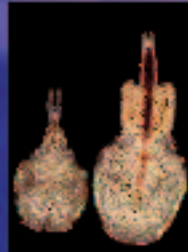




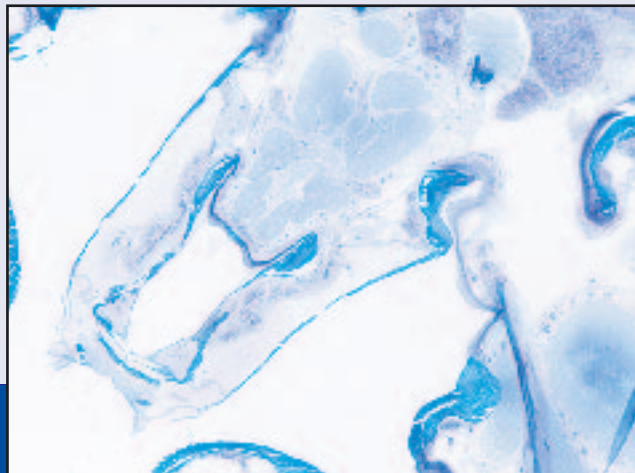
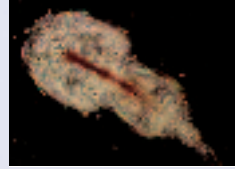
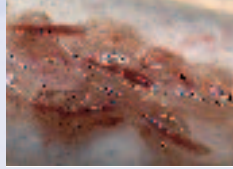
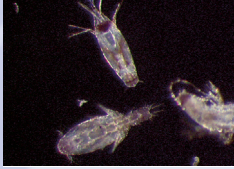
HAVFORSKNINGS TEMA 1-2003



Kampen mot lus på oppdrettsfisk:
**LØSNINGEN
LIGGER I GENENE**



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

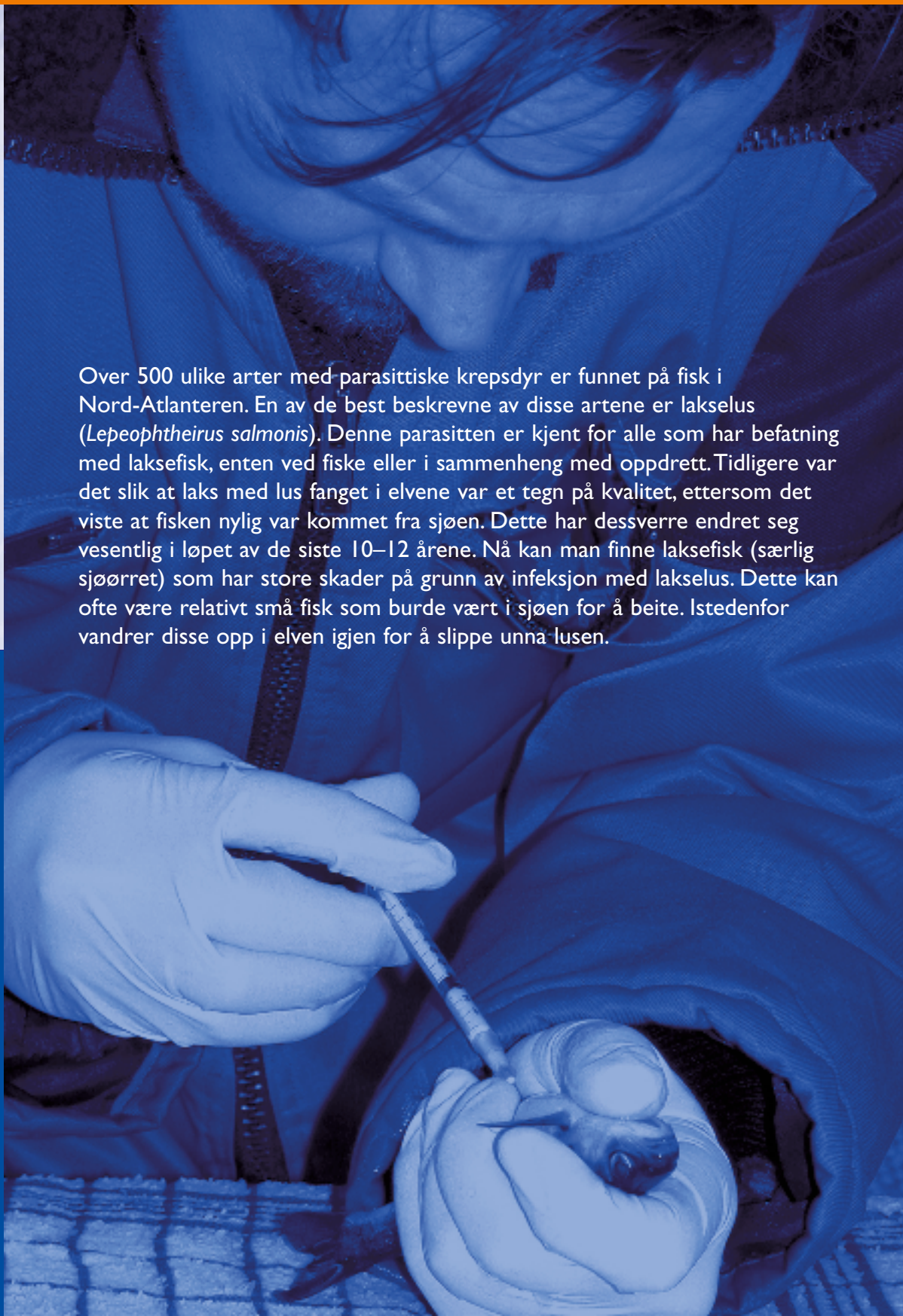


Bildet viser et snitt gjennom
lakselusens munnparti
forstørret 200 ganger

Kampen mot lus på oppdrettsfisk:

LØSNINGEN LIGGER I GENENE

Over 500 ulike arter med parasittiske krepsdyr er funnet på fisk i Nord-Atlanteren. En av de best beskrevne av disse artene er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Denne parasitten er kjent for alle som har befatning med laksefisk, enten ved fiske eller i sammenheng med oppdrett. Tidligere var det slik at laks med lus fanget i elvene var et tegn på kvalitet, ettersom det viste at fisken nylig var kommet fra sjøen. Dette har dessverre endret seg vesentlig i løpet av de siste 10–12 årene. Nå kan man finne laksefisk (særlig sjørørret) som har store skader på grunn av infeksjon med lakselus. Dette kan ofte være relativt små fisk som burde vært i sjøen for å beite. I stedet vandrer disse opp i elven igjen for å slippe unna lusen.



Norsk havbruksnæring har i alle år hatt betydelige problemer med lakselusinfeksjoner, men det var først etter at de viktigste bakteriesykdommene kom under kontroll rundt 1990 at lakselus for alvor kom i fokus. Samtidig ble det også rapportert om svært høye infeksjoner med lakselus på sjøørret og siden på utvandrende laksesmolt. Tilsvarende problemer var tidligere påvist i Skottland og Irland.

Store konsekvenser

Fram til i dag har parasitten medført betydelige utgifter for oppdrettsnæringen; i første rekke knyttet til behandling (kjemoterapeutika), tapt tilvekst, økte produksjonskostnader og nedklassifisering av fisk med luseskader. Selv om man etter hvert har fått noen få, gode behandlingsmetoder, utgjør lakselus stadig en kilde til store økonomiske tap i næringen. Det har vært beregnet at bare tapene i Norge i dag utgjør mellom hundre millioner og fem hundre millioner kroner per år, og at de globale tapene årlig ligger rundt en milliard kroner.

Norsk oppdrettsnæring har tatt problemet på alvor, og man har nå relativt god kontroll med lakselussituasjonen i de fleste oppdrettsanlegg. Det er etablert en grense på 0,5 hunnlus per fisk før tiltak skal iverksettes. En gjennomsnittlig intensitet på 0,5 lus per fisk utgjør ikke noe stort direkte tap for den enkelte oppdretter. Det høye

antallet oppdrettslaks i sjøen gjør imidlertid at lusen har tilgang på verter i en helt annen størrelsesorden enn tidligere. Det produseres så mye lakseluslarver at det flere steder utgjør et problem for villfisken. Oppdrettslaksen fungerer dermed som et lakselusreservoar for smitte til ville laksefisk.

Grunn til bekymring

Lakselusinfeksjoner kan påføre laksefisk store fysiske skader, men også en begrenset infeksjon kan redusere fiskens kvalitet og i tillegg gjøre den mer utsatt for andre infeksjoner.

Kjemisk behandling mot lakselus er i dag en innarbeidet del av lakseoppdrett, og avlusningsmidlene er gode. Erfaringer fra tilsvarende medikamenter i andre organismer indikerer imidlertid at det bare er et tidsspørsmål før lakselus utvikler resistens mot slike kjemikalier.

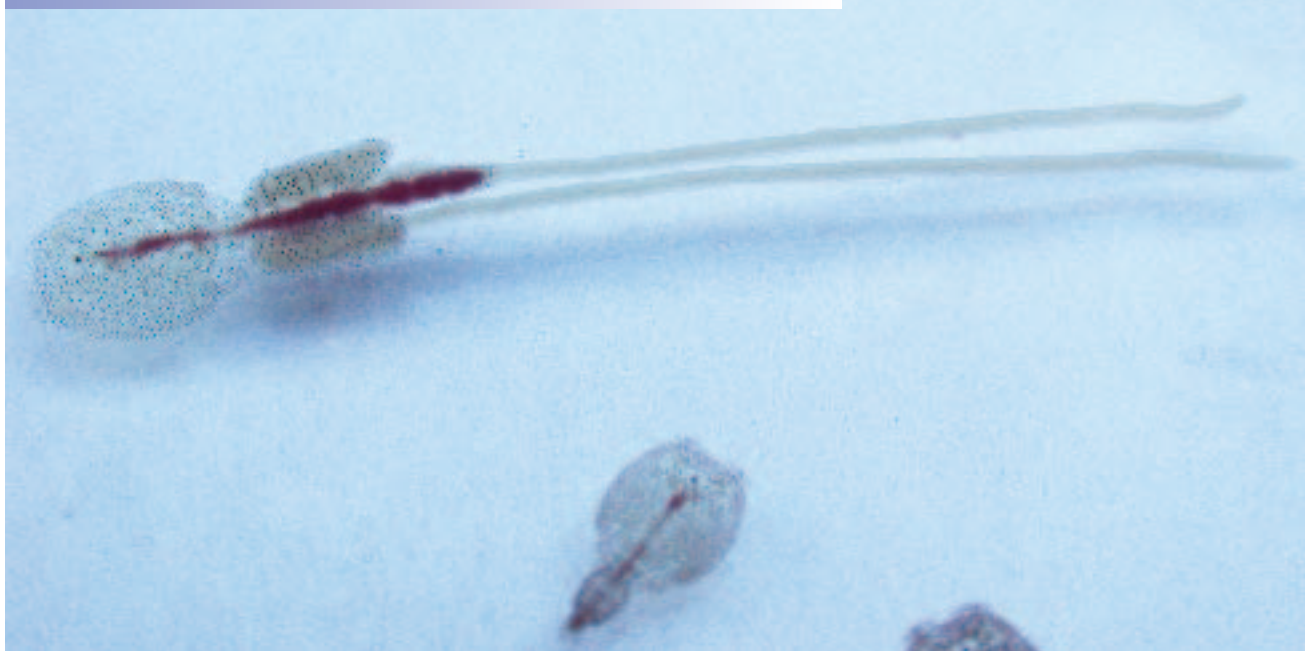
Det er også et tankekors at kjemisk behandling blant stadig mer bevisste konsumenter raskt kan gi norsk oppdrettsnæring et imageproblem, både i forhold til spørsmålet om kvalitet ("ren mat"), og til potensielt negative miljøeffekter av slik behandling. Biologisk bekjempelse med leppefisk ser ikke ut til å kunne bli mer enn et godt supplement til den kjemiske behandlingen. Det er derfor behov for nye, fremtidsrettede metoder for håndtering av lakselusproblemet.



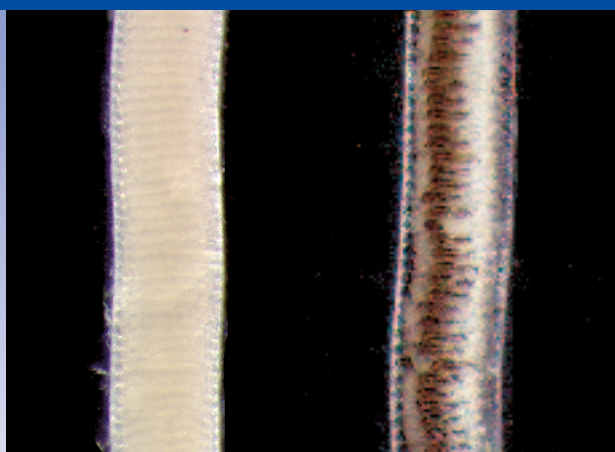


Lakselus samler seg ofte i tette klynger og kan forårsake store skader.

Lakselus, spesielt eggproduserende voksne hunner, drikker lakseblod (rød stripe er lakseblod i lusens tarmkanal). Blod er "høyenergiemat" og kan være en diett som er nødvendig for lusens evne til å produsere egg. Blodfordøyelse krever trolig et spesielt sett med aktive gener som er et potensielt angrepspunkt i fremtidig bekjempelse.



En voksen hunnlus som suger blod fra en laks, kan produsere to eggstrenger per 10. dag med inntil 400 egg i hver streng (lyse eggstrenger). Etter noen dager klekker eggene (mørke eggstrenger), og de frittlevende larvene slippes løs. På grunn av egen plommemasse kan disse leve i flere uker og fraktes langt med vannmassene i påvente av en vert. I en oppdrettsmerd med 100 000 laks med én eggproduserende lus per fisk, vil det slippes ut ca. 5 millioner luselarver hver dag. Prosesser som styrer eggproduksjonen hos lus er derfor et viktig angrepspunkt i fremtidig bekjempelse.



Viktig verktøy

I det følgende beskrives hvordan vi ved Havforskningsinstituttet kombinerer biologi og høyteknologi for å øke kunnskapen om lakselus. Målet er å utvikle en vaksine mot denne parasitten. Arbeid fra andre dyr viser at dersom f.eks. en vaksine skal virke mot ektoparasitter, må viktige prosesser i livssyklusen blokkeres via "angrep" mot helt spesifikke livsprosesser, kanskje ett enkelt, nødvendig protein. En vaksine utviklet mot flått på storfe er f.eks. basert på blokkering av et protein som er involvert i blodfordøyelse. Løsningen på fremtidens bekjempelse av ektoparasitter i oppdrett, som lakse- og torskelus, ligger derfor trolig i genene til lusen. Ved å identifisere gener som styrer viktige prosesser, f.eks. blodfordøyelse eller eggproduksjon, kan man forhåpentligvis finne lusens "svake punkt" og angripe dette, f.eks. via vaksinasjon.

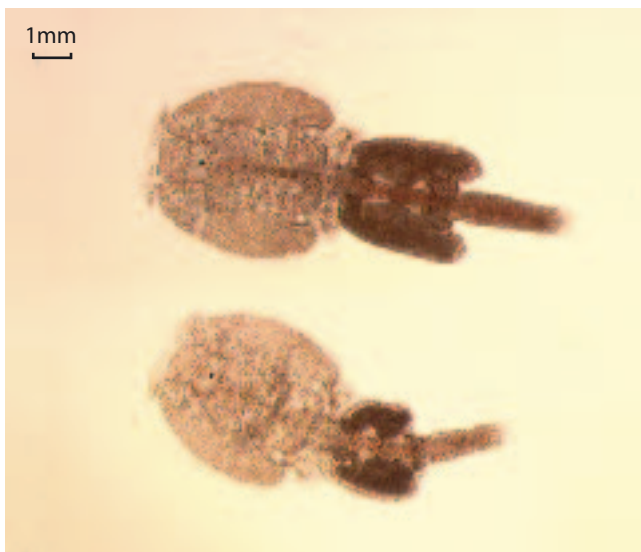
For å kunne drive god forskning er det viktig å ha tilgang på relevant biologisk materiale. Tidligere har man hentet lus fra lakselakterier, og det har vist seg vanskelig å holde en lakselusstamme i laboratoriet. Ved HI har vi nå klart å etablere en stabil "laboratoriestamme" av lakselus. Vi har nå tilgang på alle stadier og kan utføre forsøk kontinuerlig. Vi har også laget innavlede linjer, noe som er svært nyttig i molekylære studier. Systemet er utformet slik at mange eggstrenger fra enkeltlus kan inkuberes separat. Det kan benyttes til å beregne reproduksjonsevnen til mer enn hundre lus samtidig. Dette er et viktig verktøy for blant annet å evaluere effekten av en vaksine.



Eggstrenger fra enkeltlus klekkes i separate brønner med en kontinuerlig gjennomstrømning av filtrert sjøvann. Dette gjør det mulig å måle reproduksjonssuksess hos individuelle lus og er et viktig verktøy i vurderingen av en vaksines effekt. Systemet brukes også til å lage innavlede linjer og i jakten på mutante lus.



Storskalaproduksjon av luselarver. I slike inkubatorer har vi pr. i dag kapasitet til å lage opptil 130.000 infektive larver til smitteforsøk.



Bildet viser en normal lakselus og en lus med strukturelt avvik. Slike avvik kan avsløre defekte gener.

Genjakt via avl

Mange genes funksjon er oppdaget i innavlede organismer der spontane genfeil (mutanter) ses lettere enn i ville populasjoner. Dersom slike genfeil medfører at organismen får en synlig defekt i en aktuell biologisk prosess, f.eks. eggproduksjon, har man en organisme som kan "vise vei" til gener som styrer slike prosesser.

Ved Havforskningsinstituttet har vi nå etablert innavl av lakselus og funnet denne typen spontane mutanter. Spontane genfeil oppdages relativt sjeldent selv i innavlede familier, og det er arbeidskrevende å finne hvilke gener som er defekte i slike organismer. Ved hjelp av moderne genteknologiske metoder kan gener ødelegges med langt høyere frekvens, og i tillegg på en måte som gjør det relativt enkelt å identifisere det ødelagte genet. Dette arbeidet er nå under etablering ved Havforskningsinstituttet i samarbeid med SARS Internasjonale senter for marin molekylærbiologi i Bergen, som har lang erfaring med slik metodikk på sebrafisk.

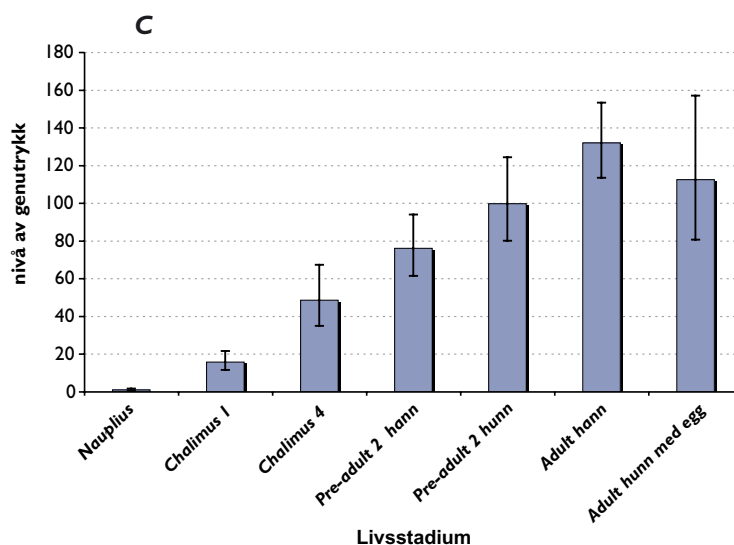
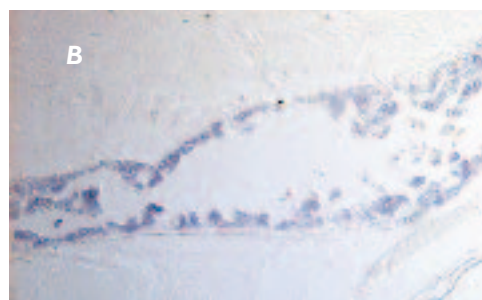
Ved å avle på lakselus med naturlige eller introduserte genetiske defekter som gir individer med lavere overlevelsessevne/reproduksjonsevne, satser vi på å kunne identifisere gener og prosesser i lakselusens livssyklus som kan blokkeres for eksempel via vaksinerings.

Kunsten å finne en nål i en høystakk...

En vaksine virker ved at et antigen, f.eks. døde bakterier, injiseres i en organisme. Organismens eget immunforsvar vil så produsere antistoffer som vil kunne blokkere en senere infeksjon med bakterien. Mot avanserte dyr som lakselus vil det ikke fungere med en vaksine basert på hele organismen. Det har imidlertid vist seg at isolerte antigener, f. eks. et enkelt protein, kan gi en effektiv beskyttelse også mot ektoparasitter som lakselus.

En lakselus har 10 000–20 000 gener, fordelt i et genom på 572 millioner basepar. Å finne gener som koder for antigener som gir god beskyttelse mot lakselus, krever koordinert anvendelse av en rekke molekylærbiologiske teknikker.

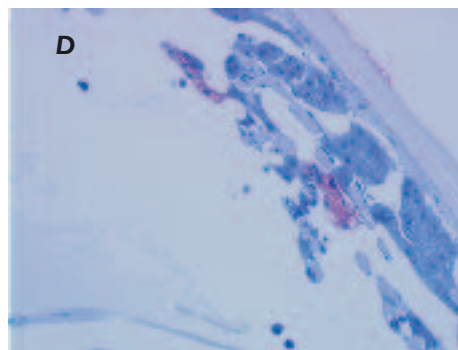
Gener oversettes til proteiner. I denne prosessen dannes det et mellomstadium som kan isoleres og sekvenseres (EST-sekvensering). Havforskningsinstituttet har til nå



Bilde A viser en voksen hunn lus med blod i tarmen. Bilde B viser hvor i tarmen genet til et bestemt fordøyelsesenzym er aktivt (*in situ*-hybridisering, mørkt område), mens grafen (C) viser i hvor stor grad det er påskrudd i forskjellige stadier i lusens livssyklus (kvantitativ PCR). Bilde D viser tilstedeværelsen av antistoffer (rød-lilla områder) fra laks i lusens tarm (immunohistokjemi).

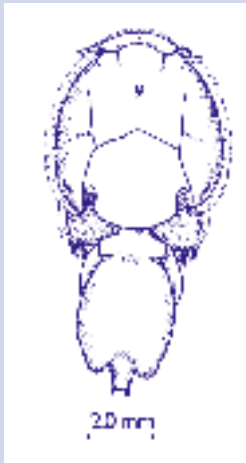
sekvensert mer enn 2 millioner basepar, fordelt på om lag 3500 EST-er. Dette er den største sekvensdatabase for lakselus i verden. Ved å sammenligne disse sekvensene med kjente sekvenser i offentlige databanker, kan vi si noe om hvilke proteiner disse koder for, og ut fra dette velge mulige vaksine-antigener.

Molekylære teknikker gjør det mulig å lokalisere hvor, når og i hvor stor grad et gen er aktivt i en organisme. Aktive gener kan lokaliseres i organismen ved hjelp av en metode kalt *in situ*-hybridisering, og det ferdige proteinet kan også lokaliseres ved hjelp av såkalt immunhistokjemi. Videre kan man måle i hvilken grad et gen er aktivt (kvantitativ PCR). Denne informasjonen gir oss grunnlag for å begrense antallet potensielle antigener ytterligere, før disse produseres og prøves ut i vaksiner.





Lepeophtheirus hippoglossi, på kveite og blåkveite.



Lepeophtheirus pollachius, på sei, lyr og lange.

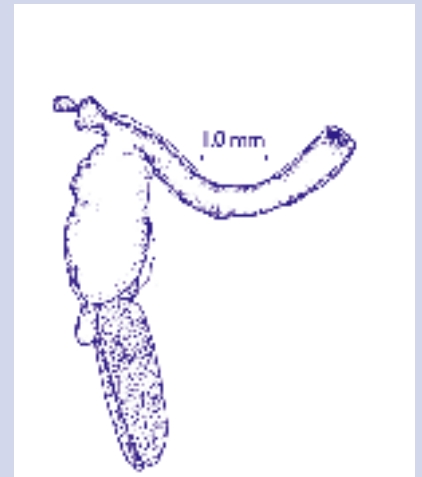


Skottelus (*Caligus elongatus*).
Er funnet på over 80 forskjellige fiskearter.

Lus på marine arter

Lakselus er bare én av mange parasittiske krepser som finnes på fisk i norske farvann. De fleste marine fiskearter har én eller flere typer lus. Oppdrett av marin fisk er i dag et av de nye satsingsområdene i Norge. Torsk og kveite er de artene der man er kommet lengst. Begge disse artene har sine lus. På torsk har man "torskelus" (*Caligus curtus*), og på kveite har man "kveitelus" (*Lepeophtheirus hippoglossi*). I tillegg vil man ofte kunne finne "skottelus" (*Caligus elongatus*) på disse og andre fisk i det marine miljø (dette gjelder også laks). Oppdrett av torsk og kveite foregår i beskjeden skala sammenlignet med laks, og det er derfor vanskelig å si hva som vil bli de "viktige" parasittsykdommene i fremtiden. Med utgangspunkt i erfaringene fra oppdrett av laksefisk er det nærliggende å anta at lus vil bli et problem også her. Siden luseartene som går på torsk og kveite, er nært beslektet med lakselus, vil kunnskap om lakselus også være relevant for lus på marin fisk.

Tegningene er hentet fra boken "Copepods Parasitic on Fishes", 1992 Z. Kabata, *Synopsis of the British Fauna*, No. 47.



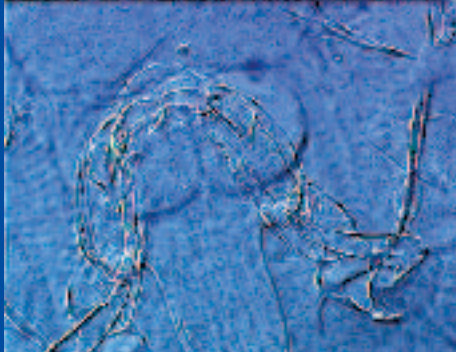
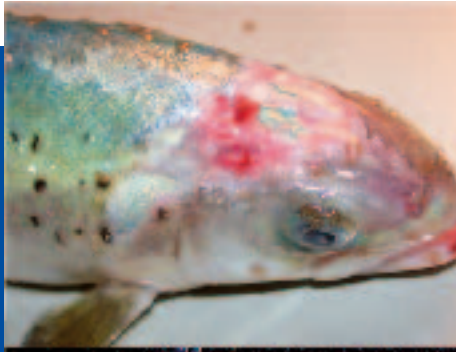
Clavella adunca, liten hvit parasitt som sitter ytterst på finnene, rundt gattet eller i munnhulen på en rekke fisk, bl.a. torsk, lyr og sei.



Holobomolochus confusus, svært vanlig forekommende på torsk, lever i nesehulen.



Gjellermark (*Lernaeocera branchialis*), på torsk og en rekke andre fisk i torskfamilien.



The salmon louse problem – A GENETIC APPROACH

More than 500 species of parasitic copepods have been observed on fish in North Atlantic waters. One of the species that many are familiar with is the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). The salmon louse is a common parasite on salmonids in the northern hemisphere that has been known for a long time. During the last few decades, growing attention to *L. salmonis* has emerged since it is one of the most significant diseases in salmon aquaculture. This parasite is responsible for serious financial losses in the salmon farming industry. Detrimental environmental impacts in the shape of severe infections of wild salmonids are also linked to infections from fish farms. Salmon louse infections are currently controlled by the chemical treatment of farmed fish. In Norway, the government has established thresholds for treatment (i.e. 0.5 female lice per fish). The emergence of resistance to the neurotoxin utilised as medication against pathogens such as the salmon louse is a significant concern. In this context, it is important to develop new and improved methods for controlling salmon louse in farmed fish. The ideal method is vaccination, and vaccines against bacterial and viral pathogens are currently a prerequisite in Norwegian aquaculture. In order to develop a vaccine against a parasite like the salmon louse detailed knowledge of key biological processes is essential. Recent advances in molecular biological methods have opened up new routes for the development of vaccines. At the Institute of Marine Research, state-of-the-art molecular tools are being utilised to identify target antigens in the salmon louse. These tools include expressed sequence tags (EST) sequencing, microarray, quantitative PCR and establishment of transgenic salmon lice. Our research focuses particularly on acquiring a molecular-level understanding of blood digestion and egg production in *L. salmonis*. Our goal is to identify key points in these processes that can be targeted in the future through a vaccine.

KONTAKTPERSONER:

Frank Nilsen

Tlf.: +47 55 23 63 02

E-post: frank.nilsen@imr.no

Petter Frost

Tlf.: +47 55 23 63 62

E-post: petter.frost@imr.no

Lars Hamre

Tlf.: +47 55 23 85 80

E-post: lars.are.hamre@imr.no



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

Nordnesgaten 50

N-5817 Bergen, Norway

Tlf.: +47 55 23 85 00

Faks: +47 55 23 85 31

INFORMASJONEN

Tlf.: +47 55 23 85 21

E-post: informasjonen@imr.no

www.imr.no