



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314536**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup>

A 61 K 39/00, 39/02, 39/12,  
A 23 K 1/00, 1/18, 1/17

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	19922445	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.10.18, PCT/GB91/01828
(22) Inng. dag	1992.06.19	(85) Videreføringsdag	1992.06.19
(24) Løpedag	1991.10.18	(30) Prioritet	1990.10.22, EP, 90311541
(41) Alm. tilgj.	1992.08.19		
(45) Meddelt dato	2003.04.07		

(71) Patenthaver	Marine Harvest, Craigcrook Castle, Edinburgh EH4 3TU, Skottland, GB
(72) Oppfinner	Michael Edward John Barratt, Bedford, England, GB Dennis Leadbeater, Sharnbrook, Bedford, England, GB
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

---

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av en oralt administrerbar blanding for fisk**

(56) Anførte publikasjoner NO 855169, NO 924858, NO 853003, NO B 134509, NO B 68561, EP 384323, US 3862313, US 3492400

(57) Sammendrag

Oral blanding for fisk eller lignende aquatiske skapninger omfatter en stabil, viskøs vann-i-olje emulsjon inneholdende en vaksine mot fiskesykdom, idet emulsjonen blir båret på fiskefjørpartikler. Den orale blanding kan administreres til fisk på en ikke-arbeidskraft intensiv måte, og forårsaker intet stress for fisken, i fullstendig motsetning til konvensjonell vaksineadministrering ved parenteral injeksjon. Dessuten kan den orale blanding i betydelig grad redusere den mininmale, effektive vaksinedose.

Denne oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av en oralt administrerbar blanding for fisk.

Det intensive oppdrett av fisk så som laks, som i dag praktiseres i vid skala, lider av den ulempen at hele fiskebestanden i et anlegg kan bli infisert med sykdom. De kommersielle konsekvenser av alvorlige sykdomsutbrudd kan være enorme. Flere velkjente fiskesykdommer forårsaker alvorlige problemer i fiskeoppdretts-  
5 industrien. Eksempler er bakteriell nyresykdom, forårsaket av *Renibacterium salmoninarum*; enterisk rødmunn, forårsaket av *Yersinia ruckeri*; og vibriose, forårsaket av forskjellige stammer av *Vibrio*, særlig *V. anguillarum* og *V. salmonicida*. For tiden er den mest betydelige sykdom, i det minste når det gjelder oppdrett i Nord-Europa av atlantisk laks (*Salmo salar*), furunkulose; denne  
10 forårsakes av bakterien *Aeromonas salmonicida*.

Ønskeligheten av å immunisere oppdrettsfisk mot slike sykdommer har lenge vært anerkjent. Den tekniske fremgang på dette området har imidlertid vært langsom. Dette gjelder både effektiviteten av de kommersielt tilgjengelige vaksiner (en fullstendig effektiv vaksine for laks mot furunkulose er ennå ikke utviklet), og  
15 også de midler som anvendes for administrasjon av slike vaksiner til fisken. Tradisjonelt har administrasjon av vaksiner til fisk enten vært ved neddykking (som medfører sløsing og er av begrenset effektivitet), eller ved injeksjon. Selv om injeksjon i enkeltfisk er en sikker måte for avgivelse av en vaksine, lider den av de ulemper at den er svært arbeidskraftkrevende, og dessuten vil håndtering og  
20 injeksjon forårsake betydelig stress for fisken, og kan utløse sykdomsproblemer eller i det minste forårsake midlertidig nedsatt vekst. Vanligvis blir fisken bedøvet før injeksjonen.

I noen tid er det blitt anerkjent at et oralt avgivelsessystem, hvori en vaksine administreres til fisken enten som del av den vanlige diett eller i en blanding  
25 administrert sammen med den regulære diett, ville være fordelaktig. Rapporterte eksperimenter omfattende forsøk på oral administrasjon av fiskevaksiner har gitt uoverensstemmende resultater, og ingen effektiv oral vaksine er ennå blitt kommersielt tilgjengelig. Spesielle problemer anerkjent ved den orale måte er: mulig tap av, eller ødeleggelse av, essensielle vaksinekomponenter under frem-

stilling av blandingen; mulig tap av vannløselige vaksinekomponenter i det vandige miljø som fisken lever i; og mulig nedbrytning av vaksinen i fiskens tarmsystem før vaksinen har frembragt en beskyttende respons.

Ved hjelp av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av en oralt administrerbar blanding for akvatiske skapninger, spesielt fisk, kjennetegnet ved at en vann-i-olje emulsjon inneholdende en vaksine, blir påført på et partikkelformig førststoff.

Den dyktige leser vil lett skjønne at blandingen som fremstilles ifølge oppfinnelsen kan tilpasses for anvendelse med andre akvatiske skapninger enn vanlig fisk, f.eks. krepsdyr så som dypvannsreker, reker, hummer og krabber, og bløtdyr så som østers. For letthets skyld skal oppfinnelsen beskrives i forhold til fisk, og betegnelsen "fisk" skal forstås som omfattende andre akvatiske livsformer som kan dra fordel av den orale administrasjon av vaksiner o.l. Eksempler på virkelig fisk som blir oppdrettet i betydelig skala i fangenskap i forskjellige deler av verden er: Atlantisk laks, Stillehavslaks, regnbueørret, ørret, malle, kveite, piggvar, karpe og tilapia.

Vanligvis vil det sensitive middel være vannløselig heller enn oljeløselig, og følgelig dispergert i den vandige fase av emulsjonen. Emulsjonen bør inneholde tilstrekkelig av det følsomme middel til å gi den ønskelige virkning, f.eks. en effektiv immunrespons, når blandingen administreres til fisken.

Fortrinnsvis blir emulsjonen påført på partikkelformig fiskefôr som har et ernæringsmessig underskudd på olje.

Fortrinnsvis omfatter emulsjonen en vann:olje-blanding inneholdende ikke mer enn ca. 70 vekt% vann. Mer fortrinnsvis er vanninnholdet ikke høyere enn ca. 65 vekt%. Likevel må emulsjonen inneholde tilstrekkelig vann til å virke som bærer for det vannløselige middel, og et spesielt foretrukket område for vektforholdet vann:olje er 6:4 til 4:6.

Fortrinnsvis omfatter emulsjonen minst ca. 1 vekt% av den endelige blanding. Mer fortrinnsvis omfatter emulsjonen minst ca. 2%, og ideelt minst ca. 3 vekt% av blandingen. Vanligvis er emulsjonsmengden ikke høyere enn ca. 10 vekt%.

Emulsjonen bør ha en viskøs konsistens, dvs. kremaktig og flytbar, for å muliggjøre jevn påføring på den partikkelformige bærer.

Bæreren bør være relativt tørr og ikke-oljeholdig, slik at den påførte emulsjon kan absorberes, i det minste delvis, av partiklene. Fortrinnsvis er den partikkelformige bærer et ikke-oljet fôr i granulær eller pelletert form. Sammensetningen av fôret er ikke kritisk for oppfinnelsen, så lenge som formuleringen er egnet for den fisk som blandingen skal føres til, og partiklene på tidspunktet for tilsetning av emulsjonen ikke inneholder olje eller andre flytende bestanddeler i slike mengder at emulsjonen ikke kan absorberes av partiklene. Etter påføringen av emulsjonen, bør partiklene fremdeles være tilstrekkelig tørre og frittflytende til å håndteres på samme måte som vanlig fiskefôr. Typisk fiskefôr har høyt proteininnhold, og er vanligvis basert på fiskemel med tilsatte komponenter så som korn, og olje som energikilde. Fiskemel inneholder naturlig en viss mengde olje, men vanligvis må denne økes av ernæringsmessige grunner. Denne ekstra olje tilsettes vanligvis til granulene eller pelletene etter at disse er blitt dannet; materialet med oljeunderskudd kalles heri "ikke-oljet".

Størrelsen av fiskepelletene varierer betydelig, avhengig av typen og alderen på fisken: for laks har pelletene typisk en diameter fra ca. 1 til ca. 6 mm, mens pelleter på ca. 3 mm er velegnet på smolttrinnet. Fiskefôr kan også inneholde mindre komponenter så som vitaminer, mineraler, konserveringsmidler og pigmenter. Alternativt kan det anvendes ikke-fôr bærere, men disse bør gi sluttblandinger som oppfattes av fisken som vanlig fôr, ellers kan fisken ignorere eller forkaste blandingen. Fisken vil gjerne være svært kritisk til å akseptere fôrpartikler, og mange faktorer så som størrelse, form, farge og tetthet, som alle påvirker partiklenes "oppførsel" i vannet, kan ha stor betydning. En blanding som fremstilles ifølge oppfinnelsen bør derfor lages slik at den har fysiske egenskaper som er så like som mulig med dem for det vanlige fôr som fisken er vant til.

Emulsjonen bør være tilstrekkelig stabil til å beskytte den vandige fase i en tid som er tilstrekkelig til å muliggjøre fremstilling av blandingen og administrasjon til fisken. Vanligvis bør emulsjonen ikke "sprekke" dvs. skille seg i atskilt vandig og

oljefase, på mindre enn 1 uke. Fortrinnsvis bør emulsjonen være stabil i minst 1 måned.

Oljen er fortrinnsvis en nøytral olje, fordi tilstedeværelsen av frie fettsyrer av og til kan forstyrre dannelsen av en tilstrekkelig stabil emulsjon. Fortrinnsvis bør nivået av frie fettsyrer ikke være høyere enn ca. 5 vekt% av oljen, og ideelt ikke høyere enn ca.3%. Foretrukne oljer er olje av hele fisken og nøytrale, marine oljer. Om ønsket kan emulsjonen innbefatte en antioksydant så som butylert hydroksytoluen eller etoksykin.

Emulgeringsmiddelet bør være av næringsmiddelkvalitet, og er fortrinnsvis et lecitin. Et ideelt emulgeringsmiddel er soya-lysolecitin (et modifisert fosfolipid) og eksempler er kommersielt tilgjengelig fra Unimills BV under varemerket "Bolek". Vanligvis vil emulgeringsmiddelet omfatte fra ca. 0,1 til ca. 5 vekt% av den samlede emulsjon.

Emulsjonen kan fremstilles ved å blande olje- og vannfasen, vanligvis ved omgivende temperatur, ved anvendelse av en homogenisator. Utstyr for homogenisering i rør blir foretrukket. Fortrinnsvis kan komponentene, om ønsket, resirkuleres to eller flere ganger gjennom homogenisatoren.

I en foretrukket utførelse ifølge denne oppfinnelse, påføres ekstra olje, f.eks. fra ca. 1 til ca. 3 vekt%, til den partikkelformige blanding etter påføringen av emulsjonen dertil. Dette kan også oppnås ved tallerkenbelegging.

Et oralt avgivelsessystem kan anvendes for å redusere det samlede effektive administrerte dosenivå av en vaksine som ellers ville behøve å administreres via en ikke-oral vei (vanligvis ved injeksjon eller neddykking) i en betydelig høyere samlet dose. Vi har funnet at administrasjon av en vaksine i en blanding fremstilt ifølge denne oppfinnelse overraskende gjør det mulig å oppnå en effektiv beskyttende respons hos fisk ved et mye lavere dosenivå. Under noen omstendigheter kan det oppnås en 10 gangers reduksjon i det effektive dosenivå.

For eksempel har vi gjennomført forsøk med en kommersielt tilgjengelig furunkulosevaksine ("Furogen") som anbefales for enkeltadministrasjon ved parenteral injeksjon i et dosenivå på 0,1 ml pr. fisk. Vi har administrert denne kommersielt tilgjengelige vaksine oralt til laks ved anvendelse av en blanding ifølge

oppfinnelsen. Vi har funnet at et samlet dosenivå på bare 0,001 ml "Furogen" pr. fisk, administrert oralt over en 10 dagers periode, ga beskyttelse som var minst like effektiv som den anbefalte enkeltdose på 0,1 ml administrert ved injeksjon. I motsetning til injeksjonsveien, forårsaket oral administrasjon av vaksinen i samsvar med denne oppfinnelse ikke noe som helst stress for fisken, og kunne gjennomføres som en del av det vanlige fôringsprogram.

Selv om teorien bak effektiviteten av denne oppfinnelse ennå ikke er fullstendig forstått, antar vi at den orale administrasjon av en furunkulosevaksine beforder en cellulær respons hos fisken, som fører til forbedret beskyttelse. Denne beskyttelse synes ikke å ha noen sammenheng med mengden av antistoffer i fiskens sirkulasjonssystem. Administrasjon av den samme vaksine ved injeksjon kan føre til forhøyet nivå av sirkulerende antistoff, men dens virkning på cellenivå er åpenbart ikke blitt studert.

Vi antar at oljen i en blanding fremstilt ifølge denne oppfinnelse beskytter de antigene komponenter i vaksinen mot nedbrytning i de øvre, sure regioner av fiskens tarmsystem, samtidig som de tillater frigjøring av de antigene komponenter i de lavere, alkaliske regioner hvor oljen fordøyes enzymatisk.

En oral blanding fremstilt ifølge denne oppfinnelse, inneholdende en vaksine, kan anvendes istedenfor konvensjonelle, injiserbare og/eller neddykkingsvaksiner. Alternativt kan det anvendes en kombinasjon av administrasjonsveier, f.eks. ved anvendelse av den orale vei for å gi et grunn-nivå av beskyttelse som kan økes ved en passende anledning (f.eks. når fisk blir flyttet eller tellet, eller på et tidspunkt for antatt høyere infeksjonsrisiko) ved en supplementerende injeksjon eller neddykking.

Selv om det blir forutsett at en blanding fremstilt ifølge denne oppfinnelse vanligvis vil bli administrert til oppdrettsfisk, kan den også distribueres "i vill tilstand" for å redusere forekomsten av fiske sykdom i det naturlige miljø, og således være en fordel for den naturlige fiskebestanden og øke de globale fiskeressurser.

Den orale blanding fremstilt ifølge denne oppfinnelse kan fremstilles "på stedet" for umiddelbar administrasjon til fisk. Alternativt kan en blanding fremstilles og emballeres på en hvilken som helst måte som vanligvis anvendes for kommersielt tilgjengelig fiskefôr, f.eks. i fettbestandige sekker, og levert som et kommersielt

produkt. Lagringstiden for blandingen kan om nødvendig økes ved tilsetning av konserveringsmidler, f.eks. i den påførte emulsjon.

Det kan administreres en hvilken som helst fiskevaksine som kan frembringe en immunrespons via tarmsystemet. F.eks. kan vaksinen være en enkel bakterin-  
5 blanding, dvs. en drept, hel kultur av en infektiv organisme, eller et ekstrakt av en drept kultur. Vaksinen kan omfatte toksoide komponenter, dvs. toksiske faktorer i sammenheng med den infektive organismen som er blitt behandlet, f.eks. med kjemiske midler så som formaldehyd- eller glutaraldehydbehandling, for å redusere deres toksiske virkning uten alvorlig å forringe deres antigene egenskaper. Hvor det  
10 er passende, kan vaksinen omfatte levende organismer, fortrinnsvis svekket f.eks. ved kontrollert dyrking eller ved genetisk manipulering. De aktive komponenter i vaksinen kan innbefatte, eller kan i virkeligheten utelukkende bestå av, faktorer som opprinnelig er identifisert i den sykdomsfremkallende organisme, men deretter fremstilt med sikte på vaksinen ved ekspresjon i genetisk modifiserte organismer  
15 såsom E. coli.

Som eksempel kan det lages en blanding som følger:

### Eksempel 1

En ca. 1:1 blanding av olje fra hel fisk og fortynnet, vandig "Furogen"  
20 injiserbar vaksine (en vandig blanding inneholdende et bakterin avledet fra drepte Aeromonas organismer) ble blandet ved flere gangers passering gjennom en ultralydhomogenisator, for å danne en stabil, kremaktig vann-i-olje emulsjon, ved hjelp av 3% (samlet vekt) av "Bolek K" lecitin emulgeringsmiddel. "Bolek K" er muligens ikke lenger kommersielt tilgjengelig, men andre lecitin emulgeringsmidler  
25 fra "Bolek" området, såsom "Bolek M", kan anses som identiske for de praktiske formål for denne oppfinnelse. "Furogen" er kommersielt tilgjengelig fra Aquahealth Limited, Canada og leveres i to formuleringer: for parenteral injeksjon og for neddykking.

Emulsjonen ble brukt til gjennombløting av ikke-oljete, konvensjonelle,  
30 ekstruderte 3 mm diameter fiskefôrpelleter (basert på fiskemel og korn) ved tallerkenbelegging, ved anvendelse av 5% emulsjon etter vekten av fôret.

Ytterligere 2,5 vekt% fiskeolje ble deretter tilsatt til fôret med samme metode.

Fisk konsumerer normalt 1-3 % av kroppsvekten pr. døgn, og mengden av "Furogen" ble justert ved fortynning med vann, til å gi en total på ca. 0,001 ml av den kommersielt leverte, injiserbare blanding over en 10 dagers risleføringsperiode.

5 Den resulterende blanding var fysisk ikke mulig å atskille fra konvensjonelle, oljete fiskefôrpelleter, og kunne håndteres og mates til fisken på en hvilken som helst konvensjonell måte, f.eks. for hånd eller med mekaniske fôringsapparater.

## 10 Eksempel 2

Forsøk på Atlantisk laks (*Salmo salar*) ble gjennomført som følger, ved anvendelse av orale blandinger laget som i eksempel 1, med en kontrollgruppe av fisk som fikk den kommersielt til-gjengelige injiserbare blanding.

15

### Grupper og behandling

All fisk var smolt av 1990 årgangen fra et kommersielt lakselekkeri.

- a) 1000 fisk; blanding i eksempel 1 inneholdende "Furogen" neddykkingsvaksineformulering i 0,1 ml/fisk\*.
- 20 b) 1000 fisk; blanding fra eksempel 1 inneholdende "Furogen" injiserbar vaksineformulering i 0,1 ml/fisk\*.
- c) 1000 fisk; blanding fra eksempel 1 inneholdende "Furogen" neddykkingsvaksineformulering i 0,01 ml/fisk\*.
- d) 1000 fisk; blanding fra eksempel 1 inneholdende "Furogen"
- 25 neddykkingsvaksineformulering i 0,001 ml/fisk\*.

Kontroll: 750 fisk som fikk en enkeltdose av "Furogen" ved injeksjon av 0,1 ml/fisk.

30 \* Total mottatt i gjennomsnitt pr. fisk over en 10 døgns fôringsperiode.

## Metode

For å identifisere gruppene, ble all fisk merket ved anvendelse av en panjetter og Alcian blått fargestoff (4%) før begynnelsen av eksperimentet.

5 Fisken ble føret med sine respektive vaksiner over en 10 døgns periode i atskilte tanker, med felles vannforsyning.

Fisken ble prøveveiet og dyrket for *A.salmonicida*. Lavnivåinfeksjon var allerede tilstede, hvilket representerte en typisk oppdrettssituasjon. Ytterligere utfordring var naturlig, fra den lokale vannforsyning.

10 Resultatene er vist i Tabell 1, og angir den prosentvise kumulative dødelighet for forsøksgruppene over en 1 måneds periode som begynte med vaksinasjonsstart. Disse resultater viser at den orale vei er et effektivt avgivelsessystem, og gir resultater minst like gode som injeksjonsveien. I virkeligheten angir resultatene at den orale vei kan muliggjøre anvendelse av lavere administrerte vaksinenivå, og på samme tid gi forbedret beskyttelse.

15

**Tabell 1**

Blanding	Dose (ml/fisk)	Dødelighet (%)
Kontroll	0,1	15,0
20 a)	0,1	12,6
b)	0,1	7,0
c)	0,01	12,8
d)	0,001	1,4

25

## Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en oralt administrerbar blanding for akvatiske skapninger, spesielt fisk, karakterisert ved at en vann-i-olje emulsjon inneholdende en vaksine, blir påført på et partikkelformig førstoff.  
5
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at ekstra olje blir påført det partikkelformige produkt etter påføring av emulsjonen til dette.
- 10 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 og 2, karakterisert ved at vaksinen er mot furunkulose.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1-3, karakterisert ved at det anvendes en emulsjon omfattende en vann:olje-blanding på 6:4 til 4:6 vektforhold.  
15
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1-4, karakterisert ved at det anvendes en emulsjon omfattende minst ca. 1 vekt% av sluttblandingen.