

Utvikling av vaksine mot lakselus

Et forskerteam ved Havforskningsinstituttet har i fem år målrettet brukt genteknologi i arbeidet med å få kartlagt flest mulige sider ved lakselusens biologi. Etter hvert er det skapt et grunnforskningsmiljø på lakselus som er unikt på verdensbasis. Dette har vært en sentral del av instituttets strategiske satsing på marin genomforskning. Nå konsentrerer vi oss om å bruke den nye kunnskapen om lakselusen til å lete etter alternative strategier for å kunne bekjempe denne parasitten. De første kliniske forsøk i fisk har allerede vist at det er mulig å redusere antall lakselus gjennom vaksinasjon.

Petter Frost
petter.frost@imr.no

Eirik Biering
eirik.biering@imr.no

Christiane Moros
christiane.moros@imr.no

Frank Nilsen
frank.nilsen@imr.no

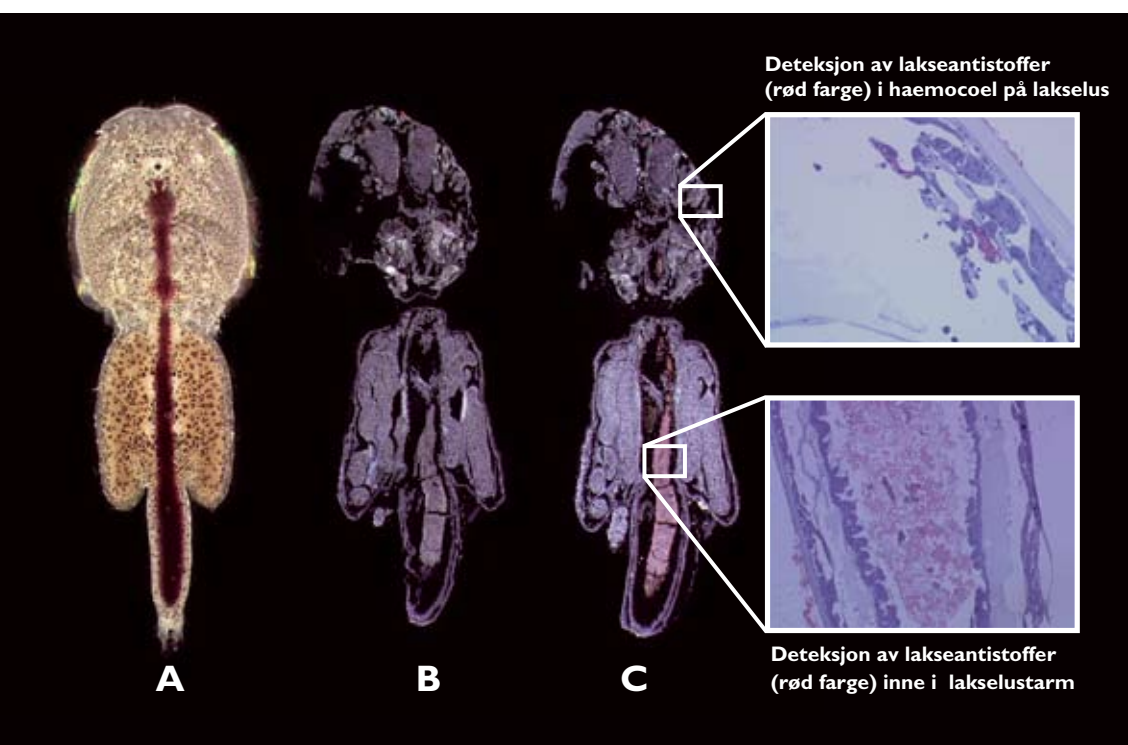
Infeksjoner med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en av de enkeltfaktorer som gir størst økonomisk tap i norsk oppdrettsnæring. Infeksjoner kan medføre dødelighet, redusert vekst og tilleggskostnader til medikamenter for avlusning. Potensielle negative miljøeffekter av avlusning og økt smittepress på villfisk er også uønskede sekundæreffekter koblet til lakselusinfeksjoner i oppdrettsanlegg. I Norge er det i dag til enhver tid over 300 millioner oppdrettslaks i sjøen, sammenlignet med anslagsvis 1–3 millioner individer av villaks og sjørøret til sammen. Selv få lakselus per oppdrettsfisk medfører en stor økning i den totale produksjonen av lakseluslarver i sjøen.

Frykt for resistensutvikling

Selv om leppefisk i dag i noen grad brukes til biologisk avlusning, holdes i realiteten

lakselusproblemet i sjakk ved hjelp av relativt omfattende bruk av noen få effektive avlusningsmidler, to pyretroider (deltametrin og cypermetrin) og emamectin benzoat ("SLICE"). Det begrensede antall medikamenter i kombinasjon med omfattende bruk, gjør at sannsynligheten for resistensutvikling over tid er stor, tilsvarende det som skjedde med organofosfatene som var i bruk til midt på 1990-tallet.

Pesticider tilsvarende det som i dag brukes mot lakselus har også vært brukt i bekjempelse av ulike skadeinsekter, og resistente stammer har da utviklet seg i mange arter. Rykter om enkelttilfeller av pyretroidresistens har versert lenge og er de senere år bekreftet vitenskapelig. "SLICE" har bare vært benyttet i Norge i få år, mens det i Chile har vært i utstrakt bruk mot *Caligus spp.* gjennom mange år. Derfra rapporteres det nå om økt behandlingsfrekvens. Det er for øyeblikket ingen store resistensproblemer med avlusningsmidlene som brukes i norsk oppdrettsnæring, men det er sannsynlig at slike problemer vil oppstå i fremtiden. Utvikling av nye avlusningsstrategier, vaksinasjon og/eller nye medikamenter, vil derfor være av stor viktighet for oppdrettsnæringen.



Figur 3.3.1

Immunohistokjemisk (IHK) påvisning av lakseantistoffer i lakselus som har spist lakseblod (snitt C). Snitt B er negativ kontroll for IHK-analysen. A viser bilde av den levende, voksne hunnlusen, med tarmen full av lakseblod (rødt), før preparering for IHK-analysene.

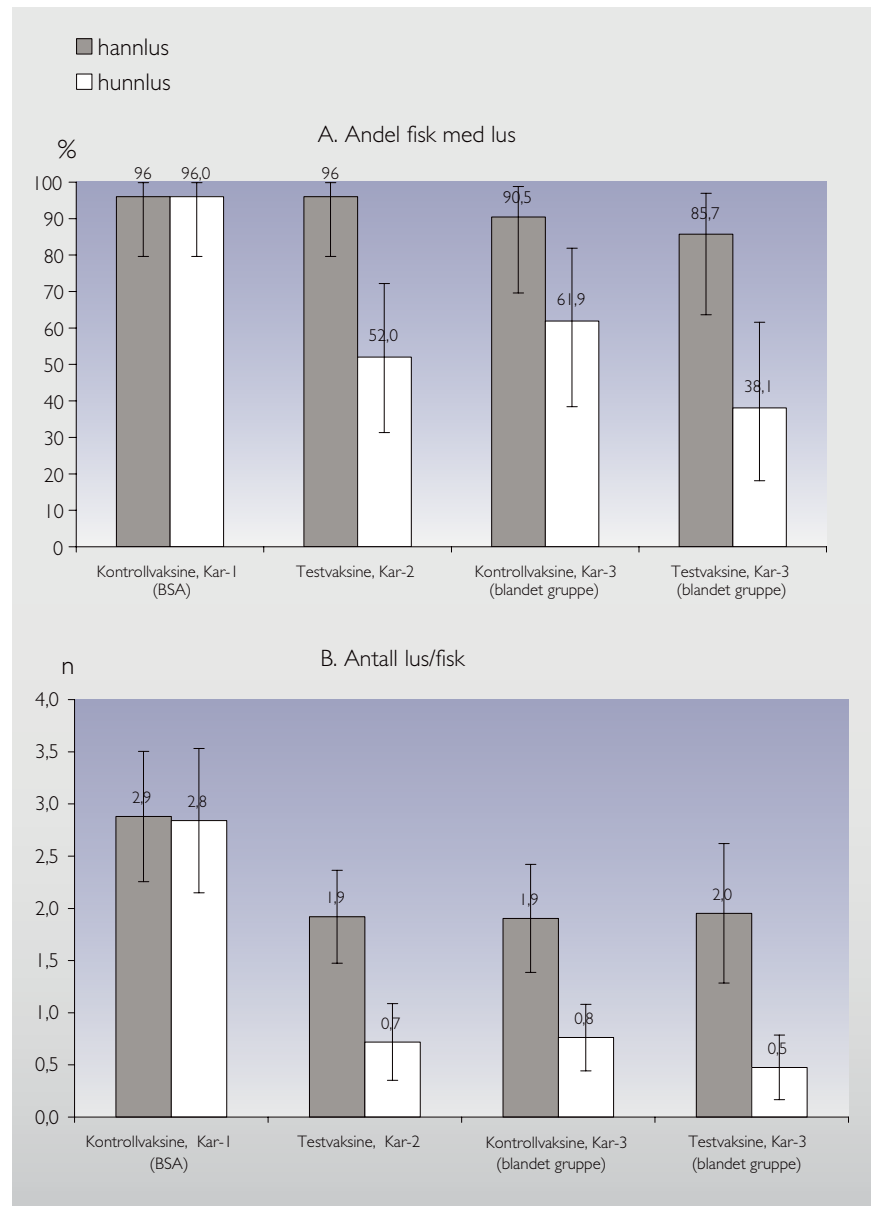
Salmon antibodies in salmon louse with salmon blood in the intestine, detected using immunohistochemistry (IHC) (Section C). Section B is the IHC negative control. Image A shows the live adult female salmon louse with salmon blood throughout the intestine (red line), prior to preparation for IHC analysis.

Vaksinasjonsforsøk

Utvikling av vaksiner mot ektoparasitter er en vanskelig oppgave. Siden disse parasittene lever på utsiden av verten, reagerer ikke fiskens immunsystem på hele parasitten, slik det gjør mot virus og bakterier. Det eneste stedet det er kontakt mellom en fisk og en lakselus er der lakselusen spiser av verten. Vertens immunsystem kan derfor bare reagere lokalt mot komponenter parasittene utskiller på infeksjonsstedet, og ikke mot komponenter som er skjult inne i parasitten. Tilnærmet alle komponenter i en ektoparasitt er derfor skjult for vertens immunsystem under en naturlig infeksjon. For ektoparasitter som spiser blod kan imidlertid komponenter inne i parasitten nås via vertens blod. Den eneste kommersielt tilgjengelige vaksinen mot en ektoparasitt (flått på storfe) er basert på et protein (Bm86) i fordøyelsessystemet til parasitten. Når kveget vaksineres med dette proteinet, danner det antistoffer mot Bm86. Dermed får flåttene i seg antistoffene når den suger blod, noe som trolig hemmer dens fordøyelsessystem og reproduksjon. Bm86 er skjult for vertens immunsystem under en naturlig infeksjon. Når det isoleres og injiseres som vaksineantigen i verten, er det en vaksine som er basert på et såkalt "skjult antigen". Lakselus spiser også blod fra verten sin, og vi har påvist lakse-antistoffer inne i lakselusen (Figur 3.3.1).

I et første forsøk med vaksinasjon av laks med "skjult antigen" fra lakselus har vi brukt en blanding av proteiner rensset fra lakselusegg. Pre-smolt av atlantisk laks ble vaksinert, og etter sjøvannstilvenning eksperimentelt smittet med infeksiose kopepoditter, produsert fra en egenutviklet laboriestamme av lakselus. Vaksinert gruppe og kontrollgrupper gikk i et felles kar inntil to uker etter smitte. Vaksinegruppene (med fasthengende chalimuslarver) ble da overført til separate kar, hvorefter lakselusen fikk utvikle seg til voksne individer. Ved avslutning av forsøket 11 uker etter smitte var det signifikant færre fisk med voksne hunnlus og lavere antall voksne hunnlus/fisk i vaksinert gruppe enn i kontrollgruppen (Figur 3.3.2). I karet der vaksinert gruppe og kontrollgruppe gikk i blanding, ble det observert en viss effekt av vaksinasjon også i kontrollgruppene. Dette skyldes trolig det faktum at lus, og særlig laboriestammer, hopper mellom ulike verter. Siden vaksine-antigenene var isolert fra egg, ble vaksineeffekt som forventet observert på hunnlus.

Vaksineforsøket indikerer klart at det teknologisk sett er mulig å bruke vaksinasjon til å redusere antall lakselus på oppdrettsfisk, men det er uavklart hvilke av komponentene i testvaksinen som fun-



Figur 3.3.2

Andel fisk med voksne lakselus (A) og antall voksne lakselus/fisk (B) på atlantisk laks vaksinert med "skjult antigen" fra lakselus. Data er innsamlet 11 uker etter eksperimentell smitte med infeksiose lakseluslarver (kopepoditter).

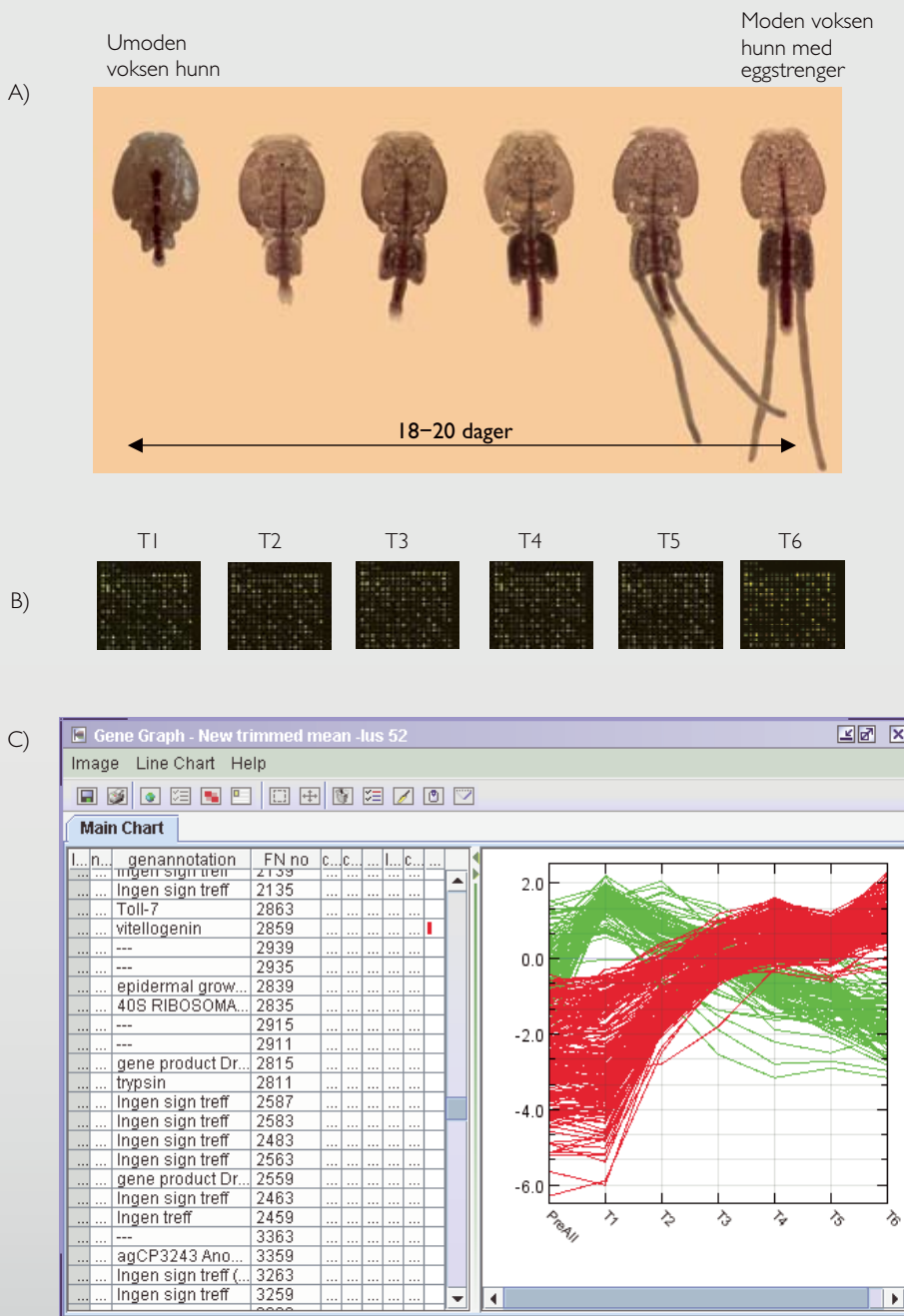
Percentage of fish with adult salmon louse (A) and number of adult lice/fish (B) on Atlantic salmon vaccinated with concealed antigens from salmon louse. Data was collected 11 weeks after experimental challenge with infectious salmon louse larvae (copepodids).

gerer. Arbeid med å avklare dette pågår i tett samarbeid med vaksineprodusenten Intervet-Norbio. Selv om det i dag allerede foreligger kandidat-antigener i klinisk utprøving, er det viktig å fortsette arbeidet med å identifisere og evaluere nye "nøkkelproteiner" som kan blokkeres ved vaksinasjon og/eller nye medikamenter. Det er ikke mulig å vite om noen av dagens kandidat-antigener, (som virker når de renses direkte fra lakselus og brukes i blanding) har effekt hver for seg eller om de lar seg produsere i industriell skala.

Utvelgelse av kandidat-antigener

Utvikling av vaksinen mot flått på storfe viste at en effektiv vaksine basert på

"skjult antigen" må bestå av ett eller noen få antigener. Dette er også en forutsetning for at en slik vaksine for fisk skal kunne produseres industrielt, til en pris som gjør det mulig å ta den i praktisk bruk i oppdrett. Detaljert kunnskap om de biologiske prosesser som kan angripes (f. eks. reproduksjon) er derfor en forutsetning for å kunne identifisere nøkkelproteiner som kan blokkeres. Parasitter som lakselus er meget kompliserte eukaryote organismer med titusenvis av gener (som ikke er karakterisert). Dette gjør identifisering av potensielle "skjulte antigen-kandidater" til en meget omfattende oppgave, der forskningsstrategier basert på å studere ett og ett gen ikke er hensiktsmessig.

**Figur 3.3.3**

Søk etter gener involvert i modning av voksne lakselushunner fra siste skallskifte til maksimal eggproduksjon, ved hjelp av mikromatriseteknologi.

A. Ulike utviklingsstadier av modnende voksne hunnlus hvorfra alle aktive gener (mRNA) isoleres for mikromatriseanalyser.

B. Utsnitt av lakselus-mikromatrise (7000 mikroflekker av DNA, som hver representerer en kjent genskvens, EST) der genaktiviteten av alle gener analyseres fra alle de ulike utviklingsstadiene. Genaktiviteten for hvert enkelt gen detekteres ved utsending av lys, og gener som endrer aktivitet gjennom modningsprosessen kan ses som endring i fargeintensitet (grønn, rød) på analyser fra ulike prøver. Lysintensitet måles ved hjelp av en laserskanner og analyseres ved hjelp av bioinformatisk verktøy.

C. Eksempel på resultat av bioinformatisk analyse av mikromatriseforsøk. Kurvene representerer nivået av genuttrykk på de ulike modningsstadiene; en kurve for hvert gen (mikroflekk) på mikromatrisen. I dette eksempelet har dataanalysen identifisert både de gener som blir "skrudd på" (røde kurver) og de som blir "skrudd av" (grønne kurver) under prosessen frem mot eggproduksjon. Identiteten til hvert enkelt av gene fremkommer automatisk av listen til venstre.

Detection of genes involved in post-molting maturation and egg production in adult female salmon louse using microarray analyses.

A. Different developmental stages of adult female salmon louse maturing for egg production, from where all expressed genes (mRNA) are isolated for microarray analysis.

B. Parts of salmon louse microarrays (7000 microspots of DNA, each corresponding to one EST) used to measure the expression level of all the genes from the individual developmental stages. The expression level of each gene is represented by emission of light and changes in gene expression are measured as changes in color-intensity (green, red) between the different samples. Laser scanning and bioinformatic tools are used to detect the light intensities and process the raw data.

C. Example of results from bioinformatic analysis of microarray data. The lines in the graph represent levels of gene expression at the different developmental stages, one line for each gene (microspot) on the array. Here the software has identified both the genes that are "switched on" (red lines) and the genes "switched off" (green lines) during maturation and egg production. The identities of the genes are automatically listed as shown to the left.

Ved Havforskningsinstituttet har vi sekvensert 7000 såkalte EST-er (biter av gener som er "påskrudd") fra lakselus. Disse representerer ca. 2500 lakselusgener hvorav omtrent 40 % ikke er funnet å ha likhet med gener fra noen andre organismer. Basert på slike databasesøk mot gener fra andre organismer kan man få en indikasjon om genfunksjon, men funksjonelle forsøk er uansett nødvendig. Med mikromatriseteknologi er det mulig å analysere genaktiviteten til titusenvis av gener i én prøve samtidig. Ved å sammenligne resul-

tater fra ulike prøver kan man med slik teknologi følgelig identifisere gener som er ulikt påskrudd i prøvene. Dermed kan de enkeltgener som er involvert i den biologiske prosess som studeres, identifiseres blant titusenvis av gener.

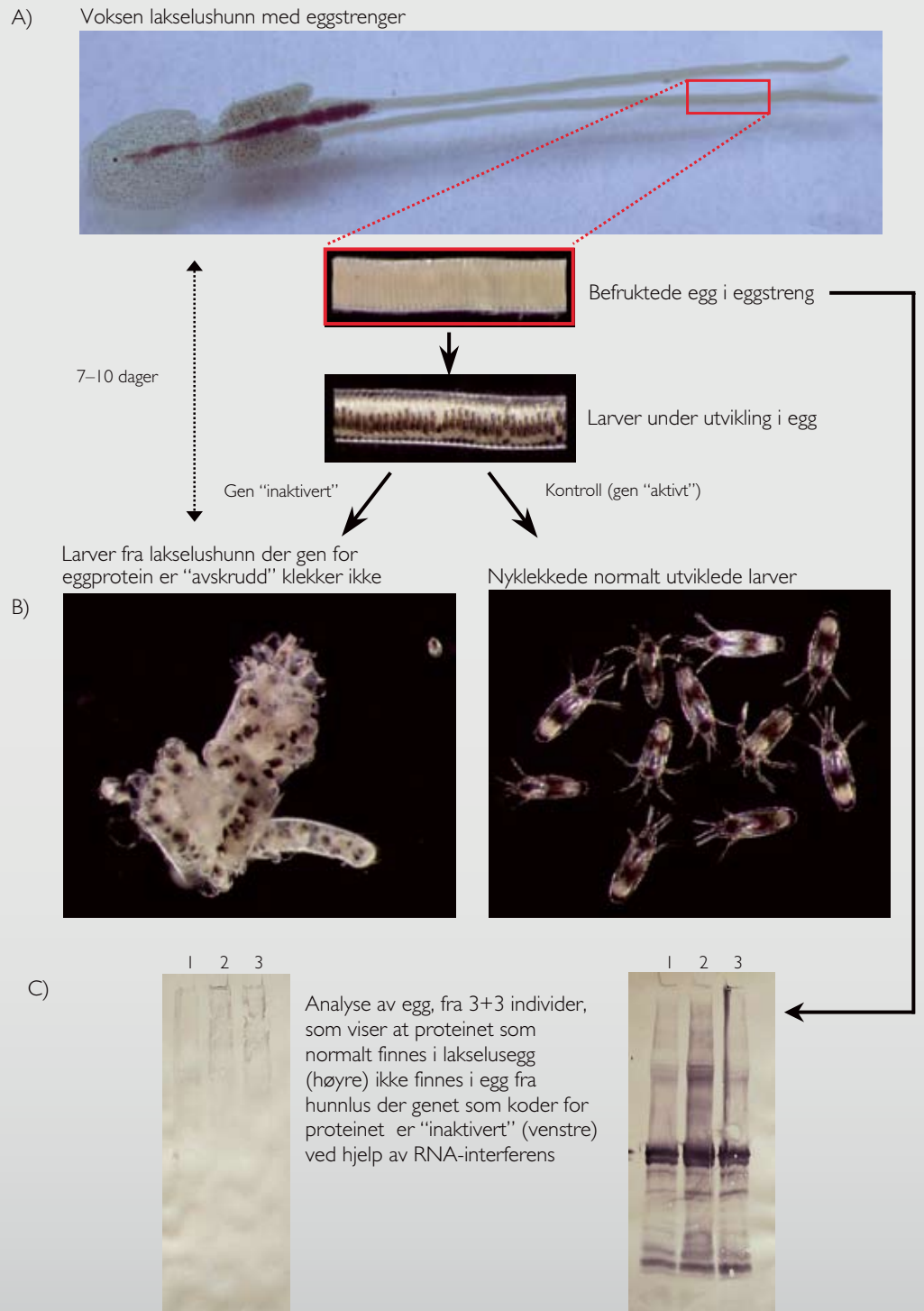
Havforskningsinstituttet har, i samarbeid med Norsk mikromatrise-konsortium, utviklet en lakselus-mikromatrise basert på våre 7000 EST-er. Ved hjelp av denne mikromatrisen har vi kartlagt uttrykk av alle de karakteriserte lakselusgene-

ne gjennom lakselusens eggproduksjon (Figur 3.3.3). Modningsprosessen som skjer i voksne hunnlus i forkant av eggproduksjon har vi de senere år dokumentert ved hjelp av egenutviklede laboratoriestammer av lakselus. Over hundre voksne lakselus i ulike modningsstadier er høstet og systematisert ved hjelp av digitale strukturanalyser. Mikromatriseanalyser på utvalg av disse prøvene påviste én gruppe gener som ble "skrudd på" under modning og eggproduksjon og en annen gruppe som ble "skrudd av". Blant gene-

Figur 3.3.4

Eksempel på evaluering av et kandidat-antigen ved hjelp av systemisk RNA-interferens i lakselus. Uttrykk av gen som koder for kandidat-antigenet (her et gen involvert i eggproduksjon) ble "slått av" i voksne hunnlus (A). Proteinene gen koder for kunne ikke detekteres i de befruktede eggene (C, venstre) noe som bekrefter at gen var avskrudd. Eggene som manglet dette proteinet utviklet seg til larver, men larvene var feilutviklet og/eller klekket ikke (B, venstre).

Example of candidate-antigen evaluation in salmon louse, using systemic RNA interference. The expression of the gene that encodes the candidate antigen (here a protein involved in egg production) was "knocked down" in adult salmon louse (A). The protein encoded by the gene was undetectable in the fertilised eggs (C, left), confirming that the gene was "off". Eggs without this protein developed into larvae but the larvae had developmental defects and/or were unable to hatch (B, left).



som ble "skrudd på", påviste vi blant annet de som koder for antigenene som ble brukt i den effektive testvaksinen beskrevet over. I tillegg ble en del nye gener påvist å være involvert i den samme prosessen. Disse utgjør da nye kandidat-antigener for å prøve å hemme reproduksjonen via vaksinasjon.

Vaksinestesting uten vaksinasjonsforsøk
Uansett teknologi vil forsøk på å utvikle en lakselusvaksine nødvendigvis evaluering av en lang rekke kandidat-anti-

gener. Selv om mikromatrise og andre funksjonelle genomstudier brukes målrettet til å identifisere kun de mest lovende av dem, vil listen over kandidat-antigener langt overstige hva som er praktisk mulig å utprøve i kliniske vaksinasjonsforsøk. Kliniske vaksineforsøk forutsetter tilgjengelig antigen (renset fra lus eller laget rekombinant), tilgjengelig forsøksfisk og fasiliteter, og inkluderer en tidkrevende prosess med vaksinasjon og eksperimentell smitte. Dette er ikke praktisk mulig om antallet kandidat-antigener er 50–100,

slik det trolig minst må forventes dersom et vaksineutviklingsprosjekt på lakselus skal lykkes. Ved Havforskningsinstituttet har vi nylig etablert en metode som lar oss evaluere vaksine kandidater uten å måtte gjennomføre vaksineforsøk. Denne metoden, RNA-interferens, gjør det mulig å skru av gener man måtte ønske i hele, levende lakselus. Dette medfører at det proteinet som gen koder for (vaksine kandidat-antigenet) ikke blir produsert, og konsekvensen av det kan observeres på den levende lakselusen. Det samme vil

da kunne skje dersom proteinet blokkeres via vaksinasjon. På denne måten kan alle kandidat-antigener der fravær/blokkering ikke har noen/tilstrekkelig effekt, fjernes fra listen. Dermed vil kliniske vaksinasjonsforsøk bare gjøres på kandidat-antigener der fravær/blokkering kan påvirke lakselusens negativt i tilstrekkelig grad (er dødelig, hemmer blodfordøyning, hemmer reproduksjon osv.).

Vi har for eksempel gjort slik RNA-interferens på et gen som koder for et av de antigenene som var i den effektive testvaksinen beskrevet over. Genet ble påvist å være "avskrudd" i de voksne eggprodu-

serende hunnene, og proteinet var ikke til stede i eggene (Figur 3.3.4). Selv om de eggproduserende hunnene ikke selv ble påvirket av at genet ble "skrudd av", viste det seg at larvene som manglet proteinet genet koder for ikke klekket. Blokkering av dette proteinet dreper altså ikke hunnlusen, men hindrer den i å reproducere seg. Pågående vaksinasjonsforsøk med kun dette proteinet vil avdekke om det samme kan oppnås via vaksinasjon.

I et nystartet NFR-prosjekt (2006–2008) skal listen av kandidat-antigener utvides og RNA-interferens brukes til å identifisere de mest lovende vaksinekandidatene.

Significant reduction in salmon lice prevalence on salmon vaccinated with concealed antigen from female louse

Infections with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) are probably the single factor causing the largest economical loss in the Norwegian aquaculture industry today. Except for cleaner-wrasse, all the current methods for controlling lice infections rely on chemical neurotoxins. Few available types of drugs combined with frequent use are factors that increase the risk of resistance development. As resistance problems are likely to appear in the future, development of alternative strategies (vaccine and/or new therapeutics) is of great importance for the aquaculture industry.

Currently there is one commercial available vaccine against ectoparasites (a cattle tick vaccine). This vaccine is based on a single concealed antigen from the tick. Antibodies probably block the function of this protein within the ticks when they eat blood from vaccinated animals. Salmon lice also feed on salmon blood and salmon antibodies are detectable within the salmon louse (Figure 3.3.1).

We have recently conducted vaccination trials using concealed antigens purified from one of our laboratory strains of salmon louse. Following experimental challenge, vaccinated fish showed a significant reduction in female lice prevalence (the number of fish with female lice) and in the abundance (number of lice/fish) clearly demonstrating that it is possible to reduce the number of salmon louse by vaccination (Figure 3.3.2). Further clinical trials with these concealed antigens are in progress. However, the antigens may not work individually or may not be possible to produce in an industrial scale. Therefore, screening for additional vaccine antigen-candidates continues and for highly complex organisms like the salmon

louse this is a difficult task. Detailed knowledge about the salmon louse life cycle at the molecular level is of fundamental importance in order to identify potential "vaccine targets" within the louse.

At the Institute of Marine Research we have sequenced 7000 ESTs (small tags of genes that are active) representing approximately 2500 genes. By microarray analysis the activity of all these genes can be studied simultaneously. We have, in cooperation with the Norwegian Microarray Consortium, developed such a microarray for salmon louse and applied it in expression profiling for all the 7000 ESTs during the post-molting maturation and egg production in adult female salmon louse (Figure 3.3.3).

Salmon louse vaccine development will include clinical testing of a range of candidate antigens. Even though functional genomics is used to identify only the most promising candidates, the list of candidates will outnumber what is possible to evaluate by vaccination trials in fish. We aim to use systemic RNA interference in salmon louse as an initial screening of vaccine antigen-candidates. RNA interference is a method that makes it possible to "knock down" a selected gene (and only that) in the entire salmon louse. This enables us to observe the consequence of a potential successful blocking of the protein the gene encodes, without doing time-consuming vaccination trials. By screening all vaccine antigen-candidates with the high capacity RNA interference method, only the candidates that severely affect the louse if they are blocked will be tested in clinical trials. We have recently established systemic RNA interference in adult salmon louse and demonstrated the effect of knocking down a gene encoding one of the antigens from our effective test vaccine (Figure 3.3.4).