

## Uttalelse til Forsøksdyrforvaltningen angående produksjon av IgY antistoff.

### Bakgrunn:

I mai 2020 publiserte EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) anbefalingen: «EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies». Anbefalingen viser til at *in vitro* antistoff-produksjon nå er tilgjengelig og av så høy kvalitet at det anbefales at disse skal brukes istedenfor metoder som er avhengige av bruk av levende dyr. Anbefalingen sier videre at produsenter nå må fase ut bruken av levende dyr i sin produksjon av antistoffer og samarbeide med forvaltningen om mål og frist for dette.

I februar 2021 tok Forsøksdyrforvaltningen i Mattilsynet kontakt med Forsøksdyrkomiteén og etterspurte en uttalelse angående anbefalingen fra EURL ECVAM. Forsøksdyrkomiteén fulgte opp dette med en skriftlig uttalelse, sendt til Forsøksdyrforvaltningen i mai 2021:

<https://www.forsoksdyrkomiteen.no/wp-content/uploads/2021/06/Uttalelse-om-dyrefri-produksjon-av-antistoff.pdf>

I uttalelsen anbefaler Forsøksdyrkomiteén at Forsøksdyrforvaltningen følger EURL ECVAM sin anbefaling og avslår søknader om bruk av levende dyr til produksjon av antistoffer hvis det finnes vitenskapelig akseptable alternativer. Det bør stilles spesifiserte krav til søker om en velbegrunnet redegjørelse om hvilke *in vitro* alternativer som finnes innenfor det aktuelle feltet og hvorfor levende dyr eventuelt allikevel må brukes.

I november 2021 fikk Forsøksdyrkomiteén en ny henvendelse fra Forsøksdyrforvaltningen som etterspør en ytterligere vurdering av om Immunoglobulin Y (IgY) produsert i hønseegg kan anses som en raffinering av antistoffproduksjon, selv om metoden innebærer immunisering av høns. Metoden ble på slutten av 90-tallet anbefalt av dyrevelferdshensyn av EURL ECVAM, siden metoden ikke krever blodtapping:

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/026119299602400607>

Anbefalingen fra EURL ECVAM fra 2020 har ikke tatt for seg IgY spesifikt. Et av argumentene i anbefalingen er ulikheter fra batch til batch av antistoffer produsert i dyr (IgG). Ifølge den norske produsenten av IgY er dette ikke et problem for denne antistoffklassen. I tillegg defineres polyklonale antistoffer i rapporten som serum eller Ig-fraksjoner fra blod fra immuniserte dyr. Dette er uaktuelt for antistoff produsert i høns.

Forsøksdyrkomiteén har nå undersøkt produksjonen av IgY nærmere. Vi har vært i kontakt med arbeidsgruppen med eksperter på antistoff nedsatt av ENCN (European National Committee Network) og fikk følgende opplysninger (fra Thomas Bouquin og Erwin Roggen):

I Frankrike brukes ikke lenger høner til IgY antistoff-produksjon. De bruker hovedsakelig *in vitro* metoder og noen unntak er gitt til prosjekter med den tradisjonelle metoden på pattedyr (mus og lama). Det er strenge krav for hvilke prosjekter som skal få unntak, søker må bevise at antistoffet produsert i levende dyr både er av høyere kvalitet, affinitet og spesifisitet, og også raskere og

billigere enn ved å skifte til et *in vitro* alternativ. For å undersøke dette må det gjøres et pilotforsøk for å finne ut om det går an å lage et *in vitro* alternativ til det aktuelle antistoffet.

Det er gjennomført et prosjekt ved Universitetet i København, finansiert av det danske 3R senteret, om utvikling av en alternativ metode hvor man bruker aerosoler som administrasjon istedenfor injeksjon i hønene:

<https://en.3rcenter.dk/research/projects/projects-2015/a-refined-approach-to-producing-polyclonal-antibodies-in-chickens>

Forsøksdyrkomitéen har vært i kontakt med prosjektleder for dette prosjektet (Otto Kalliokoski) og her er informasjonen vi fikk: Prosjektet er ferdigstilt og metoden fungerer, men problemet var at vaksinene i hønseproduksjonen, som ble testet ut, var av så lav kvalitet at resultatet ble utilstrekkelig.

Et annet prosjekt ved School of Veterinary and Agricultural Sciences i Australia sammenlignet vaksinasjon av høns via øyedråper og aerosoler:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2019.1572103>

Deres resultater viste at vaksinasjon via øyedråper ga god respons i starten som avtok over tid, mens vaksinasjon via aerosoler ga først svak respons, men ble sterkere over tid. Det kan virke som om den alternative metoden for administrasjon via både øyedråper og aerosoler trenger mer utprøving.

Det finnes også et tidligere prosjekt på en metode med oral administrasjon istedenfor injeksjon, ved Uppsala Universitet:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12929578/>

Men her kan det også virke som om resultatet ga noe lav antistoff-konsentrasjon. Når det gjelder metoden med per oral administrasjon stiller komiteen seg skeptisk til om dette er en bedre metode, da gavage er blitt brukt. Utvikling av en metode med frivillig per oralt inntak ville vært bedre.

Når det gjennomføres en kost/nytte-vurdering så burde også bruken av adjuvant vurderes. I fjor ble det publisert en bok om IgY antistoffer, hvor noen forskjellige adjuvanter diskuteres:

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-030-72688-1.pdf>

En nylig publisert review-artikkel fra Collage of Veterinary Medicine i Beijing, viser en oversikt over produksjon av IgY i høns:

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.1c06750>

Denne artikkelen omtaler metoden som «non-invasive», dette henviser kun til høstingen av antistoffene fra eggene, til sammenligning med blodtapping. Men metoden inkluderer injeksjon av hønene. Artikkelen inkluderer en liste med fordeler med denne metoden i motsetning til den tradisjonelle metoden i for eksempel mus og kanin. Men forfatterne understreker også at en *in vitro* metode ville vært enda bedre.

En annen review-artikkel publisert National Centre for Scientific Research i Hellas, viser noen positive initiativer til å teste ut *in vitro* alternativer:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8472547/>

### **Forsøksdyrkomitéens uttalelse:**

Det er gjort tydelig fra EURL ECVAM at alle søknader om bruk av levende dyr til produksjon av antistoff hvor det finnes gode alternativer skal avslås, og at de virksomhetene som belager sin drift på antistoffproduksjon gis en frist for nedtrapping. Denne anbefalingen gjelder altså også for denne norske produsenten av IgY. Produsentens argument om at EURL ECVAMs anbefaling gjelder kun for antistoff produsert i serum er irrelevant, og unntar ikke metoden fra Forsøksdyrdirektivet som tydelig sier at hvis det finnes gode alternativer, så skal disse tas i bruk, uavhengig av metode.

Både den norske produsenten og flere publikasjoner om metoden beskriver antistoff-produksjon i egg som en raffinering sammenlignet med ascites-metoden eller metoder hvor ulike arter blodtappes. Både den norske produsenten og review-artikkelen beskriver metoden som non-invasive, men dette er altså kun med tanke på høstingen av antistoffet fra eggene.

Forsøksdyrkomitéen vil understreke at så lenge det brukes injeksjon av de levende hønene, og spesielt intramuskulær injeksjon som er mer smertefull enn injeksjon under huden, så er dette ikke en non-invasive metode og at en *in vitro* metode ville være å foretrekke. Forsøksdyrkomitéen vil påpeke at selv om hønseeggmetoden var en raffinering i forhold til andre alternativer på 90-tallet, må man ifølge Forsøksdyrforskriften likevel ta i bruk ytterligere raffinerte metoder når de blir tilgjengelige. Hvis produsentens argument er at antistoff-produksjon i høns er nødvendig fordi det per dags dato ikke finnes gode nok alternativer til denne metoden, anbefales det at Forsøksdyrforvaltningen stiller krav til dokumentasjon fra produsenten som sannsynliggjør dette.

Det har tidligere blitt meldt tilbake til EURL ECVAM at det kan være vanskelig for den enkelte forsker/produsent å dekke ressurser til utvikling av nye alternative metoder og svaret var tydelig at ansvaret for å delegere ressurser til dette arbeidet ligger hos den nasjonale myndighet. Dette bygger opp under Forsøksdyrkomitéens anbefaling fra august 2020 om at det bør etableres et 3R-senter i Norge som blant annet kan utforske gode alternativer i saker som denne. Uttalelsen finnes her:

<https://www.forsoksdyrkomiteen.no/wp-content/uploads/2020/08/Forsoksdyrkomite%CC%81ens-uttalelse-Overgang-til-forskning-uten-forsoksdyr-august-2020.pdf>

Forsøksdyrkomitéen oppfordrer myndighetene til fortgang i delegering av midler til utvikling av alternative metoder til bruk av forsøksdyr.

### **Komitéens godkjenning av uttalelsen:**

Denne uttalelsen er godkjent av komitéens medlemmer: Kristine Hansen, Anton Krag, Jenny Mattisson, Kathrine A. Ryeng, Espen Engh, Grete Bæverfjord og Hogne Bleie.

Imot: Ingen.

Denne uttalelsen er signert av komitéens leder: Tore S Kristiansen.



Tore S Kristiansen, 17.03.22

Leder for Forsøksdyrkomitéen – Norges nasjonale komité for beskyttelse av forsøksdyr.