

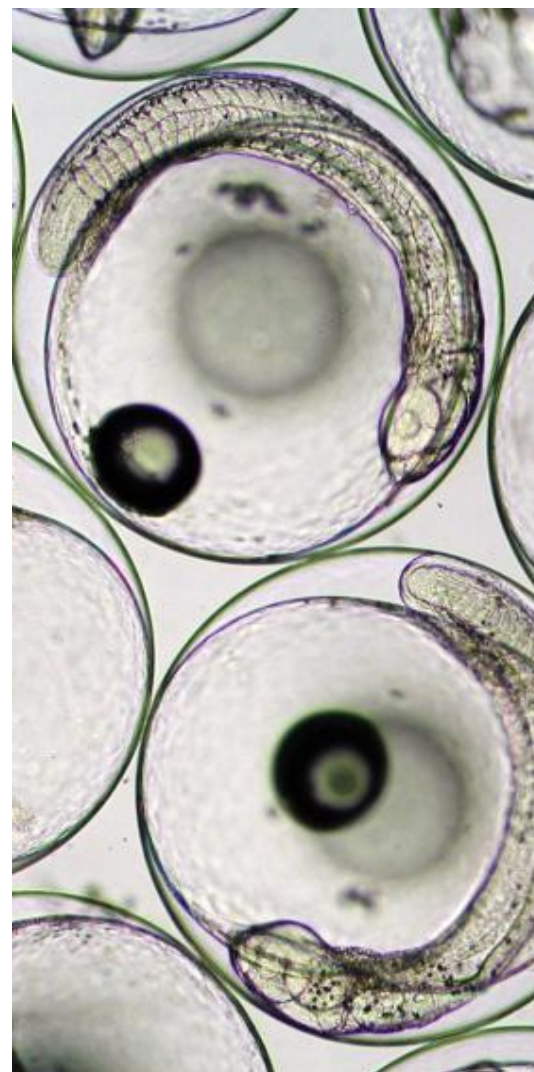
Integrated Pest Management

Helhetlig lusebekjempelse med fokus
på helsefôr

Linda B. Jensen

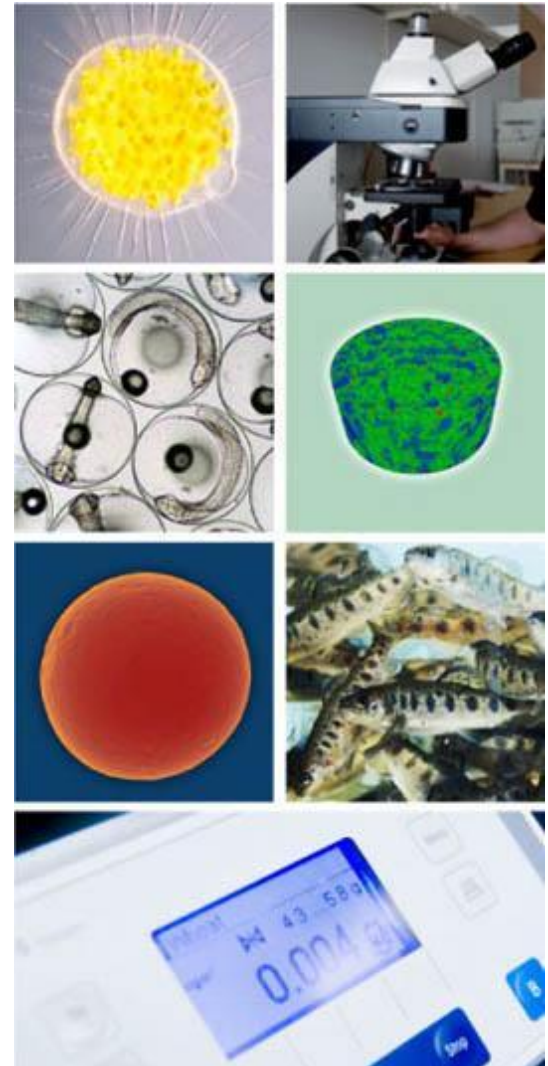
Skretting Aquaculture Research Centre

Aliráðstevnu 22. februar 2013



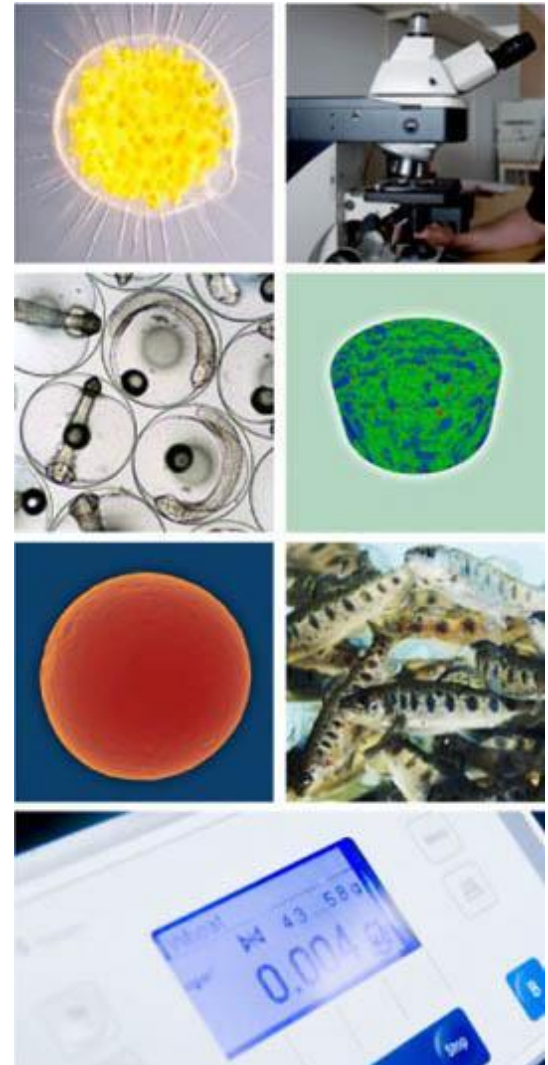
Innhold

- Skretting ARC
- IPM prinsipper
- Verktøykassen
- Helsefôr
 - Smitteforsøk
 - Kvantitativ histologi
 - Proteomikk
- Konklusjon



Skretting ARC

- Global forskningsavdeling for Skretting
- Basert i Stavanger, har aktiviteter i Italia, Spania, Japan og Kina
- 70 ansatte, 30 er forskere
- Eies av nederlandske Nutreco B.V.
- Forskningsområder:
 - Helse
 - Ernæring
 - Fôrproduksjon



Lerang forskningsstasjon

Forskning på laks og kaldtvannsarter

Utstyr:

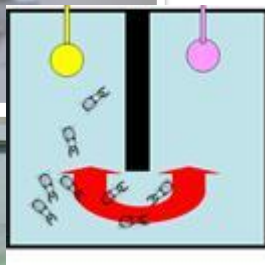
- 234 kar, alle land basert
 - 24 x 0.6 meter (Ø)
 - 135 x 1 meter (Ø)
 - 5 x 2 meters (Ø)
 - 58 x 3 meters (Ø)
 - 4 x 5 meters (Ø)
 - 8 x 8 meters (Ø)
- Filtrert og UV-behandlet salt- og ferskvann
- Kontroll med temperatur, lys, salinitet og oksygen
- Fôroppsamling
- Røntgen-utstyr
- Undervannskamera
- Luselab

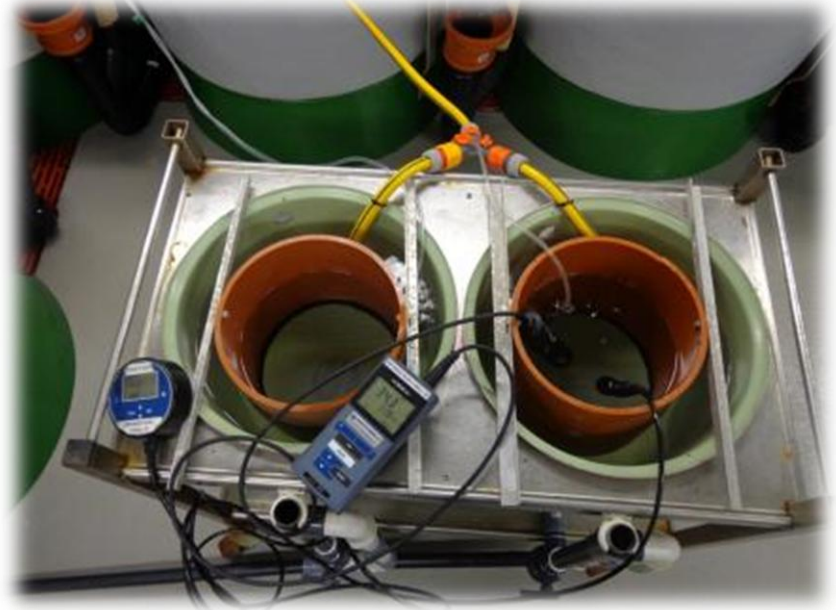


Lerang forskningsstasjon luselab



- Startet i 2011
- 15 1m kar
- Klekking av innkjøpte eggstrenger
- In vitro forsøk
- In vivo forsøk





Utfører 8-10 smitteforsøk per år
Testet 30 ulike dietter i luselaben til nå

IPM mot lus

Ett mål – mange virkemidler

IPM er en bærekraftig tilnærming til å bekjempe lakselus ved å kombinere ulike virkemiddel:

- organisatoriske
- biologiske
- fysiske/mekaniske
- kjemiske

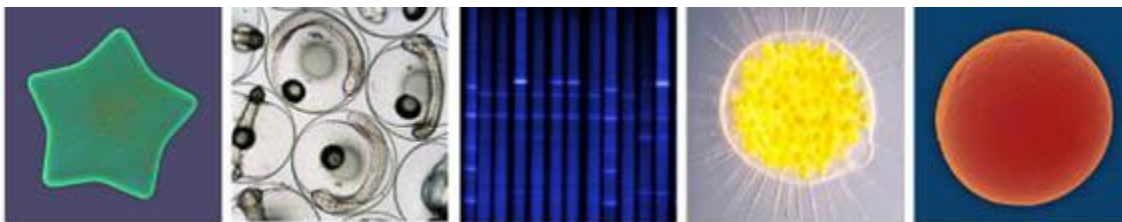
på en slik måte at det reduserer

- miljørisiko
- helserisiko
- økonomisk risiko



Hvorfor IPM?

- Lus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en av næringens største utfordringer
- Lakselus er et krepsdyr som finnes naturlig i havet. Kan ikke utryddes.
- Ingen midler er i dag 100% effektive
- Resistensutvikling
- Ingen nye vidundermiddel rundt hjørnet
- Viktig å forlenge levetiden på de behandlingsmidlene vi har



Verktøykassen mot lus

Lokalitet
Brakklegging

Overvåking
Fellesavlusning

Medisin-
fôr

Rensefisk

Rene merder

Unngå stress

Mekanisk
fjerning

H₂O₂

Lukkede
merder/
skjørt

Helsefôr

Bade-
behandling

Avl

Vaksine

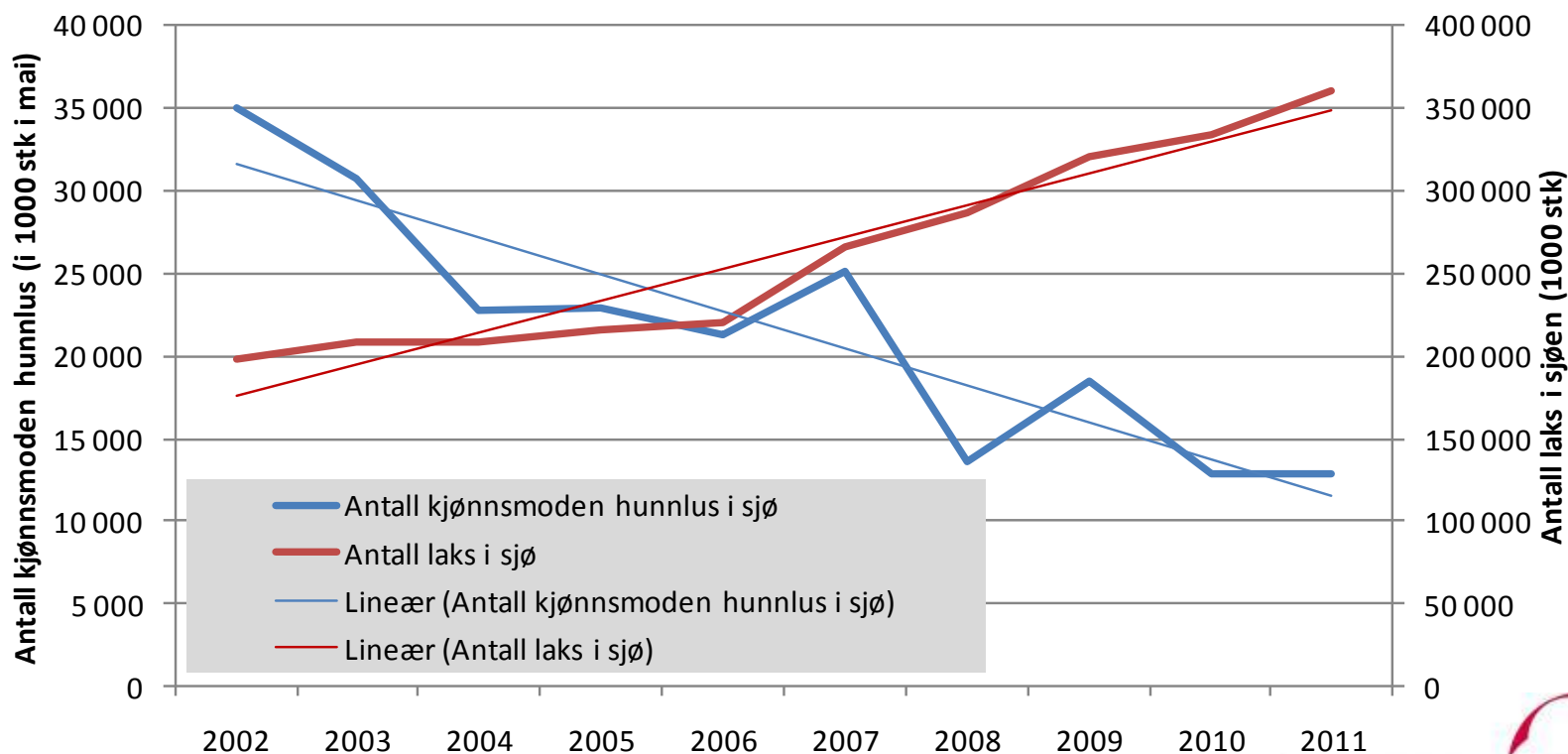


- Strømgjerder
- Laser
- Permaskjørt
- Lusefeller



Tiltakene virker

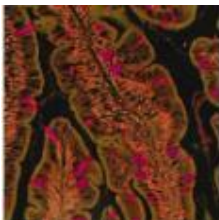
Lusenivåene i anleggene om våren er redusert samtidig med at produksjonen har økt:



Lusesituasjonen forrige uke

Uke 7		Voksne hunnlus
Finnmark	→	0,02
Troms	→	0,05
Nordland	→	0,08
Nord-Trøndelag	→	0,10
Sør-Trøndelag	→	0,06
Møre og Romsdal	→	0,12
Sogn og Fjordane	→	0,10
Hordaland	→	0,16
Rogaland og Agder	→	0,12

lusedata.no



**CURIOSITY
IS OUR MAIN
INGREDIENT**



SKRETTING
AQUACULTURE RESEARCH CENTRE

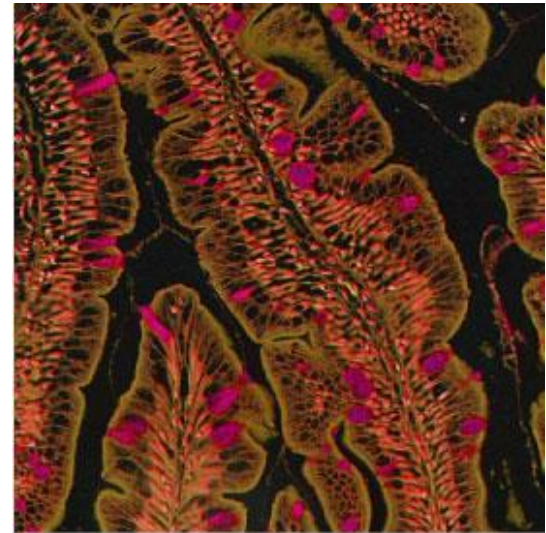
Bruk av helsefôr til laks (*Salmo salar*) i kampen mot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)

Linda B. Jensen^{1,3}, Fiona Provan², Julia Mullins¹, Kai Erik Uleberg², Eivind Larssen² og Alex Obach¹

¹ Skretting Aquaculture Research Centre

² International Research Institute of Stavanger

³ NIFES/UiB



CURIOSITY
IS OUR MAIN
INGREDIENT

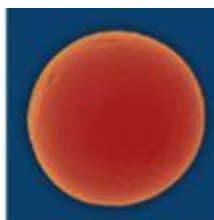


Bakgrunn

- Forskning har vist at immunostimulanter (IS) og andre funksjonelle ingredienser kan styrke laksens immunrespons og dermed redusere påslaget av lus
- En systematisk, helhetlig bekjempelsesstrategi (Integrated Pest Management) gjør lusekampen mer effektiv

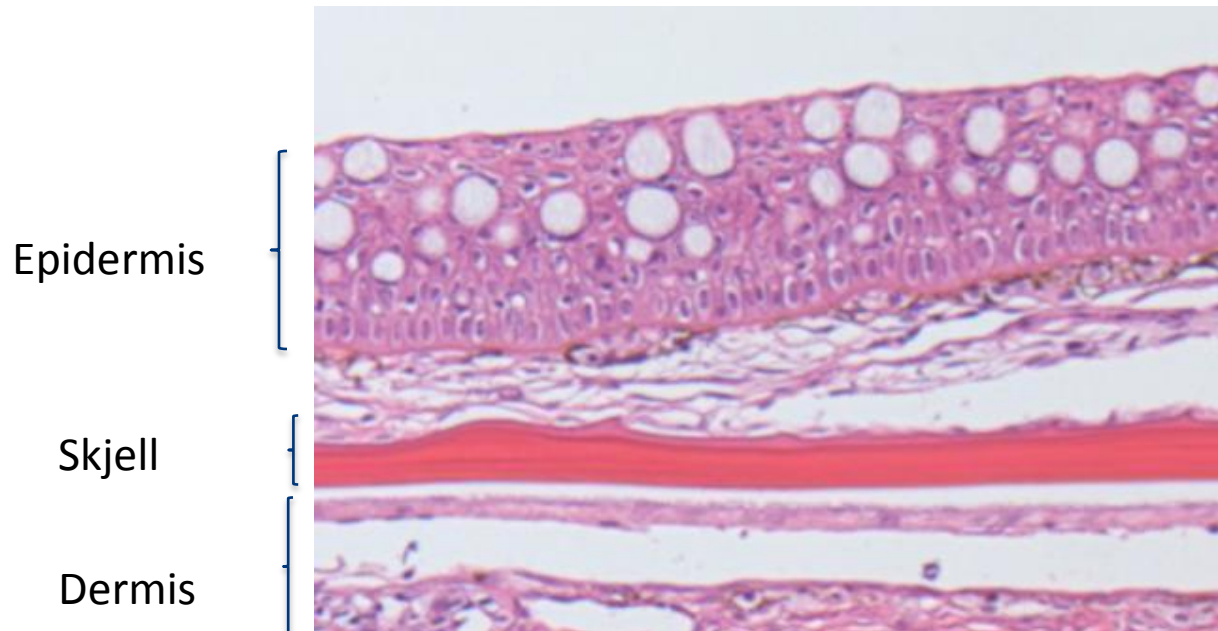


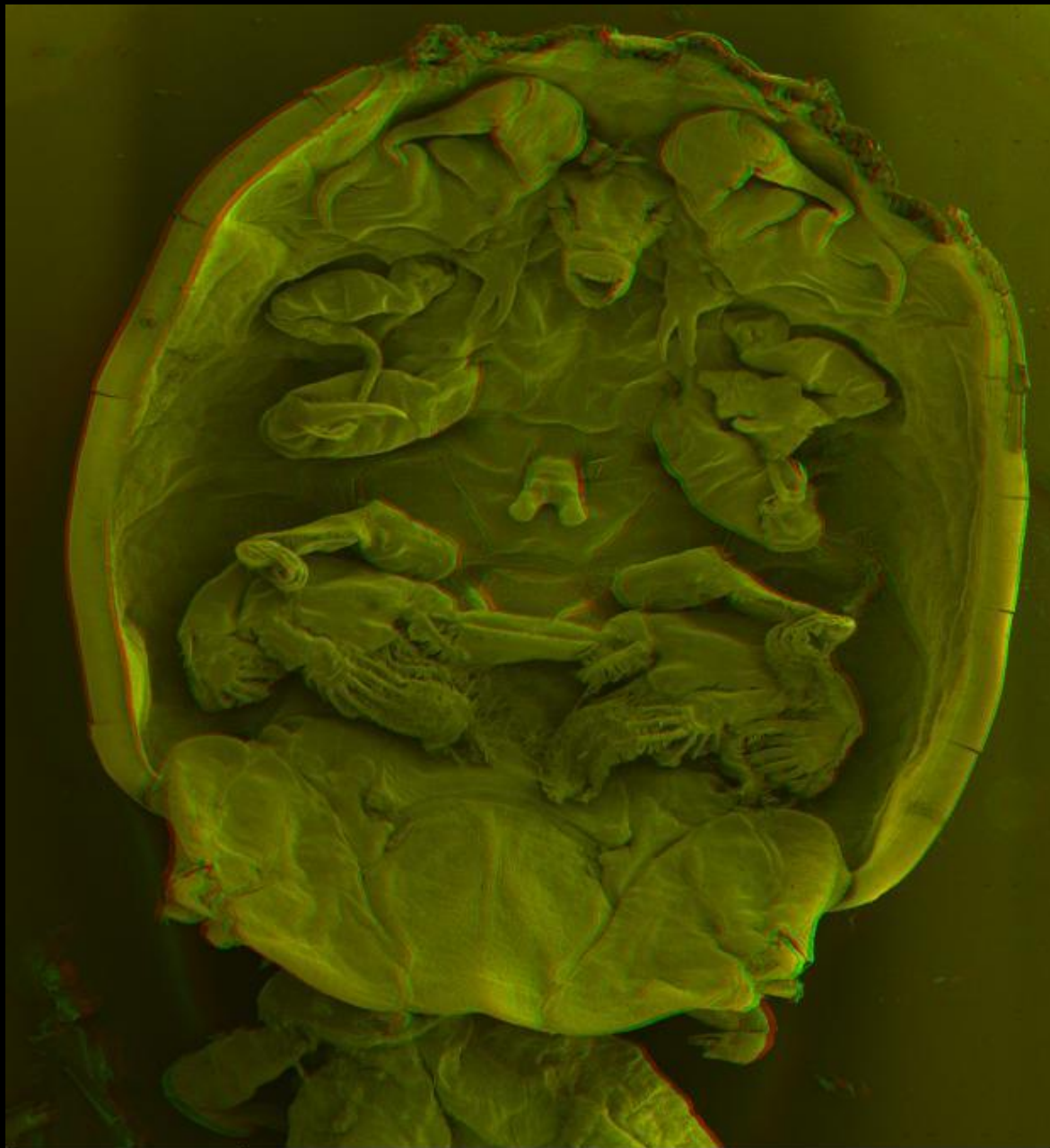
CURIOSITY IS
OUR PASSION



Fiskeskinn og mucus

- Fiskeskinn er et multifunksjonelt organ
- Skinn og mucus er den første barrieren mot omgivelsene
- Mucus inneholder bl.a. lysozym, proteaser, ALP, immunoglobuliner, C-reactive protein, feromoner
- Sammensetningen av mucus viktigere enn mengde





Microscope	Accelerating Voltage	
-	-	—1 mm—

Photo: Dr.James Bron,
University of Stirling

"Klørne" som fester seg til laksen



Photo: Dr. James Bron, University of Stirling

Lusa fester seg

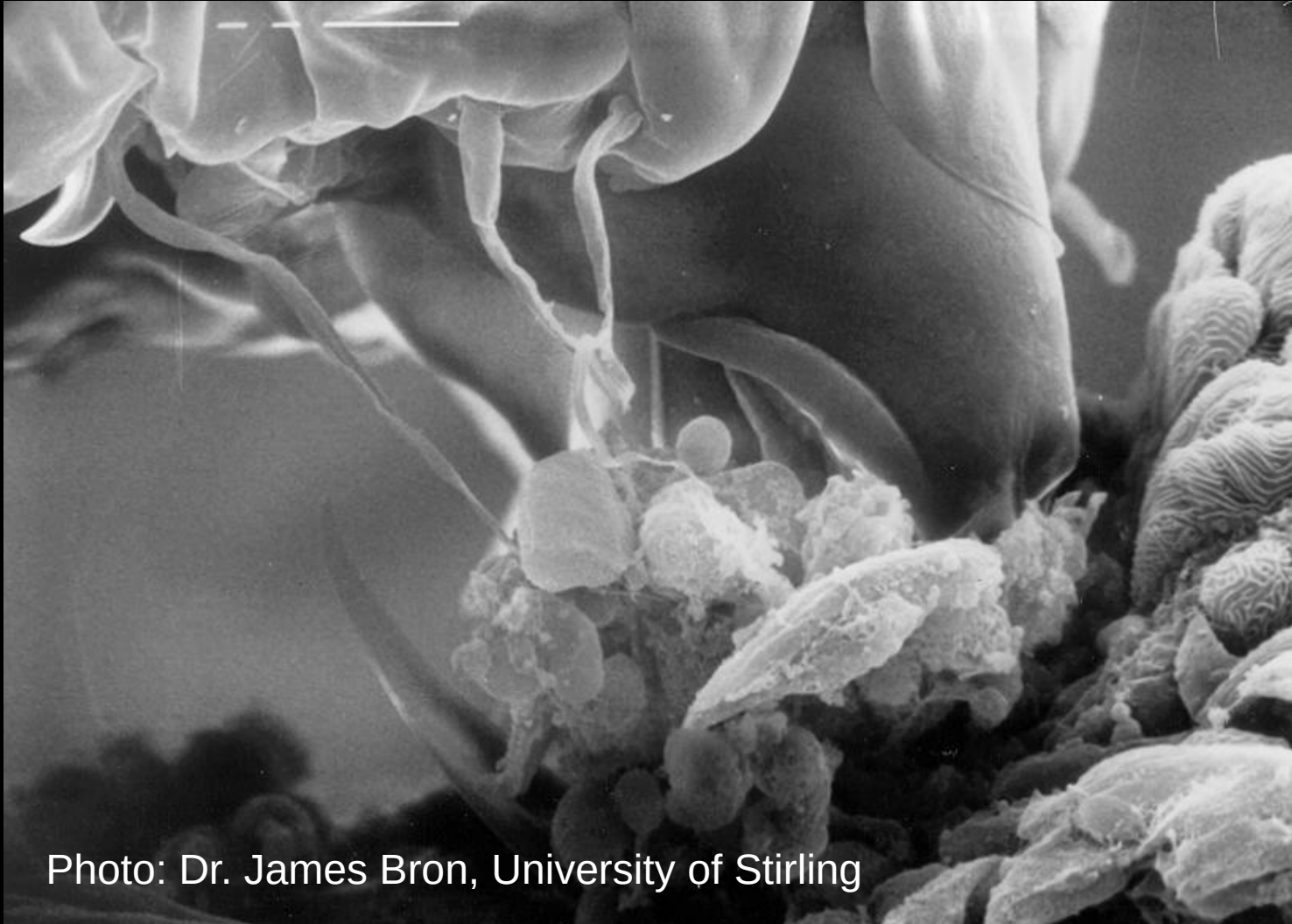


Photo: Dr. James Bron, University of Stirling

Lusa graver seg ned i mucus og epidermis

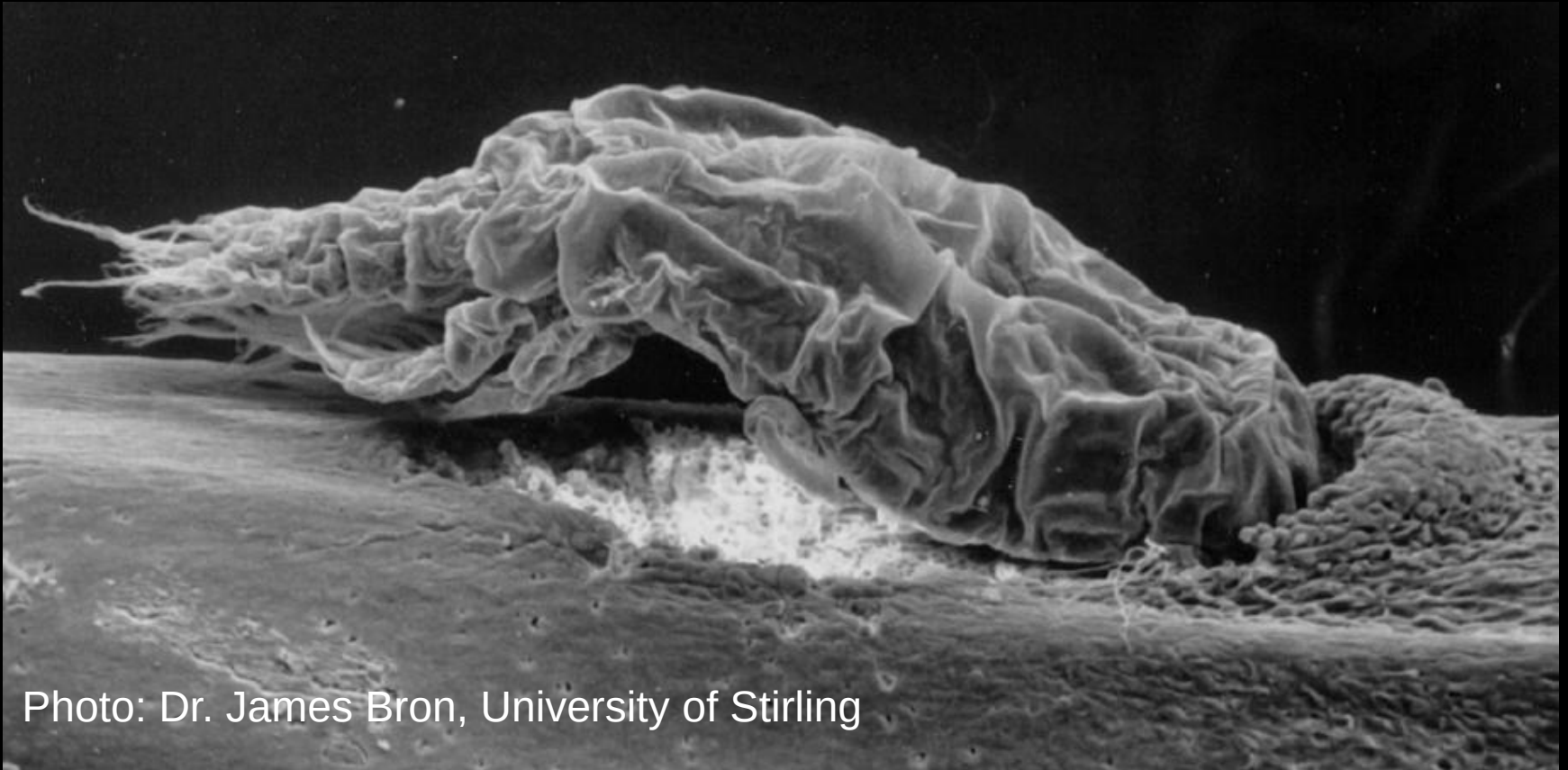


Photo: Dr. James Bron, University of Stirling

Chalimus-larven er festet til laksen når den begynner å beite på mucus

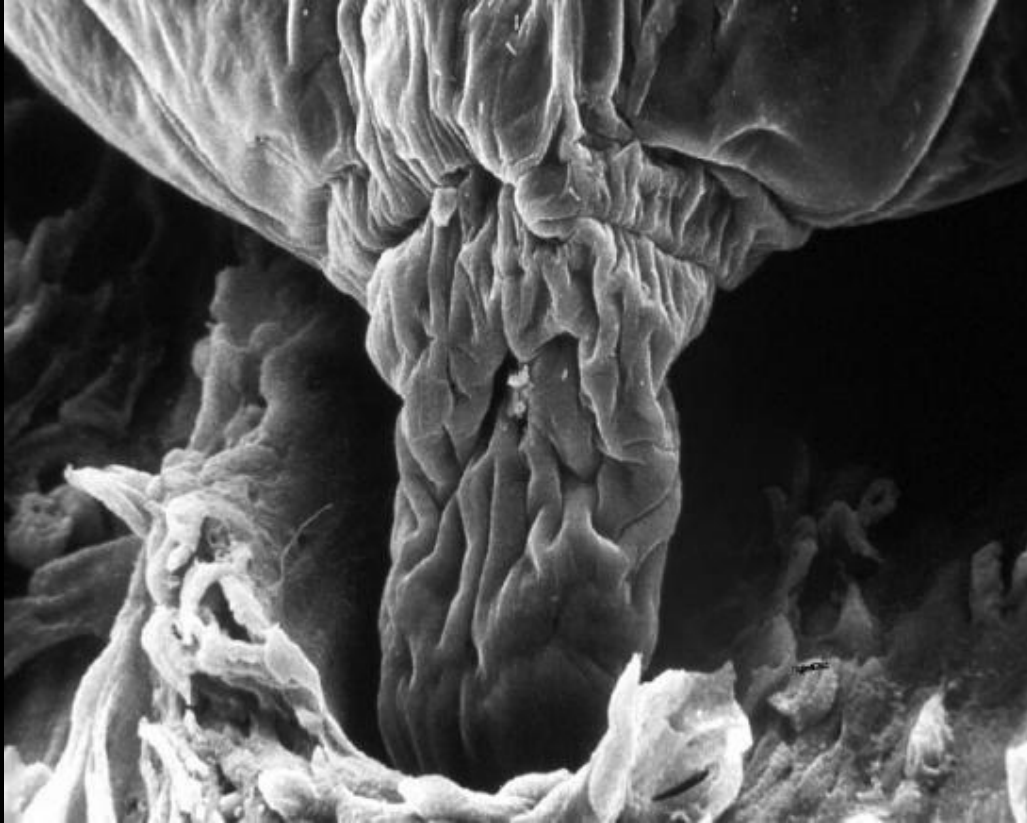
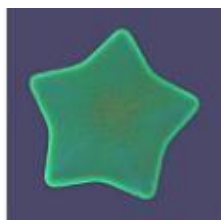


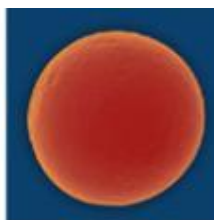
Photo: Dr.James Bron, University of Stirling

Forprosjekt (VRI 09/2453-17)

- Effekten av IS og andre funksjonelle ingredienser ble testet i et smitteforsøk
- Et av fôrene ga ca. 25% reduksjon i smitte
- Proteomikkanalyser av slim viste forskjeller i proteinkonsentrasjon og –sammensetning mellom gruppene
- (Resultater presentert ved Sea Lice 2010, Vancouver)



CURIOSITY IS
OUR PASSION

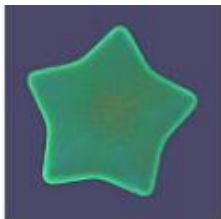


Prosjektets hovedmål

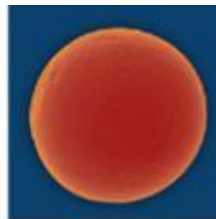
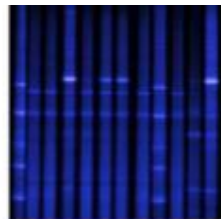
- Utvikle et helsefôr som reduserer påslaget av lus gjennom å styrke laksens skinn og slimlag

Delmål

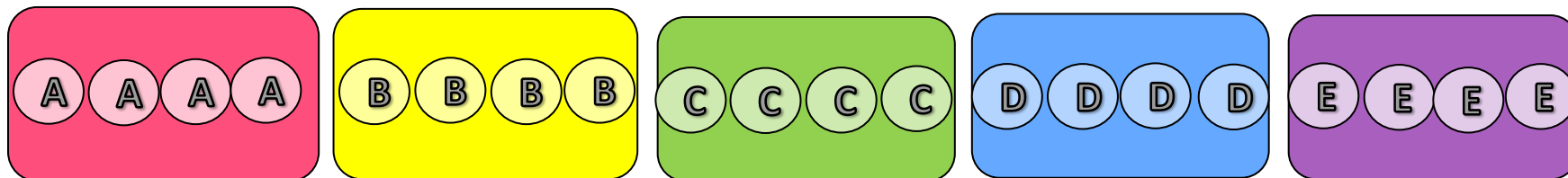
- Identifisere IS eller funksjonelle ingredienser som kan stimulere fiskens eget forsvar mot lus
- Identifisere protein og peptidmarkører i plasma og mucus som påvirkes av diett og lusesmitte
- Korrelere endringene i proteinuttrykk med parametere fra biokjemiske og histologiske analyser



CURIOSITY IS
OUR PASSION



Forsøksoppsett



Fôret med forsøksfôr i 4 uker før smitte

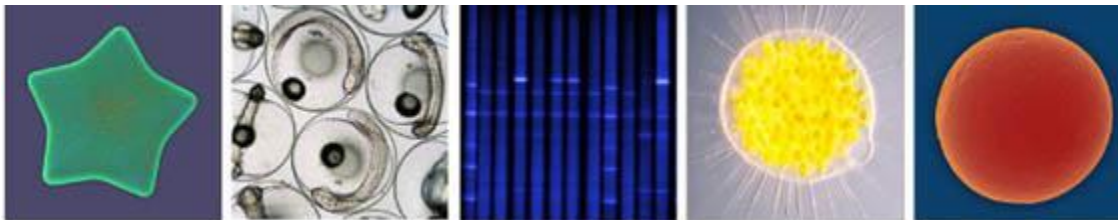
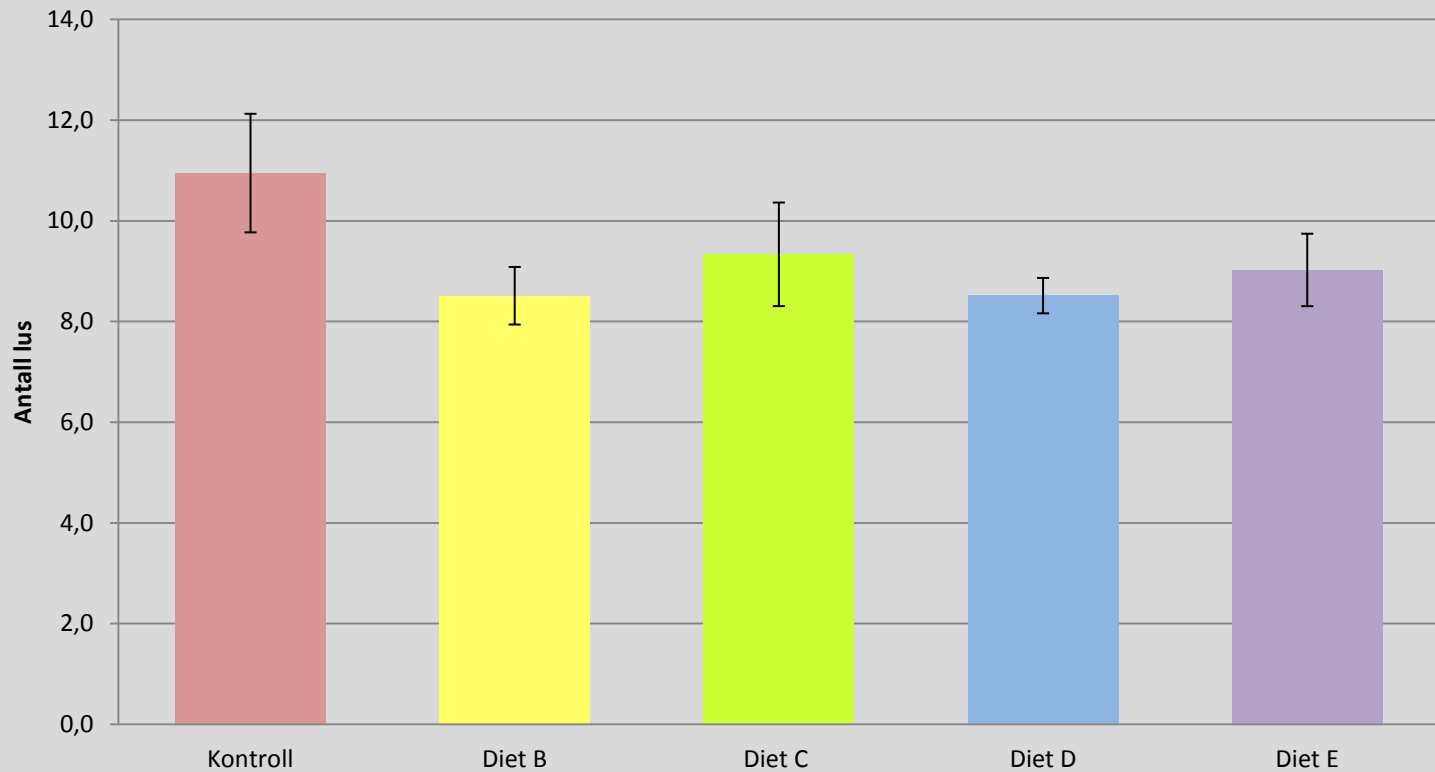
Prøveuttak for proteomikk og histologi



Prøveuttak ved Chalimus III/IV (dag 11-12) for

- Lusetelling
- Histologi
- Proteomikk

Gjennomsnittlig antall lus per diett

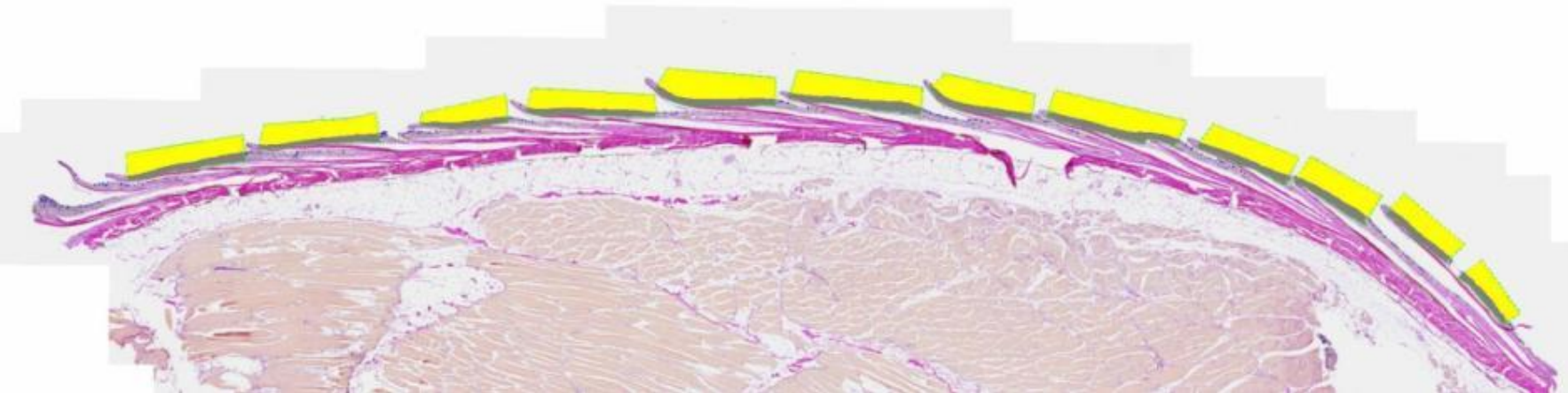
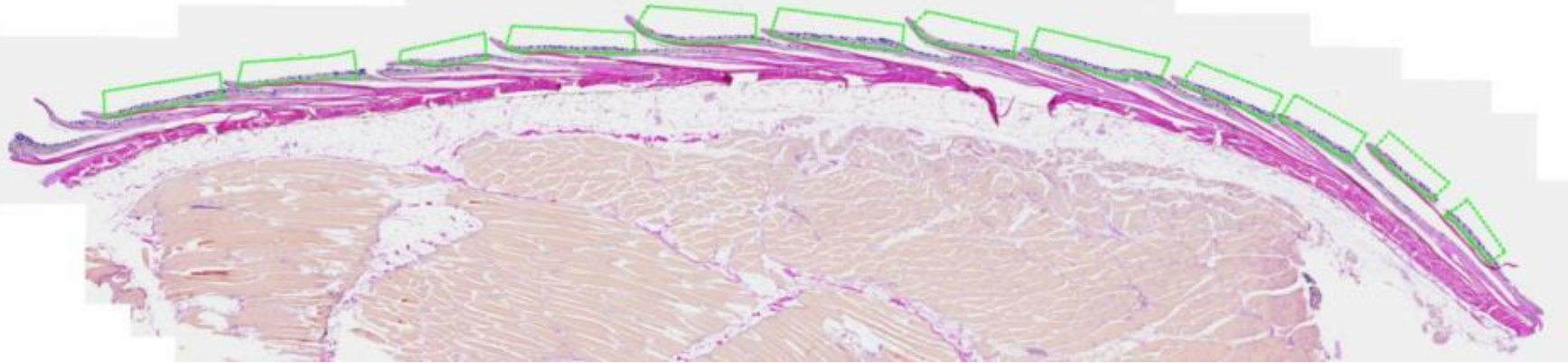


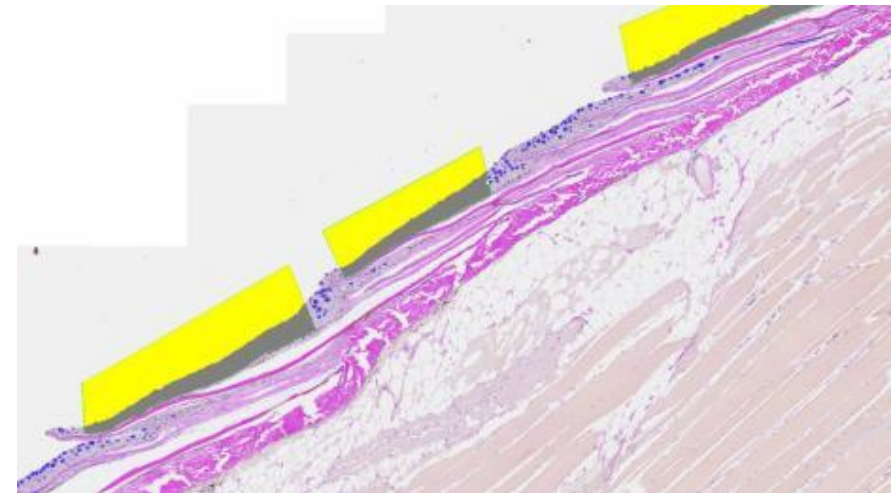
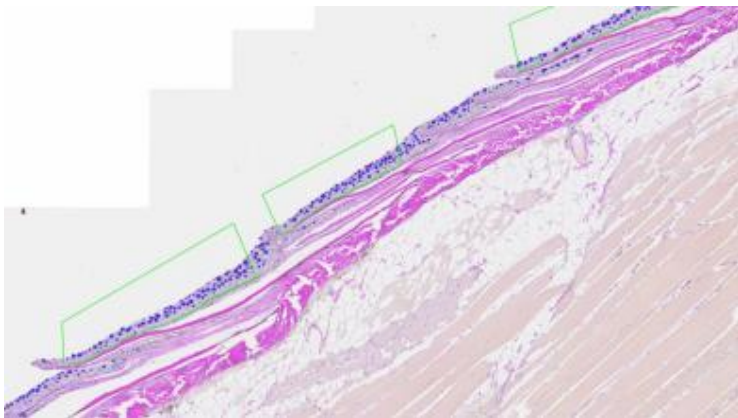
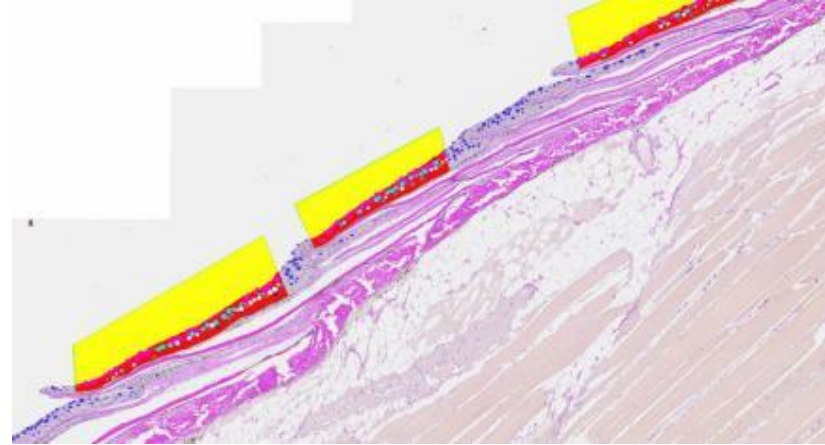
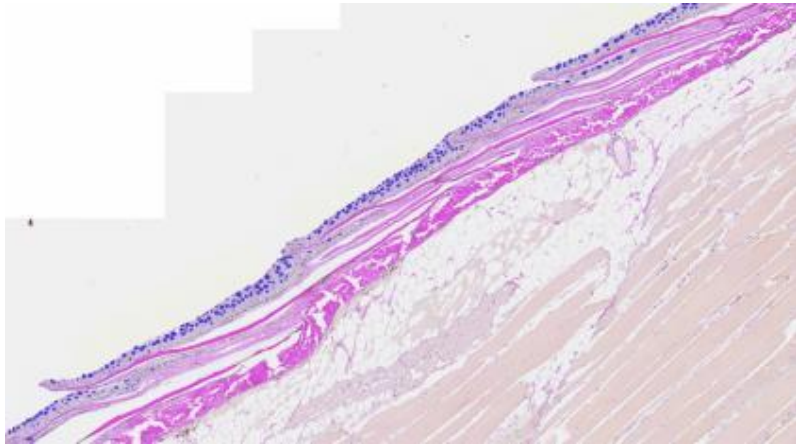
Kvantitativ histologi

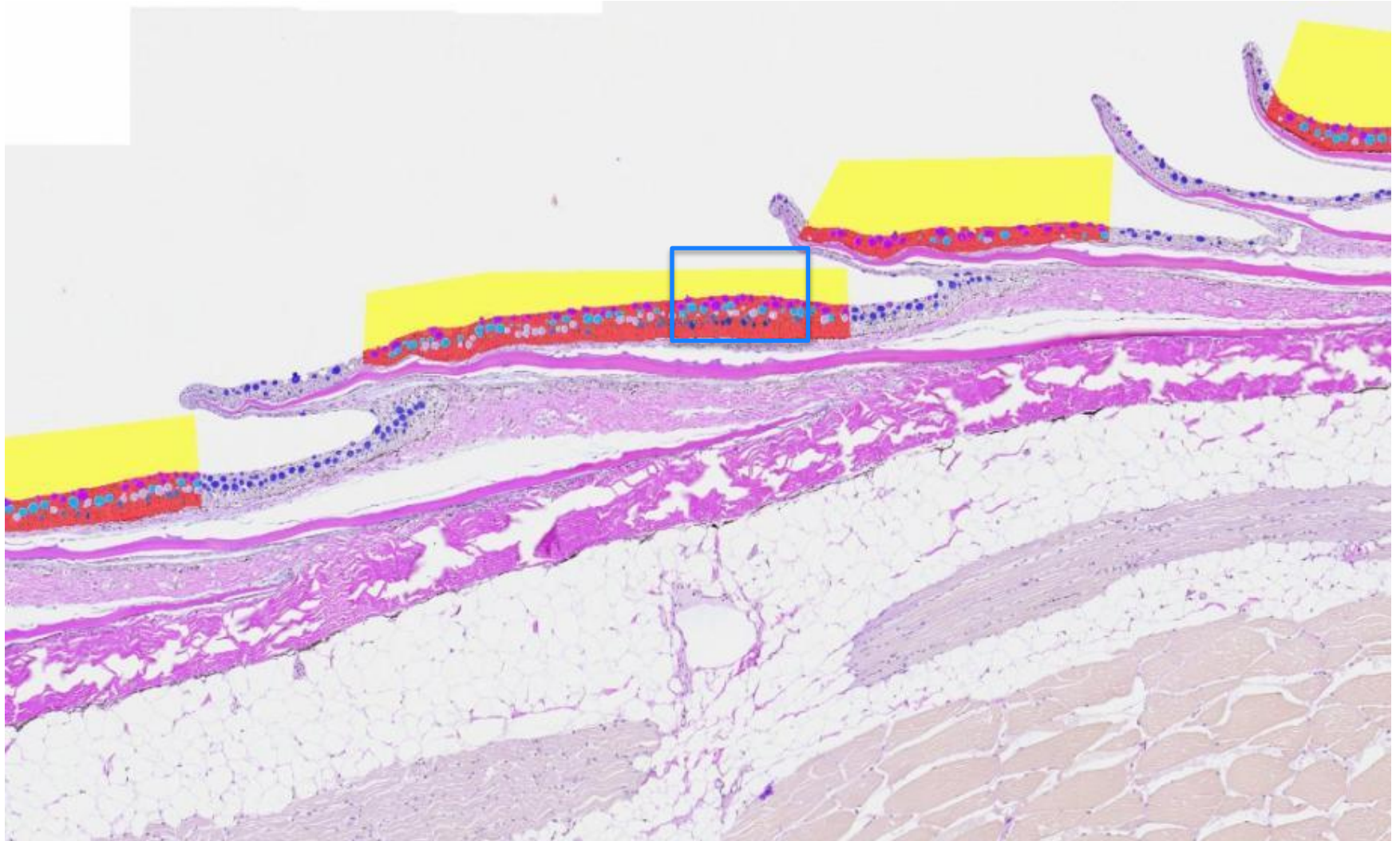
- Mindre subjektivt enn tradisjonell histologi
- Mulig å analysere store mengder data
- Undersøkt diett A (kontroll) og diett B:
 - 5 fisk per diett før smitte
 - 5 fisk per diett etter smitte
- Farget med Alcian blue/PAS
- Scannet med Zeiss Mirax skanner
- Analysert med Visiopharm software

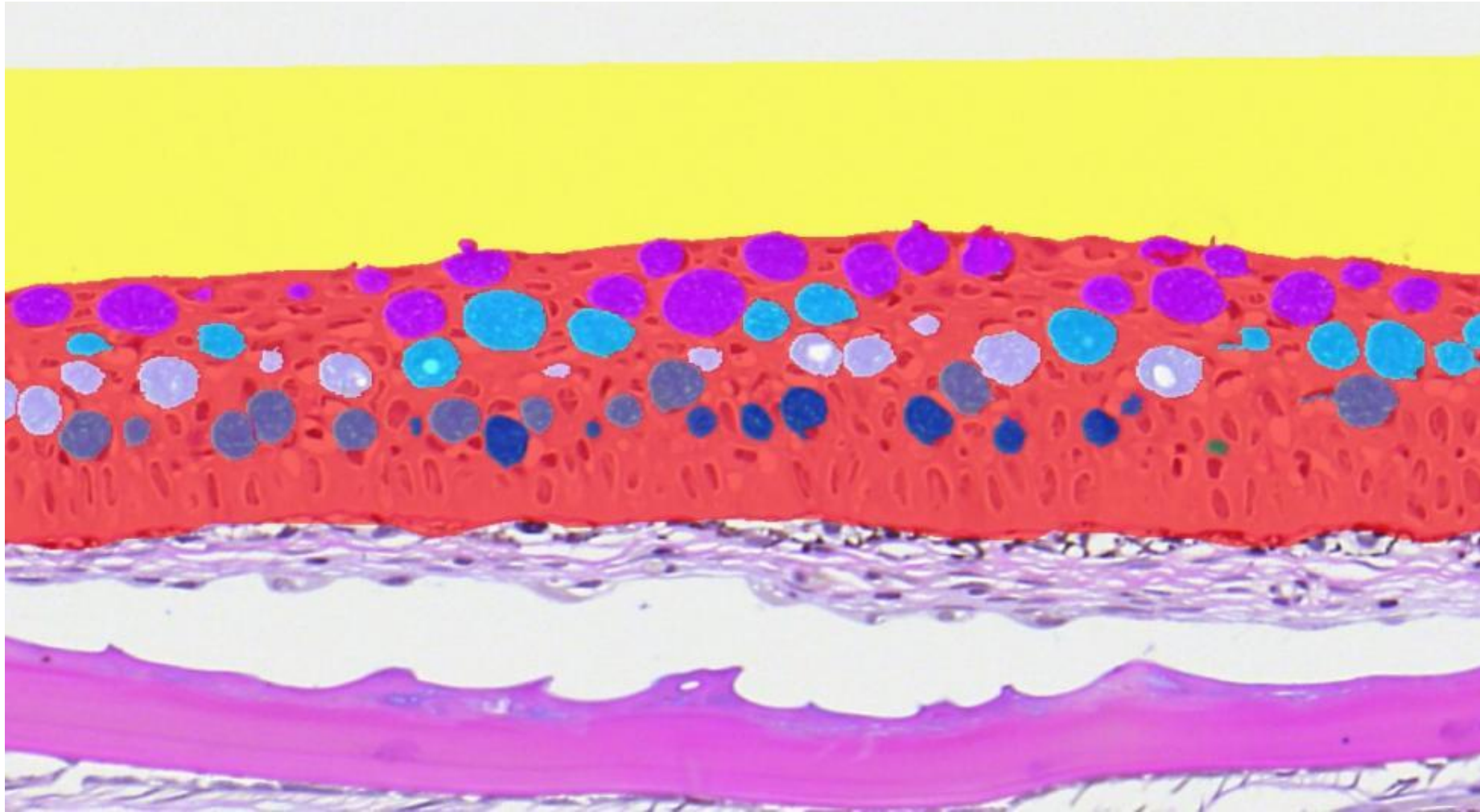


Visiopharm software

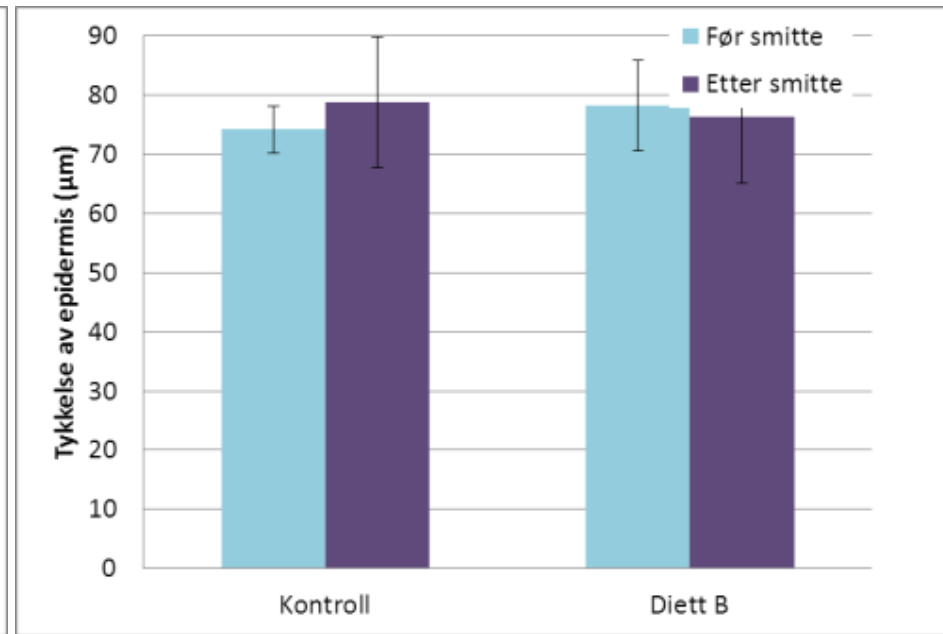
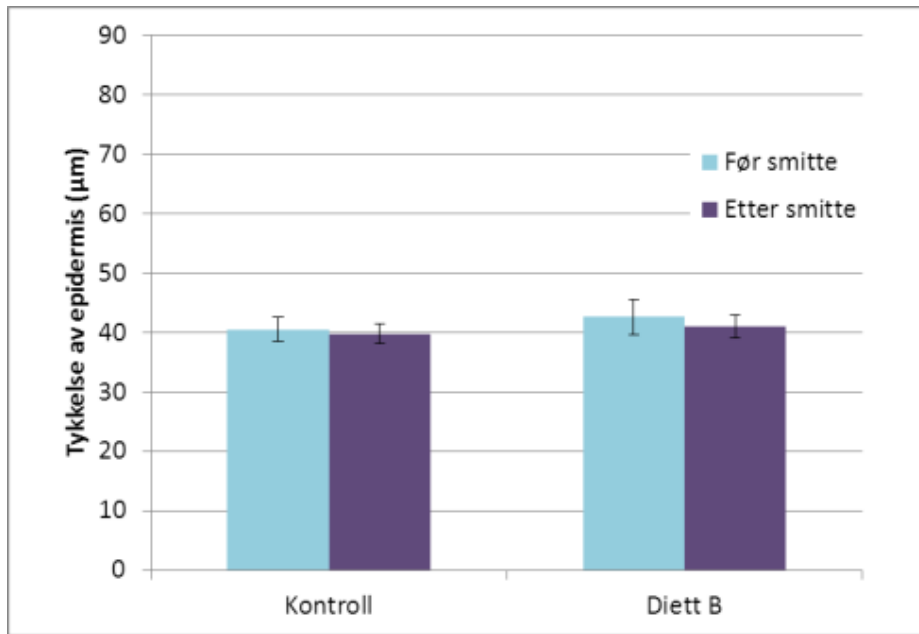




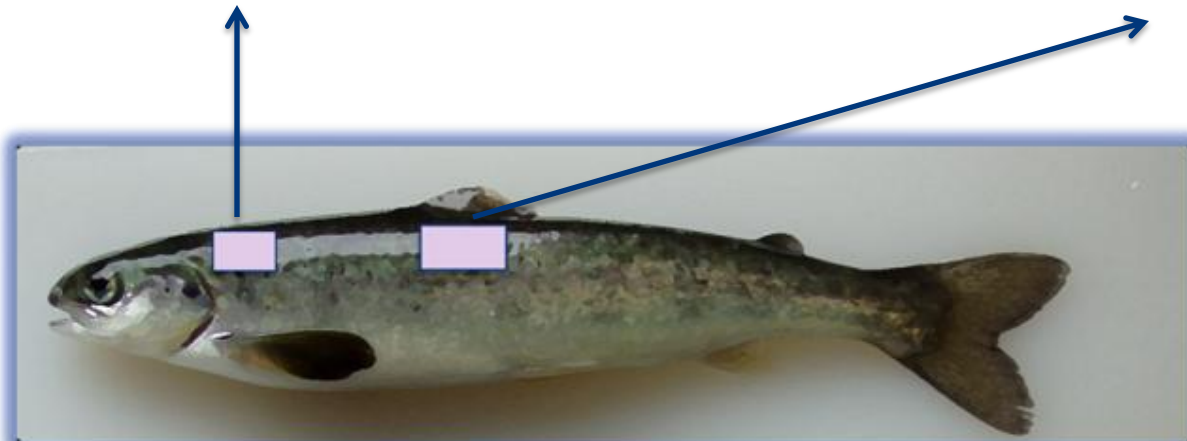
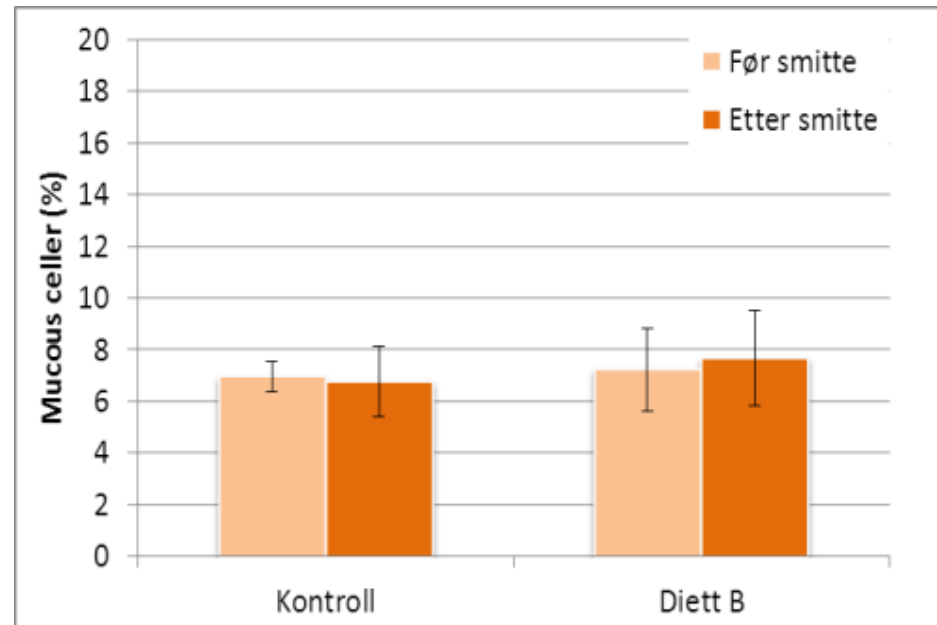
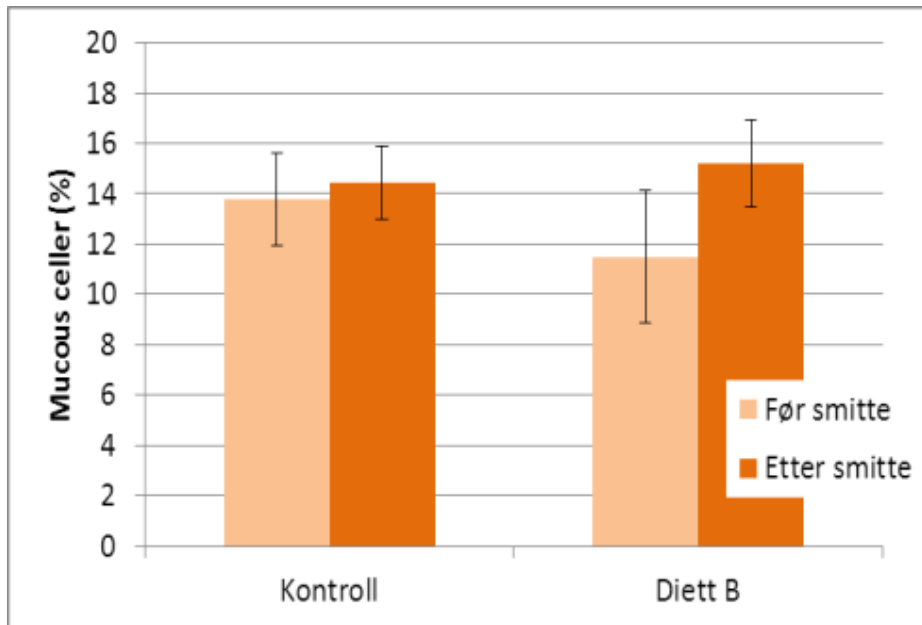




Tykkelse av epidermis



Mucous cells (% dekning av epidermis)



Proteomikk

- Karakterisering av proteinuttrykket i en celle eller vev, endres ved ulike stimuli
 - Diett
 - Kontroll (uten smitte)
 - Lavt smittenivå
 - Høyt smittenivå

Proteinprofil i mucusprøver fra epidermis undersøkes.

- - Identifikasjon og semikvantitative analyser av protein i mucus



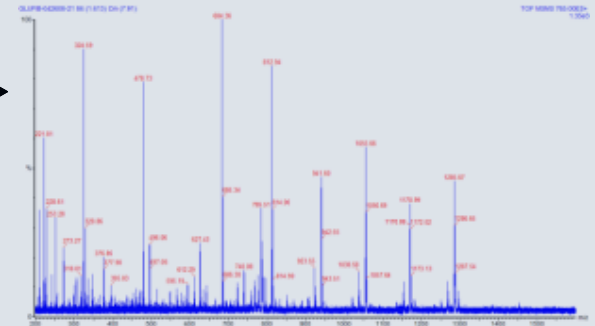
LTQ-orbitrap



Salmon mucus



Analysis by
Nanoflow LC-MS/MS



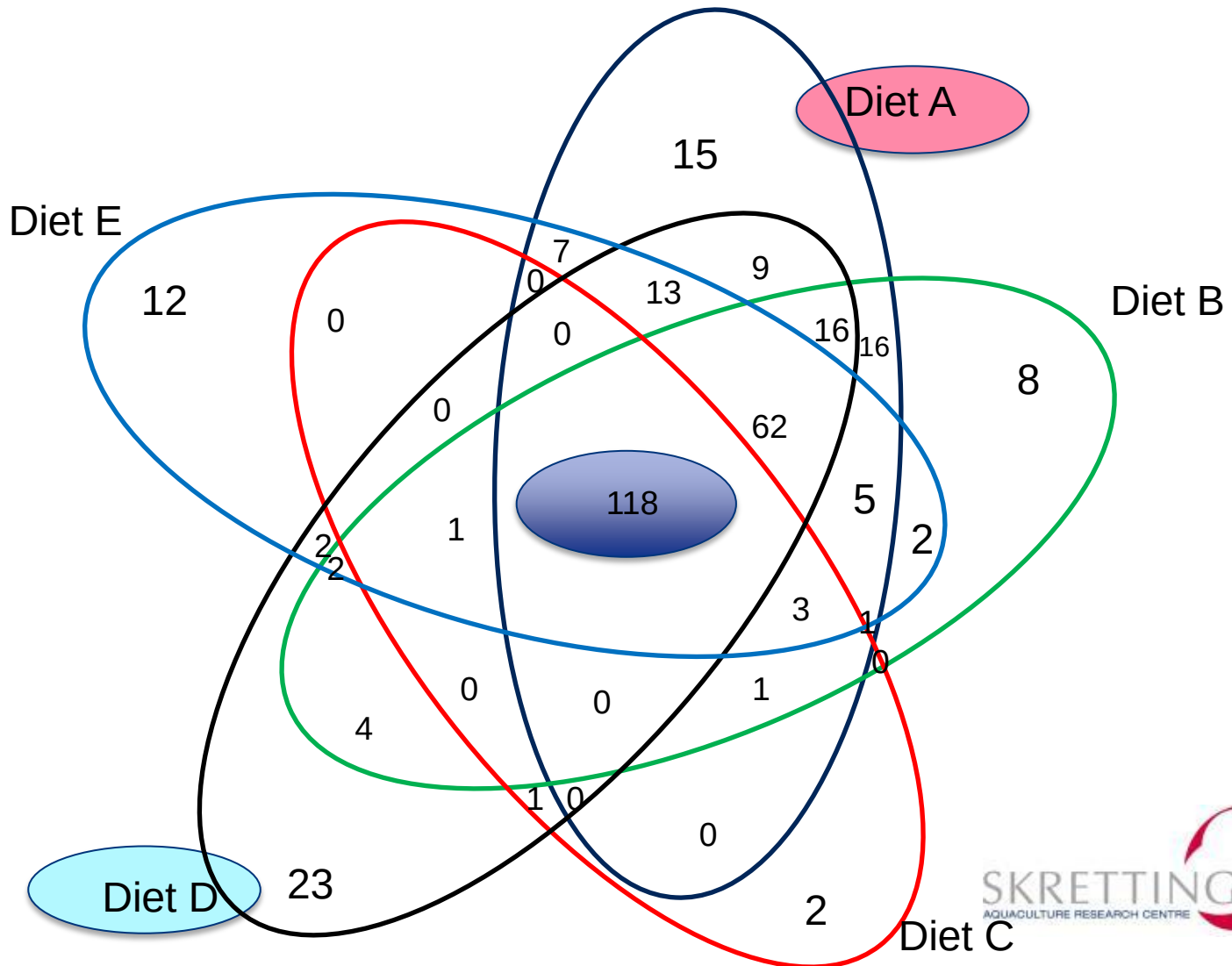
Databehandling med
Proteome Discoverer

Multivariat analyse av data med
SIRIUS

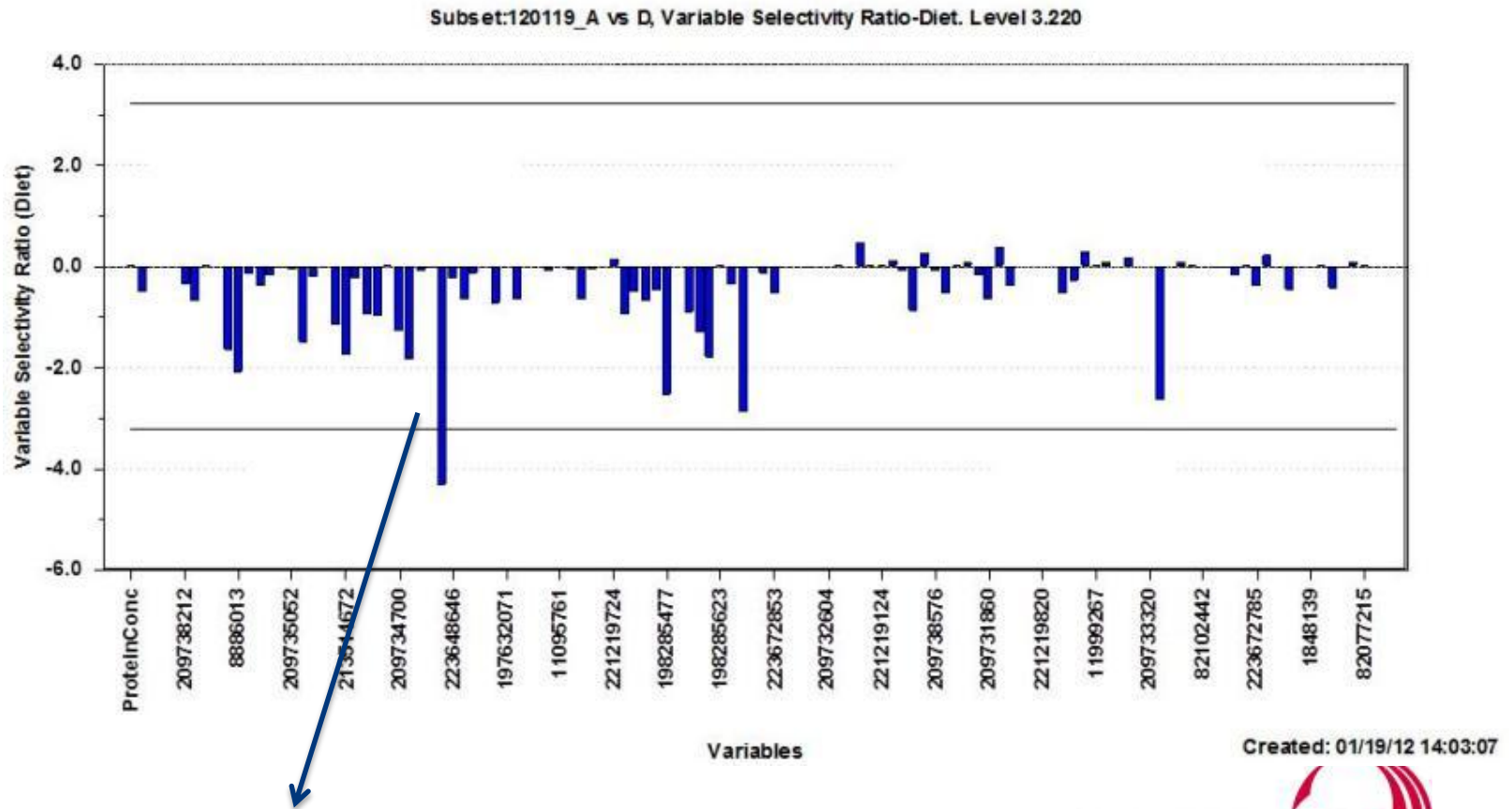
Identifiserer peptider og proteiner

Identifiserer mulige markører

Proteiner identifisert i mucus før smitte

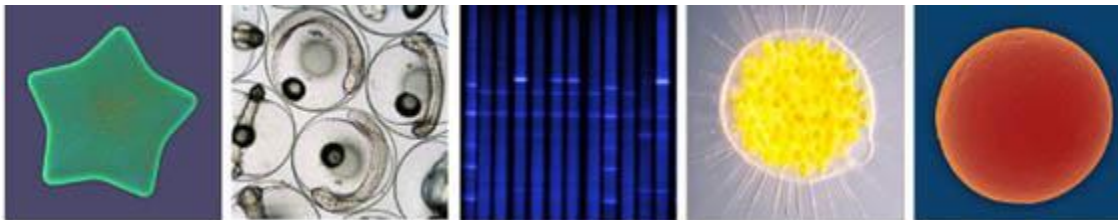
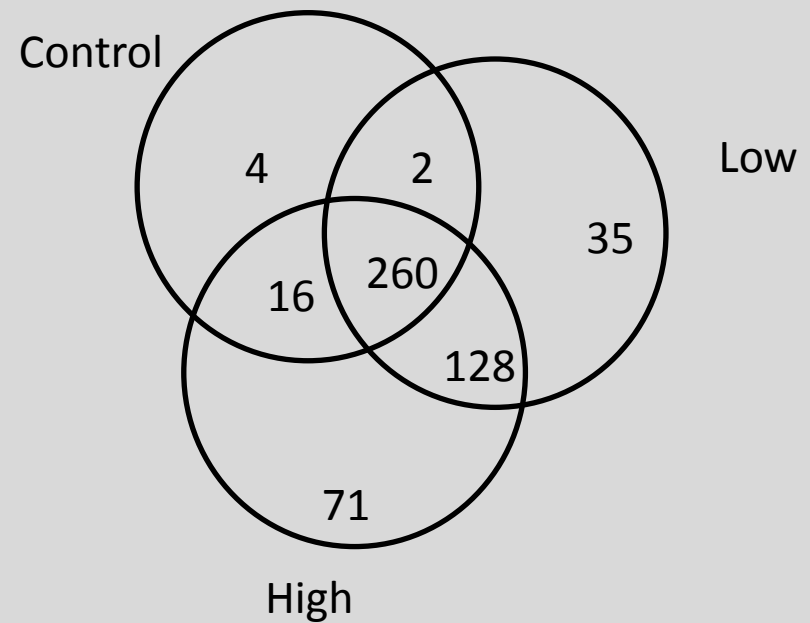
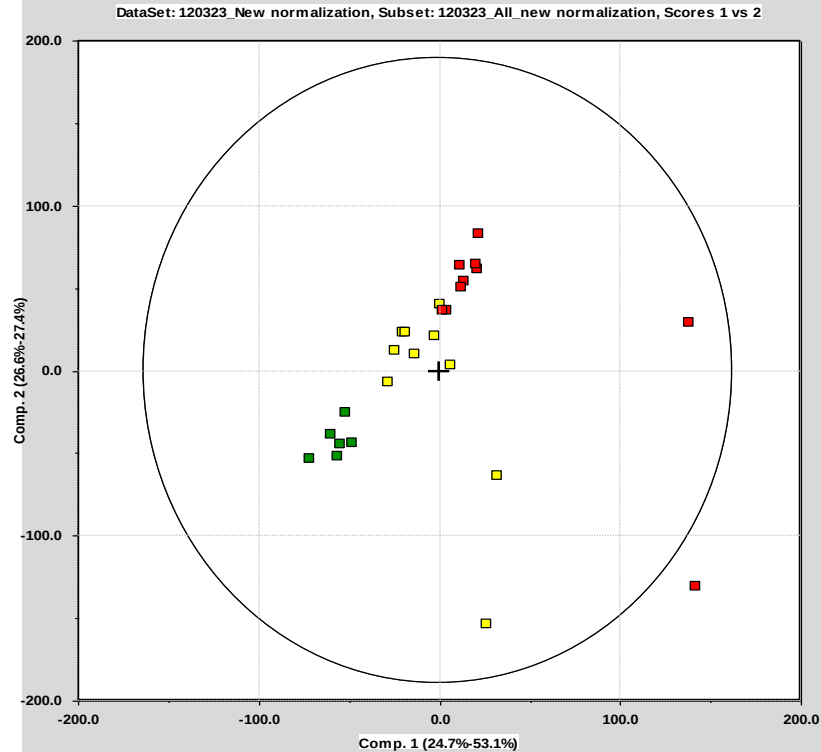


Hvilke proteiner endrer uttrykk i fisk fôret funksjonelt fôr?



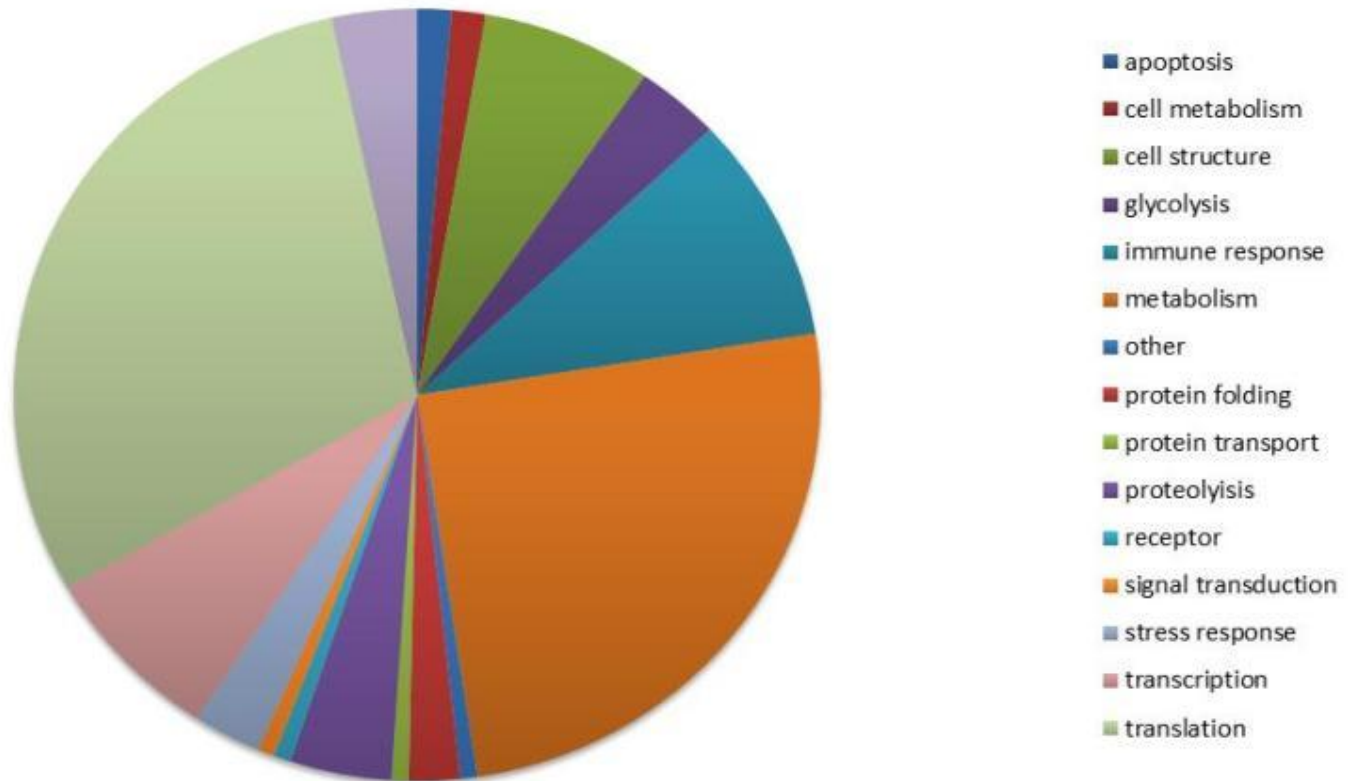
Immunophilin family protein

Proteiner ved ulikt smittenivå



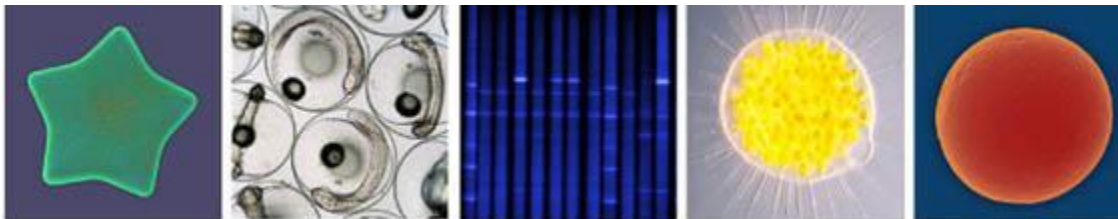
Biologiske prosesser

- 260 felles protein identifisert i alle tre grupper



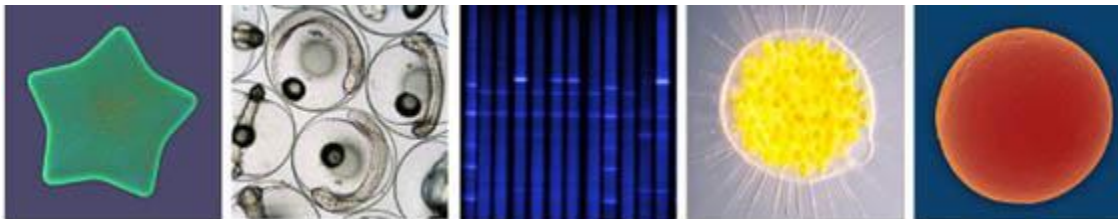
Identifiserte proteiner relatert til immunrespons inkluderer:

- Complement components C3, C6 and C9
- Heatshock protein (hsp70 og hsp 90)
- Lysozyme
- Transferrin fragment



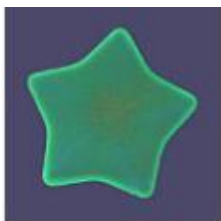
Proteinnivå endres i smittet fisk

- Oppregulerte proteiner i fisk smittet med høyt lusnivå inkluderer heat shock protein 90 (hsp90 beta) og transferrin fragment
- Protein involvert i metabolske prosesser som glykolyse og aminosyre metabolisme er også oppregulert i smittet fisk
- Har identifisert to interessante protein som kun er tilstede i smittet fisk

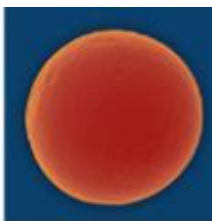


Oppsummering

- Det ble funnet lavere antall lus per fisk i diett B og D (22%)
- Ingen signifikant endring i tykkelse av epidermis eller i areal av mucousceller som følge av diett eller lusesmitte
- Stor variasjon i tykkelse av epidermis og areal av mucousceller mellom ulike områder på fisken
- Over 500 proteiner identifisert i slim
- Proteinsammensetningen endres ved diett og smitte

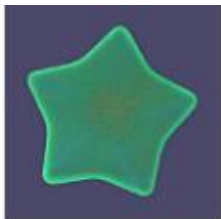


CURIOSITY IS
OUR PASSION

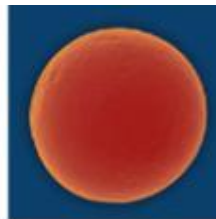
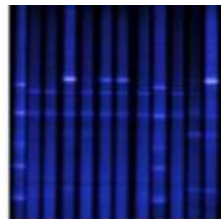


Konklusjon

- Helsefôr kan være en viktig bidragsyter til IPM, over 20% lavere påslag er en god effekt
- Både kvantitativ histologi og proteomikk er gode verktøy til å vurdere endringer i skinn og mucus som følge av diett og lusesmitte
- Arbeidet fremover vil fokusere på histologi ved ulike tidspunkt og samt videre karakterisering av proteiner som endres ved diett og smitte



CURIOSITY IS
OUR PASSION



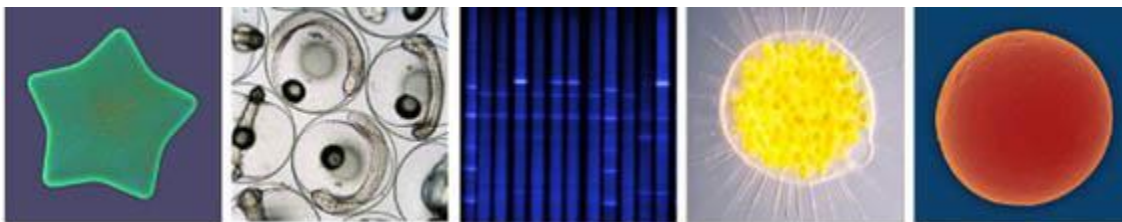
Takk til

- Regionalt forskningsfond Vestlandet
- Lerang forskningsstasjon
- Kjell Birger Øysæd, IRIS
- Anne Elin Varhaug, SUS
- Charles McGurk, Skretting ARC
- Olav Kvalheim og Tarja A R.Kvalheim, UiB

J.Fish Disease 2013, 36(3):311-321

Provan, F., Jensen, L.B., Uleberg, K.E., Larssen, E., Rajalahti, T., Mullins, J. & Obach, A.

Proteomic analysis of epidermal mucus from sea lice infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L



Takk for oppmerksomheten!

