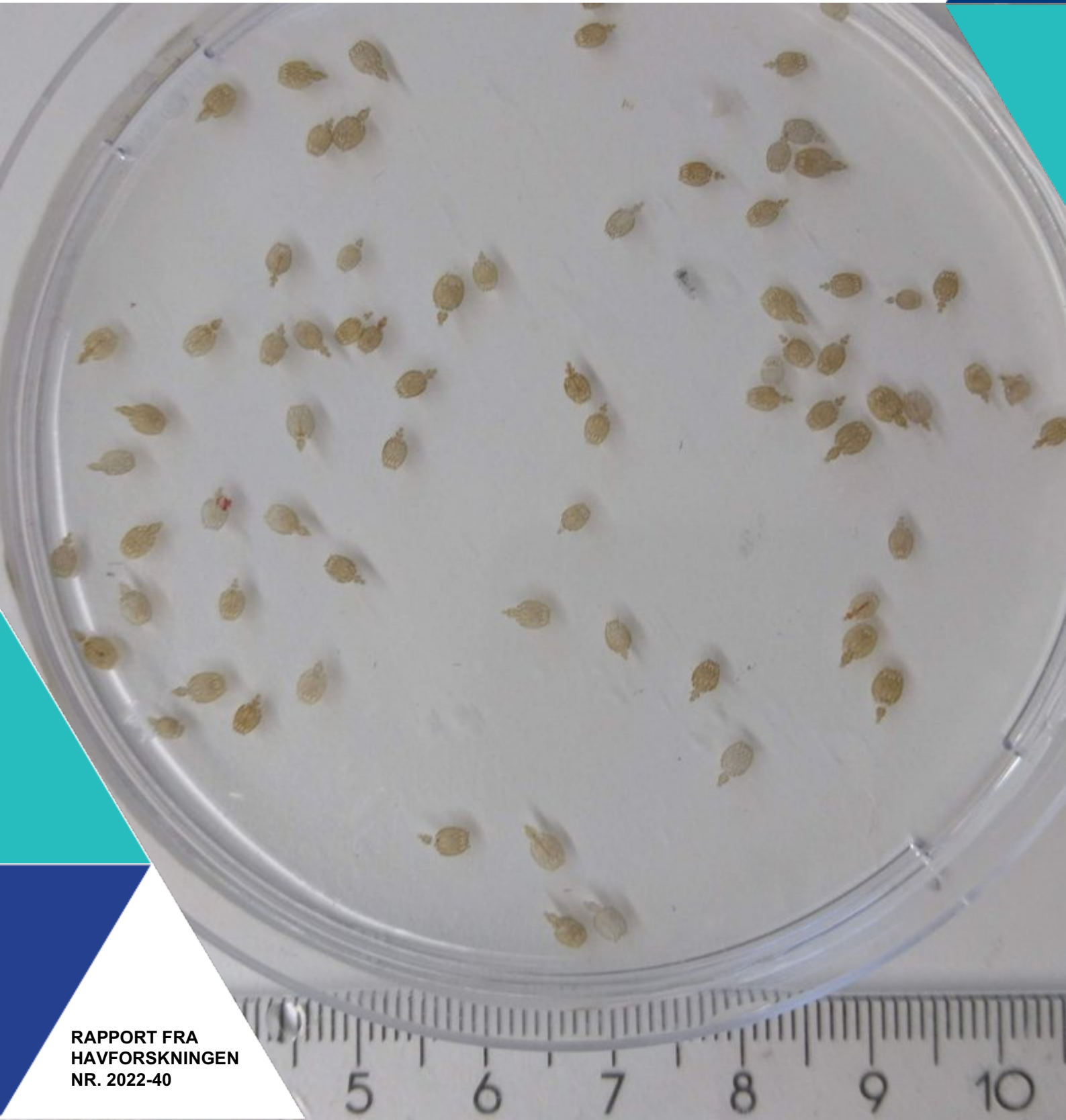




SLUTTRAPPORT FOR INFEST

Effekter av infestasjonsparametere på interaksjonen mellom laks og lakselus

Sussie Dalvin og Mathias Stølen Ugelvik (HI)



Tittel (norsk og engelsk):

Sluttrapport for INFEST
Final project report: INFEST

Undertittel (norsk og engelsk):

Effekter av infestasjonsparametere på interaksjonen mellom laks og lakselus
Effects of infestation parameters on the interaction between salmon and salmon lice

Rapportserie:

Rapport fra havforskningen
ISSN:1893-4536

År - Nr.:

2022-40

Dato:

28.10.2022

Forfatter(e):

Sussie Dalvin og Mathias Stølen Ugelvik (HI)

Forskningsgruppeteider(e): Bjørn Olav Kvamme (Smittespredning og sykdom)

Godkjent av: Forskningsdirektør(er): Geir Lasse Taranger
Programleder(e): Terje Svåsand

Distribusjon:

Åpen

Prosjektnr:

15514

Oppdragsgiver(e):

Fiskeri- og havbruksnæringens
forskningsfinansiering

Oppdragsgivers referanse:

901565

Program:

Fremtidens havbruk

Forskningsgruppe(r):

Smittespredning og sykdom

Antall sider:

20

Sammendrag (norsk):

Lakselus er per dags dato en av de største utfordringene i norsk og internasjonalt lakseoppdrett. Langsiktige løsninger for å begrense infestasjoner er nødvendig for å opprettholde en bærekraftig industri. Lakselusen er en ektoparasitt som sitter på huden av vertsfisken og kontakten mellom immunsystemet til verten og parasitt er derfor begrenset. Atlantiske laksefisk (Laks, sjøørret og sjørøye) er mottakelige for gjentakende infestasjoner med parasitten. Prosjektet har studert interaksjonen mellom lakselus og Atlantisk laks med spesielt søkelys på det immunologiske svaret i laksehud hvor lakselusen sitter.

Denne immunologiske responsen var karakterisert ved bruk av gen ekspresjonsanalyse og forsøkene belyste hvordan infestasjonsforhold som temperatur, smittepress og infestasjonsmønster påvirkede denne responsen. Genuttrykk i laksen viste de største forandringer i huden rett under hvor lus var plassert. Høye temperaturer var positive for laksen sin evne til å reagere på infestasjonen, mens antallet av lakselus hadde lite betydning. Den immunologiske responsen på gjentatt infestasjoner var kompleks og knyttet opp imot antallet av lakselus, lengde av infestasjon og stress i fisken.

Basale biologiske studier av samspillet mellom lakselus og fisken er viktig verktøy for å kunne håndtere og begrense lakselusinfestasjoner i fremtiden.

Sammendrag (engelsk):

The salmon louse is currently one of the biggest challenges in Norwegian and international salmon farming. Long-term solutions to limit infestations are necessary to maintain a sustainable industry. The salmon louse is an ectoparasite that sits on the skin of the host fish and the contact between the immune system of the host and the parasite is therefore limited. Atlantic salmonids (salmon, sea trout and char) are susceptible to repeated infestations with the parasite. The project has studied the interaction between salmon lice and Atlantic salmon with a particular focus on the immunological response in salmon skin where the salmon lice reside.

This immunological response was characterized using gene expression analysis and the experiments highlighted how infestation conditions such as temperature, infection pressure and infestation pattern affected this response. Gene expression in the salmon showed the greatest changes in the skin just below where the lice were positioned. High temperatures were positive for the salmon's ability to react to the infestation, while the number of salmon lice was of little importance. The immunological response to repeated infestations was complex and related to the number of salmon lice, length of infestation and stress in the fish.

Basic biological studies of the interaction between salmon lice and the fish are important tools for managing and limiting salmon lice infestations in the future.

Innhold

1	Innledning	5
1.1	Prosjekt informasjon	6
2	Problemstilling og formål	7
3	Prosjektgjennomføring	8
4	Oppnådde resultater	9
4.1	Lokaliseringen av immunresponsen mot lakselus	9
4.2	Immunrespons i huden «Temperaturforsøket»	9
4.3	Immunrespons i huden «Doseforsøket»	9
4.4	Immunrespons i huden «Gjentatt infestasjonsforsøket»	9
4.5	Immunrespons i hodenyre	10
4.6	Stress	10
4.7	Lusepåslag	11
4.8	Proteomikkstudie av protein fra slim	11
4.9	Videre bruk av resultater	12
5	Hovedfunn	13
6	Referanser	14
7	Leveranser	16

1 - Innledning

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) smitte og håndtering av infestasjonen er en stor utfordring i norsk akvakultur av laksefisk. Lakselusmitte på oppdrettsfisk har mange konsekvenser inkludert produksjon av smittsomme lakseluslarver som kan smitte villfisk og andre oppdrettsfisk, nedsatt fiskevelferd og vekst hos oppdrettsfisken, mindre fleksibilitet i produksjonen og direkte beiteskader på huden til fisken og/eller i kombinasjon med sekundære infeksjoner.

Lakselus er en naturlig forekommende ektoparasitt på laksefisk i Nordatlanten. Lakselus har en direkte livssyklus, som betyr at med unntak av de planktoniske larvestadiene tilbringer lakselusen alle stadier på huden til laksefisk. Lakselus kan leve på verten i opptil 15 måneder. I denne perioden må lakselusen håndtere fisken sine forsøk på å kvitte seg med de både gjennom adferdsmessige og immunologiske responser. Samtidig forsøker fisken å minimere skadene som lusen påfører fisken via beiting og immunmodulering, for å bedre kunne motstå nye infestasjoner av lakselus og/eller andre fiske sykdommer. En rekke studier har beskrevet denne interaksjonen, men de fleste studiene begrenser seg til enkle infestasjoner som til dels bare er fulgt i en kort tidsperiode (for eksempel Braden mfl. 2012, Øvergård et al. 2018, Skugor mfl. 2008, Sutherland mfl. 2014). Dette skiller seg imidlertid fra situasjonen i oppdrettsanlegg, der fisken ofte smittes flere ganger, med varierende mengder lakselus og sjøtemperaturen varierer. Dette kan resultere i langvarige infestasjoner hvor lusen ofte har utviklet seg til det preadulte eller adult stadiet før infestasjonen oppdages, og eventuelle tiltak blir iverksatt.

Langs norskekysten varierer sjøtemperaturen både i henhold til geografi (nord-sør) og mellom årstidene. Generell er de laveste temperaturene i Nord-Norge mot slutten av vinteren og de varmeste temperaturene i Sør-Norge mot slutten av sommeren. Temperatur har stor påvirkning på lakselus med forsinkelse av utvikling og nedsatt evne til å infisere fisken ved lave temperaturer (Hamre mfl. 2019, TEMPLUS sluttrapport FHF prosjekt 901283). Samtidig påvirker sjøtemperaturer også fisken sin evne til å kunne håndtere infestasjoner. Ved lave temperaturer har fisk nedsatt immunologiske responser (generelle og spesifikke) og evne til å hele sår (Abram mfl. 2017, Alcorn mfl. 2002, Anderson and Roberts 1975). Sårtilheling er essensielt for å opprettholde god fiskehelse og velferd og studier av lakselus infestasjoner på motstandsdyktige Stillehavslaks (Coho) viser at sårtilheling er sterkt aktivert og spiller en stor rolle i fisken sin evne til å motstå lakselus (Albright and Johnson 1992 og personlig kommunikasjon L. Braden). Nedsatt evne til sårtilheling og redusert immunrespons er observert i Atlantisk laks (Jensen mfl. 2015), men ytterligere studier av dette, særlig i kombinasjon med lakselus, er nødvendig.

Det er godt dokumentert at luserelaterte skader på fisken henger sammen med antallet lakselus og fiskens størrelse (oppsummert i Taranger mfl. 2015). Stor fisk håndterer flere lakselus enn mindre fisk. Likevel har disse studiene primært satt søkelys på måling av fysiologiske parametere i blod og kvantifisering av mortalitet hos fisken. Det finnes imidlertid lite informasjon om de bakenforliggende molekylære prosessene inkludert den immunologiske responsen til fisken. Suksessen til den enkelte lakselusen, altså sjansen for å overleve til voksen er heller ikke blitt korrelert til antall lakselus per fisk. Gjentakende infestasjoner med lakselus er studert i svært liten grad i laboratoriet til tross for at dette er den naturlige situasjonen både for vill og oppdrettsfisk. Forsøk med gjensmitte av fisk som tidligere har vært smittet, men der lusen fra tidligere infestasjoner er fjernet har vist at Atlantisk laks ikke oppbygger varig immunitet eller andre mekanismer som hindrer ny smitte (Overton mfl. 2018, Bui mfl. 2018, Glover mfl. 2005). For å bedre forstå hvordan luse infestasjoner skjer under naturlige forhold er der derfor viktig å få innsikt i effekten av gjentakende infestasjoner på fisken sin respons og lusen sin evne til å vokse på fisken.

Studier av samspillet mellom lakselus og fisk er nødvendige for å forstå hvilke prosesser i lusen som muliggjør etablering og vedlikehold av infestasjonen på verten og hvilke prosesser i fisken som begrenser infestasjonen. Dette kan bidra til utvikling av vitenskapsbaserte strategier, basert på en forståelse av hvordan grunnleggende biologiske prosesser kan påvirke fisken sin evne til å bekjempe infestasjonen og/eller metoder som unnytter lakselusen sine sårbare punkter. Eksempler på dette inkluderer utvikling av vaksiner, avl av mer luseresistent fisk (tradisjonell eller ved hjelp av gen redigering som CRISPR), immunfremmede fiske fôr og tiltak knyttet til håndtering av fisk ved lave temperaturer. Eksperimentelle studier inkludert i denne søknaden vil øke vår kunnskap om samspillet mellom lakselus

og fisk med kvalitative og kvantitative data på fisken sin respons sett i sammenheng med lusen sin respons, evne til å smitte og overleve på fisken. I tillegg til å kunne bidra til utvikling av nye forebyggende strategier, vil disse resultatene også være viktig for å evaluere eksisterende og fremtidige tiltak.

1.1 - Prosjekt informasjon

Prosjektet startet 1.5.2019 og ble avsluttet 31.10.2022. Prosjektet ble utført ved Havforskningsinstituttet med bruk av eksperimentelle fasiliteter i Matredal og i Bergen. Prosjektet var ledet av seniorforsker Sussie Dalvin og budsjettet utgjorde 9.072.000 kr. Prosjektet hadde et aktivt samarbeid og delte referansegruppe med Modulus prosjektet (ledet av Aina Øvergård) ved Universitetet i Bergen. Referansegruppen bestod av Aoife Westgård (Emilsen Fisk), Bjarne Reinert (Lerøy Seafood Group), Karl Fredrik Ottem/Tiril Slettjord (Cermaq Norway). FHF ansvarlig var Kjell Maroni.

Mye av prosjektperioden sammenfalt med den globale COVID-19 pandemien. Til tross for dette ble prosjektet relativt lite påvirket. Pandemien begrenset derimot samarbeidet med Modulus prosjektet, der det hadde vært gunstig med flere fysiske møter. All konferansedeltakelse ble også forskjøvet mot slutten av prosjektet. Praktisk arbeid med fisk i tankforsøk pågikk i perioder med relativt få inngripende koronatiltak, siden det ved prøveinnsamling er vanskelig å opprettholde stor avstand til andre medarbeidere. Prosjektmedarbeidere hadde tilgang å bearbeide prøver i laboratoriet etterpå. Prosjektmedarbeideren sin stilling ble utvidet med 3 måneder (tilleggsfinansiering fra Havforskningsinstituttet) for å kompensere for forsinkelser knyttet til pandemien, noe som var positivt for tid til analyse av resultater.



2 - Problemstilling og formål

Bakgrunnen for prosjektet var at fisk som smittes i sjø naturlig vil oppleve ulike scenarier når de smittes: Temperaturen varierer geografisk og mellom de ulike sesongene, som påvirker både laksen og lakselusen. Mengden av kopepoditter i vannmassene rundt et anlegg er i tillegg påvirket av produksjon av luselarver i områder oppstrøms for anlegget. Sist, men ikke minst vil de fleste fisk bli smittet flere ganger, ikke en enkelt gang som er vanligst i laboratorieforsøk med lakselus.

Hovedmål for prosjektet var å øke kunnskapen om prosessene i både lus og fisk i løpet av infestasjonens ulike faser, under forskjellige miljømessige forhold, med mål om å kunne bidra med kunnskap til å utvikle metoder for bedre forebygging og kontroll med luseinfestasjoner i fremtiden.

For å oppnå dette studerte vi effekten av tre grunnleggende faktorer som påvirker infestasjonen: **Temperatur, dose og infestasjonsmønster**. Herunder ble følgende spørsmål knyttet til disse faktorene:

- Hvordan påvirker temperaturen laksen sin evne til å håndtere lakselusinfestasjoner og hvilke konsekvenser har dette for utfallet av infestasjonen?
- Hvordan må temperatur integreres i håndtering av infestasjoner med tanke på lokalitet og sesong?
- Hvilke effekter har dose på interaksjonen mellom laks og lakselus?
- Er det kvantitative og eller kvalitative forskjeller på å utsette fisk for gjentakende små infestasjoner eller én kraftigere smitteepisode?
- Hvilke faktorer (temperatur, dose og infestasjonsmønster) har størst innflytelse på hvordan fisken håndterer infestasjon?
- Under hvilke smitteforhold, må man i høyere grad forvente store negative effekter av påslag?

3 - Prosjektgjennomføring

I prosjektet ble det gjennomført tre forskjellige smitteforsøk med infestasjon av Atlantisk laks med lakselus: et med ulike temperaturer, et hvor fisken ble smittet med ulike doser og et hvor fisken ble smittet to ganger. **Hovedfokus i prosjektet var å studere genuttrykk av immun og sårtilhelingsgener i huden til fisken.** Felles for forsøkene var at fisken ble undersøkt tre ganger i løpet av perioden hvor lus utviklet seg fra kopepoditter til voksne. På grunn av forekomsten av ulike lusestadier er det sannsynlig at fisken sin respons varierer over tid. I tillegg er det vanlig at immunresponsen endrer seg over tid, fra den første fasen som er dominert av generelle medfødte elementer til en reaksjon som er mer spesifikk rettet mot den aktuelle parasitten.

Prøvetaking i de tre forsøkene var identisk: Umiddelbart etter avliving ble hudprøver tatt ved å skjære ut små biter av hud (4x4mm) med skalpell. Eventuelle muskelrester ble skrapet av før prøven ble plassert på tørris. Fra infisert fisk ble det tatt to hudprøver: en rett under lus og en på tilsvarende hud, men der det ikke var lus. Fra kontroll fisk ble det tatt en hudprøve tilsvarende prøven der det ikke var lus på infisert fisk. RNA ble senere ekstrahert fra hudprøver og en kvantitativ analyse av mengden av utvalgte immun og sårtilhelingsgener ble utført med bruk av realtime RT-PCR.

I tillegg til hudprøvene ble stadiet til lus og antallet lus per fisk notert og blodprøver til måling av plasma kortisol og vevsprøver av hodenyre innsamlet. Vi forsøkte også å utvikle en metodikk med ikke-inngripende prøvetaking av fisk i form av slimprøver tatt fra hud og kortisolprøver tatt i vannet.

4 - Oppnådde resultater

Alle resultater er kommunisert gjennom både populærvitenskapelige og vitenskapelige artikler (se kapittel 8), hvor det komplette forsøksoppsettet og mer detaljer er tilgjengelig.

4.1 - Lokaliseringen av immunresponsen mot lakselus

Når lakselus infiserer en fisk, forventer man en immunologisk respons i fisken. Styrken, typen og spesifisiteten i denne responsen kan avgjøre forløpet til infestasjonen. Vi fokuserte hovedsakelig på huden siden den er i direkte kontakt med lusen, men vi undersøkte også responsen mot lakselus i hodenyre, som er et sentralt immunologisk organ hos fisk. Våre resultater samsvarte med en rekke nyere studier som viser at responsen på lakselus er sterkest lokalt i huden og med de største endringene i huden rett under lakselusen. Forskjellene mellom hud fra kontroll (ikke infisert) fisk og hud fra infisert fisk, men der det ikke er lakselus, var små. Erfaringer fra forsøkene er også at hud kan ha ganske stor variasjon i genuttrykk mellom ulike hudbiter. Dette samsvarer med funn av Holm med flere (2017), som fant variasjon i hud fra ulike områder på fisken. Dette kan muligens være et resultat av at hud er et heterogent vev som består av mange ulike cellyper. Det kan derfor være utfordrende å ta prøver i huden, men det kan også muligens påvirke hvor lakselusen etablerer seg på fisken.

4.2 - Immunrespons i huden «Temperaturforsøket»

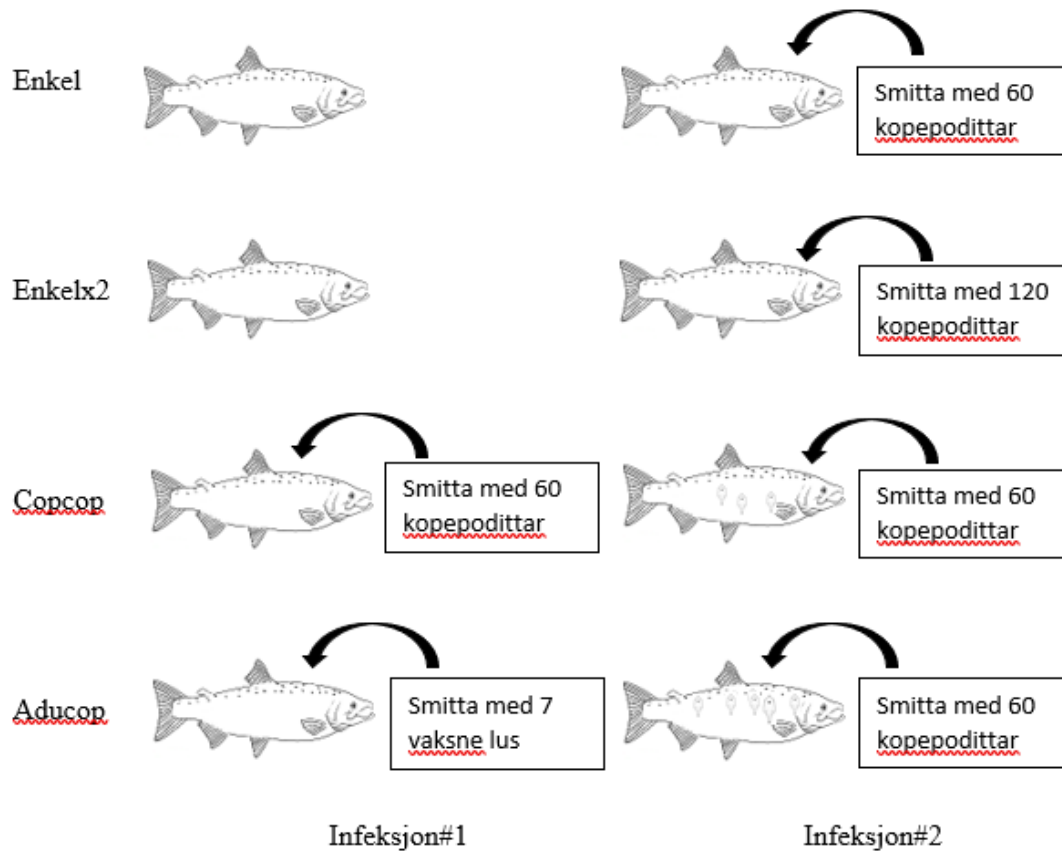
Tidlige studier av temperatur og lakselus har primært satt søkelys på temperaturens effekt på lakselusen sin utvikling og suksess, hvor det er observert at lakselusen utvikler seg saktere og har dårligere evne til å smitte ved lave temperaturer. I dette studiet ble fisken sin evne til å respondere på lakselusen observert ved 4, 8, 12 and 16°C. Den immunologiske responsen i huden var svakere og til dels forsinket ved lave temperaturer. På tross av den reduserte immunresponsen hos verten, fører lave sjøtemperaturer til at færre lakselus greier å etablerer seg på fisken. Det vil derfor sannsynligvis være enklere å kontrollere lakselus ved lave sjøtemperaturer, som kan forklare hvorfor lakselus er et mindre problem nord enn sør i landet

4.3 - Immunrespons i huden «Doseforsøket»

I forsøket undersøkte vi effekten av dose på fisken sin immunrespons i huden. Smittenivået ble holdt relativt lavt for bedre å illustrere realistisk smitte for oppdrettsfisk. Forsøket omfattet grupper av fisk med to ulike smittenivåer i tillegg til usmittet kontrollfisk (0, 10 og 25 lus/fisk ved første samplingtilsvarende 0,02 og 0,06 chalimi/g fisk). Vi observert ingen konsistente forskjeller mellom responsen mot lakselus ved høy eller lav dose.

4.4 - Immunrespons i huden «Gjentatt infestasjonsforsøket»

Smitte med sykdom og den resulterende immunresponsen kan for noen sykdommer resultere i at individet blir immunt mot den aktuelle parasitten. Ny smitte vil da føre til en kjapt og beskyttende immunrespons basert på spesifikke mekanismer. For laksefisk fra Atlanterhavet ser vi ikke en slik fullstendig beskyttelse ved andregangs smitte, men forsøk har likevel observert forskjeller mellom tidligere smittet og usmittet fisk. Formålet med dette forsøket var derfor å studere om det å bli smittet to ganger med lakselus utløser en annen immunrespons i huden enn det å bli smitte en enkel gang med lus. Forsøksoppsettet ble justert i forhold til den opprinnelig beskrivelse etter diskusjoner i referansegruppemøtet og er illustrert i figur 1.



Figur 1 Forsøksoppsett fra gjentatt smitteforsøk.

I forsøket inngikk to kontrollgrupper for å kunne ta høyde for en eventuell effekt av dose. Altså at eventuelle effekter ikke var på grunn av at fisken ble smittet to ganger, men at dosen var dobbel så stor. Resultatet av forsøket var til dels utfordrende å tolke siden immunresponsen endret seg over tid og varierte mellom de ulike gruppene. Likevel har vi sterke indikasjoner på at fisk som hadde lakselus fra før responderte annerledes på ny smitte. Fisken som tidligere var infisert (Copcop gruppen i figuren over) hadde en tidligere respons mot lusen (sampling 1), var responsen i denne gruppen mindre senere i infestasjonsforløpet (sampling 2 og 3) enn i fisk fra de tre andre gruppene.

4.5 - Immunrespons i hodenyre

Hodenyrene er organ med mange ulike funksjoner, og det er blant annet viktig for stress og systemiske immunologiske responser hos fisk. Færre gener var opp eller nedregulert i hodenyren sammenlignet med hud, men spesielt i hudprøvene tatt rett under lusen Dette støtter teorien at det er en begrenset systemisk respons mot lakselus i Atlantisk laks, noe som kan vanskeliggjøre avl av mer luseresistent fisk. Vi så imidlertid en respons både i noen generelle og spesifikke immuntranskripter i hodenyrene til infisert fisk, mens sistnevnte var bare observert i fisk infisert med voksen lus i den gruppen som hadde den lengste pågående infestasjonen (Copcop gruppen). Det kan indikere at det kan ta lang tid å inducere spesifikke responser mot lakselus i Atlantisk laks, som kan medvirke til artens mottakelighet mot lus. Lave temperaturer kan trolig ytterligere forsinke denne responsen.

4.6 - Stress

Håndtering av fisk (for eksempel avlusning) og sykdommer som lakselus kan føre til en stress respons (akutt eller

kronisk) hos oppdrettsfisk. Høyt stressnivå kan videre påvirke fisken sin evne til å motstå ny lusesmitte eller andre infeksjoner, siden stresshormonet kortisol kan negativt påvirke fisken sin immunrespons. For å undersøke stressnivået til fisken tok vi derfor blodprøver for å kunne måle plasma kortisol nivået. Vi prøvde også å måle kortisol utløpsvannet i doseforsøket, men disse samsvarte ikke med verdiene i plasma og ble dermed ikke brukt videre. Generelt så vi liten effekt av luseinfestasjonen på stressnivået til fisken, men dette er ved relativt lave lusedoser. Likevel så vi at selv om fisken tilsynelatende ikke var stresset av lusen, var de mer stressbare ved håndtering. Infisert fisk som ble tatt sent ut av karet og som dermed hadde blitt utsatt for stress flere ganger hadde høyere plasma kortisol nivåer enn uinfisert kontroll fisk som hadde gjennomgått samme behandling. Stress responsen til fisken ble også påvirket av temperatur og ved 4°C økte kortisol nivået ikke som ved høyere temperaturer. I forsøket med gjentatt infestasjoner, så vi at den gruppa som var infisert lengst (Cocpop gruppen) hadde høyest stressnivå tidlig i infestasjonen, men lavest nivå sent i infestasjonen. Ved siste sampling var kortisol nivået høyest hos den gruppen som var infisert en gang med en dobbel dose kopepoditter, selv om de hadde like mange lus som den gruppen som hadde den lengste luseinfestasjonen

4.7 - Lusepåslag

Påslag eller infestasjons og utviklingssuksess ble observert i alle tre forsøkene. Som påvist tidligere observerte vi fallende smitteeffektivitet ved lavere temperaturer. Vi observerte også fallende smitteeffektivitet med økte mengder av lakselus slik at vi fikk mer, men ikke dobbel så mange lus hvis vi doblet mengden kopepoditter (smittsomme lakselus). Videre var det færre lus fra den andre infestasjonen på fisk i gruppene som tidligere hadde vært eksponert for lus enn i den gruppa som tidligere var usmittet med lus. Det kan derfor tyde på at allerede infisert fisk er mindre mottakelig for ny lusesmitte enn tidligere usmittet fisk, men det er usikkert om dette er på grunn av endringer i fisken (f.eks. immunologiskrespons eller atferd) eller lusen (atferd).

4.8 - Proteomikkstudie av protein fra slim

Slimet til fisken har mange funksjoner inkludert å beskytte mot parasitter og mikroorganismer. Kunnskap om eventuelle endringer i slimet til infisert fisk er derfor viktig. Der ble derfor tatt prøver til identifisering og kvantifisering av proteiner i slimet på overflaten av huden. Prøven (n=6) ble tatt ved å legge 5 mm papirbiter på huden i 10 sekunder (figur 2). Prøver ble tatt fra kontroll fisk og fra infisert fisk (både under lus og fra områder uten lus). Senere ble protein ekstrahert og analysert med proteomisk og bioinformatisk analyse (LC-MS Proteomics profiling ved PROBE UiB). Dette ga informasjon både om hvilke proteiner som fantes i slimet, men og hvor mye som var til stede av de ulike proteinene.



Figur 2 Laks med papirbit (hvit sirkel) til prøvetaking av slim. Preadulte lakselus kan ses langs ryggen til høyre for papiret

Data fra denne analysen er svært lovende, og vi har identifisert mange ulike lakseproteiner (>6000) inkludert proteiner involvert i sårtilheling og immunresponsen. Videre ser vi forskjell i infisert fisk i prøver tatt under lusen og prøver tatt vekk fra lusen. Dette kan tyde på at det skjer endringer i slimet til fisken der lusen sitter. Dette samsvarer med den hovedsakelige lokale responsen mot lusen vi har observert i huden. Denne absorpsjonsmetoden er tidligere brukt på fisk (Fæste mfl. 2020), men ikke i forbindelse med lakselusinfestasjoner. Prosedyren er enkel, og det umiddelbare inntrykket er at denne typen analyse kan være et nyttig verktøy for å overvåke tilstanden til slimet på fisken. En stor

fordel med denne metoden er at siden den kan utføres uten å skade fisken, kan endringer i den samme fisken undersøkes over tid (f.eks. før og etter bruk av ikke medikamentelle lusebehandlinger). En lignende metodikk kan muligens også brukes til å måle kortisol på en skånsom måte.

4.9 - Videre bruk av resultater

Lave temperaturer har negativ effekter på laksen sin immunologiske respons mot lakselus, men dette får små konsekvenser for utfallet av infestasjonen eksperimenter og i oppdrett. Dette skyldes sannsynligvis at de negative effektene av lave temperaturer er større for lakselusen enn for fisken. Dette betyr også at vi kan forvente færre problemer med håndtering av lakselus i den kalde sesongen/lenger nord hvor temperaturene er lavere. Selv om laksen hadde en kraftigere/kjappere immunologisk respons ved høyere temperaturer så vi ingen beskyttende effekt og anlegg i områder med varmere vann (generelt eller sesongbetont) kan forventes å oppleve større utfordringer i håndtering av luseinfestasjoner. Dette må det tas høyde for i fremtidig planlegging i en tid med stigende sjøtemperaturer grunnet klimaendringer.

Gjentatt infestasjon, som vil være vanlig i sjø har effekter på fisken sin immunrespons, men det ble ikke observert klare indikasjoner på negative effekter utover den implisitte økende antall av lus og et noe høyere stressnivå tidlig i infeksjonen. Økte doser på fisken (ved lav smitte) har i seg selv lite effekt på fisken sin respons. I forhold til håndtering betyr dette at det å fjerne lakselus tidlig i infestasjonen ikke nødvendigvis er en stor fordel.

Av de tre undersøkte miljømessige faktorer var temperaturen den faktor som hadde størst effekt på fisken sin evne til å respondere på infestasjon med lakselus. Det skal bemerkes at prøvetaking var justert etter temperaturen slik at prøvetaking gikk over lenger tid for fiskegrupper ved lave temperaturer, siden lusen utviklingstid øker ved lavere temperaturer. Likevel ble en forsinket immunrespons observert. Gjentatt infestasjon påvirket immunresponsen, men ikke minst, hadde det også effekter på infestasjons/utviklingssuksess og stress. Dose på de undersøkte nivåer hadde ikke stor effekt på immunresponsen til fisken, men smittesuksessen var lavere med mer smitte.

5 - Hovedfunn

- Immunresponsen hos Atlantisk laks mot lakselus var større i hud enn i hodenyre som er et viktig immunologisk organ hos fisk. Responsen var lokal og høyere i huden rett under lakselus. Denne responsen var ikke avhengig av antall lus på fisken
- Ved lave temperaturer (4°C og 8°C) var laksen sin immunrespons i hud mot lakselus redusert sammenlignet med ved 12°C og 16°C. Dette var ikke reflektert i smitte og utviklingssuksessen til lakselus som også var høyere ved 12°C og 16°C. Det kan derfor tyde på at lave temperaturer negativt påvirker lusen mer enn laksen.
- Laksen sin immunrespons i hud mot lakselus endret seg over tid og ble påvirket av gjentatt smitte og/eller lengden av infestasjonen.
- Stressnivået (plasma kortisol) til infisert fisk var ved de undersøkte nivåer ikke høyere i lusesmittet enn i kontrollfisk, men lusesmittet fisk vart mer stresset av håndtering enn kontrollfisken. Stressresponsen vart også redusert ved lav temperatur.
- Analyser av slim sammensetning og mengde er et ikke-inngripende verktøy som kan være nyttig i fremtiden blant annet til å undersøke effekten av ikke medikamentell avlusing

6 - Referanser

- Abram QH, Dixon B, Katzenback BA. Impacts of Low Temperature on the Teleost Immune System. *Biology* 6(4) 2017.
- Albright LJ, Johnson SC. Comparative Susceptibility and Histopathology of the Response of Naive Atlantic, Chinook and Coho Salmon to Experimental-Infection with *Lepeophtheirus-Salmonis* (Copepoda, Caligidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 14(3) 1992.
- Alcorn SW, Murra AL, Pascho RJ. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunology* 12(4) 2002.
- Anderson CD, Roberts RJ. A comparison of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. *Fish biology* 7(2) 1975.
- Bui S, Dalvin S, Dempster T, Skulstad OF, Edvardsen RB, Wargelius A, Oppedal F. Susceptibility, behaviour, and retention of the parasitic salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) differ with Atlantic salmon population origin. *Journal of fish Disease* 41 (3) 2018.
- Braden LM, Barker DE, Koop BF, Jones SRM. Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 7(2) 2012
- Fæste, C.K. Tartor, H. Moen A., Kristoffersen A.B., Dhanasiri A.K.S., Anonsen J.H., Furmanek T., Grove, S. Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. *Journal of Chromatography B*, 1138, 2020,
- Glover, K.A. Aasmundstad T., Nilsen F., Storset A., Skaala, Ø. Variation of Atlantic salmon families (*Salmo salar* L.) in susceptibility to the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus*. *Aquaculture*, 245, 2005
- Hamre LA, Bui S, Oppedal F, Skern-Mauritzen R, Dalvin, S. Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24 °C. (in revision in *Aquaculture Environment Interactions*)
- 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 Immunol.*, 42 (2) 2015.
- Holm, HJ Skugor, S. Bjelland A.K, Radunovic S, Wadsworth S. Koppang E.O. Evensen, Ø. Contrasting expression of immune genes in scaled and scaleless skin of Atlantic salmon infected with young stages of *Lepeophtheirus salmonis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 67, 2017.
- Jensen LB, Wahli T, McGurk C, Eriksen TB, Obach A, Waagbø R, Handler A, Tafalla C. Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem*. 41(6) 2015.
- Overton K, Samsing F, Oppedal F, Dalvin S, Stien LH, Dempster T. The use and effects of hydrogen peroxide on salmon lice and post-smolt Atlantic salmon. *Aquaculture* 486, 2018
- Skugor S, Glover KA, Nilsen F, Krasnov A. Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics* 2008.
- Sutherland BJB, Koczka KW, Yasuike M, Jantzen SG, Yazawa R, Koop BF, Jones SRM. Comparative transcriptomics of Atlantic *Salmo salar*, chum *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* during infections with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*. *BMC Genomics* 15 20140
- Sveen LR, Timmerhaus G, Krasnov A, Takle H, Stefansson SO, Handeland SO, Ytteborg E. High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scientific Reports* 8(1) 2018.

Taranger GL, Karlsen Ø, Bannister RJ, Glover KA, Husa V, Karlsbakk E, Kvamme BO, Boxaspen KK, Bjørn PA, Finstad B, Madhun AS, Morton HC, Svåsand T. Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming. *ICES Journal of Marine Science*, 72(3) 2015.

Thorstad EB, Todd CD, Uglem I, Bjørn PA, Gargan PG, Vollset KW, Halttunen E, Kålås E, Berg M, Finstad B. Effects of salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* on wild sea trout *Salmo trutta*—a literature review. *Aquaculture environment interactions*, 7, 2015

Øvergård AC, Hamre LA, Harasimczuk E, Dalvin S, Nilsen F, Grotmol S. Exocrine glands of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae): Distribution, developmental appearance, and site of secretion. *Journal of Morphology* 2016.

Øvergård AC, Hamre LA, Grotmol S, Nilsen F. Salmon louse rhabdoviruses: Impact on louse development and transcription of selected Atlantic salmon immune genes *Developmental & Comparative Immunology*, 68, 2018.

Templus sluttrapport: <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2019-13>

7 - Leveranser

Prosjektet sine resultater er kommunisert i en rekke vitenskapelig (open access) og populære vitenskapelige publikasjoner i tillegg til presentasjoner på nasjonale og en internasjonal konferanse. All kommunikasjon er lagt inn i det nasjonale registeret over forskningspublikasjoner og forskningsresultater i Norge (cristin.no).

Vitenskapelige

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie. The effect of different intensities of the ectoparasitic salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) on Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases* 2022, 45(8) s. 1133-1147

Ugelvik, Mathias Stølen; Mæhle, Stig; Dalvin, Sussie. Temperature affects settlement success of ectoparasitic salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) and impacts the immune and stress response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases* 2022

Ugelvik, Mathias Stølen, Mæhle, Stig, Mennerat, Adele, Dalvin, Sussie. Repeated infections of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with the ectoparasitic salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) modulates immune response and parasite success. *Manuskript under utarbeiding, planlagt innsendelse november 2022*

Ugelvik, Mathias Stølen, Mæhle, Stig, Dalvin, Sussie. Systemic immune response in head kidney in naïve and previously exposed Atlantic salmon (*Salmo salar*) to ectoparasitic salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) *Manuskript skrevet, planlagt innsendelse desember 2022*

Ugelvik, Mathias Stølen, Mæhle, Stig, Dalvin, Sussie. Proteomic mucus analysis of salmon skin during salmon lice infection. *Data analyse pågår. Innsendelse februar 2023*

Populær vitenskapelige



I forsøket såg ein at fleire lakselus greier å etablere seg på verten ved aukande temperatur. Foto: Sussie Dalvin/Havforskningsinstituttet

Slik påverkar temperatur samspelet mellom laks og lakselus

For å få meir kunnskap om effekten av temperatur på ikkje berre laks og lakselus, men også interaksjonen mellom dei, har ein i prosjektet Infest ved Havforskningsinstituttet undersøkt om ulike stadier av lakselus påverkar verten sin immun- og stressrespons ved ulike temperaturar, samt om det påverkar parasitten si evne til å etablere seg og overleve på verten.

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie.

Effekten av temperatur på samspelet mellom laks og lakselus. Norsk Fiskeoppdrett 2021 ;Volum 4.



I forsøket fann vi at laxselus hovudsakeleg førte til ein respons (immunologisk og sårtilheling) i huden rett under parasitten, men vi såg også nokon mindre endringar i huden til infisert fisk der det ikkje var lus. Det kan derfor tyde på at responsen hos laks mot laxselus i stor grad er lokal og ikkje i heile huden hos infisert fisk (systemisk respons).

Påverkar mengda laxselus, laksen sin respons mot parasitten?

I eit forsøk blei laks infisert med ulike doser laxselus for å undersøkje om det påverkar immun- og

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie.

Påverkar mengda laxselus, laksen sin respons mot parasitten? Norsk Fiskeoppdrett 2022 ;Volum 1.

Fører gjentatt smitte til endringar i responsen hos atlantisk laks mot lakselus?

Få forsøk har undersøkt effekten av gjentatt smitte med lakselus på laks. Disse forsøka har heller ikkje fokusert på underliggjande mekansimer. Derfor ville vi gjennom FHF-prosjektet Infest få meir kunnskap om korleis parasitten, verten og samspelet mellom dei blir påverka av gjentatte smitte med lakselus. Vil ville også undersøkje om det er kvalitative og/eller kvantitative forskjellar i verten sin immunrespons mot lusa i tidlegare infisert og kontrollfisk.

Lakselus er ei utfordring for oppdrettsnæringa, både når det gjeld økonomiske tap, men og knytt til fiskehelse og -velferd. Myndigheiter og oppdrettsnæringa har difor investert store midlar i forskning både på biologien til parasitten og på samspelet med verten for å kunne redusere luseforekomsten både på oppdretts- og villfisk. Dette har blant anna resultert i gjennomføring av infeksjonsforsøk i laboratoriet på atlantisk laks og andre vertsfiskar som regnbogeaure, røye og sjøaure. Det er likevel stor forskjell på å gjennomføre eit kontrollert forsøk i laboratoriet og korleis infeksjon og samspelet mellom vert og parasitt utspelar seg i eit oppdrettsanlegg eller hos villfisk i havet.

Ulikt smitteregime i sjø og lab

I sjøen blir laksen eksponert for og smitta

infisert med smittsamt kopepodittar ein gong eller at vaksne lus blir satt direkte på fisken. Sidan lusa utviklar seg meir eller mindre synkront, vil det dermed vere eit eller maksimalt to lakselus-stadium på fisken samstundes. Dette er dermed forskjellig for korleis infeksjonsforløpet normalt utartar seg i havet. Dette har potensielt stor betydning for samspelet med verten, sidan det er stor forskjell i biologien til dei ulike stadia av lakselus. Til dømes er somme stadium fastsittjande på verten (chalimus), mens andre er mobile (adulte og pre-adulte) og kan bevege seg fritt på huda til fisken. Forsøk har i tillegg vist at lusa i liten grad negativt påverkar verten før den når det pre-adulte stadiet, og då er det ved store forekomstar vanleg å observere luserelaterte skadar på huda til fisken og auka dødelegheit.

Etablerte parasitter kan påverke

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie. Fører gjentatt smitte til endringar i responsen hos atlantisk laks mot lakselus? Norsk Fiskeoppdrett 2022 ;Volum 8.

Dalvin, Sussie; Ugelvik, Mathias Stølen. Atlantisk laks i åpne merder smittes med lakselus, men hvilke faktorer er avgjørende for hvordan det går med fisken og hvordan den responderer på denne smitten? *Tekst under utarbeidelse, planlagt innsendt til Norsk fiskeoppdrett Nov 2022.*

Konferanser:

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie; Mæhle, Stig. The effect of temperature on the interaction between salmon lice and Atlantic salmon. Sealice conference international 2022

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie. Påverkar temperatur samspelet mellom lakselus og Atlantisk laks? Lusekonferansen 2022

Ugelvik, Mathias Stølen; Dalvin, Sussie; Mæhle, Stig. Effekten av temperatur på interaksjonen mellom lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og atlantisk laks (*Salmo salar*). Frisk fisk 2022



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

Postboks 1870 Nordnes

5817 Bergen

Tlf: 55 23 85 00

E-post: post@hi.no

www.hi.no