alle stadier som beskrevet ovenfor) eller med rekombinante antigener i de tilfellene hvor de har vært tilgjengelige. Detaljene framkommer for de ulike forsøkene.

Blodprøvene fra atlantisk laks har blitt tatt med bruk av vacutainer tilsatt Li-heparin. Disse blir sentrifugert (3500 rpm i 15 minutter), overføres til Eppendorf-rør (2 ml) og fryses ved -20 eller -80 °C før de tines og brukes i ELISA-oppsettene. For detaljer vedr. ELISA-metodene og uttak og lagring av prøver henvises det til en nylig publikasjon av Gislefoss og medarbeidere².

Resultater

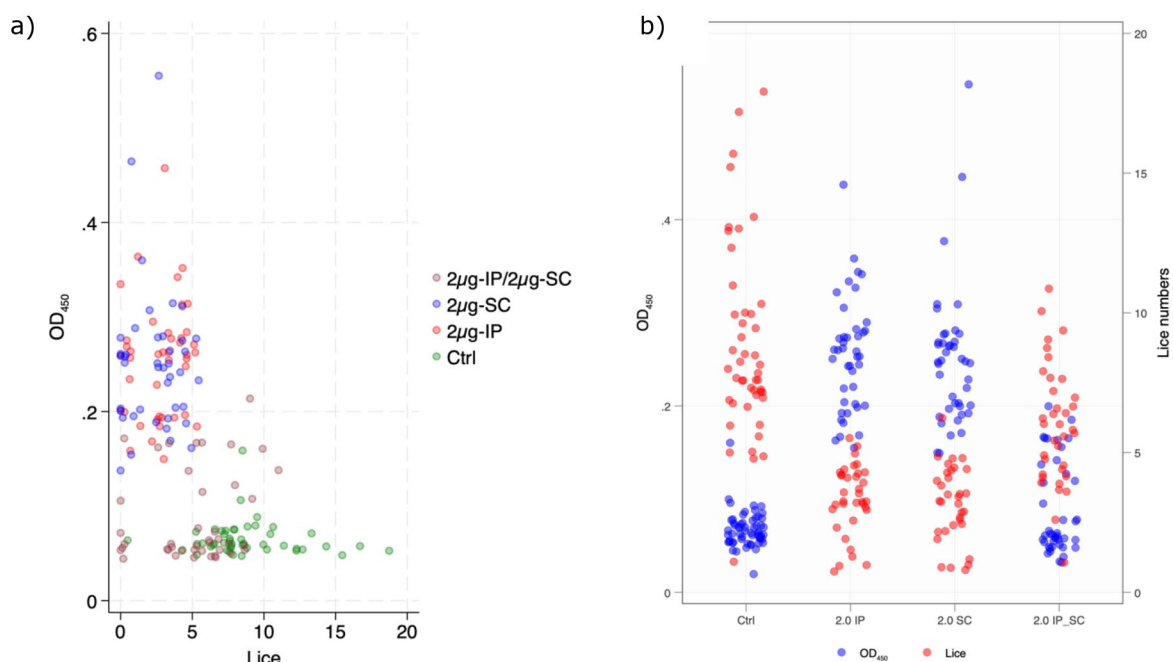
Nivået av sirkulerende antistoffer målt ved ELISA har blitt sammenlignet med lusetall for de samme individene for de ulike forsøkene hvor dette har vært tilgjengelig.

Dose-respons studien som ble presentert i Forsøk II (*Effekt av vaksinedose ved bruk av luse-antigener fra alle utviklingsstadier*) basert på 2 ulike antigen-doser viser en viss sammenheng mellom sirkulerende nivå av antistoffer og lusetall (Figur 8). Det er lavt antistoffnivå i kontroller og en markant økning i vaksinerte grupper, høyest i 0.5 µg gruppen.



Figur 8. Lusetall plottet mot antistoffnivå målt i ELISA ved OD₄₅₀ viser en invers sammenheng mellom lusetall og antistoffnivå, $R^2=0.43$, $p<0.00001$.

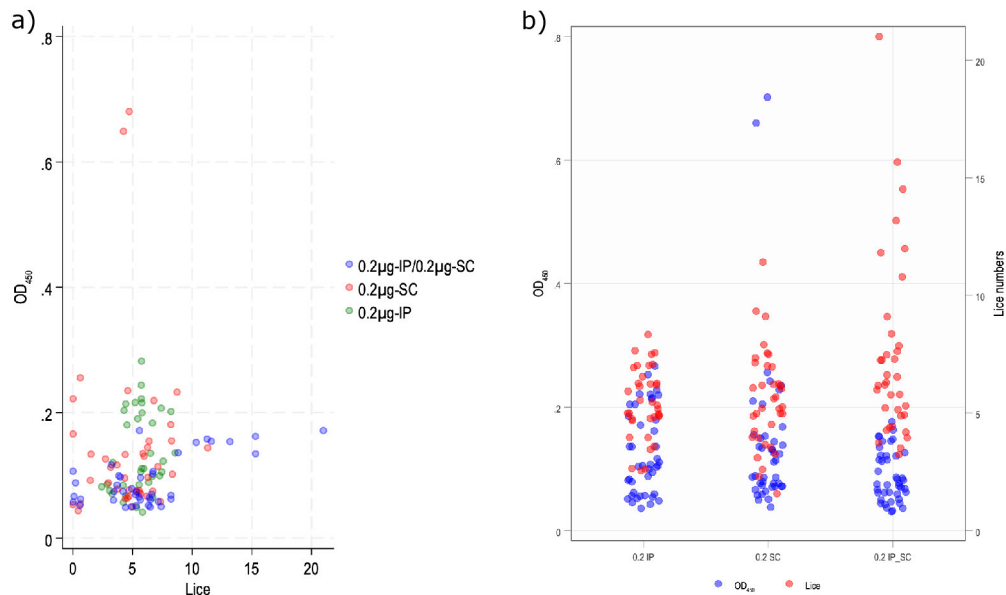
I Forsøk III (*Effekt av vaksinerings via ulike administrasjonsveier og antigen-doser og effekt på tilhefting og utvikling av lakselus*) ble det tatt ut blodprøver som ble analysert på samme måte som i Forsøk II, hvor ELISA-platene ble coatet med hele luse-antigener. Her ser vi først på de gruppene som ble gitt høy antigen-dose, 2.0 µg/g henholdsvis IP og SC samt en kombinert injeksjon. For disse gruppene er det en god (negativ) korrelasjon, $r^2 = -0.43$ ($p < 0.00001$) mellom OD verdi og lusetall og det er en god kontrast mellom nivå av antistoffer hos IP og SC gruppene som er gitt en injeksjon og lusetall versus den gruppen som har fått en kombinert injeksjon (Figur 9).



Figur 9a,b. Lusetall og antistoffnivå plottet mot hverandre viser et økende nivå av antistoffer med fallende lusetall; dette framkommer av begge grafene. Merk at for b) er antistoffene vist på venstre y-akse og lusetall på høyre y-akse.

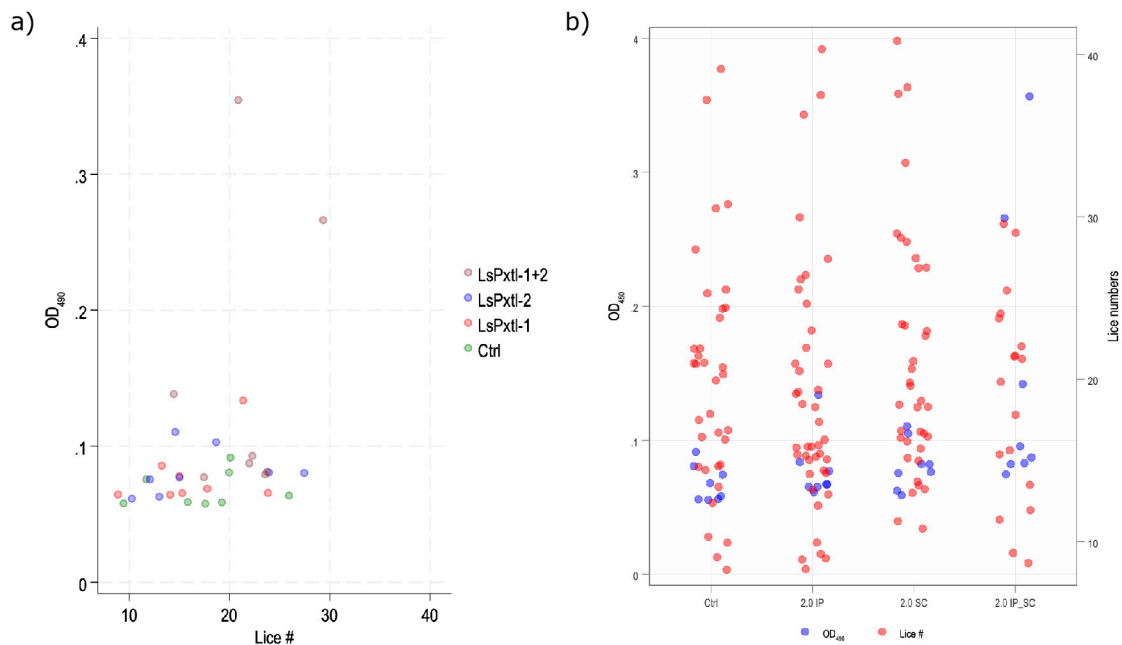
I Figur 9b vises det klart at når antistoffnivå stiger synker lusetallet, og omvendt for 2.0 IP_SC – kombinert vaksinasjon. Denne effekten av kombinert IP og SC vaksinasjon har vi nå observert i to ulike forsøk samt at det her vises at eksponering av luseantigener i hud/hudnære, anatomiske regioner/strukturer gir en nedregulering av immunresponsen. Dette kan henge sammen med den generelle forståelsen at eksponering for lus hos atlantisk laks generelt gir en nedregulering av pro-inflammatoriske immunresponser i den hensikt å unngå en kraftig immunreaksjon som i sin tur gir vevsskade (*collateral damage*).

For gruppene som ble gitt en dose 1:10 av høy-dose-gruppene er det ingen sammenheng mellom antistoff-nivå og lusetall (Figur 10), $r^2 = 0.14$, $p = 0.11$ og igjen ser vi en klar negativ effekt av å kombinere vaksinasjonsmodaliteter, IP og SC (Figur 10).



Figur 10. Lusetall og antistoffnivå plottet mot hverandre for vaksiner med lav antigen dose. Det er ingen sammenheng mellom antistoffnivå og lusetall. Merk at for b) er antistoffnivå vist på venstre y-akse og lusetall på høyre y-akse.

I Forsøk IV (Effekt av DNA vaksinasjon og kombinasjonen av DNA vaksine som primærvaksinasjon og en boost-vaksine med definerte, rekombinante luseantigener) ble også antistoff-nivået målt ved smittetidspunkt for de fire vaksinerte gruppene og kontrollgruppen². Resultatene er framstilt i Figur 11.



Figur 11. Antistoff-nivå målt ved ELISA ved smittetidspunkt for de ulike vaksinerte gruppene (som angitt) og kontrollgruppen. Det kommer fram i b) at med stigende antistoffnivå så går lusetallet noe ned, men antall fisk i LsPx1l1/LsPx1l-2B (boost) er antall fisk noe lavt.

Det er også i denne studien en viss tendens til at økende antistoffnivå gir et noe lavere lusetall, men forskjellen er ikke signifikant ($p=0.54$).

Diskusjon/konklusjon

På basis av de ulike forsøkene som er gjennomført kan det ikke enhetlig konkluderes med at et økende antistoff-nivå, som et mål for en bedre humoral immunrespons, gir et lavere lusetall, men det er en klar tendens i materialet. For noen av forsøkene er også korrelasjonen signifikant, men dette er småskala forsøk i våtlab/kar-studier. Som nevnt tidligere er det ikke gitt at mekanismen som gir lavere lusetall i grupper med høye antigen-nivåer og høyere antistoffnivåer er knyttet til den humorale immunresponsen, men det kan være en markør eller proxy for de underliggende immunresponsene som igjen har betydning for hvordan laksen reagerer på infestasjon og i hvilken grad den infektive kopepoditten reagerer ved innledende kontakt med verten. Det er behov for ytterligere forsøk og analyser av lokale og systemiske immunresponsen ved vaksinasjon mot lus og hvordan vert og lus reagerer ved første kontakt når verten er immun.

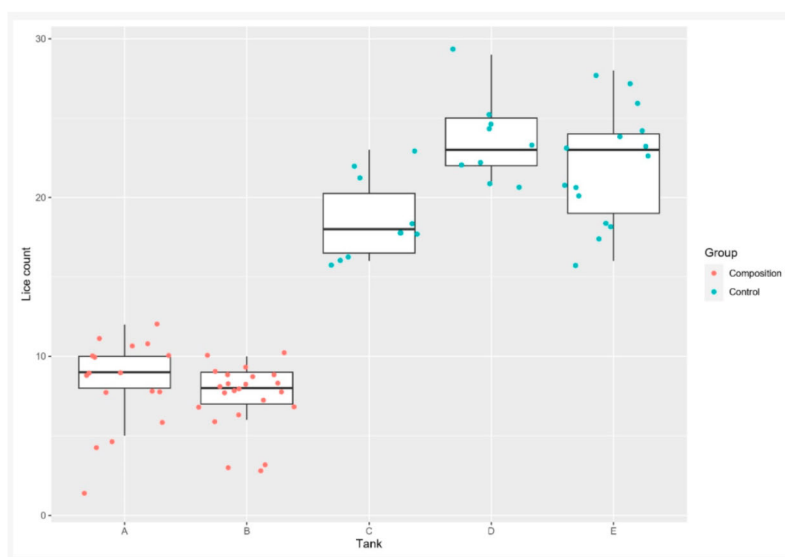
FORSØK VII: EFFEKT AV KONDISJONERING AV HUDENS MIKROBIOTA MED PROBIOTISKE BAKTERIER FØR INFESTASJON MED KOPEPODITTER OG EFFEKT AV INFESTASJON PÅ HUDENS MIKROBIOTA ETTER INFEKSJON

Oppsett/tilnærming

Betydningen av hudens mikrobiom for nivå av luseinfestasjon er omdiskutert, mens endringer eller forskyvinger i mikrobiomet etter infeksjon er relativt godt dokumentert⁶. Som en del av dette prosjektet har vi hatt et samarbeid med Previwo AS hvor den forebyggende effekt av Stembiont behandling før eksperimentell lakselus-infestasjon i kar. Disse resultatene er nylig publisert (doi.org/10.3390/applmicrobiol3040090) og detaljer vedr. studien og resultatene finnes der.

Resultater

Tilnærming har vært en kondisjonering av fiskens hudmikrobiota i forkant av smitte og tiden mellom kondisjonering og smitte har variert fra 58 til 155 dager. I Figur 12 vises resultatene fra studien hvor det var et mellomrom på 155 dager mellom kondisjonering og smitte. Det har vært gjennomført ytterligere to forsøk som inngår i studien og som er tilgjengelig i angitt publikasjon.



Figur 12. Resultater fra ett av forsøkene hvor gruppe A og B er fisk som har vært forbeholdt med *Allivibrio* sp., to varianter i forkant av smitte med 30 kopepoditter/fisk. Gruppene (tank) C-E er alle ubehandla kontroll. Fra doi.org/10.3390/applmicrobiol3040090.

Diskusjon/kommentarer

De refererte studiene er kontrollerte studier i små tanker, men det er også flere rapporter som indikerer en effekt av probiotika overfor lakselus. Et annet forhold er at de hyppige mekaniske avlusningene i sesong med høyt lusepress potensielt vil påvirke og utarme diversiteten i hudens mikroflora, noe som kan ha betydning for opptreden av hudsår i etterkant av mekanisk påvirkning.

Effekt av infestasjon på hudens mikrobiota

Det har blitt gjennomført noen tidlige studier av endringer i mikrofloraen knyttet til lakselusinfeksjon og med fokus på mycobiomet, siden det er et nesten ubeskrevet fagfelt, både når det gjelder forekomst av marine sopparter og ikke minst hvilke som forekommer som en del av normalfloraen i hud hos laks.

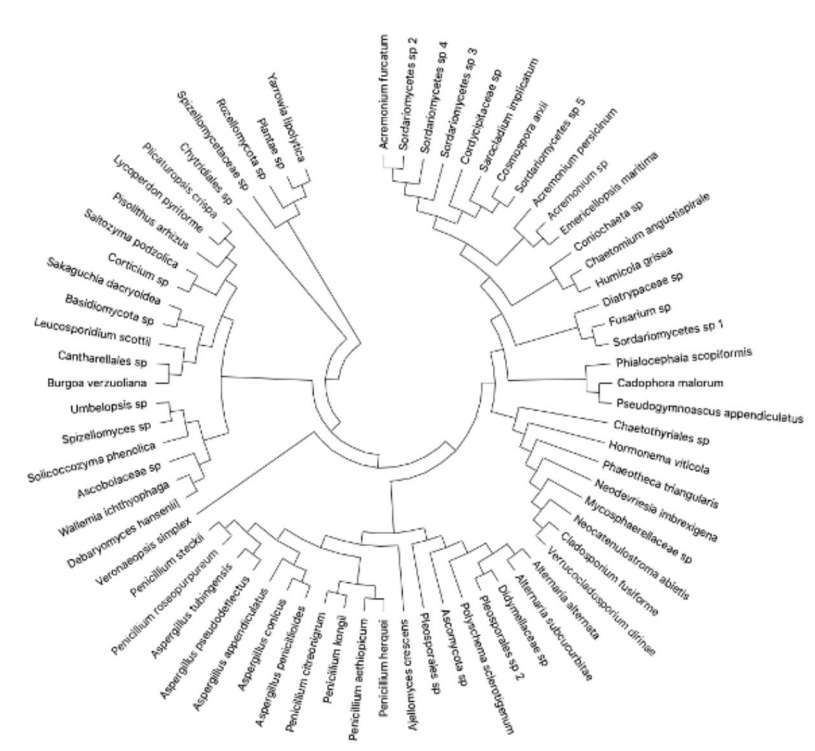
Oppsett/metoder

Det ble tatt ut prøver med svabere fra laks som var infestert med ulike nivåer av lakselus sammen med ikke-infiserte kontroller. Disse ble sendt over til University of Berkeley, John Taylors laboratorium, for karakterisering og kvantifisering av mikrobiomet. Antall lakselus hos infesterte fisk varierte fra 1/ fisk til 19 lus/fisk til 19 lus/fisk, totalt 18 infesterte fisk og ikke-infesterte 6 kontroller. Gjennomsnittlig lusetall hos de infesterte var 8 lus/fisk.

Prøvene ble analysert for forekomst ved bruk av 16S rRNA analyse.

Resultater

Fra ikke-infestert laks ble det påvist et relativt bred spekter av ulike sopparter (Figur 13).



Figur 13. Sopparter påvist hos ikke-infestert laks. Dette er arter som ikke er beskrevet som endel av mycobiomet hos laks tidligere.

Det ble så foretatt en PCA (principal component analyse) for å se på eventuelle underliggende trender for sammenhengen mellom lusetall og mycobiomet. Det ble ikke påvist noen underliggende trender i materialet som tilsier at det er endring av mycobiomet som et resultat av luseinfestasjon (Figure 14),

dette framkom også med en Mantel test; det er ikke påvist noen sammenheng mellom mycobiomet og luseinfestasjon.

En nærmere OTU (operational taxonomic units) analyse viser at det er positiv korrelasjon mellom antall lus og *Penicillium aethiopicum*.

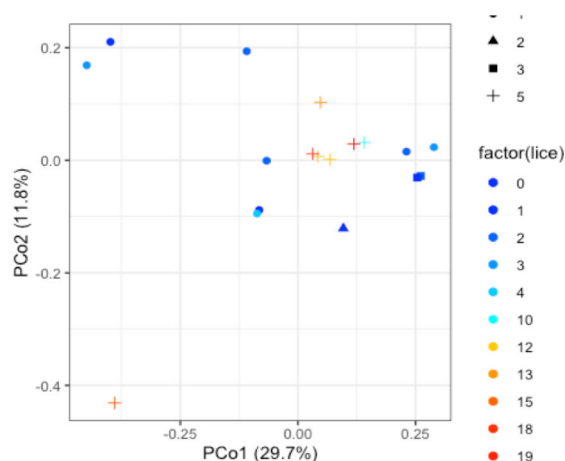
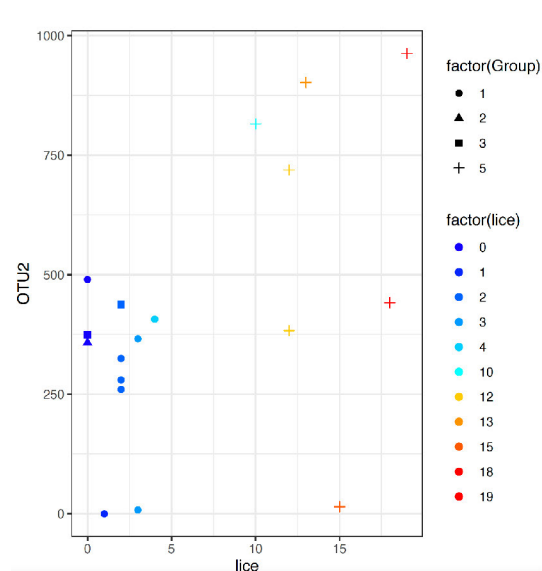


Figure 14. Principal component analyse for sammenheng mellom lusetall og mycobiomet hos laks.



Figur 15. *Penicillium aethiopicum* er positivt korrelert med antall lus.

Betydningen av sammenhengen mellom *Penicillium aethiopicum* og lusetall er usikker. Der kjent at denne sopparten produserer ulike sekundærmetabolitter som kan ha betydning, men som regel vil det være knyttet til konkurranse med andre sopparter.

Diskusjon/konklusjon

De studier som er foretatt så langt er av preliminær natur og vi har fokusert på mycobiomet siden det er et nesten ubeskrevet fagfelt. Det er påvist en positiv korrelasjon mellom lusetall og *P. aethiopicum*, men betydning er ukjent. Sammenholdt med de positive funn for bruk av probiotika som en innsatsfaktor mot lakselus, er det lett å se at det er behov for flere studier og mer kunnskap omkring betydningen av hudens mikrobiom for lakselusinfestasjon.

OVERORDNET DISKUSJON OG KONKLUSJON

De forsøkene som har vært gjennomført som en del av dette prosjekt har hatt fokus på vaksinasjon mot lakselus med hel-lus antigener og definerte rekombinante antigener. Det har også vært gjennomført innledende forsøk for å forstå betydningen av laksens hudmikrobiom for luse-infestasjon etter eksperimentell smitte. Vi har også studert effekt av mikrobiomkondisjonering i forkant av lusesmitte.

På et overordnet nivå finner vi at vaksinasjon med luse-antigener laget fra homogeniserte preparater av de ulike stadiene av lakselus, gir et redusert påslag etter eksperimentell smitte i karforsøk. Reduksjonen er i noen av forsøk meget høy (90% relativ reduksjon) og det vist at vaksine-effekten har en dose-respons profil, samt at fisk som er vaksinert med ulike doser og som holdes i samme kar også gir en dose-respons effekt. Dette er gode indikasjoner for at vaksinasjon med hele lakselus eller definerte rekombinante proteiner reduserer lusepåslaget ved eksperimentell smitte.

Videre er det vist i flere forsøk at det er en sammenheng mellom målte nivåer av sirkulerende antistoffer mot lakselus-antigener og lusetall etter eksperimentell smitte. Dette betyr ikke at det er antistoffer som utgjør det aktive prinsipp, men det gir indikasjoner om at måling av antistoffer med ELISA metode etter vaksinasjon mot lakselus kan være en in vitro proxy for de immunresponser som gir beskyttelse eller redusert lusepåslag.

Et annet funn, som også er vist i flere forsøk, er betydningen av leveringsmåte av vaksinene. Generelt så gir en IP-vaksinasjon alene eller en SC-vaksinasjon, den beste effekten. Hvis det gis en kombinasjon av de to modalitetene, så reduseres effekt av begge, selv når det gis dobbel dose for den kombinerte vaksinasjonen. Det er ikke enkelt å forklare de underliggende mekanismene for disse observasjonene; en mulig forklaring kan ligge i de «pre-programmerte»/default responsene laks igangsetter ved eksponering for lus på slimhinner. På samme måte som en IP-SC kombinasjon reduserer effekten så har vi også vist at en IP – oral boost kombinasjon kommer dårligere ut enn IP alene. Hvorvidt laks har en samordnet systemisk og lokal respons som har en effekt på tvers av ulike slimhinner er ikke kjent.

Probiotisk kondisjonering av fisk i forkant av smitte gir et redusert lusepåslag ved eksperimentell smitte i karforsøk selv når kondisjoneringen skjer flere måneder i forkant av smitte.

Samlet sett er vi mer håpefulle for at det skal være mulig å utvikle en vaksine mot lakselus-infestasjon nå enn når vi startet prosjektet. Det er vist i flere av våre studier at man oppnår et redusert lusepåslag etter vaksinasjon.

HOVEDFUNN

- Vaksinasjon mot lakselusinfestasjon basert på hel-lus antigener gir et redusert lusepåslag i småskala karstudier
- Vaksiner basert på rekombinante proteiner fra lakselus og formulert som en olje-emulsjon gir god relativ beskyttelse mot infestasjon med lakselus
- Beskyttelse mot infestasjon og nivå av sirkulerende antistoffer har en negativ korrelasjon, høye antistoffnivåer gir lavere lusetall
- Kondisjonering med probiotiske bakterier i forkant av smitte med kopepoditter gir en god relativ reduksjon i lusepåslag

References

- [1] Holm H, Santi N, Kjøglum S, Perisic N, Skugor S, Evensen Ø: 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 immunology* 2015, 42:384-94.
- [2] Gislefoss E, Abdelrahim Gamil AA, Overgard AC, Evensen O: Identification and characterization of two salmon louse heme peroxidases and their potential as vaccine antigens. *iScience* 2023, 26:107991.
- [3] Carpio Y, Basabe L, Acosta J, Rodriguez A, Mendoza A, Lisperger A, Zamorano E, Gonzalez M, Rivas M, Contreras S, Haussmann D, Figueroa J, Osorio VN, Asencio G, Mancilla J, Ritchie G, Borroto C, Estrada MP: Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: a promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine* 2011, 29:2810-20.
- [4] Swain JK, Carpio Y, Johansen LH, Velazquez J, Hernandez L, Leal Y, Kumar A, Estrada MP: Impact of a candidate vaccine on the dynamics of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One* 2020, 15:e0239827.
- [5] Leal Y, Velazquez J, Hernandez L, Swain JK, Rodriguez AR, Martinez R, Garcia C, Ramos Y, Estrada MP, Carpio Y: Promiscuous T cell epitopes boosts specific IgM immune response against a P0 peptide antigen from sea lice in different teleost species. *Fish Shellfish Immunol* 2019, 92:322-30.
- [6] Llewellyn MS, Leadbeater S, Garcia C, Sylvain FE, Custodio M, Ang KP, Powell F, Carvalho GR, Creer S, Elliot J, Derome N: Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Sci Rep* 2017, 7:43465.

LEVERANSER

Gislefoss E, Gamil AAA, Øvergård A-C, Evensen O (2023). Identification and characterization of two salmon louse heme peroxidases and their potential as vaccine antigens. *iScience* 21: 26(10):107991. doi: 10.1016/j.isci.2023.107991

Dobloug MS, Skagen-Sandvik C, Evensen O, Gadan K, Bakke MJ, Sørsum H, Saloni K (2023). Reduced Infestation Levels of *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) following Immersion Exposure to Probiotic *Aliivibrio* spp. *Appl. Microbiol.* 2023, 3(4), 1339-1354. doi.org/10.3390/applmicrobiol3040090

Rodríguez A, Gadan K, Pérez L, Evensen O, Estrada MP, Carpio Y. Prime-boost vaccination with prototype chimeric antigens confers protection against experimental *Lepeophtheirus salmonis* infestation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Submitted Vaccines* 2023, november.

Evensen O (2021). Vaksinasjon mot lakselus – en drøm blir til virkelighet? Foredrag AquaNor 2021.

Skagen-Sandvik C, Klakegg Ø, Gadan K, Evensen O, Sørsum H (2020). Effect of probiotic and disinfectant bath application on the skin health and resulting lice attachment as assessed using a salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) cohabitant challenge model in Atlantic salmon. *Frisk Fisk*, 2020.

Evensen O (2019). Host-lice crosstalk – importance for infection success and possibilities for intervention. Foredrag NTNU, September 2019.

Gislefoss E, Gamil AAA, Evensen O (2019). Differences in antibody responses and C3 levels in Atlantic salmon following immunization with whole sea lice antigen using different immunization protocols. EAFP meeting, Abstract book.

Gadan K, Evensen O (2018). Infection dynamic post copepodid challenge; effect of counting on lice numbers over course of infection. *Sealice* 2018, Chile.