



**U i T**

**NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET**

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Norges Fiskerihøgskole (NFH)

**Humorale immunresponser i bukhule og systemiske organer hos  
Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) – sammenligning av levende og  
inaktivert salmonid alphavirus 3 administrert i bukhulen**

---

**Mathias Abrahamsen**

*Masteroppgave i fiskehelse (60 stp)*

*Mai 2019*



## Forord

*Denne oppgaven ble utført i forskningsgruppen «Fish Immunology and Vaccinology» ved Norges Fiskerihøgskole, fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved UiT Norges arktiske universitet. Oppgaven ble påbegynt i mars 2018 og avsluttet i juni 2019.*

Dette masterløpet har på mange måter vært veldig spennende, men også krevende, og jeg sitter igjen med mer kunnskap og takknemlighet enn jeg på forhånd kunne forestilt meg. Det har vært både oppturer og nedturer, men med litt viljestyrke, litt velvilje og minst en kopp kaffe kommer man langt. Denne oppgaven er på mange måter mitt produkt, men jeg er ikke alene om å ha bidratt til det ferdige produktet. Tett og solid oppfølging har jeg fått fra mine fantastiske veiledere Jorunn B. Jørgensen og Ingvill Jensen. Jeg vil takke dere begge for fantastisk faglig veiledning, positivitet, tålmodighet og for at dere alltid er tilgjengelige for spørsmål. Dere, og forskningsgruppa, tok meg imot med åpne armer og det setter jeg stor pris på. Takk til mine flotte bi-veiledere Shiferaw og Linn for grundig opplæring på lab og for god hjelp med gjennomføringen av ELISpot og RT-qPCR. En spesiell takk til Shiferaw for uvurderlig hjelp både under de lange uttaksdagene og i masterløpet generelt. Jeg ønsker også å rette en takk til Michelle, Guro og Henriette for deres positivitet og hjelp med gjennomføring av uttak og analysering av prøvematerialene brukt i min oppgave.

Tusen takk til alle medstudenter. Allerede første dag på studiet skjønnte jeg hvilken flott gjeng jeg kom til å studere sammen med. Dere har gjort studietiden ved NFH førsteklasses enestående og helt uforglemmelig. En spesiell takk må jeg også få rette til Sjøpøls! Sist men ikke minst vil jeg takke mamma, pappa og min bror for at dere alltid er der til støtte og hjelp når det trengs. Dere er gulle gode og jeg kan ikke ordlegge hvor mye dere betyr for meg.

Tromsø, mai 2019



Mathias Abrahamsen

## Sammendrag

Pankreassykdom (PD) er en sykdom som forårsakes av salmonid alphavirus (SAV) og anses som en av de mest utbredte virussykdommene i dagens oppdrettsnæring. I tillegg til at sykdommen fører til store tap for næringa, utgjør sykdommen også et stort problem sett fra et fiskevelferds-perspektiv. Siden det ikke finnes behandling mot sykdommen ligger fokuset på forebyggende tiltak. Det er utviklet flere vaksiner med formål å redusere dødelighet og antall utbrudd knyttet til PD, men med suboptimale resultater. Virusvaksiner settes vanligvis intraperitonalt (ip) i bukhulen hos fisken og en viktig del av beskyttelsen er at de induserer nøytraliserende antistoffer i serum. Nøytraliserende antistoffer skilles ut av antistoffsekreterende B-celler (ASC). Distribusjonen av og responsen til ASC før, under og etter en virusinfeksjon i bukhule og systemiske organer er lite studert i fisk. DNA-vaksiner med plasmider som koder for virusproteiner eller IFN-I er vist å stimulere antivirale prosesser i fisk, men mekanismene bak og virkemåte for disse responsene er også lite studert i fisk, både i eksperimentelle studier av levende fisk og i cellekultur. På bakgrunn av dette ble laks ip injisert med inaktivert eller levende SAV og B-celle responsene i bukhule og systemiske organer ble kartlagt over 10 uker etter injeksjon ved hjelp av et B-celle ELISpot assay for å måle antallet IgM-produserende celler. RT-qPCR ble brukt til å verifisere SAV-infeksjonen ved deteksjon av virustranskripter (nsP1) i hjerte, mens ELISA ble brukt til å måle SAV E2-spesifikk antistoffrespons i serum. I et separat forsøk ble naive leukocytter fra laks stimulert med ulike type I IFNer for å studere hvordan IFN-I påvirker antall IgM ASC i cellekultur.

Allerede 3 uker etter smitte hadde frekvensen av IgM ASC økt betydelig i bukhule, men også i milt og baknyre, sammenlignet med kontrollfisken. Forhøyet frekvens IgM ASC i baknyre ble videre observert 6 uker etter smitte. Generelt var økningen av IgM ASC moderat i alle vev etter ip injeksjon av inaktivert SAV, men i baknyre var antallet forhøyet, sammenlignet med kontrollgruppen, allerede 3 uker etter injeksjon. Lave nivåer av virustranskripter ble observert 3 uker etter smitte og høyeste nivå ble målt i uke 6. Nedgangen i virustranskripter etter uke 6 knyttet til en signifikant økt SAV E2-spesifikk antistoffrespons 6 uker etter smitte. Det separate forsøket viste at IFNa og IFNb stimulering av leukocytter i kultur ikke øker antallet IgM ASC, men at IFNc gir en beskjeden effekt ved langtids inkubering av cellene. Disse funnene har bidratt til å belyse B-celle responser hos naiv og smittet laks i sjøvann, og effekten av IFN-I på naive lakseleukocytter i cellekultur, og er viktige oppdagelser for videre forskning.

# Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Pankreassykdom (PD)	2
1.2.1	Virus	2
1.2.2	Regulerende tiltak mot PD	3
1.2.3	Symptomer, smitteforløp og behandling	5
1.2.4	Vaksiner	5
1.3	Immunologiske organer hos benfisk	6
1.3.1	Hodenyre og baknyre	7
1.3.2	Milt og tymus	8
1.3.3	Bukhule	8
1.4	Immunforsvaret hos benfisk	9
1.4.1	Medfødt immunitet	10
1.4.2	Adaptiv immunitet	10
1.4.3	Humoral og cellemediert adaptiv immunitet	12
1.4.5	Immunoglobuliner hos benfisk	13
1.5	Interferoner	14
1.5.1	Type I interferoner hos benfisk	14
1.6	Problemstilling	17
<b>2</b>	<b>Materiale og metode</b>	<b>18</b>
2.1	Forsøksfisk og organuttak	18
2.1.1	Virus – levende, inaktivert og rekombinant E2 protein	18
2.1.2	Forsøksfisk	19
2.1.3	Organuttak	19
2.2	Isolering og telling av leukocytter fra atlantisk laks	21
2.2.1	Isolering av leukocytter fra hodenyre, baknyre, milt og bukhole	21
2.2.2	Telling av isolerte celler	23
2.3	<i>In vivo</i> SAV3 eksperiment	23
2.3.1	Injeksjon av levende og inaktivert SAV virus	23
2.3.2	Kvantifisering av IgM-sekretende B-lymfocytter ved ELISpot analyse	23
2.3.3	Påvisning av SAV spesifikk antistoffrespons ved ELISA	26
2.3.4	Ekstraksjon og isolering av totalt RNA fra hjerte	28
2.3.5	cDNA-syntese	29
2.3.6	RT-qPCR måling av SAV nsP1-uttrykk	30
2.4	<i>In vitro</i> SAV eksperiment	33
2.4.1	Stimulering av leukocytter med rekombinant type I interferoner	33

2.4.2	Kvantifisering av IgM-sekretende B-lymfocytter fra laks etter stimulering med type I interferoner .....	33
2.5	Databehandling .....	34
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>35</b>
3.1	<i>In vivo</i> SAV eksperiment .....	35
3.1.1	Basale leukocyt- og IgM ASC nivå hos naiv atlantisk laks .....	35
3.1.2	Vektutvikling etter ip injeksjon av inaktivert salmonid alfavirus (SAV) og levende SAV i laks .....	37
3.1.3	Måling av SAV E2 spesifikk antistoffrespons i laks etter ip injisert inaktivert eller levende SAV .....	40
3.1.4	Måling av SAV nsP1-uttrykk i hjerte hos ip SAV3 smittet laks .....	42
3.1.5	Sammenligning av B-celle responser i laks etter ip injeksjon av inaktivert salmonid alfavirus og ip injeksjon av levende SAV .....	43
3.2	ELISpot assay av type I IFN-stimulerte lakseleukocytter .....	46
3.2.1	IFN $\alpha$ 1-stimulering av milt leukocytter fra laks – deteksjon av IgM ASC .....	46
3.2.2	Stimulering av IgM ASC fra laks med flere type-1 interferoner .....	47
<b>4</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>49</b>
4.1	Infeksjonsforløp i hjerte etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV .....	50
4.1.1	Påvisning av SAV infeksjon og vektreduksjon .....	50
4.1.3	Antistoffresponser mot SAV .....	51
4.2	Leukocytall i bukhule, hodenyre, baknyre og milt .....	52
4.3	IgM ASC responser i ulike vev etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV .....	52
4.3.1	Bukhule .....	53
4.3.2	Systemiske organer .....	54
4.4	<i>In vitro</i> type I IFN-stimulering av lakse-IgM ASC .....	56
4.5	Eksperimentelle betingelser og metode .....	57
4.5.1	Forsøksbetingelser .....	57
4.5.2	Metodediskusjon – B-celle ELISpot for totale IgM ASC populasjoner .....	58
4.6	Videre forskning .....	59
<b>5</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>61</b>
	<b>Appendix .....</b>	<b>68</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Oppdrett og kultivering av marine organismer utgjør en viktig del av norsk kultur og økonomi. Kommersiell fiskeoppdrett i Norge startet på 1970-tallet hvor man begynte med oppdrett av laks og ørret i primitive merder på sjø. I Norge i dag drives det kommersiell oppdrett på både atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* W.). Bare i 2017 ble det produsert 1,2 millioner tonn uforedlet laks til en verdi av 61,6 milliarder kroner i Norge, ifølge tall fra Statistisk Sentralbyrå (SSB). Majoriteten av norskprodusert laks og ørret eksporteres ut til flere land i Asia, Europa og Nord-Amerika. Fokus på fiskehelse og fiskevelferd har blitt enda viktigere de siste årene og tall fra Fiskeridirektoratet har vist en stabil dødelighet blant laks og regnbueørret etter utsett i sjø på henholdsvis 15 og 17 % mellom 2014-2018. Forøkt dødelighet og skader på fisk skjer i hovedsak i forbindelse med lusebehandling og generell håndtering av oppdrettsfisk, men også virussykdommer bidrar til økt dødelighet og tap under produksjon (Hjeltnes et al. 2019). I dag er de vanligste sykdommene blant laks og ørret i sjøfasen hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og vintersår som alle finnes endemisk langs hele kysten, i tillegg til pankreassykdom (PD) som kun forekommer endemisk sør for Flatanger. Tabell 1 under viser antall påvisninger av liste 2 og 3 sykdommer mellom 2011 og 2018. I 2017 var det en kraftig økning i antall påvisninger av SAV3 på Vestlandet og dette skyldes innføringen av obligatorisk screening fra september samme år (Hjeltnes et al. 2019).

**Tabell 1. Antall påvisninger av liste 2- og liste 3 sykdommer for årene 2011-2018. Data er utarbeidet av Veterinærinstituttet.** Tallene viser en reduksjon av PD-tilfeller fra 2017. Antall rapporterte tilfeller av ILA har vært uforandret de siste årene med totalt 13 nye tilfeller i 2018 (Hjeltnes et al. 2019).

Sykdom	Liste	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Oppdrettsfisk (laksefisk)									
ILA	2	1	2	10	10	15	12	14	13
VHS	2	0	0	0	0	0	0	0	0
PD	3	89	137	100	142	137	138	176	163
Furunkulose	3	0	0	0	1	0	0	0	0
BKD	3	3	2	1	0	0	1	1	0

## Innledning

Mot slutten av 1980-tallet var forbruket av antibakterielle midler i oppdrettsnæringen i Norge høyere enn noensinne. Introduksjonen av effektive oljebaserte vaksiner mot bakterielle sykdommer førte til at man fikk kontroll på sykdomsproblemene i den norske laksenæringen (Berg et al. 2007). I dag er vaksiner av oppdrettsfisk den mest effektive måten for å forebygge bakterielle sykdommer. Forebygging av virussykdommer i form av vaksiner har til nå bare ytt suboptimal effekt, i tillegg mangler det vaksiner mot de fleste virussykdommer. Det produseres og brukes virusvaksiner mot PD, infeksiøs pankreas nekrose (IPN) og infeksiøs lakseanemi (ILA) i ulik grad i Norge. Vaksinene reduserer dødeligheten og antall utbrudd, men selv etter vaksiner observeres det utbrudd i felt. Utviklingen av DNA-vaksiner har en gitt en viss beskyttelse mot virussykdommer i laks, både med og uten ko-injisering med plasmider som uttrykker interferoner (Robertsen et al. 2016; Robertsen 2018)

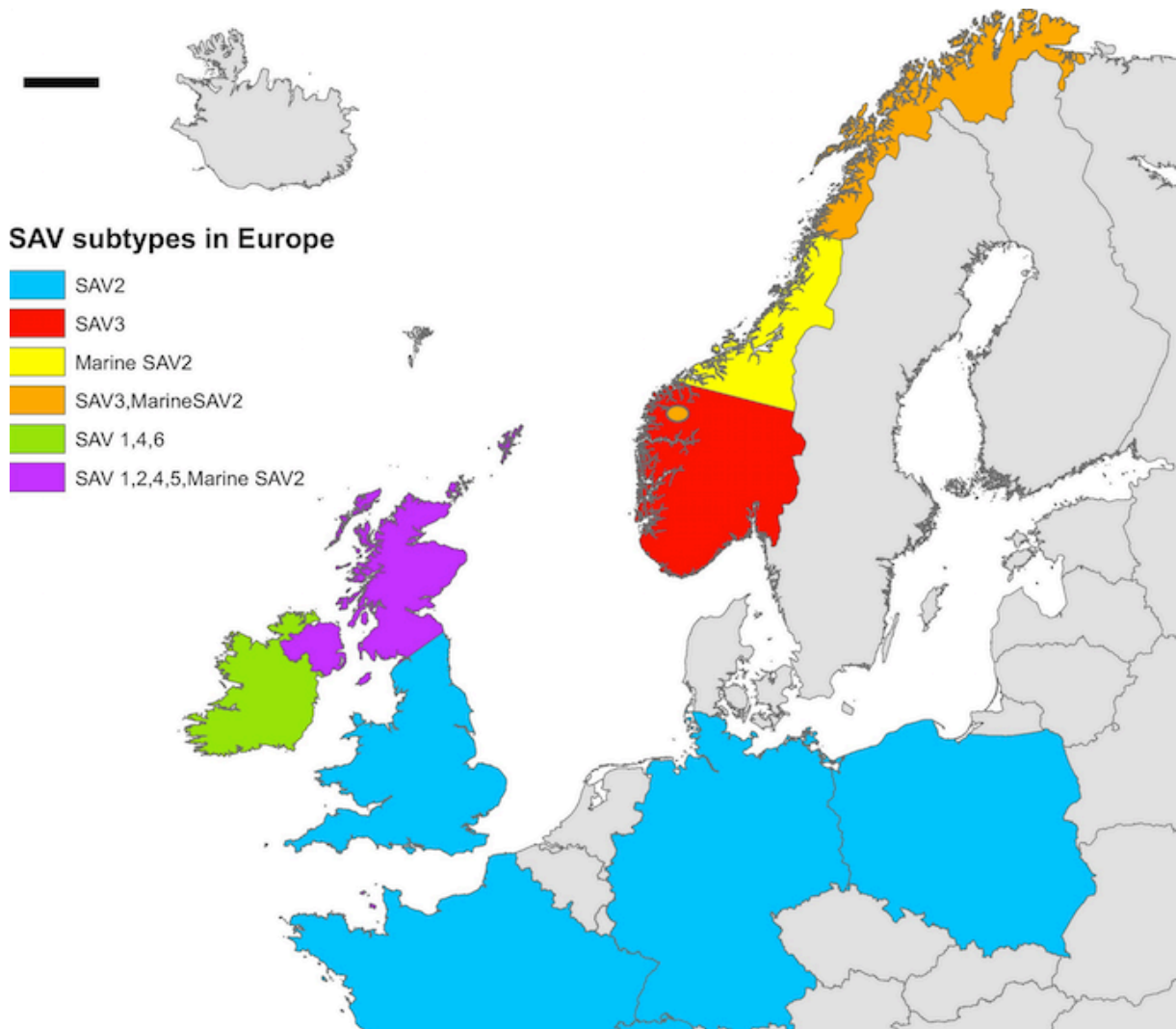
## 1.2 Pankreassykdom (PD)

### 1.2.1 Virus

PD anses som en av de mest alvorlige virussykdommene hos laksefisk i sjøvannsoppdrett i Norge og forårsakes av salmonid alphavirus (SAV). For tiden preges Norge av to PD-epidemier, SAV3 på Vestlandet og SAV2 nord for Hustadvika i Møre og Romsdal og Trøndelag. I 2018 ble det påvist totalt 163 nye tilfeller av pankreassykdom, en liten reduksjon i antall tilfeller fra 2017 (Hjeltnes et al. 2019). Sykdommen fører til dårlig fiskehelse, store økonomiske tap og kan fungere som en inngang til andre sykdommer på grunn av fiskens reduserte immunforsvar. PD ble først beskrevet hos atlantisk laks i Skottland i 1976 (Munro et al. 1984). Viruset som forårsaket sykdommen, SAV, ble oppdaget i Irland på atlantisk laks i 1995 (Nelson et al. 1995). Viruset er sfærisk og har et kappekledd kapsid med positivt enkelttrådig RNA (ssRNA) genom og en diameter på rundt 65 nm. Viruset tilhører familien Togaviridae (Hodneland et al. 2005). SAV-genomet koder for åtte proteiner; fire strukturelle kapsid glykoproteiner (E1, E2, E3 og 6K) og fire ikke-strukturelle proteiner (nsP1-4) (Weston et al. 2002). E2-proteinet er mest immunogent av de ulike proteinene og spiller en viktig rolle i reseptor-binding til og infisering av vertsceller, og videre formeringen av flere virus intracellulært i verten (Deperasinska et al. 2018).

## Innledning

Fylogenetisk sett skiller man mellom seks ulike genotyper av viruset navngitt SAV1-6 (Fringuelli et al. 2008). Kun marin SAV2 og SAV3 har vært påvist i Skandinavia, til tross for at SAV2 er den mest utbredte genotypen i Europa i både ferskvann og sjøvann (Figur 1). Blant oppdrettsfisk i Norge rammes både atlantisk laks og regnbueørret i sjøvann av pankreassykdom (Olsen et al. 1997).



**Figur 1. Fordeling av ulike SAV-genotyper i Europa og Skandinavia.** I Norge har man endemiske tilfeller av både marin SAV2 og SAV3 sør for Flatanger. Sporadiske tilfeller av begge virustypene har vært påvist i Nord-Norge (Jansen et al. 2017).

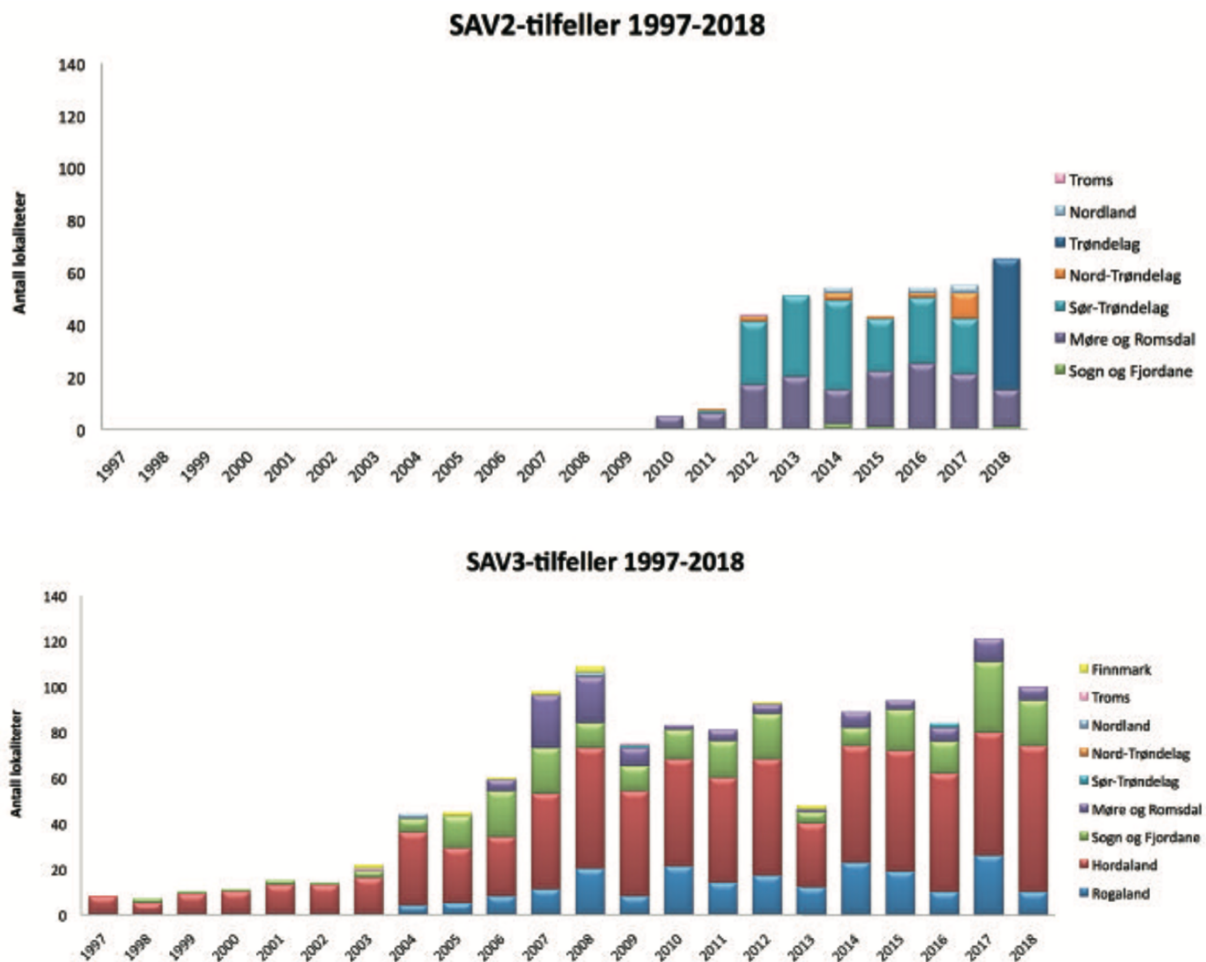
### 1.2.2 Regulerende tiltak mot PD

PD er en liste 3 sykdom og ved forekomst av eller mistanke om PD skal Mattilsynet kontaktes. Myndighetene har gjort grep for å hindre videre utbredelse av viruset i form av forskrifter som pålegger nasjonal overvåking i form av screening av fisk, innrapportering til Mattilsynet ved påvisning av sykdommen og geografiske restriksjoner som skiller mellom ulike genotyper av



## Innledning

SAV. PD-forskriften, først etablert i 2012, ble oppdatert i 2017 (*Forskrift om tiltak for å forebygge, begrense og bekjempe PD hos akvakulturdyr*: FOR-2017-08-29-1318) hvor det ble lovpålagt å foreta månedlig screening for begge SAV subtypene ved PCR av hjertevev fra oppdrettsfisk i sjøvann over hele landet. Det er etablert en aktiv PD-sone og to overvåkningssoner for sykdommen. I PD-sonen, som strekker seg fra Jærens rev ved Søre Revtangen i sør til Flatanger i nord, forekommer både SAV2 og SAV3 for tiden endemisk. De to overvåkningssonene strekker seg henholdsvis fra Søre Revtangen til grensen mellom Norge og Sverige (SAV3), og fra Flatanger til grensen mellom Norge og Russland (SAV2). I 2018 var det ett tilfelle av SAV3 nord for Hustadvika og ett tilfelle av SAV2 sør for Hustadvika, der begge genotypene ble påvist ved begge lokalitetene. I 2018 opplevde man det høyeste antallet tilfeller av SAV2 i Norge siden genotypen ble registrert for første gang (Figur 2) (Hjeltnes et al. 2019).



**Figur 2. Antall påviste tilfeller av SAV2 og SAV3 i Norge i perioden 1997-2018.** Marin SAV2 ble først påvist i Møre og Romsdal i 2010, men spredte seg raskt til flere fylker i 2012. I dag blir den primært påvist i Trøndelag fylke. Antall tilfeller av SAV3 i Norge har vært stabilt siden 2010 med flest påvisninger i Hordaland fylke (Hjeltnes et al. 2019).

### 1.2.3 Symptomer, smitteforløp og behandling

PD-rammede individer har ofte redusert appetitt og unormal bevegelse i vannsøylen, og kan også kjennetegnes som mager taperfisk med dårlig tilvekst. Ved hjelp av histopatologi kan man knytte redusert vekst til endringer i vev. Histopatologiske undersøkelser av smittet fisk viser vanligvis tap av eksokrint pankreasvev, nekrose i hjertevev og betennelser og degradert vev i skjelettmuskel (Taksdal et al. 2007). Man mistenker at fisken mest sannsynlig blir smittet gjennom gjeller, hud og tarm. Smitten kan foregå både innen et anlegg, via havstrømmer til andre anlegg i området og ved transport av infisert fisk. Det finnes få synlige kliniske tegn til sykdom ved smitte, noe som gjør det vanskelig å oppdage sykdom før et eventuelt utbrudd. Utbrudd kan forekomme gjennom hele produksjonssyklusen i sjø, men skjer som oftest ved første sommer- og høst etter utsett. Det har vært påvist RNA fra viruset i feces og slim hos SAV-infisert fisk (Graham et al. 2012; Hellebø et al. 2014) og i lipider i vannoverflaten ved SAV-infiserte lokaliteter (Stene et al. 2016). Virusmitte gir som oftest ikke dødelighet uten at andre faktorer som miljø, andre infeksjoner eller håndteringsstress også er tilstede (Brun et al. 2005). For tiden finnes det ingen måter å behandle fisk mot virussykdommer, og derfor har man fokus på gode forebyggingsstrategier i form av screening, færre håndtering og hygieniske tiltak ved transport og slakting.

### 1.2.4 Vaksiner

All kommersiell oppdrettslaks i ferskvannsfasen vaksineres i Norge i dag. Vaksinen administreres ip og den vanligste vaksinetypen er en 6-komponentsvaksine som gir beskyttelse mot bakteriesykdommene furunkulose, kaldtvannsvibriose, vibriose, vintersår og virussykdommen IPN. En PD-vaksine (Norvax®Compact PD, MSD Animal Health) med inaktivert PD-virus (stamme F93-125) ble tilgjengelig for kommersielt salg i 2007 (Felleskatalogen 2016). Effekten av vaksinen har vært mye omdiskutert siden antall sykdomstilfeller ikke ble redusert i like stor grad som forventet, likevel har vaksinen ført til et redusert antall utbrudd, kumulativ dødelighet og slaktesvinn (Jensen et al. 2012). Vaksinen var først tilgjengelig som en monovalent vaksine og anbefalt og injiseres 230 døgngrader før multikomponentsvaksinen (Brudeseth et al. 2013). En slik strategi førte til mye håndtering og stress for fisken. En oppdatert vaksine med 7-komponenter (Aquavac®PD7, MSD Animal Health), der man også inkluderte inaktivert SPDV, har vært kommersielt tilgjengelig siden 2015 (Felleskatalogen 2017b). I 2017 mistet MSD Animal Health monopol på salg av PD-vaksine i Norge, og en ny PD-vaksine (ALPHA JECT micro®1PD, PHARMAQ) med inaktivert SPDV

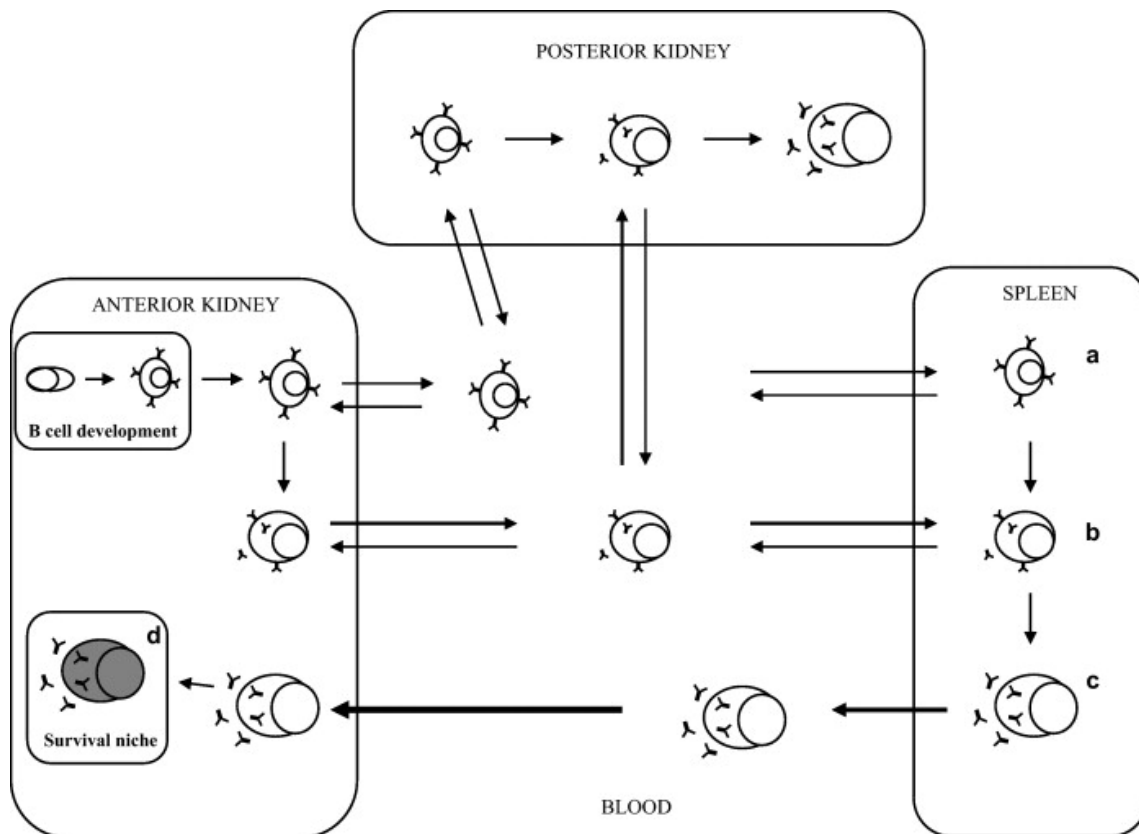
ble tilgjengelig fra PHARMAQ (Felleskatalogen 2017a). Vaksinen er rapportert å gi relativt god beskyttelse mot SAV-indusert dødelighet etter ip-, kohabitant- og feltsmitte (Karlsen et al. 2012). I 2018 ble en DNA-vaksine mot SAV3 (Clynav®, Elanco) kommersielt tilgjengelig i Norge (Felleskatalogen 2018; Hosteland 2018). Vaksinen inneholder DNA-plasmider som koder for proteiner fra SAV3 og injiseres intramuskulært (im). Prinsippet bak DNA-vaksiner er å benytte DNA-plasmider som koder for antigene virusproteiner og injisere disse i muskelvev. Injisert plasmid vil føre til genuttrykk av virale proteiner i muskelvevet hos vaksinert fisk, og potensielt forsterke immunresponsen og gi bedre beskyttelse enn tradisjonelle vaksiner mot virus (Evensen et al. 2013). DNA-vaksiner der man har brukt plasmider som uttrykker for type I interferoner (IFN) som adjuvans, ga sterke adaptive immunresponser mot ILA i nyere forsøk (Robertsen et al. 2016).

### 1.3 Immunologiske organer hos benfisk

Flere likheter finnes mellom immunforsvaret hos benfisk og pattedyr, men det finnes også en rekke distinktive forskjeller. En klar forskjell er mangelen på benmarg og lymfeknuter hos fisk. De immunologiske organene karakterisert hos fisk er nyre, tymus, milt og mukosa-assosierte lymfoide vev (MALTs) (Press et al. 1999). De mukosa-assosierte lymfoide vevene kan også deles inn i fire individuelle deler; tarm-assosiert lymfoid vev (GALT), hud-assosiert lymfoid vev (SALT), gjelle-assosiert lymfoid vev (GIALT) og nasopharynx-assosiert lymfoid vev (NALT) (Salinas 2015). I tillegg er et femte lymfoid vev, det interbranchiale lymfoide vevet (ILT), identifisert i gjellene på atlantisk laks (Haugarvoll et al. 2008). Cellepopulasjonen som befinner seg i de lymfoide vevene, og som deltar i både medfødt og adaptivt immunforsvar, inkluderer granulocytter, lymfocytter, makrofager, monocytter og trombocytter (Ellis 1977). Andre celletyper også identifisert hos benfisk er mastceller, cytotoxiske- og dendritiske celler (Reite et al. 2006; Nakanishi et al. 2011; Bassity et al. 2012). B-lymfocytene, også kalt B-celler, uttrykker B-cellereseptorer (BCR) og skiller ut positive immunoglobuliner ( $Ig^+$ ), mens T-lymfocytene, også kalt T-celler, uttrykker T-cellereseptorer (TCR) som gjenkjenner overflateproteiner (Rowley et al. 1988). Hos fisk regnes nyre og tymus som de primære lymfoide organene hvor produksjon og modning av henholdsvis B- og T-celler foregår (Press et al. 1999; Zwollo et al. 2005; Bowden et al. 2005), mens milt og de mukosal-assosierte lymfoide vevene fungerer som viktige sekundære lymfoide organer (Haugarvoll et al. 2008). Både hodenyre og baknyre fungerer også som sekundære lymfoide organer i benfisk (Zwollo et al. 2005).

### 1.3.1 Hodenyre og baknyre

Nyrens struktur og funksjon har vært undersøkt til en begrenset grad hos fisk tidligere. Studier har vist stor variasjon i anatomiske og funksjonelle egenskaper, men ofte deler man den inn i tre adskilte segmenter; fornyre, midnyre og baknyre (Press et al. 1999). Histologisk og funksjonelt sett skiller man mellom hematopoetisk vev (bloddannende), eksokrint og endokrint vev. Fornyre, også kalt hodenyre, er et viktig bloddannende organ hvor man finner alle stadier i modningen av blodceller spredt i vevet mellom et rammeverk av stamceller. Blodceller er et samlebegrep på røde blodceller som er viktige for gassutvekslingen og hvite blodceller, deriblant B- og T-celler, som deltar i immunforsvaret (Kryvi et al. 2016). Den inneholder store mengder B- og T-celler, lymfocytt-forløpere og plasmaceller (Zwollo et al. 2005). Hodenyren er også sete for produksjon av lymfocytt-modningsfaktorer som man også finner i pattedyr; inkludert Ikaros, RAG-1/2 og TdT (Bromage et al. 2004).



**Figur 3. Differensiering og distribusjon av ulike B-celler stadier i nyre og milt hos benfisk.** Hodenyren er et område for både tidlig B-celleutvikling og langtlivende plasmacelle-nisjer. (a) En naiv B-lymfocytter produseres i milt hvor den distribueres gjennom blod til andre vev som baknyre og milt. (b) Tilstedeværelse av patogener aktiverer utviklingen av plasmablast, og (c) plasmaceller, som begge kan bli langtlivende celler i en stamcellenisje (d) der celledeling, selvfornyelse og differensiering er viktige prosesser. Figur hentet fra (Ye et al. 2011).

## Innledning

Midt- og baknyre består av både renalt- og immunologisk vev rikt på delvis aktiverte B-celler og plasmablaste. Fordelingen av B-celler i nyren antyder at modning foregår i hodenyren etterfulgt av migrering til baknyre hvor B-celler aktiveres til plasmablaste, deretter beveger seg tilbake til hodenyren som fullt utviklede plasmaceller (Figur 3) (Zwollo et al. 2005). Baknyrens funksjon som enten primært eller sekundært lymfoide organ har tidligere vært mye omdiskutert og det mangler fortsatt mye forskning på baknyrens rolle som immunologisk organ hos benfisk.

### 1.3.2 Milt og tymus

Milt hos benfisk er et fibrøst og bloddannende vev som histologisk og funksjonelt sett deles inn i rød og hvit pulpa og befinner seg kaudalt i bukhulen (Kryvi et al. 2016). Rød pulpa består av et nettverk av blodfylte sinusoider med en bred cellepopulasjon som blant annet inkluderer makrofager og lymfocytter (Press et al. 1999). Hvit pulpa er mindre komplekst og deles gjerne inn i to rom som henholdsvis inneholder akkumulerte melano-makrofager og ellipsoider. Områder med akkumulerte melanomakrofager har vist seg å være viktige seter for presentering og destruering av antigener, i likhet hos andre større virveldyr (Agius 1980). Ellipsoidene består av årekanaler som bidrar til utfiltrering og lagring av antigener i celleveggen slik at makrofager kan komme til. Sammenlignet med større virveldyr har hverken follikulære dendritiske celler eller B-hukommelsesceller blitt påvist i milt hos benfisk tidligere (Arkoosh et al. 1991). Milten er generelt sett mye mindre utviklet hos fisk sammenlignet med pattedyr. Tymus er et parett organ plassert dorsalt for gjellene. Sammen med hodenyrene anses tymus som et av de primære lymfoide organene hos benfisk og som et viktig organ for T-celle modning av umodne tymocytter (Koppang et al. 2010; Anderson et al. 2012).

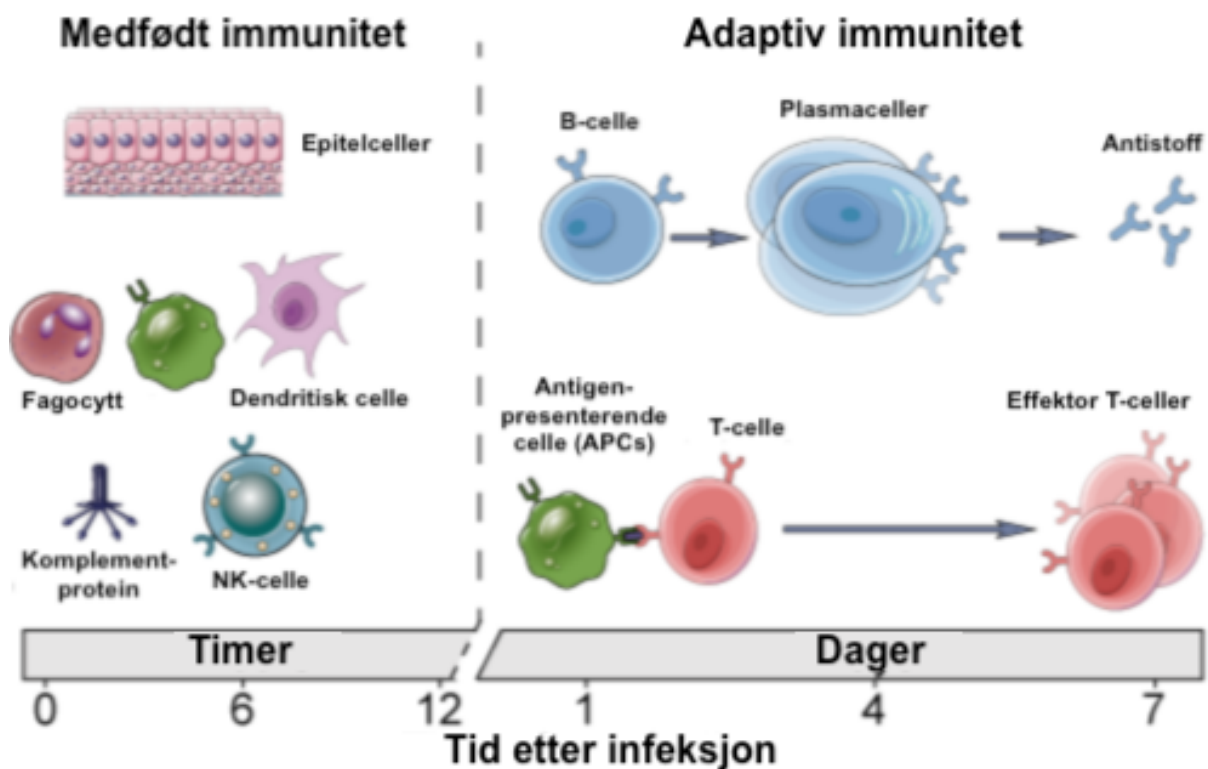
### 1.3.3 Bukhule

I bukhulen hos benfisk fins det ulike immunceller, deriblant makrofager, monocytter, nøytrofile granulocytter og lymfocytter som alle beskytter mot farlige mikroorganismer i kroppshulen. Det har vært vanlig å bruke injeksjon av immunstimulanter eller bakterier/virus og deretter høsting av bukhuleceller som en modell for å studere inflammasjon i fisk og pattedyr (Chaves-Pozo et al. 2005; Korytar et al. 2013). Reguleringen av B-celler i bukhulen både i fravær og tilstedeværelse av patogener har i de siste årene blitt forsket mye på. Nylig ble det rapportert at det etter injeksjon av bakteriell infeksjon av regnbueørret ble rapportert om tilstrømming av myeloide celler de første timene etter infeksjon, mens IgM-sekretende celler (IgM ASC) utgjorde

omtrent halvparten av alle bukceller i bukhulen 48 timer etter infeksjon (Korytar et al. 2013). Et enda nyere studie foreslår at IgM<sup>+</sup> B-celler er en av den største gruppen celler som strømmer til bukhulen som respons på enten bakterielle eller virale antigener, i tillegg til at man har oppdaget to ulike typer IgM<sup>+</sup> B-celler som funksjonelt ligner på henholdsvis naive B-celler og antigen-sekreterende celler (ASC) (Castro et al. 2017; Granja et al. 2019).

## 1.4 Immunforsvaret hos benfisk

En fysisk barriere som hud og slim fungerer godt som beskyttelse mot skadelige mikroorganismer som finnes i det ytre miljøet. Men ikke alle patogener stoppes her og vertens kropp må derfor også være forberedt med et sterkt indre forsvar. I likhet med immunforsvaret hos pattedyr og øvrige virveldyr er immunforsvaret hos benfisk svært omfattende. Immunforsvaret hos benfisk deles, i likhet med andre dyr, inn i medfødt og adaptiv immunitet (Figur 4).



**Figur 4. Fordeling av viktige immunceller under medfødt og adaptiv immunitet.** Den medfødte immuniteten består av celler med lav spesifisitet, men med rask reaksjon mot en bred rekke patogener. Den adaptive immuniteten består av celler med høy spesifisitet, tar lengre tid å aktivere men masseproduserer antistoffer mot spesifikke patogener presentert for B- og T-celler. Effektor T-celler deles inn i hjelper T-celler som forsterker humoral immunitet og cytotoksiske T-celler som dreper infiserte celler ved binding til APCs. Figur hentet fra (CreativeDiagnostics 2019).

### 1.4.1 Medfødt immunitet

Helt fra embryostadiet til den er ferdig utviklet er fisken avhengig av sin medfødte immunitet for å overleve. Den medfødte immuniteten, også kalt uspesifikk immunitet, fungerer som et raskt førstelinjeforsvar som både tar hånd om og uskadeliggjør farlige mikroorganismer. Det består gjerne av tre distinkte deler; fysiske, humorale og cellulære faktorer. Fiskens fysiske forsvar består av hud- og mukosa-relaterte slimlag. Komplementsystemet, cytokiner og antivirale proteiner utgjør det humorale forsvaret, og ulike immunceller som fagocytiske celler (som makrofager, monocytter og nøytrofile celler), natural-killer celler (NK-celler), dendrittiske-, epitel- og endotelceller er cellulære faktorer som beskytter mot patogener. Cellene i det medfødte forsvaret bruker «pattern recognition receptors» (PRRs) til å gjenkjenne konserverte strukturer på patogener som for eksempel «patogen-assosierte molekulære mønstre» (PAMPs), inkludert polysakkarider, peptidoglykaner på bakterielt DNA, nukleinsyrer (RNA) og andre molekyler som ellers ikke er assosiert med multicellulære organismer (Uribe, Folch, et al. 2011). Gjenkjenningen skjer ved binding mellom PRRs og PAMPs uttrykt på celleoverflaten til immunceller i det medfødte forsvaret. Ulike faktorer kan påvirke effektiviteten til det medfødte forsvaret; eksempelvis temperaturendring og stress som kan virke hemmende, mens kosttilskudd i fôr og ulike immunstimulanter kan gi en forsterkende effekt (Magnadottir 2006, 2010).

### 1.4.2 Adaptiv immunitet

Både den medfødte og adaptive immuniteten må jobbe sammen for å uskadeliggjøre og destruere farlige mikroorganismer. Patogener som unnslipper det medfødte forsvaret aktiverer spesifikk immunrespons i den adaptive immuniteten og involverer et komplekst nettverk av spesialiserte celler, proteiner, gener og biokjemiske signaler som bidrar til at kroppen kan aktivere effektorceller og antistoffproduksjon med høy spesifisitet og affinitet (Uribe, Folch, et al. 2011). Den adaptive immunresponsen har både lengre responstid og varighet enn den medfødte immunresponsen. Det adaptive immunforsvaret består blant annet av B- og T-celler med henholdsvis BCR og TCR som proteinbaserte reseptorkomplekser integrert i membranen på cellene. BCR gjenkjenner antigener ved å direkte binde til dem, mens TCR gjenkjenner antigener som presenteres via MHC klasse I og II uttrykt på membranen til antigen-presenterende celler (APCs). Binding av antigener til BCR og TCR fører til en aktivering av cytoplasma-assosierte enzymer knyttet til signalproteinene på BCR- og TCR-kompleksene, deretter en fosforylering av proteiner og videre en signalkaskade som aktiverer transkripsjon

## Innledning

av en rekke gener som blant annet fører til antiviral aktivitet (Abbas et al. 2015). I motsetning til PRRs, med svært begrenset diversitet, har BCR og TCR en bredspektret diversitet som gjenkjenner mange ulike antigener. En slik bredspektret diversitet av antigen-spesifikke reseptorer er skapt gjennom rekombinasjon av gen segmenter, og da spesifikt somatisk rearrangering av VDJ-segmenter lokalisert i TCR- eller BCR/Ig-kodende loci og inkorporeringen av tilfeldige innføringer eller fjerninger av nukleotider (Ichinohe et al. 2018).

Ved hjelp av klonal seleksjon og ekspansjon sørger det adaptive immunforsvaret for å effektivisere forsvaret ved å favorisere produksjon av B- og T-celler som binder til antigener med høy spesifisitet. Dannelsen av hukommelses B- og T-celler under infeksjon øker effektiviteten til det adaptive immunforsvaret ved en potensiell senere infeksjon av samme patogen. Det adaptive immunforsvaret hos benfisk mangler enkelte egenskaper som man ellers vet er viktige egenskaper i immunologiske prosesser hos pattedyr (Tabell 2). De egenskapene som er felles for begge er gjerne mindre utviklet hos benfisk sammenlignet med pattedyr.

**Tabell 2. Det adaptive immunforsvaret hos pattedyr og benfisk.** Sammenligning av funksjoner hos lymfocytter fra pattedyr og benfisk. AID: aktiveringsindusert deaminase, MHC: major histocompatibility complex. Grad av funksjonalitet er merket med (+). Tabell hentet fra (Sunyer 2013).

Nøkkelementer	Pattedyr	Benfisk
Affinitetsmodning	+++	+
AID	Ja	Ja
CD28, CD40, CD80, CD86, ICOS	Ja	Ja
Germinale senter og lymfeknuter	Ja	Nei
Hukommelsesrespons	+++	+
Immunoglobuliner	IgM, IgG, IgA, IgD og IgE	IgM, IgD og IgT (eller IgZ)
Isotypeskifte	Ja	Nei
MHC klasse I og II	Ja	Ja
Milt, tymus og benmarg	Ja	Ja (ikke benmarg)
Mucosa-assosierte lymfoide vev	Ja	Ja
Somatisk hypermutasjoner	+++	++
TCR, CD4, CD8	Ja	Ja
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2 og T <sub>H</sub> 17 cytokiner	Ja	Ja



### 1.4.3 Humoral og cellemediert adaptiv immunitet

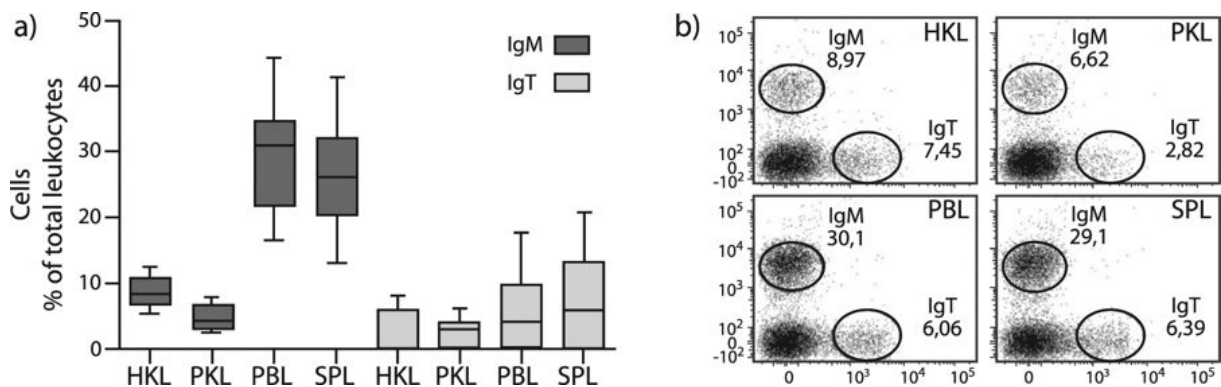
Det adaptive immunforsvaret deles inn i to funksjonelle systemer, humoral og celle-medierte immunitet som, ved hjelp av ulike celler og molekyler, bidrar til beskyttelse mot henholdsvis ekstracellulære og intracellulære mikroorganismer. Antistoff produsert av B-celler utgjør den humorale immuniteten i det adaptive immunforsvaret. Antistoffets viktigste oppgave er å forhindre at mikroorganismer får tilgang til og koloniserer vertens egne celler (Abbas et al. 2015). Hos benfisk produseres naive B-celler i hodenyren, differensierer til plasmaceller i milt og migrerer deretter tilbake til hodenyren (Bromage et al. 2004; Zapata et al. 2006). På overflaten til naive B-celler finnes membranbundne antistoffer som gjenkjenner ekstracellulære antigener og antigener på celler, og differensierer til plasmaceller som produserer store mengder frie antistoffer spesifikt mot antigenet. Frigjorte antistoffer nøytraliserer og eliminerer mikroorganismer og toksiner som befinner seg i blod, lymfoide vev og ekstracellulær væske.

Den cellemedierte immuniteten bidrar til å lokalisere og eliminere intracellulære mikroorganismer og infiserte vertsceller med hjelp fra T-celler som produseres og modnes i tymus hos fisk (Rezzani et al. 2014). T-celler deles inn i to funksjonelle typer; hjelper T-celler ( $CD4^+$ ) og cytotoksiske T-celler ( $CD8^+$ ).  $CD4^+$  celler uttrykker TCR assosiert med koreseptor CD4 og aktiverer elimineringen av fagocyterte mikroorganismer ved binding til antigen presentert av MHC klasse II molekyler på APCs overflate som deretter trigger utskillelsen av cytokiner. Makrofager, dendritiske- og B-celler er slike APCs (Lewis et al. 2014). Utskillelsen av cytokiner er effektormekanismen til  $CD4^+$  og er viktig for at B-celler skal skille ut antistoffer.

$CD8^+$  celler uttrykker TCR assosiert med koreseptor CD8 og dreper infiserte vertsceller ved binding til MHC klasse I molekyler uttrykt på overflaten til APCs. Mens B-celler har evnen til å gjenkjenne en bred variasjon av overflatemolekyler, deriblant proteiner, karbohydrater, nukleinsyrer og lipider, kan T-celler kun gjenkjenne proteinbaserte antigener (Abbas et al. 2015). Cellemediert immunitet hos benfisk er fortsatt lite studert som delvis skyldes mangelen på leukocytmarkører for T-celler hos fisk (Dahle et al. 2019). Gener som koder for TCR, CD3, CD4 og CD8, i tillegg til gen markører for APCs som for eksempel MHC I og II, er allerede identifisert hos fisk (Ashfaq et al. 2019).

### 1.4.5 Immunoglobuliner hos benfisk

Immunoglobuliner (Ig), også kjent som antistoff, er heteromeriske glykoproteiner som har en viktig rolle i humoral immunitet hos de fleste virveldyr (Guselnikov et al. 2018). Tre isotyper av immunoglobulin er identifisert hos benfisk; IgM, IgD og IgT (IgZ hos zebrafisk). Klassifiseringen av IgM, IgD og IgT isotypene er definert som følge av deres respektive tungkjedemolekyler  $\mu$ ,  $\delta$  og  $\tau$ . Alle tre isotypene er også identifisert hos atlantisk laks. Hver Ig består av to identiske tungkjeder og to identiske lettkjeder (Hordvik 2015). Det mest systemisk utbredte immunoglobulinet hos laksefisk er IgM som produseres hovedsakelig av plasmaceller og plasmablaster i hodenyre (Zwollo et al. 2005). IgD er vanligvis ko-uttrykt på overflaten til IgM<sup>+</sup> B-celler men både single positive IgM<sup>+</sup> og IgD<sup>+</sup> B-celler eksisterer hos benfisk, mens single IgT<sup>+</sup> B-celler tilhører en separat B-cellelinje som er viktig for mukosal immunitet (Penaranda et al. 2019). Hvilke B-cellepopulasjoner og/eller linjer som er viktige for beskyttelsen mot infeksjoner og immunitet etter vaksinasjon av beinfisk er fortsatt ikke godt nok kartlagt (Edholm et al. 2010; Zhang et al. 2010; Penaranda et al. 2019). Distribusjonen av IgM<sup>+</sup> og IgT<sup>+</sup> B-celler i systemiske organer ble nylig kartlagt (Figur 5) og viser blant annet at IgM er den mest utbredte Ig isotypen i systemiske organer hos laks (Jenberie et al. 2018).



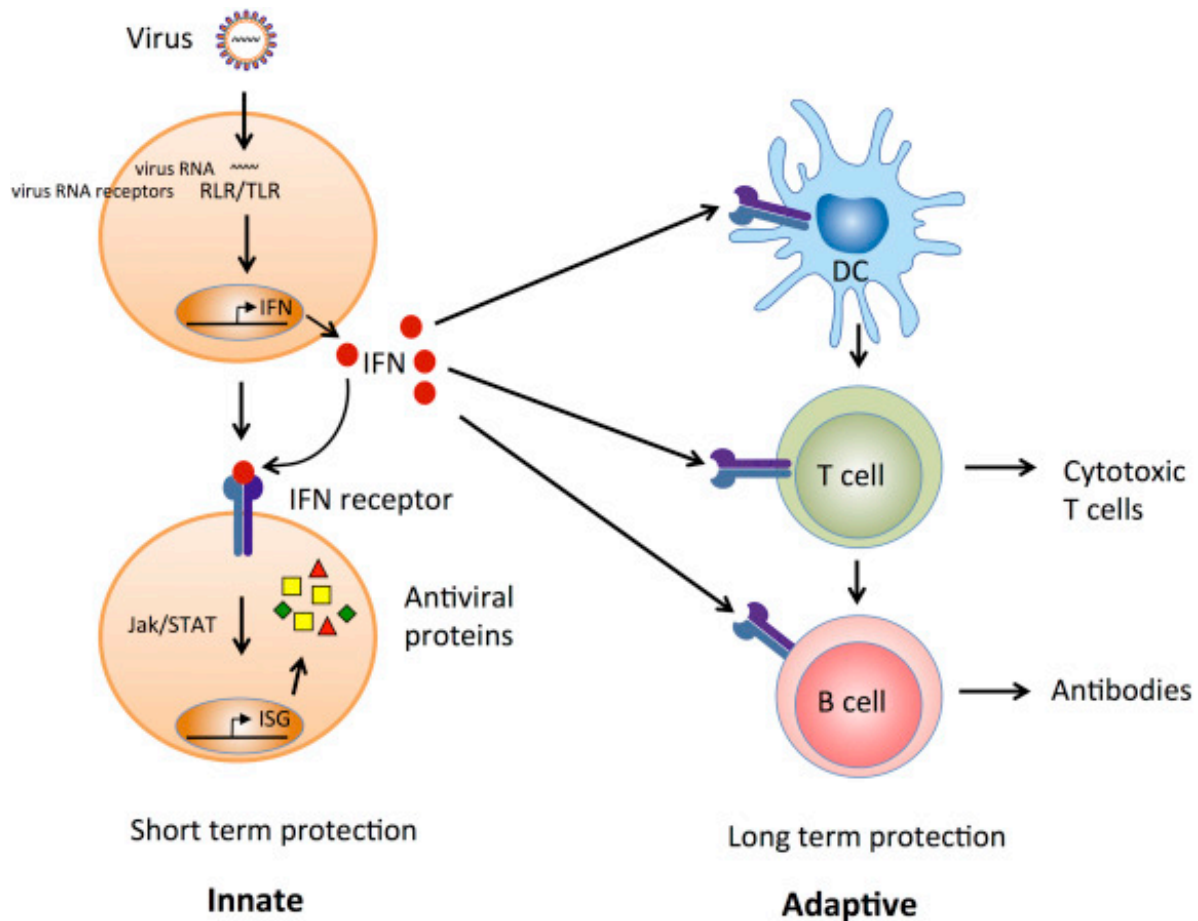
**Figur 5. Distribusjon av IgM og IgT B-lymfocytter i systemiske organer hos atlantisk laks.** IgM er den mest utbredte Ig isotypen blant B-lymfocyttopulasjonen i systemiske organer. Leukocytter fra hodenyre (HKL), baknyre (PKL), perifert blod (PBL) og milt (SPL) ble farget med ørret anti-IgM og IgT mAbs (monoklonalt antistoff) og analysert ved Flow-cytometri. **(a)** Median-frekvenser av IgM<sup>+</sup> og IgT<sup>+</sup> B-lymfocytter av totalt antall leukocytter og **(b)** representativ Flow-cytometri prikk-plottning som viser prosentandelen IgM og IgT i systemiske organer (Jenberie et al. 2018).

### 1.5 Interferoner

Cytokiner innbefatter en stor gruppe cellesignaliserende ekstracellulære polypeptider og glykoproteiner produsert av ulike immunologiske celler. Det finnes flere ulike typer cytokiner inkludert kjemokiner, IFNer, interleukiner (IL), lymfokiner og tumor nekrosis faktor (TNF) som regulerer både medfødt og adaptivt immunforsvar (Ferreira et al. 2018). Interferoner ble først identifisert hos pattedyr som proteiner med antivirale egenskaper (Isaacs et al. 1957), men de har også andre viktige regulatoriske funksjoner i både det medfødte og adaptive immunforsvaret (Stark et al. 1998; Sun et al. 2011). Det er isolert tre typer interferoner fra pattedyr: type I IFN (IFN-I), type II IFN (IFN-II) og type III IFN (IFN-III). Mens IFN-I og IFN-III primært spiller en viktig rolle i medfødt immunitet og skiller ut ved gjenkjenning av virale nukleinsyrer (Figur 6) lokalisert på infiserte vertsceller, produseres IFN-II, også kalt IFN-gamma, av T-celler og er spesielt viktig i den adaptive immuniteten mot intracellulære patogener. Både IFN-I og IFN-II er beskrevet hos benfisk, men IFN-III er ennå ikke funnet i denne gruppen (Zou et al. 2011; Robertsen 2018). IFN-I er en viktig del av den medfødte immuniteten, men den spiller også en viktig rolle i adaptiv immunitet da den induserer både antiviral aktivitet og stimulering av T-celler, B-celler og dendrittske celler (Le Bon et al. 2001; Longhi et al. 2009; Robertsen 2018).

#### 1.5.1 Type I interferoner hos benfisk

IFNa1 hos atlantisk laks er blant en av de første IFN-I som ble identifisert hos fisk. Det er isolert fire subtyper med tilhørende gener av IFN-I fra laks; IFNa1-3, IFNb1-4, IFNc1-5, IFNd, i tillegg til IFNe og IFNf som også er isolert hos regnbueørret (Sun et al. 2009; Zou et al. 2014). Store deler av IFN-I systemet hos atlantisk laks har blitt karakterisert over de siste 20 årene. I likhet med type I IFN hos pattedyr, har IFN I hos fisk antiviral aktivitet, blant annet hemmer IFN-I hos laks replikasjon av infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV), infeksjøs lakseanemi virus (ILAV) og SAV. Mens IFN-I bidrar til en kortvarig beskyttelse mot virus under naturlige forhold, har man sett en langvarig systemisk beskyttelse (opp til 10 uker) mot ILAV og SAV ved injeksjon av plasmider som uttrykker for IFN-I i laks (Chang et al. 2014; Robertsen 2018).



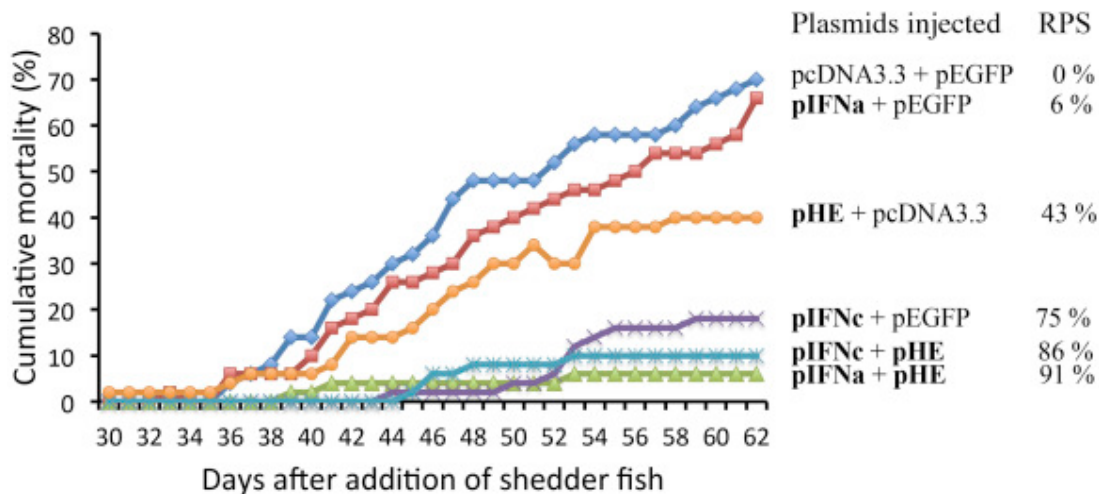
**Figur 6. Oversikt over rollen til type I IFN (IFN-I) i det medfødte og adaptive immunforsvaret.** Under en virusinfeksjon vil vertsceller gjenkjenne viralt RNA ved binding til cytoplasmiske (RLR) eller endosomale reseptorer (TLR) og frigjøre IFN-I. Frigjort IFN-I fører til 1) transkripsjon av IFN-induserte gener (ISG), f.eks. antivirale proteiner, ved binding til vertscelle-assosierte IFN-I reseptorer og 2) stimulering av det adaptive immunforsvaret gjennom B-, T- og dendrittiske celler. RLR innbefatter både RIG-I og MDA5, mens TLR innbefatter TLR3, TLR7 og TLR22 (Robertsen 2018).

**Tabell 3.** Funksjonelle egenskaper til IFNa, IFNb, IFNc og IFNd (Robertsen 2018). ISG=IFN-induserte gener, poly I:C=polyinosin:polycytidylisk syre, R848=TLR-7 og -8 agonist.

	IFNa	IFNb	IFNc	IFNd
Antiviral aktivitet i celledinjer	+++	+	+++	-
Antiviral aktivitet <i>in vivo</i>	+	++	+++	-
Systemisk induksjon av ISGs	-	++	+++	-
Induksjon av poly I:C i celledinjer	+++	-	-	-
Induksjon av poly I:C <i>in vivo</i>	+++	-	+++	-
Induksjon av R848 i celledinjer	-	-	-	-
Induksjon av R848 <i>in vivo</i>	-	++	++	-

## Innledning

Hos atlantisk laks er IFN $\alpha$ 1 og IFN $\alpha$ 2 de primære interferonene induisert gjennom RIG-I/MDA5 reseptorene, mens IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  er de primære interferonene induisert gjennom TLR7 reseptoren (Figur 6) (Robertsen 2018). De kjente funksjonelle egenskapene til IFN-I hos laks er vist i Tabell 3. Funksjonen til IFN $\delta$  hos laks er fortsatt ukjent, men den ser ut til å mangle antiviral aktivitet (Chang et al. 2009). IFN-I hos fisk har vist seg å fungere som adjuvans ved bruk av en DNA-vaksinemodell der atlantisk laks ble immunisert ved injeksjon av plasmider som uttrykker for ILAV hemagglutininesterase (HE) som antigen sammen med plasmider som uttrykker for IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  eller IFN $\gamma$  (Chang et al. 2015). To av IFN-I plasmidene som ble injisert sammen med HE plasmid gav en forsterket beskyttelse mot ILAV infeksjon og dermed en høyere relativ overlevelsesprosent (Figur 7).



**Figur 7. Beskyttelse av atlantisk laks mot ILAV infeksjon ved DNA-vaksinering med plasmider som uttrykker for IFN $\alpha$  (pIFNa) eller IFN $\gamma$  (pIFNc) som adjuvans.** Figuren illustrerer utvikling av kumulativ dødelighet etter at fisken injiseres med henholdsvis 15  $\mu$ l pIFN og pHE, og deretter smittes fisken av sheddere. pcDNA3.3 er plasmidkontroll for IFN-plasmidene, mens pEGFP er en plasmidkontroll for HE plasmidet. RPS=relativ overlevelsesprosent (Robertsen 2018).

Mekanismene bak IFN-I plasmider som adjuvans hos atlantisk laks er foreløpig bare delvis kartlagt. RT-qPCR studier av muskelvev viste tegn til at injeksjon av IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  plasmider førte til økt influx av IgM og IgT B-lymfocytter, samt cytotoksiske T-celler, til injeksjonsstedet. Dermed kan IFN-I hos fisk både induere utskillelse av antivirale proteiner og stimulere humorale adaptive immunresponser (Chang et al. 2015). Nyere studier viser at im injisering av plasmider som koder for det strukturelle SAV-polypeptidet fører til en oppregulering av IFN-I stimulerte gener hos laks (Sobhkezh et al. 2018). DNA-vaksiner ko-injisert med IFN-I som adjuvans har også vist å gi en betydelig reduksjon i dødelighet og antall utbrudd av ILA hos laks (Robertsen 2018).

### 1.6 Problemstilling

Mangelen på gode kommersielle vaksiner mot virussykdommer utgjør et av oppdrettsnæringens største problemer i dag. Samtidig er det humorale immunforsvaret hos fisk omfattende og mangelen på leukocytmarkører gjør det vanskelig å studere cellene som deltar i fiskens humorale immunforsvar. Det er også begrenset kunnskap på hvordan det humorale immunforsvaret responderer på en virusinfeksjon hos fisk, og spesifikt hvilke immunceller som deltar i stimuleringen av antivirale prosesser. Nye studier viser at IgM ASC finnes i store mengder i ulike vev hos laks og at slike celler er viktige i responsen mot bakterier og virus ved ip smitte. Andre studier har klart å stimulere både humorale og antivirale responser hos fisk ved injeksjon av plasmider som koder for strukturelle virus-polyproteiner eller plasmider som koder for IFN-I. Formålet med dette studiet var å sammenligne B-celle responser i bukhole og systemiske organer hos laks etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV, i tillegg til å undersøke om IFN-I kan påvirke antistoffproduksjonen hos naive lakseleukocytter i cellekultur.

#### **Delmål 1:**

Måle antall leukocytter, frekvens av og totalt antall IgM ASC i bukhole, hodenyre, baknyre og milt ved ulike tidspunkt etter ip injeksjon av inaktivert SAV3 og ip smitte av levende SAV3 hos atlantisk laks.

#### **Delmål 2:**

Måle SAV E2-spesifikk antistoffrespons ved ulike tidspunkt etter ip injeksjon av inaktivert SAV3 og ip smitte av levende SAV3 hos atlantisk laks.

#### **Delmål 3:**

Verifisere SAV-infeksjonen ved å måle virustranskripter (nsP1) ved RT-qPCR i hjerte etter ip SAV3 smitte hos atlantisk laks.

#### **Delmål 4:**

Undersøke om type I interferoner påvirker antistoffproduksjon hos kultiverte lakseleukocytter.

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Forsøksfisk og organuttak

#### 2.1.1 Virus – levende, inaktivert og rekombinant E2 protein

Salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3) (PDV-H10-P3A) mottok vi fra professor Øystein Evensen (Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet). Virusisolatet ble opprinnelig isolert fra hjerte til atlantisk laks med kliniske tegn til PD og identifisert som SAV3 etter sekvensering (Xu et al. 2010; Xu et al. 2012). Viruset ble dyrket og titrert i CHH-1 celler fra normalt hjertevev hos ketalaks (*Oncorhynchus keta* W.) med Leibovitz's L-15 medium (L-15) (Gibco® Life Technologies) tilsatt 10 µl/ml streptomycin (Gibco® Life Technologies) og 10 U/ml penicillin, kalt L-15<sup>+</sup>, og 5% fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG) ved 15°C. Før bruk ble FBS-utgangsløsningen varmebehandlet ved 58°C i 30 minutter i vannbad og filtrert gjennom et 45 µm filter (Falcon), videre kalt FBS<sup>Inaktivert</sup> (FBS<sup>I</sup>).

Virustiter ble målt med TCID<sub>50</sub> metoden, der et monoklonalt mus anti-SAV E2 antistoff (Moriette et al. 2005) gitt av Dr. Bremont v/French National Institute for Agricultural Research, ble brukt til å kvantitere SAV-positive celler (Thim et al. 2012). Dyrkning og kvantitering av SAV ble utført av overingeniør Guro Strandskog v/Norges Fiskerihøgskole. Inaktivert SAV1-virus ( $4,9 \times 10^9$ ) ble gitt i gave fra MSD Animal Health. Det inaktiverte viruset ble dyrket i CHSE celler (0,3 mg/ml). Rekombinant SAV E2 protein ble produsert i *E. coli* (*Escherichia coli*) av Dr. Hastie v/University of Dundee.

### 2.1.2 Forsøksfisk

All forsøksfisk ble levert av Havbruksstasjonen i Tromsø (Kårvika). Smitteforsøket med SAV ble utført på fiskehelselaben ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Fisken var av art *Salmo salar* L. (QTL-innOva SHIELD), atlantisk laks, og rogn ble produsert av AquaGen A/S. Fisken stod på 24 timer mørke per døgn før startfôring og 24 timer lys per døgn etter påbegynt startfôring. I løpet av produksjonsperioden ble fisken føret med Nutura Olympic (Skretting), i henhold til fôringsregimer gitt fra produsent, og oppbevart i kar med en gjennomsnittlig vanntemperatur på 10°C fra forsøksstart til slutt.

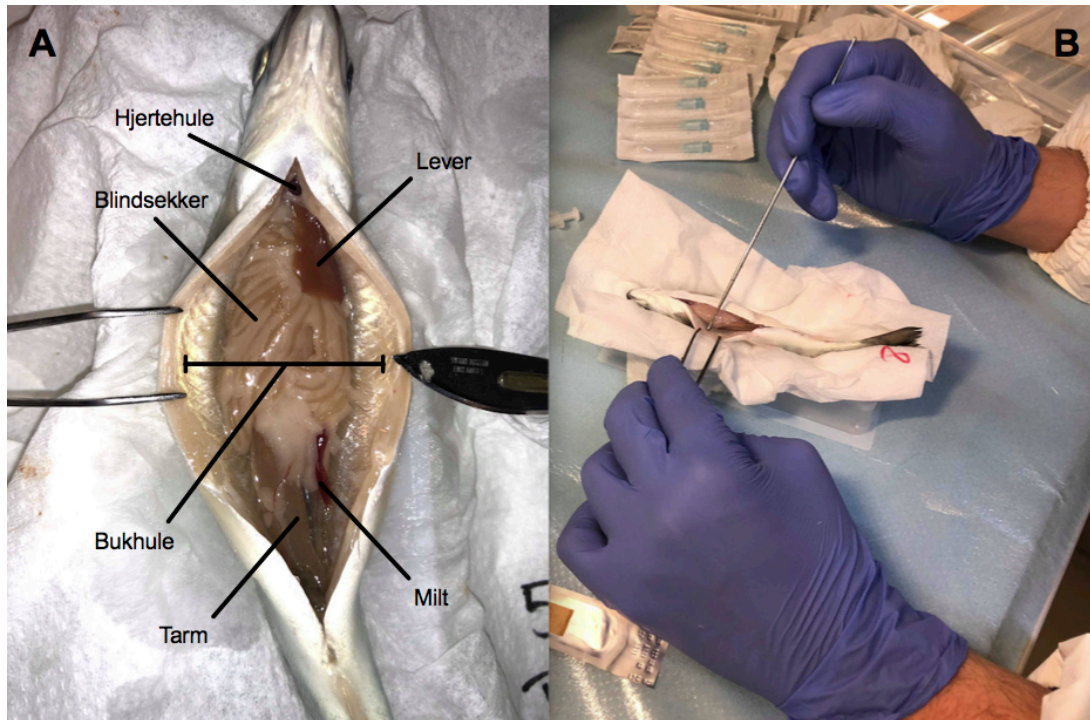
Fisk brukt til *in vivo* eksperimenter stod på saltvann gjennom hele forsøksperioden. Fisken ble overført fra ferskvann til saltvann fire dager før uttakene begynte. Ved første uttak (dag 0) stod fisken på 10°C og hadde en gjennomsnittsvekt på 37 gram. Tidspunkt for smoltifisering og gjennomsnittlig salinitet utover i forsøket ble ikke bestemt. Fisk brukt til *in vitro* celleforsøk stod på ferskvann ved 10°C gjennom hele forsøksperioden. Ved de to organuttakene hadde fisken en gjennomsnittlig vekt på henholdsvis 250 og 1500 gram.

### 2.1.3 Organuttak

Fisken ble avlivet med en overdose benzokain, 10 ml benzokain per 10 liter vann, og gitt et par slag mot hodet videre veid og plassert på et nummerert underlag over et reservoar. Blodet ble tappet ved hjelp av en 1ml sprøyte injisert rett bak gattfinnen og deretter overført til nummererte Eppendorf-rør. Med en steril skalpell ble buken åpnet og cellene vasket ut i tre omganger med 3 x 1 ml vaskebuffer tilsatt bukhulen. Ved å forsiktig gni på bukveggen og rundt i organpakken med en stålstang løsnet cellene slik at de kunne tas ut med en pipette. Bukcellene ble så overført til 15 ml rør med 2 ml transport-medium (2% FBS<sup>1</sup> i L-15 tilsatt 20U/ml heparin) på is. Videre ble det tatt ut milt, hodenyre og baknyre med steril skalpell og vevene ble oppbevart på 15 ml rør med tilsatt 2 ml transportmedium. Hjerte og pankreas ble også tatt ut, overført til RNAlater og oppbevart på -20°C til RT-qPCR analyse. Celler fra bukhole, hodenyre, baknyre og milt ble prosessert videre for isolering av leukocytter. Blod ble sentrifugert ved 240 g i 10 minutter, plasma overført til PCR-rør og lagret på -80°C til ELISA analyse.

Figur 8 viser hvordan organuttakene ble utført på fiskehelselaben ved Havbruksstasjonen i Kårvika. En oversikt over analyser, uttakstidspunkt, antall fisk og organer for forsøk gjort *in vivo* og *in vitro* finner man i henholdsvis Tabell 4 og 5.





**Figur 8. Uttak av organer fra atlantisk laks.** (A) Bildet viser organplasseringer i fiskens bukhole (som også er markert). Fisken på bildet hadde en vekt på 62 gram (uke 10). (B) Med en stålstang ble bukcellene frigjort ved å tilsette vaskebuffer og ved å forsiktig gni bukveggen og organene som lå i bukholen. Fisken på bildet hadde en vekt på 34 gram (uke 3)

**Tabell 4.** Oppsummering av organuttak for *in-vivo* eksperiment. CTRL = kontroll, IN = inaktivert SAV3, SAV = levende SAV, PER= bukhole, HN = hodenyre, BN = baknyre, MI = milt, HJ = hjerte, SE = serum.

Analyse	Antall individer (CTRL/IN/SAV)	Organer	Uttakstidspunkt (uke)	Undersøkelse
Antall IgM-sekretierende celler (IgM ASC)	5 / 0 / 0	HN, BN, MI, PER	En uke før forsøksstart	<b>ELISpot</b>
SAV-E2 spesifikk antistoffrespons	8 / 8 / 8	SE	0, 3, 6, 10	<b>ELISA</b>
SAV nsP1-uttrykk	6-8 / 6-8 / 5-8	HJ	0, 3, 6, 10	<b>RT-qPCR</b>
Totalt antall leukocytter og IgM ASC i vev	4-5 / 4-5 / 4-5	HN, BN, MI, PER	0, 3, 6, 10	<b>ELISpot</b>
Kloridnivå i serum	8 / 8 / 8	SE	0, 3, 6, 10	<b>Kloridmåling</b>
SAV-E2 spesifikk antistoffrespons etter uke 6 boost*	6 / 6 / 0	HN, BN, MI, PER, SE	10	<b>ELISA</b>

\*I uke 6 ble 24 fisk fra CTRL og 24 fisk fra IN injisert med 200 µl inaktivert SAV.

**Tabell 5.** Oppsummering av organuttak for in-vitro eksperiment. HN = hodenyre, MI = milt.

Eksperiment	Antall fisk	Celler fra	Stimulering	Inkubering	Undersøkelse
Interferon-stimulering av IgM-sekretierende celler (IgM ASC)	8	HN, MI	IFN $\alpha$ 1 og LPS	48 timer (+ 48 timer)	<b>ELISpot</b>
Interferon-stimulering av IgM ASC	4	HN	LPS, Poly I:C, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ og IFN $\gamma$	5 og 11 dager (+ 48 timer)	<b>ELISpot</b>

## 2.2 Isolering og telling av leukocytter fra atlantisk laks

Isoleringen av leukocytter fra hodenyre, baknyre og milt ble gjennomført som beskrevet etter Jørgensen et. al. (Jørgensen et al. 2001). Perkoll-gradienter (GE Healthcare) brukes til å separere celle-, protein- og viruspartikler etter spesifikk tetthet. Perkoll består av kolloidale silica partikler som danner diskontinuerlige tetthetsgradienter når ulike konsentrasjoner tilsettes samme rør. Det ble brukt 25% og 54% perkoll-gradienter for å separere og isolere leukocytter. Leukocytene vil under sentrifugering akkumulere i sjiktet mellom de to tetthetene og kan enkelt både observeres og ekstraheres. Cellekonsentrasjonen ble bestemt ved å bruke NucleoCounter™ NC-100 (ChemoMetec). Instrumentet detekterer signaler fra propidium-jodid-bundet DNA og gjør det mulig å bestemme den totale cellekonsentrasjonen basert på mengden DNA i prøven (ChemoMetec 2015).

### 2.2.1 Isolering av leukocytter fra hodenyre, baknyre, milt og bukhule

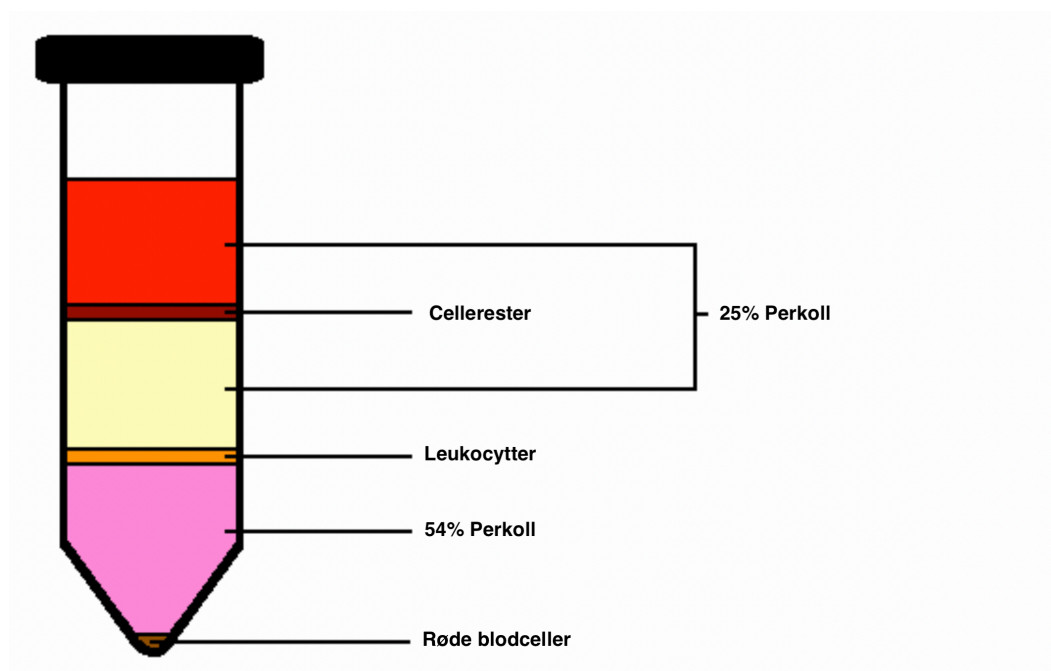
Isolering av leukocytene ble utført på en sterilbenk for å unngå kontaminering av prøvene. Baknyre, hodenyre og milt ble overført til en 100  $\mu$ M cellestrainer (Falcon) og homogenisert ved å gni organene med et sprøytetempel. Transportmediet - tilsatt 100 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin og penicillin, 2% FBS<sup>1</sup> (Gibco®) og 20 U/ml heparin (Leo Pharma®) - som organene var lagret på under uttak ble brukt til å vaske cellene gjennom cellestraineren ned i et 50ml rør. Tillagingen av transportmediet og Perkoll er vist i Tabell 6. Cellene fra bukhule trengte ikke å homogeniseres og ble overført direkte til perkollgradient. Cellene ble deretter overført til sine respektive gradienter og videre spunnet i en Multifuge 1S-R sentrifuge (Heraeus®) ved 400 x g på 4°C i 40 minutter. På grunn av ulik tetthet befinner leukocytene seg etter sentrifugering mellom 25% og 54% sjiktene av perkoll (Figur 9).

## Materiale og metode

Cellebåndet med leukocytterne ble overført til nye rør hvor de så ble resuspendert i L-15 til et totalt volum på 12 ml og sentrifugert ved 400 g på 4°C i 10 minutter. Cellepellet ble resuspendert i ulike L-15 volum med hensyn på type organ. Celler fra hodenyre ble resuspendert i 5 ml, fra baknyre og milt i 1,5 ml og bukcellene i 750 µl. Ulik mengde leukocytter i de ulike vevene ligger til grunn for at ulike volum ble brukt. Av erfaring vet man at hodenyre inneholder flere leukocytter enn baknyre og milt.

**Tabell 6.** Oversikt over komponenter brukt til å lage 100 ml løsning transportmedium og Perkoll.

Løsning	Komponenter
L-15 med FBS <sup>1</sup> og heparin (Transportmedium)	98 ml L-15 (tilsatt streptomycin og penicillin) 2 ml FBS <sup>1</sup> 0,4 ml heparin
90% Perkoll	90 ml Perkoll-utgangsløsning 10 ml (3 ml 5M NaCl + 7 ml ultra pure H <sub>2</sub> O) 0,4 ml heparin
54% Perkoll	59 ml 90% Perkoll 41 ml L-15 m/ FBS <sup>1</sup> og heparin
25% Perkoll	28 ml 90% Perkoll 72 ml PBS 0,288 ml heparin



**Figur 9.** Illustrasjon av Perkoll-gradient med de ulike lagene etter sentrifugering.

### **2.2.2 Telling av isolerte celler**

Fra de resuspenderte bukcellene ble 15 µl overført til et Burkemeierkammer og deretter talt manuelt i mikroskop. Cellene fra hodenyre, baknyre og milt ble talt i NucleoCounter™. Passende fortytning av celleduspensjonene ble overført til Eppendorf-rør med 100µl Cell counting stabiliseringsbuffer (buffer A) og deretter tilsatt 100 µl Cell counting lyseringsbuffer (buffer B). Suspensjonen ble så sugd opp i en NucleoCassette™ og videre plassert inn i maskinen NucleoCounter™ NC-100 for telling. Tallet produsert av maskinen ble deretter brukt til å beregne fram det totale antallet leukocytter.

## **2.3 *In vivo* SAV3 eksperiment**

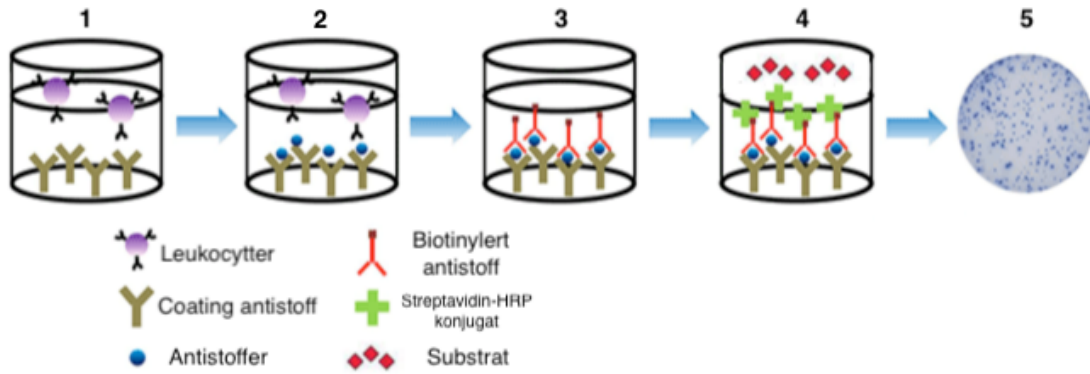
### **2.3.1 Injeksjon av levende og inaktivert SAV virus**

Før forsøksstart ble 195 fisk fordelt på to ulike rom ved Fiskehelselaboratoriet (FHL). Fisk som skulle brukes som kontrollgruppe og fisk som skulle injiseres med inaktivert SAV ble oppbevart i samme tank på lageret, mens fisk som skulle smittes med levende SAV3 ble oppbevart i en tank på smittecelle. Ved forsøksstart ble 84 fisk ip injisert med 200 µl PBS, 81 fisk injisert ip med 200 µl  $4,9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> inaktivert SAV1 og 30 fisk injisert ip med 200 µl  $1,0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> levende SAV3. For å skille kontrollfisk og inSAV-fisk fra hverandre ble inSAV fisken merket med blå tatovering på buken. All fisk ble holdt på 24 timers lys per døgn ved 10°C. Fisken på begge avdelingene ble sultet minimum en dag før hvert uttak. Forsøket var godkjent av Forsøksdyrutvalget i Norge.

### **2.3.2 Kvantifisering av IgM-sekreterende B-lymfocytter ved ELISpot analyse**

Enzym-linket immunosorbent spot (ELISpot) er en kvantitativ metode brukt til å undersøke immuncelleresponser hos mennesker og dyr. Metoden ble først beskrevet i 1983 ved inkubering av miltceller fra immunisert mus på en antigen-tildekket plate og deretter brukt til å undersøke forekomsten av ASC. Disse ble påvist i form av sirkulære soner på platen (Czerkinsky et al. 1983). ELISpot-assayet for B-celler fra laks kan brukes til å estimere total IgM ASC i ulike vev (Figur 10). ELISpot for påvisning og kvantifisering av celler som sekreterer spesifikke antistoffer rettet mot SAV er under etablering, men er ikke en del av denne oppgaven.

## Materiale og metode



**Figur 10. Prinsippet bak B-celle ELISpot metoden.** (1) Membranen tildekket med antistoff som binder lakse-IgM før leukocyttar tilsettes. (2) IgM som produseres og skilles ut av B-cellene (ASC), binder til anti-IgM på membranen. (3) Cellene vaskes bort før et biotinylert antistoff spesifikt for IgM binder seg til IgM-antistoff komplekset på membranen. (4) Ubundet antistoff vaskes bort før Streptavidin-HRP konjugat (enzym) tilsettes og binder seg til biotin. TMB-substrat tilsettes og binder seg til komplekset. Enzymet initierer en reaksjon der det blir fargeendring. (5) Fargereaksjonen gir synlige prikker på membranen hvor hver prikk representerer en ASC. Figur hentet fra (ThermoFisher 2019).

ELISpot-assayet ble i denne oppgaven brukt for å måle antallet IgM-produserende celler fra ulike vev hos atlantisk laks. En MSIPS4510 plate (Merck Millipore) med immobilon-PDVF membran ble preparert i forkant av isolering og telling ved å tilsette 15 µl 35% etanol (99,8% etanol (Sigma-Aldrich) fortynnet i ultra pure (UP) H<sub>2</sub>O) til hver brønn og inkuberte i maks 1 minutt (minimum 5 sekund). Platen ble tømt for etanol, vasket 2x med 200 µl sterilt UP H<sub>2</sub>O (Biochrom AG) etterfulgt av 2x med 200 µl steril phosphate-buffered saline (PBS). Til slutt ble membranen tildekket med 100 µl rensed antistoff (mus anti-ørret IgM/ F1-18) (Hedfors et al. 2012) fortynnet i PBS til en konsentrasjon på 1,0 µg/ brønn og inkubert ved 4°C over natt. Etter inkubering ble platen tømt og vasket 4x med 200 µl PBS (den første vasken stod i 5 minutter). Deretter ble 100 µl L-15<sup>+</sup> tilsatt 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) tilført platen for å blokkere uspesifikk binding og inkubert i 1,5 time ved romtemperatur.

## Materiale og metode

**Tabell 7. Antall leukocytter fra bukhole (PER), hodenyre (HN), baknyre (BN) og milt (MI) fra både usmittet og smittet gruppe ved ulike uttakstidspunkt, sådd ut per brønn til en 96-brønners ELISpot-plate.** Ved dag 0 ble det sådd ut leukocytter fra naiv laks. For alle vev mellom uke 3-10 ble det sådd ut like mengder leukocytter fra kontrollgruppe (injisert med PBS), inSAV-gruppe (injisert med inaktivert SAV) og wtSAV-gruppe (injisert med wild-type SAV3). Ved uttakspunktene der det ikke ble sådd ut 25.000 celler ble det multiplisert opp henholdsvis 4 (6250) og 2 (12500) til 25.000, og i resultatdelen stilt opp som antall IgM ASC per 25.000 leukocytter.

Vev:	Dag 0		Uke 3		Uke 6		Uke 10
PER	6250	12.500	12.500	25.000	6250	12.500	25.000
HN	6250	12.500	12.500	25.000	6250	12.500	
BN	6250	12.500	12.500	25.000	6250	12.500	
MI	6250	12.500	12.500	25.000	6250	12.500	

Isolerte leukocytter ble så fortynnet i L-15<sup>+</sup> (tilsatt 5% FBS<sup>1</sup>) og 100 µl tilsatt hver brønn i duplikater, og inkubert i 48 timer ved 14°C. Tabell 7 viser hvilke cellekonsentrasjoner som ble sådd ut på platen ved de ulike uttakene. Det ble etablert en negativ kontroll med alle reagenser uten celler og en negativ kontroll med celler uten biotinyleret antistoff, for hver ELISpot analyse.

Etter inkubering i 48 timer ble platen tømt og vasket 5x med 200 µl PBS tilsatt 0,1% Tween 20 for å fjerne restceller og ubundet IgM. Den første vasken stod i 10 minutter, mens de fire påfølgende vaskene stod i 2 minutter hver. Biotinyleret antistoff (mus anti-ørret IgM/F1-18, EZ-Link NHS-PEG Solid Phase Biotinylation kit, Thermo Scientific) ble fortynnet i PBS tilsatt 1% BSA og 0,1% Tween 20, deretter tilsatt platen (100 µl/brønn) i en konsentrasjon på 1,5 µg/ml PBS og inkubert i 1,5 time i romtemperatur. Platen ble tømt og vasket 4x med 200 µl PBS 0,1% Tween 20 i 2 minutter hver runde. Streptavidin-HRP konjugat (Mabtech) ble deretter fortynnet 1:500 i PBS og 100 µl tilsatt hver brønn, deretter inkubert i 1 time ved romtemperatur. Platen ble tømt og vasket 4x med 200 µl PBS 0,1% Tween 20 i 2 minutter hver runde og sluttvis tilsatt 100 µl tetramethylbenzidine (TMB) substrat (Mabtech), filtrert gjennom et 0,45 µm filter (Falcon), per brønn. Platen ble inkubert i mørke i 10 minutter for å utvikle farge. Etter inkubering ble platen forsiktig vasket grundig i springvann, plastforseglingen på undersiden fjernet og platen plassert i et mørkt kjøleskap ved 4°C over natt.

Platen ble scannet digitalt av analysemaskinen ImmunoSpot. Antall prikker på membranen ble automatisk kalkulert av dataprogrammet Cellular Technology Limited (CTL). Det totale antallet IgM ASC per organ ble beregnet utfra det totale antallet leukocytter per vev og frekvensen av IgM ASC per 25.000 leukocytter. Det totale antallet IgM ASC i hvert organ over forsøksperioden er presentert i appendix.

### 2.3.3 Påvisning av SAV spesifikk antistoffrespons ved ELISA

Enzym-linket immunosorbent assay (ELISA) er en teknikk for å detektere mengden substanser, ofte proteiner eller antistoffer, i en prøve. Metoden ble først beskrevet, i sin helhet, i 1978 etter en suksessfull detektering av antistoff mot blodparasitter i husdyr og mus (Weiland 1978). I denne oppgaven ble metoden brukt til å påvise E2-spesifikke antistoffresponser i serum fra atlantisk laks. Jo høyere konsentrasjon av det primære antistoffet, desto sterkere fargeendring (Figur 11).

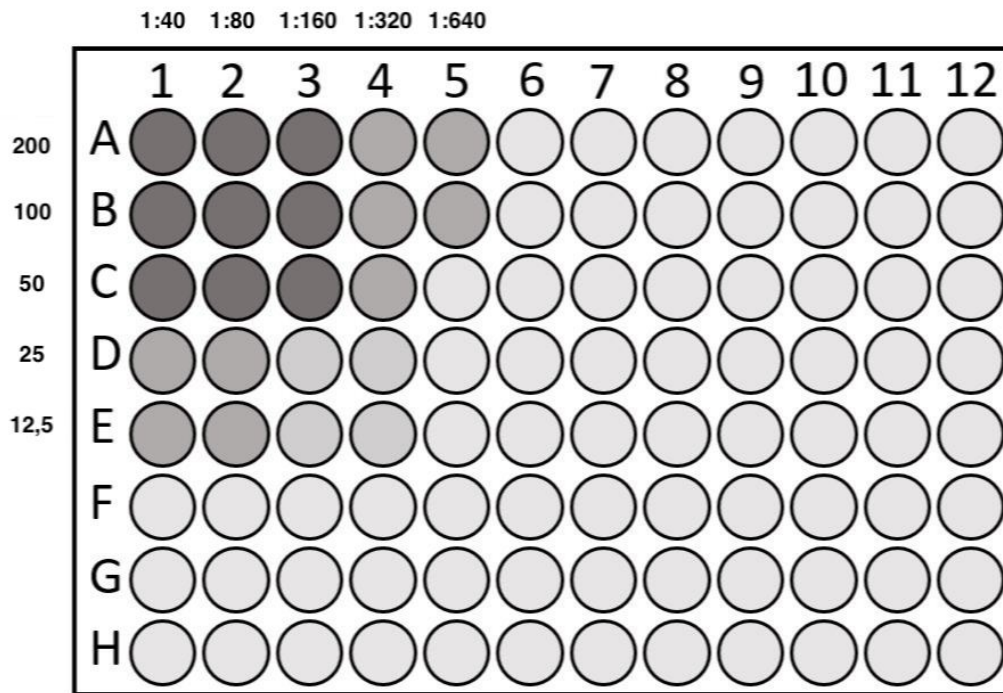


**Figur 11. Prinsippet bak ELISA metoden.** Platens brønner blir tildekket med et målprotein (rekombinant E2-protein) og inkubert ved 4°C over natt. Ubundede proteiner fjernes ved vasking og tilsettes deretter fortynnet serum fra laks som inneholder antistoffer spesifikt for målproteinet (E2-protein), i figuren kalt primært antistoff, og inkuberes ved 4°C over natt. Videre vaskes brønnene og tilsettes henholdsvis fortynnet anti-ørret IgM, enzym og substrat som videre fører til en enzymatisk reaksjon og sluttvis fargeendring som kan måles spektrofotometrisk (MBL 2019).

Blodet ble tappet fra laksens kaudale blodåre, overført til 1 ml Eppendorf-rør og lagret på 4°C over natt. Blodet ble så spunnet ned på 240 g i 10 minutter og serumet lagret ved -80°C. Før gjennomføring av hovedforsøket ble assayet optimalisert for korrekt konsentrasjon av coating-antigen og serumfortynning. En checkerboard-fortynning kan brukes til å bestemme to variabler, i dette tilfellet rensed coating-antigen (rekombinant E2-protein fra SAV) og E2-positivt serum fra SAV3-smittet laks fra et tidligere forsøk, samtidig. Ved å tilsette ulikt forhold mellom coating-antigen og serum, til hver brønn kan man bestemme både optimal konsentrasjon for hver substans og det optimale forholdet mellom disse.

## Materiale og metode

Figur 12 viser oppsettet for optimaliseringen i en 96-brønners MaxiSorp-plate (Thermo Fischer). Til A1-5 ble det tilsatt 200  $\mu\text{l}$  coating-antigen med konsentrasjon på 200 ng/100  $\mu\text{l}$  karbonat-coating buffer. En fortyningsserie for antigenet ble gjort ved å overføre 100  $\mu\text{l}$  fra rad A til B med en multipipette etterfulgt av grundig miksing. Dette ble gjentatt med rad C, D og E. Deretter ble platen inkubert ved 4°C over natt. Til 1A-E ble det deretter tilsatt 200  $\mu\text{l}$  serum fortynnet til 1:40 i protein-fri blokkeringsbuffer (PFBB) (Thermo Scientific). En fortyningsserie for serumet ble gjort ved å overføre 100  $\mu\text{l}$  fra kolonne 1 til 2 med en multipipette etterfulgt av grundig miksing. Dette ble gjentatt for kolonne 3, 4 og 5. Optimal konsentrasjon for coating-antigen og serumfortynning ble satt til henholdsvis 200 ng/100  $\mu\text{l}$  og 1:160 fortytning av serum.



**Figur 12. Optimalisering av ELISA ved checkerboard-titrering i en 96-brønners MaxiSorp-plate.** Til kolonne A-E og rad 1-5 ble det tilsatt ulike forhold av coating antigen (E2) og SAV positivt serum for å optimalisere ELISA. Coating-antigen ble tilsatt til rad A-E (med startkonsentrasjon på 200 ng/100  $\mu\text{l}$ ) og serum til kolonne 1-5 (startfortynning på 1:40) med økende grad av fortytning. Figur hentet fra (Boster 2019).

Betingelsene bestemt ved titreringen ble så videre brukt i analysene av serumprøvene fra forsøket. Til en 96-brønners MaxiSorp-plate ble det tilført 200 ng E2/100  $\mu\text{l}$  rekombinant E2 protein i karbonat-coating buffer og inkubert ved 4°C over natt. Dagen etter ble platen vasket 4x med PBS og deretter ble 250  $\mu\text{l}$  PFBB tilsatt hver brønn og inkubert en time ved



romtemperatur. Serum ble tinet og fortynnet i PFBB til 1:160. Hundre  $\mu\text{l}$  av fortynnet serum ble tilsatt platen i duplikater og inkubert ved  $4^{\circ}\text{C}$  over natt. Etter inkubering ble platen vasket 4x med 200  $\mu\text{l}$ /brønn PBS tilsatt 0,05% Tween 20 (PBST). Deretter ble 100  $\mu\text{l}$  rensert antistoff (mus anti-ørret IgM/ F1-18) (Hedfors et al. 2012) fortynnet 1:500 i PFBB, tilsatt til hver brønn og inkubert en time ved romtemperatur. Det ble etablert en negativ kontroll tilsatt fortynnet serum fra usmittet fisk og en positiv kontroll tilsatt fortynnet serum fra SAV-smitte fisk fra et tidligere forsøk. Platen ble så vasket 4x med 200  $\mu\text{l}$ /brønn PBST, tilsatt 100  $\mu\text{l}$  HRP-konjugert geit anti-mus (Bio-Rad) til hver brønn og inkubert enda en time i romtemperatur. Platen ble sluttvis vasket 4x med 200  $\mu\text{l}$ /brønn PBST og deretter tilsatt TMB substrat (Life Technologies) med inkubering i 30 minutter i mørke. OD ble lest av i spektrofotometer VersaMax™ (Molecular Devices) ved bølgelengde 650 nm med dataprogrammet SoftMax® Pro 6.3.

### 2.3.4 Ekstraksjon og isolering av totalt RNA fra hjerte

For å måle genuttrykk ved RT-qPCR må RNA isoleres fra celler eller organer. Ved økt uttrykk av et bestemt gen produseres flere messenger RNA (mRNA) produkter fra genet i cellenes cytosol. I denne oppgaven ble RNA fra hjerte hos kontrollfisk og SAV3-smittet fisk isolert ved bruk av RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Løsningen med organhomogenatet ble kjørt gjennom en selektiv silicamembran som spesifikt binder RNA (kun RNA lengre enn 200 basepar), mens kontaminanter og RNA under 200 basepar ble spunnet ut under sentrifugering. Først homogeniseres vevet til et lysat i en RLT buffer (Qiagen) med guanidin isotiocyanat. Bufferen denaturerer RNaser og hindrer RNA-degradering. Videre inkuberes lysatet med proteinase K (Applied Biosystems) med varme for ytterligere nedbrytning av vevet. Etanol tilsettes lysatet for å forsterke bindingen mellom RNAet og silicamembranen når lysatet tilføres en RNeasy Mini spin kolonne. Etter at lysatet spinnes gjennom kolonnen, sentrifugeres buffer RW1 (Qiagen) og RPE (Qiagen) gjennom kolonnen før RNAet elueres fra membranen ved hjelp av RNase fritt  $\text{H}_2\text{O}$ . Hjertene ble lagret i RNAlater på  $-20^{\circ}\text{C}$  etter uttak.

Til hvert Eppendorf-rør (2 ml) ble det tilsatt 30 mg hjertevev (0,5x0,4 cm), én stålkule og 600  $\mu\text{l}$  RLT-buffer. Hundre  $\mu\text{l}$  beta-merkaptoetanol ( $\beta\text{-ME}$ )/10 ml var tilsatt RLT-buffer. Rørene ble deretter plassert i en homogeniseringsmaskin (TissueLyser II Qiagen), vevet lysert og homogenisert ved 300 g i 2 minutter. Totalt RNA ble isolert fra lysatet i samsvar med protokollen utarbeidet av produsent (Qiagen). Etter isolering ble RNA-konsentrasjon og renhet målt i en Nanodrop® spektrofotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Instrumentet måler absorpsjonen til løsningen ved en bølgelengde på 260 nm for å bestemme konsentrasjonen RNA (ng/μl) i løsningen. I tillegg måles absorpsjonen ved 280 nm, der forholdet mellom absorbansen ved 260 og 280 nm brukes til å bestemme renheten til RNAet. Et forhold på ~2,0 anses som et akseptabelt resultat. Et lavere forhold mellom absorbansene indikerer at prøven er kontaminert med andre substanser som også absorberer lys ved 280 nm.

### 2.3.5 cDNA-syntese

Ved PCR brukes DNA som templat for reaksjonen og komplementært DNA (cDNA) syntetiseres fra isolert RNA. Isolert RNA tilføres til en løsning som inneholder et enzym kalt revers transkriptase, i tillegg til nukleotider og korte primersekvenser. Enzymet fester seg til korte oligonukleotider på RNA-tråden, syntetiserer en komplementær DNA-tråd og degraderer mRNA. Syntesen deles inn i tre aktive steg; primeraktivering, revers transkripterung og mRNA degradering. De forskjellige stegene styres av endringer i temperatur. Revers transkriptase degraderer ikke fritt mRNA og sikrer derfor at det kopieres før det brytes ned. Syntetisert cDNA kan da brukes til qPCR-analyse. Under optimale forhold bør cDNA-syntesen produsere en cDNA-mengde tilsvarende mengden mRNA før syntetisering. For denne metoden ble kitet Quantitect Reverse Transcriptase® (Qiagen) benyttet. Reagenser brukt i metoden er listet under i Tabell 8. For å unngå degradering av RNA ble prøvene holdt på is under hele prosedyren.

Alle inkubasjoner ble gjort i et temperaturkontrollerende apparat kalt ThermalCycler 2720 (Applied Biosystems). RNA prøvene ble i forkant fortynnet 1:2 og videre fortynnet med RNase-fritt vann for å oppnå en konsentrasjon på 100 ng/μl. En mastermix bestående av 2 μl gDNA Wipeout buffer og 4 μl RNase fritt vann per reaksjon ble preparert. I hver reaksjon ble det tilsatt 6 μl mastermix og 8 μl RNA isolat (800 ng) til et totalt volum på 14 μl. Løsningen ble mikset og spunnet ned, så inkubert ved 42°C i 2 minutter og deretter umiddelbart nedkjølt til 4°C. Siste steg var å preparere mastermixen til cDNA syntesen. Den bestod av 1 μl Quantiscript Revers Transcriptase, 4 μl Quantiscript RT buffer og 1 μl RT primer mix per reaksjon. Fra mastermixen ble 6 μl overført til hvert PCR-strips, deretter mikset og spunnet ned. Tabell 8 viser reagensene brukt til å lage mastermixen. Negativ revers transkriptase kontroll ble inkludert, der enzymet Quantiscript Revers Transcriptase ble utelatt fra to individuelle prøver, i både kontroll- og SAV3-smittet gruppe. Ved en amplifisering av PCR-produkter i negativ revers transkriptase kontrollene kan det bety at prøvene tilsatt revers transkriptase kan gi falsk-positive resultater.

Løsningen ble først inkubert i 15 minutter ved 42°C og deretter i 3 minutter ved 95°C for å inaktivere transkriptasen. Ferdig syntetisert cDNA ble fortynnet 1:5 og lagret ved -80°C.

**Tabell 8.** Reagenser brukt ved cDNA-syntese.

Reagenser	Volum
RNA + H <sub>2</sub> O	12 µl (8 + 4)
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 µl
Quantiscript RT buffer 5x	4 µl
RT primer mix	1 µl
Quantiscript revers transkriptase	1 µl
<b>Totalt volum</b>	<b>20 µl</b>

### 2.3.6 RT-qPCR måling av SAV nsP1-uttrykk

Siste steg for å måle genuttrykket i celler er Real-time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR). Metoden benytter spesifikke primere og DNA polymerase for å amplifisere spesifikke DNA sekvenser til et målgen, i dette tilfellet gener i syntetisert cDNA, for deretter å kvantifisere mengden av dette. Et RT-qPCR assay for å spesifikt amplifisere SAV i eksperimentelt smittet laks er etablert (Hodneland et al. 2006; Thim 2016). I denne oppgaven ble metoden brukt til å måle uttrykket av SAV nsP1-genet og referansegenet EF1aB i cDNA fra kontroll- og SAV3-smittet laks. Prinsippet bak metoden er basert på et fargestoff (SYBR® Green) som uspesifikt binder til dobbeltrådig DNA (dsDNA) og avgir en sterk fluorescens. Mens mengden dobbeltrådig DNA fordobles for hver PCR-syklus, øker også fluorescens-signalet fra fargestoffet proporsjonalt. Når fluorescens-signalet øker over bakgrunnen vil det utelukkende være cDNA-templatet for de spesifikke primerne som amplifiseres og fordobles i en eksponentiell fase. Syklusen oppnådd kalles da cycle threshold (Ct) og er et relativt uttrykk for antall sykluser gjennomført etter at fluorescens-signalet treffer terskelverdien for amplifisering. Ct-verdien er invers relatert til mengden cDNA i den analyserte prøven. Et referansegen brukes for å relatere til målgen-uttrykket ved kvantifisering av et gitt målgen. Referansegenet forventes å være stabilt uttrykt uavhengig av genmateriale og behandlingsmetode. I denne oppgaven ble elongeringsfaktor 1A (EF1aB) brukt som referanse. Tidligere forsøk har vist at EF1aB fungerer optimalt som referansegen i undersøkelser av genuttrykk i naiv og SAV-smittet atlantisk laks (Olsvik et al. 2005; Lovoll et al. 2011).

## Materiale og metode

En syklus i en real time PCR reaksjon skjer i tre steg; denaturering, hybridisering og polymerisering (Tabell 10). De ulike stegene styres av endringer i temperatur. Første denaturering skjer i en hold-fase der temperaturen økes til 95°C i 20 sekunder for å aktivere AmpliTaq Gold® DNA polymerase som i utgangspunktet er inaktivert. Andre denaturering skjer ved samme temperatur der dsDNA splittes til enkelttrådig DNA (ssDNA) og varer i 3 sekunder. Deretter senkes temperaturen til 60°C i 30 sekunder hvor både hybridiseringen og polymeriseringen skjer. Under hybridisering binder forward- og revers-primer seg til sine respektive sekvenser på ssDNA trådene. Videre syntetiserer DNA polymerase dannelsen av to nye dsDNA tråder fra to ssDNA tråder ved å koble sammen nukleotider og primere. Reaksjonen gjentas x antall sykluser. I dette forsøket ble RT-qPCR reaksjonen utført med 40 sykluser.

På grunn av at SYBR® Green binder uspesifikt til all dsDNA, inklusivt primer dimer, kontaminerende gDNA og uspesifikke PCR produkter ved feil sekvensbinding mellom primere og DNA, lages en smeltekurve etter siste RT-qPCR syklus for å sikre at prøvene ikke inneholder kontaminanter eller DNA-mutasjoner. Under denne prosessen økes temperaturen sakte og reduksjon av fluorescens registreres. En smeltepunktanalyse undersøker om PCR-reaksjonen har produsert ett eller flere produkter, der større PCR-produkter har høyere smeltepunkt enn mindre. Hvis det er flere produkter i reaksjonen vil disse produsere flere toppe i smeltekurven.

**Tabell 9.** Oversikt over reagenser brukt til mastermix (per reaksjon) ved bruk av assay fra SYBR® Green. Primere ble fortynnet i dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 5 µM og videre brukt i mastermixen.

Reagenser	nsP1	EF1aB
SYBR® Green	7,5 µl	7,5 µl
Forward primer	0,8 µl	0,8 µl
Revers primer	0,8 µl	0,8 µl
<b>Totalt mastermixvolum</b>	<b>9 µl</b>	<b>9 µl</b>
cDNA templat	6 µl	6 µl
<b>Totalt reaksjonsvolum</b>	<b>15 µl</b>	<b>15 µl</b>

## Materiale og metode

En mastermix bestående av 0,8 µl Primer forward, 0,8 µl Primer revers og 7,5 µl SYBR® Green per reaksjon ble preparert, mikset og spunnet ned (Tabell 9). Til et 96-brønners brett (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate) ble 9 µl mastermix overført til hver aktuell brønn, deretter ble 6 µl cDNA (fortynnet 1:5) overført til sine respektive brønner på platen, i duplikater. Alle prøvene ble analysert med 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

I tillegg til de to negative cDNA-kontrollene satt opp for hver behandlingsgruppe (uten tilsatt revers transkriptase) for å utelukke kontaminering med genomisk DNA, ble det også etablert to negative vannkontroller på brettet uten tilsatt cDNA for å utelukke DNA-kontaminering i fargestoffet, mastermixen eller primerløsningene brukt i forsøket. Tabell 11 viser oversikten over primersekvenser og tilhørende genbanknummer for genene brukt til RT-qPCR.

**Tabell 10.** Program for RT-qPCR ved bruk av SYBR® Green.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet (sekunder)	Antall sykluser
<b>Denaturering</b>	95	20	Hold-fase
<b>Denaturering</b>	95	3	40
<b>Hybridisering og polymerisering</b>	60	30	40

**Tabell 11.** Primersekvenser for RT-qPCR og tilhørende genbanknummer.

Gen	Sekvens	Genbank nr.	Primereffektivitet
EF1aB	Fw: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC Rev: CACGGCCCACAGGTACTG	BG933897	1,99
nsP1	Fw: CCGGCCCTGAACCAGTT Rev: GTAGCCAAGTGGGAGAAAGCT	EF675594	2,09

## 2.4 *In vitro* SAV eksperiment

### 2.4.1 Stimulering av leukocytter med rekombinant type I interferoner

Stimulering av leukocytter med IFN-I har vist seg å indusere antiviral aktivitet i B-lymfocytter i både humoral og adaptiv immunitet hos atlantisk laks ved bruk av *in vivo* modeller (Robertsen 2018). Det er imidlertid gjort lite forskning på effekten av *in vitro* stimulering av leukocytter fra laks. I denne oppgaven har man ønsket å sammenligne effekten av ulike type I IFNer på IgM ASC ved å stimulere leukocytter fra atlantisk laks. Leukocytter fra milt ble stimulert med rekombinant IFN $\alpha$ 1 i ulike konsentrasjoner (Robertsen et al. 2003), mens leukocytter fra hodenyre ble stimulert med syntetisk poly I:C (Pharmacia Biotech) og IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$  og IFN $\gamma$ .

### 2.4.2 Kvantifisering av IgM-sekreterende B-lymfocytter fra laks etter stimulering med type I interferoner

Forsøksfisken her og isoleringen av leukocytter er beskrevet foran (se punkt 2.1.2 og 2.2.1). I det første forsøket ble leukocytter fra milt sådd ut i en konsentrasjon på  $1,5 \times 10^6$ /ml i 48-brønners brett i triplikater. Samme dag ble leukocytene stimulert med henholdsvis konsentrasjoner på 100, 200, 500 og 1000 enheter/ml rekombinant IFN $\alpha$ 1 og 100  $\mu$ g/ml LPS. Etter 2 dager ble leukocytene høstet, overført til Eppendorf-rør og talt på nytt før de ble sådd ut på ELISpot brett på forhånd coatet med mus anti-ørret IgM i 50.000 celler/brønn i triplikater. Og videre inkubert i 48 timer og prosessert etter ELISpot protokollen (se punkt 2.3.2). I neste forsøk ble leukocytter fra hodenyre sådd ut i en konsentrasjon på  $1,5 \times 10^6$ /ml i 48-brønners brett i triplikater. Samme dag ble leukocytene stimulert med henholdsvis konsentrasjoner på 10  $\mu$ g/ml poly I:C (Pharmacia Biotech), 50  $\mu$ g/ml LPS og 1000 enheter/ml av rekombinant IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$  og IFN $\gamma$ . Etter 2 dager ble leukocytene høstet, overført til Eppendorf-rør og talt på nytt før de ble sådd ut på ELISpot brett på forhånd coatet med mus anti-ørret IgM i 50.000 celler/brønn i triplikater. Og videre inkubert i 48 timer og prosessert etter ELISpot protokollen.

For hvert runde med stimulering ble det inkludert en negativ kontroll med ustimulerte leukocytter. LPS-stimulering fungerte som en positiv kontroll ettersom man allerede vet at den induserer økt IgM ASC (Wold 2018). Ved langtidsstimulering av leukocytene (over 2 dager) ble cellene tilført nytt medium på dag 2 ved å tilsette L-15<sup>+</sup> tilsatt 5% FBS for å unngå celledød.

## Materiale og metode

**Tabell 12.** Antall stimulerte leukocytter fra hodenyre (HN) og milt (MI) fra naiv atlantisk laks sådd ut per brønn til en 96-brønners ELISpot-plate.

Vev:	LPS + IFN $\alpha$ 1	LPS, poly I:C, IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$
MI	50.000 celler	
HN		50.000 celler

Videre kvantifisering av antall IgM ASC per 50.000 leukocytter etter IFN-I stimulering av leukocytter fra milt og hodenyre (Tabell 12) ble gjort i henhold til ELISpot-protokollen.

### 2.5 Databehandling

Data fra alle analyser ble analysert i GraphPad Prism (versjon 8). Det relative genuttrykket til SAV nsP1 ble beregnet etter den komparative Ct-metoden, også kjent som  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden (Schmittgen et al. 2008).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct \text{ målgen} - Ct \text{ ref.gen})_{\text{prøve A}} - (Ct \text{ målgen} - Ct \text{ ref.gen})_{\text{prøve B}}]}$$

Ligningen brukes for å sammenligne genuttrykket i to ulike prøver der begge prøvene er relatert til et referansegen. Prøve A inneholder infiserte prøver, mens prøve B inneholder kontrollprøver. Primereffektivitet tas ikke hensyn til i denne beregningen. Sluttvis ble det foretatt en log transformasjon på forholdet mellom dem basert på følgende formel. Resultatene er presentert som linje- eller søylediagram og representert som gjennomsnittsverdier for alle individer innen de angitte gruppene (kontroll, inSAV og wtSAV) ved ulike uttakstidspunkt. Datasettene er også markert med standardavvik som tar utgangspunkt i gjennomsnittsverdiene. Statistiske signifikante forskjeller mellom alle tre gruppene ble beregnet med en-veis ANOVA, mens forskjeller mellom kontroll- og wtSAV-gruppene ble beregnet med enten ikke-parametrisk Mann Whitney-test eller ikke-parametrisk Kruskal-Wallis test. Signifikante forskjeller i grafene er angitt som \*; der \*p > 0,05, \*\*p > 0,002 og \*\*\*p > 0,001.

## 3 Resultater

### 3.1 *In vivo* SAV eksperiment

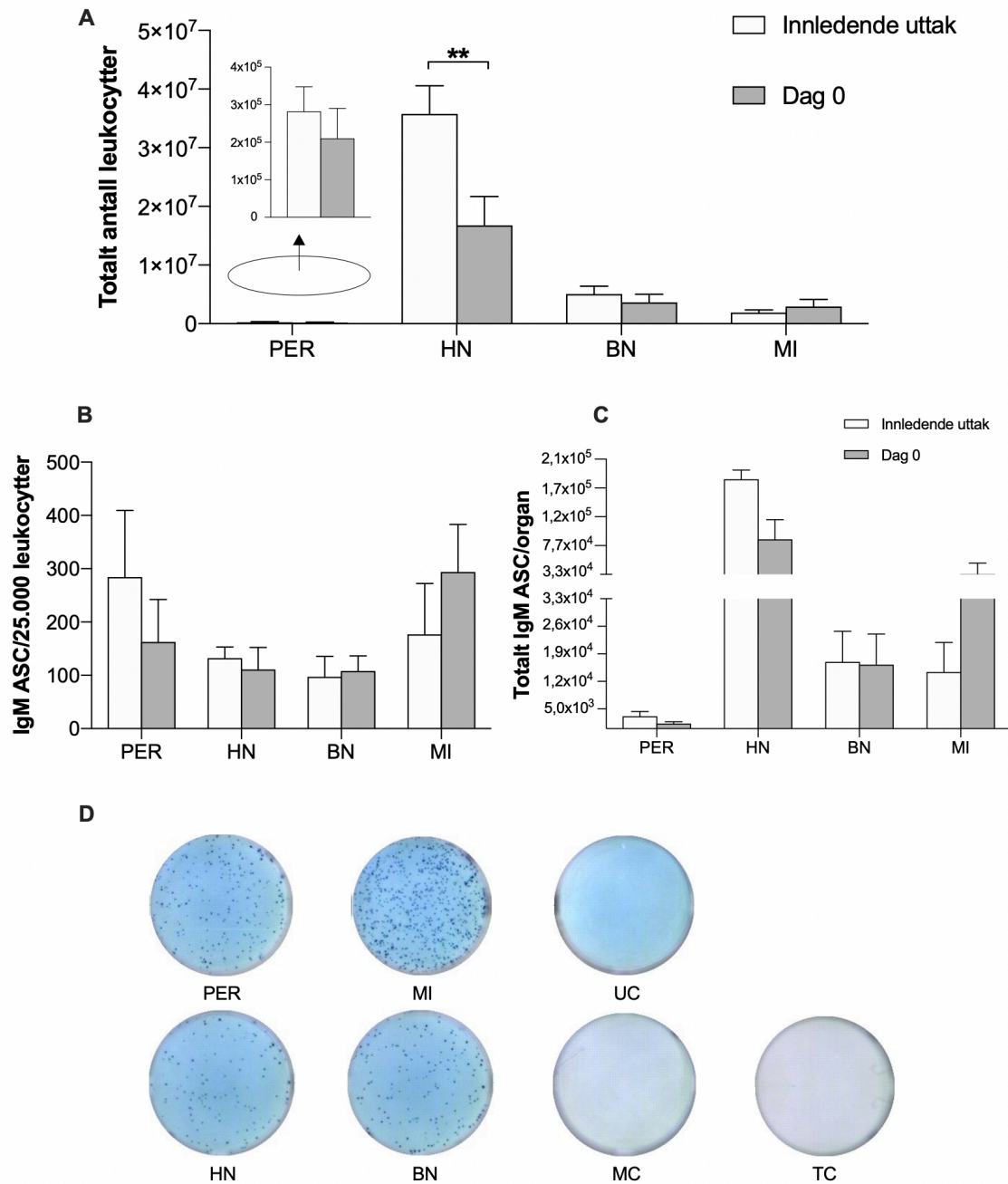
Forsøket ble gjennomført med tre fiskegrupper, alle injisert ip.: PBS-injisert kontrollgruppe (kontroll), levende SAV (wtSAV) og inaktivert SAV (inSAV). I uke seks ble noen fisk fra kontrollgruppa og inaktivert SAV-gruppe re-injisert med inaktivert SAV. Hovedformålet med forsøket var å sammenligne lokale og systemiske B-celle responser i laks injisert ip med levende SAV og inaktivert SAV, samt undersøke effekt av re-injeksjon av antigen (boost). I tidligere forsøk i vår gruppe hadde kun levende SAV og kontrollgruppe vært sammenlignet (Johansen et al. 2015). En ip smittemodell ble valgt for forsøket da denne best etterligner hvordan dagens vaksiner administreres på laks. Forsøket skulle, som de tidligere forsøkene, gjennomføres med lakseparr på ferskvann ved 10°C. Sju uker etter forsøksstart ble det oppdaget at all forsøksfisk hadde stått på saltvann. Dette skyldtes en teknisk feil ved FHL ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Trolig hadde fisken blitt overført direkte fra landanlegget, hvor den gikk for påvekst i ferskvann, til saltvann ved FHL. Eksakt hvilken salinitet fisken ble eksponert for ved forsøksstart til uke sju er ikke klart, men fra sju uker og til avslutning ble saliniteten satt til 34 promille. Siste celleuttak og hhv. ELISpot analyse ble gjennomført i uke 10, mens det uttaket planlagt til uke 17 ikke ble gjennomført på grunn av endringene i forsøksbetingelsene.

#### 3.1.1 Basale leukocyt- og IgM ASC nivå hos naiv atlantisk laks

Basalt nivå av leukocytter og total IgM ASC ble analysert i to uttak. Et innledende celleuttak ble gjort før forsøksstart mens fisken gikk på ferskvann ved landanlegget. I tillegg ble det gjort et uttak på dagen for forsøksstart (dag 0). Da var fisken overført til FHL ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Disse uttakene ble gjort for å undersøke nivået av IgM ASC i den fiskebatchen som skulle brukes i forsøket samt etablere metodene og hvilket celletall som var hensiktsmessig å så ut for ELISpot-analyser. Baknyre hos laks har ikke vært brukt til isolering av leukocytter i tidligere forsøk, så her manglet det informasjon om både celletall og tilstedeværelse av IgM ASC.



## Resultater



**Figur 13. Basalnivå for leukocytter, frekvens av og totalt antall IgM ASC i bukhole (PER), hodenyre (HN), baknyre (BN) og milt (MI) fra naiv laks ved innledende uttak og dag 0. (A)** Totalt antall leukocytter fra bukhole, hodenyre, baknyre og milt. Leukocytter ble isolert i skillet mellom 25 og 54% perkoll i en perkollgradient. Celletallet for hodenyre, baknyre og milt ble bestemt ved nukleocounter målinger, mens bukcellene ble manuelt talt i et tellekammer, som beskrevet i M&M. Den innskutte grafen viser det totale antallet leukocytter for bukhole i en egen y-akse skala. **(B)** En ELISpot plate ble coatet med anti-laks IgM (1,5 µg/0,1 ml PBS) over natt før isolerte leukocytter ble sådd ut i duplikater (25 000 celler per brønn) til en 96-brønners ELISpot-plate og videre fremkalt som beskrevet i materiale og metode. **(C)** Totalt antall IgM ASC i bukhole, hodenyre, baknyre og milt. **(D)** Digitale ELISpot-avlesninger av brønner for frekvensen av IgM ASC i bukhole, hodenyre, baknyre og milt ved dag 0. Brønnene viser gjennomsnittlige IgM ASC for hvert vev. Blåfargen fremkommer når det tilsatte TMB-substratet binder seg. UC = brønn uten celler tilsatt biotinylert antistoff, MC = brønn tilsatt celler uten tilsatt biotinylert antistoff, TC = tom brønn. Søylen viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=3-6). Signifikansnivå er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (\*), P<0,002 tilsvarer (\*\*), P<0,001 tilsvarer (\*\*\*)

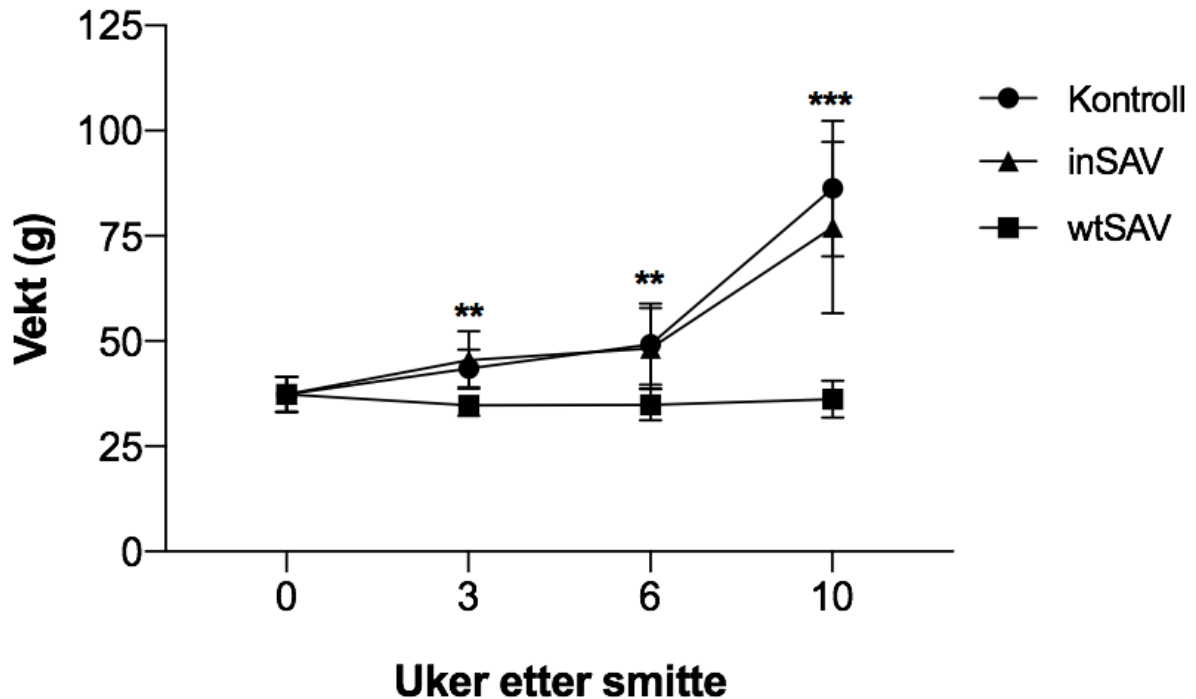
## Resultater

Figur 13 viser basalnivået for antall leukocytter per vev, samt frekvens av og totalt antall ASC i de ulike vevene ved innledende uttak og dag 0. Det totale antallet leukocytter i de ulike vevene er vist i Figur 13A. Hodenyre er det vevet med høyest antall leukocytter, mens bukhalen inneholder lavest antall leukocytter – dette gjelder begge uttakene. Frekvensen av antall IgM ASC per 25.000 celler var høyest i bukhalen ved innledende uttak med 1,1%, etterfulgt av 0,7% i milt, 0,5% i hodenyre og 0,4% i baknyre; mens frekvensen av antall IgM ASC per 25.000 celler var høyest i milt ved dag 0 med 1,2%, etterfulgt av 0,7% i bukhaler, 0,4% i hodenyre og 0,4% i baknyre (Figur 13B). Figur 13C viser likevel at hodenyre har høyest antall totalt IgM ASC ved begge uttak. Totalt IgM ASC var omtrent like stort i både bukhaler og baknyre ved innledende uttak og dag 0, mens det i milt ble observert en ~50% økning i antall ved dag 0 (fra  $1,4 \times 10^4$  til  $3,4 \times 10^4$ ). En sammenligning av totalt antall leukocytter og frekvens av totalt antall IgM ASC i de ulike organene mellom innledende uttak og dag 0 viste små forskjeller. Ved innledende uttak stod fisken på ferskvann før den ble flyttet to dager senere til fiskehelselaben på Havbruksstasjonen i Kårvika. En signifikant reduksjon i totalt antall leukocytter i hodenyre ble observert ved dag 0 sammenlignet med innledende uttak. Det ble i tillegg observert en lavere frekvens av IgM ASC bukhalen (fra 284 til 163 IgM ASC) og en økning i frekvens av IgM ASC i milt (fra 177 til 293 IgM ASC) fra innledende forsøk til dag 0. Tilsvarende endringer ble ikke funnet i baknyre og milt.

### **3.1.2 Vektutvikling etter ip injeksjon av inaktivert salmonid alfavirus (SAV) og levende SAV i laks**

Registrering av vekt ble gjort på fisk i alle forsøksgruppene før blodtapping og organuttak. Figur 14 viser vektutviklingen over forsøksperioden. Figur 14 viser vektutviklingen i de tre gruppene over forsøksperioden. Fisk hadde gjennomsnittlig startvekt på 37 gram ved dag 0. Fisk fra kontrollgruppa hadde en lav, men signifikant, tilvekst mellom dag 0 og uke 6, og en bedre tilvekst mellom uke 6 og 10. I uke 10 hadde fisken en gjennomsnittlig sluttvekt på 86 gram. Fisk som ble ip injisert med inaktivert SAV hadde en signifikant økt tilvekst mellom dag 0 og uke 3. Tilveksten til inSAV-gruppen fulgte samme signifikante utvikling som kontrollen og hadde en gjennomsnittlig sluttvekt på 77 gram i uke 10. Fisk ip injisert med levende SAV hadde en gjennomsnittlig startvekt på 35 gram. Tilveksten til wtSAV-gruppen var sterkt redusert under hele forsøksperioden. Frem mot uke 6 tyder tallene på at fisken i snitt gikk ned i vekt, mens den frem mot uke 10 hadde en liten tilvekst.

## Resultater



**Figur 14. Vektutvikling hos atlantisk laks over 10 uker etter ip injeksjon av inaktivert SAV eller levende SAV3.** Atlantisk laks ble injisert ip med PBS (kontroll), inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV). Seks fisk ble veid ved forsøksstart, og seks fisk fra hver gruppe veid etter 3, 6 og 10 uker. Punktene viser gjennomsnittsvikt i gram  $\pm$  standardavvik ( $n=6$ ). Signifikansnivå er satt til 0,05 der  $P<0,05$  tilsvarer (\*),  $P<0,002$  tilsvarer (\*\*) og  $P<0,001$  tilsvarer (\*\*\*).

Det ble ikke registrert dødelighet i forsøket. Fisken utøvde normal adferd og fluktrespons under alle uttakene. Figur 15 viser ytre og indre forandringer som ble observert i alle fiskegruppene over forsøksperioden. Det ble observert sår- og blodig ryggfinne på fisk, i tillegg til rødmet finnebases ved buk- og gattfinne, blant fisk fra kontrollgruppen i uke 6 (Figur 15A) men ikke fra inSAV-gruppen i samme kar. De fleste individene fra kontroll- og inSAV-gruppen viste ytre tegn til å være smolt i uke 10; med tydelig sølvfarget kropp, ingen parmerker og mørke finner (Figur 15B). Fisk infisert med SAV3 vokste dårlig gjennom hele forsøksperioden. Den hadde i tillegg fortsatt markerte parmerker på sidene og en lys grønnfarget kropp ved uke 10 (Figur 15C). Ved uke 10 ble det også observert små blødninger i henholdsvis tarm- og milt området og i blindsekkene, mens enkelte individer i tillegg hadde knudret milt (Figur 15D).

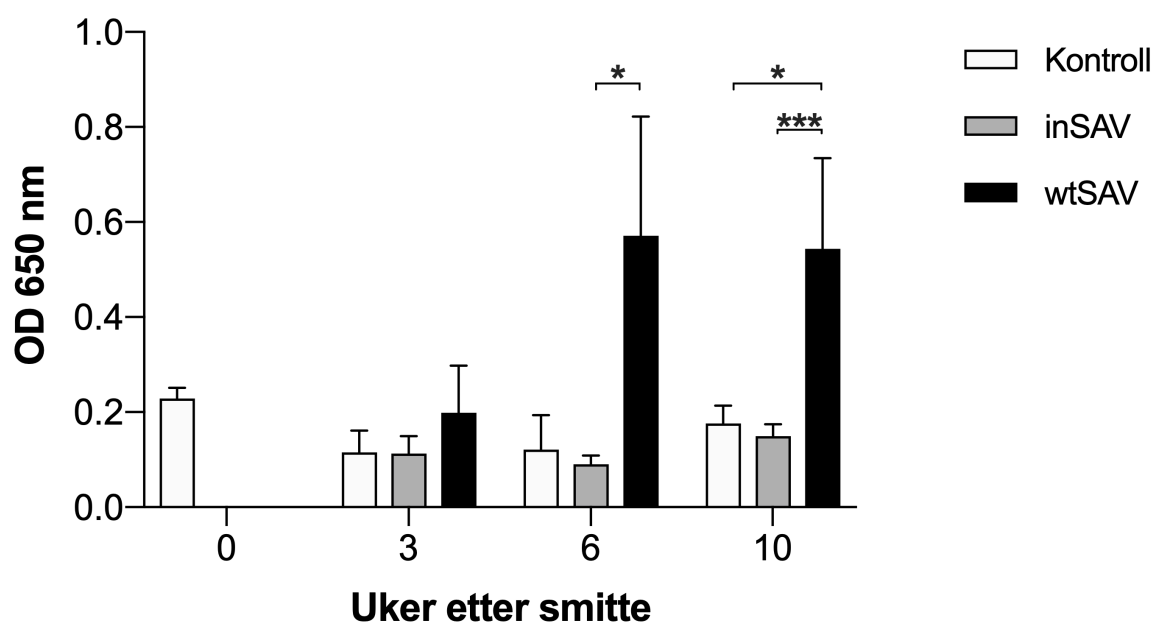
## Resultater



**Figur 15. Ytre og indre forandringer hos forsøksfisk fra kontroll-, inSAV- og wtSAV gruppene over forsøksperioden på 10 uker. (A)** Fisk fra kontrollgruppen tatt i uke 6. Fisken har sår- og blodig ryggfinne (markert med hvit sirkel), i tillegg til rødmet finnebasis ved buk- og gattfinne. **(B)** Fisk fra inSAV-gruppen tatt i uke 10. **(C)** Fisk fra wtSAV-gruppen tatt i uke 10. **(D)** Fisk fra wtSAV-gruppen tatt i uke 10. De hvite sirklene indikerer små blødninger i henholdsvis tarm/milt-området og i blindsekkene.

### 3.1.3 Måling av SAV E2 spesifikk antistoffrespons i laks etter ip injisert inaktivert eller levende SAV

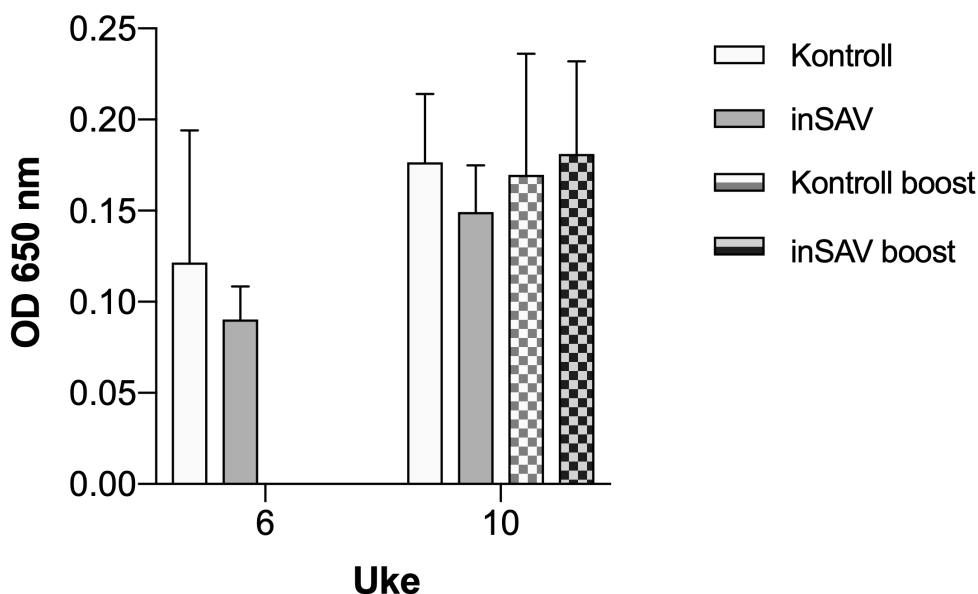
Etter ip injeksjon av inSAV og wtSAV er det mulig å benytte seg av ELISA-metoden for å påvise spesifikke antistoffer mot SAV - i dette tilfellet E2-proteinet hos SAV – i serum hos laks. All kontrollfisk var negativ for E2-spesifikk antistoffrespons under hvert uttak (Figur 16). Det ble heller ikke påvist E2-spesifikk antistoffrespons i serum fra fisk med ip injisert inaktivert SAV-virus over forsøksperioden.



**Figur 16. Påvisning av E2-spesifikk antistoffrespons i serum fra atlantisk laks etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV.** Serumprøver fra laks injisert med PBS (kontroll), inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV) 3, 6 og 10 uker etter injeksjon ble analysert for tilstedeværelse av spesifikk antistoffrespons mot SAV E2 ved ELISA. ELISA brønner ble coatet med rekombinant E2 protein og tilsatt lakse-serum fortynnet 1:160 i duplikater og fremkalt som beskrevet i materiale og metode. Spesifikk antistoffrespons er uttrykt som OD-verdier ved 650 nm. Ett E2-positivt kontrollserum ble brukt og gav en OD-verdi på 1,5. Punktene viser gjennomsnittsverdier  $\pm$  standardavvik (n=8). Signifikansnivå er satt til 0,05 der  $P < 0,05$  tilsvarer (\*),  $P < 0,002$  tilsvarer (\*\*) og  $P < 0,001$  tilsvarer (\*\*\*)

I wtSAV-gruppen ble det påvist en spesifikk antistoffrespons mot SAV E2 i serum 6 og 10 uker etter smitte. Ett individ blant de 8 individene tatt fra wtSAV-gruppen i uke 3 fikk påvist E2-spesifikk antistoffrespons i serum (OD-verdi på 0,395). En signifikant økt OD-verdi ble observert i uke 6 blant wtSAV-gruppen hvor høyeste verdi ble målt til OD=0,857. Dette var også den høyeste OD-verdien målt over forsøksperioden. I ett av de 5 individene tatt fra wtSAV-gruppen i uke 6 ble det ikke påvist E2-spesifikk antistoffrespons (OD-verdi på 0,208). I uke 10 ble det også observert signifikante forskjeller mellom wtSAV-gruppen og de øvrige gruppene. Store individuelle forskjeller ble registrert i wtSAV-gruppen både ved uke 6 og 10.

## Resultater

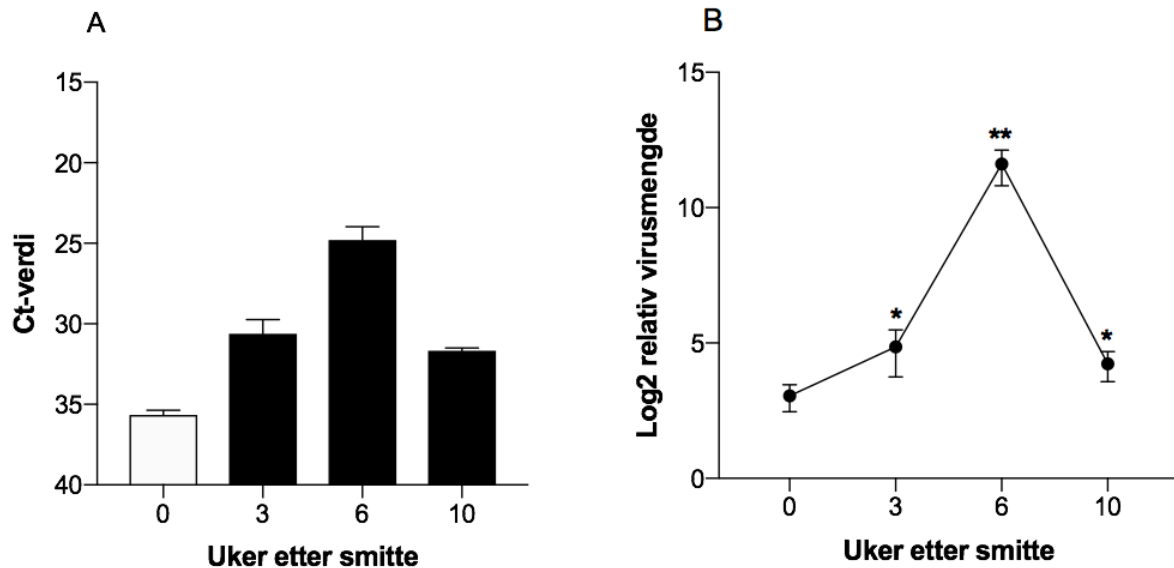


**Figur 17. Påvisning av E2-spesifikk antistoffrespons i serum fra laks etter sekundær ip injeksjon (boost) av PBS eller inaktivert SAV.** Serumprøver fra inSAV-laks injisert med PBS (kontroll) eller inaktivert SAV (inSAV) 6 uker etter første injeksjon ble analysert for tilstedeværelse av spesifikk antistoffrespons mot SAV E2 ved ELISA. ELISA brønner ble coatet med rekombinant E2 protein og tilsatt lakse-serum fortynnet 1:160 i duplikater og fremkalt som beskrevet i materiale og metode. Spesifikk antistoffrespons er uttrykt som OD-verdi ved 650 nm. Ett E2-positivt kontrollserum ble brukt og gav en OD-verdi på 1,5. Punktene viser gjennomsnittsverdier  $\pm$  standardavvik (n=8).

Seks uker etter første injeksjon ble fisk fra både kontroll- og inSAV-gruppen injisert på nytt med inaktivert SAV (inSAV-boost) for å potensielt registrere en sekundær immunrespons ved senere uttak. I uke 10 ble det ikke registrert statistisk signifikante forskjeller hverken mellom kontroll- og inSAV-boost gruppene eller sammenlignet med kontroll og inSAV-gruppene (Figur 17).

### 3.1.4 Måling av SAV nsP1-uttrykk i hjerte hos ip SAV3 smittet laks

Virus RNA fra alle SAV subtyper kan etter ip smitte påvises hos laks ved å måle nsP1-uttrykk. Genet nsP1 koder for et ikke-strukturelt protein hos SAV viktig for virusreplikasjonen (Hodneland et al. 2006). I dette forsøket ble RT-qPCR brukt for å detektere mengden nsP1-transkripter som et relativt mål for virusmengde i hjerte (Figur 18).

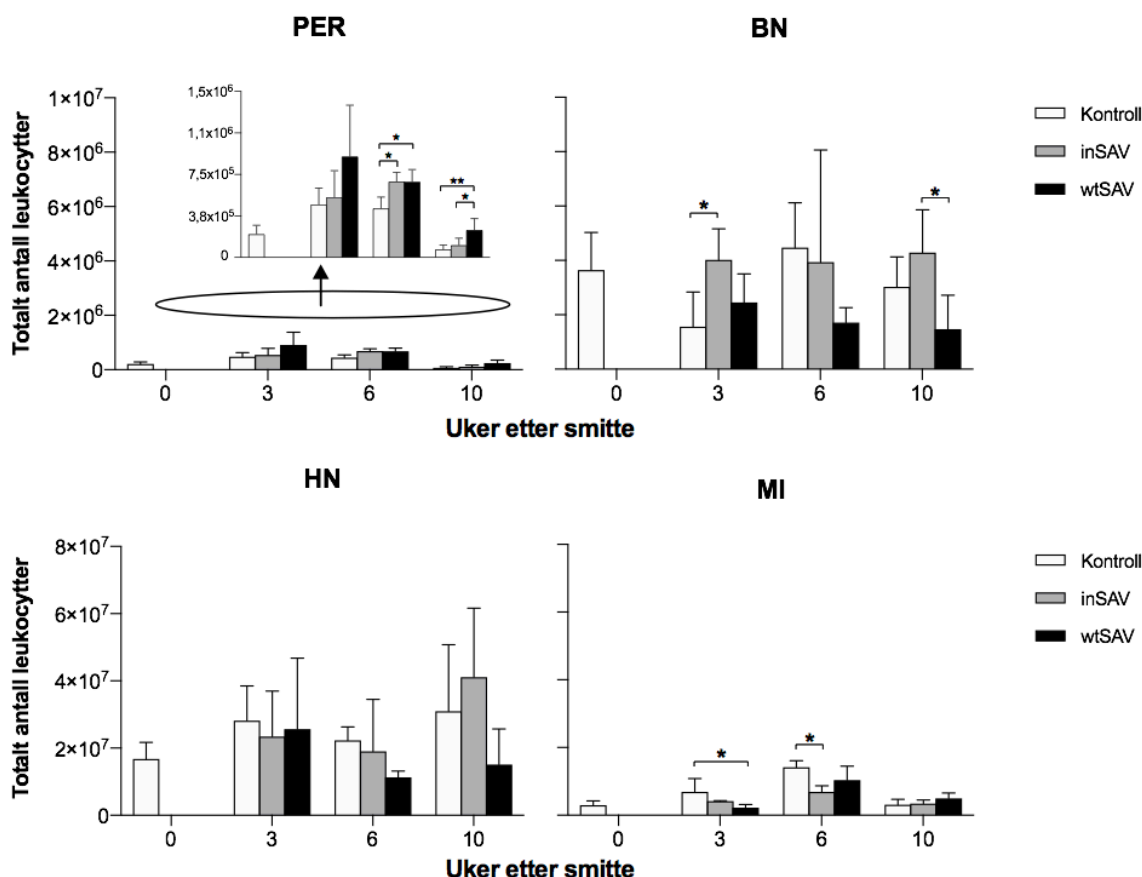


**Figur 18. Relativ virusmengde i hjerte etter ip smitte med SAV3 hos atlantisk laks.** (A) nsP1-uttrykk i hjerte analysert med RT-qPCR og angitt med Ct-verdier. RNA ble ekstrahert fra 100  $\mu$ l serum og 8  $\mu$ l RNA ble brukt til cDNA-syntesen. PCR analysen ble utført i 20  $\mu$ l reaksjon med 6  $\mu$ l 1:5 fortynnet cDNA. Den hvite søylen viser PBS-injisert kontrollgruppe, mens de sorte søylene viser SAV3-infisert gruppe. (B) nsP1-uttrykk i hjerte analysert med RT-qPCR og angitt med Log2 relative verdier beregnet med  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoden (Schmittgen et al. 2008). Ct-terskelverdi var satt til 0,200 for målgenet (nsP1) og 0,209 for referansegenet (EF1aB). Deteksjonsgrensen for virus var satt til Ct = 35,7. Forandring i genuttrykk ble målt i forhold til kontrollgruppe og EF1aB-genet. Punktene viser gjennomsnittsverdier  $\pm$  standardavvik (n=6). Signifikansnivå er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (\*), P<0,002 tilsvarer (\*\*) og P<0,001 tilsvarer (\*\*\*)

Det ble ikke påvist virus RNA i hjertet hos noen av individene i kontrollgruppen. I uke 3 ble det første gang påvist virustranskripter, med Ct-verdier på mellom 28,9 og 31,5, i hjerte på SAV3 smittet laks. En signifikant økning i virustranskripter ble observert i uke 6. Her ble Ct-verdiene målt til å være mellom 23,9 og 24,7. Størst mengde virustranskript ble påvist i uke 6 med en relativ virusmengde som var ~107 ganger større enn i uke 3. Mellom uke 6 og 10 sank den relative virusmengden til en gjennomsnittlig Ct-verdi på 31,6. I tidligere eksperimentelle forsøk gjort i vår gruppe med ip SAV3 smitte på laks i ferskvann var infeksjonsforløpet noe annerledes, hvor høyest mengde virus RNA ble påvist to til tre uker etter smitte. Fra tre til seks uker og videre til ni uker etter smitte, avtok mengden virustranskripter betydelig (Styrvold 2018).

### 3.1.5 Sammenligning av B-celle responser i laks etter ip injeksjon av inaktivert salmonid alfavirus og ip injeksjon av levende SAV

Figur 19 viser det totale antallet leukocytter i bukhole, hodenyre, baknyre og milt over forsøksperioden i de ulike gruppene. Generelt så viser dataene store individuelle forskjeller som bidrar til at det er få statistisk signifikante forskjeller. Kun i bukhole ved 6 og 10 uker er det en signifikant økning i antall leukocytter etter SAV-smitte. I de andre vevene indikerer resultatene en reduksjon i leukocytntall som følge av virusinfeksjonen ved 6 og 10 uker. Gruppen som fikk injisert inaktivert SAV viste også en økning i celletall i bukhole etter 6 uker, men ikke etter 10 uker. I de andre vevene var endring i inSAV-gruppe i forhold til kontrollgruppe mindre uttalt enn for wtSAV-gruppen, bortsett fra i baknyre hvor leukocytntallet var signifikant høyere i inSAV-gruppe sammenlignet med kontroll ved 3 uker.

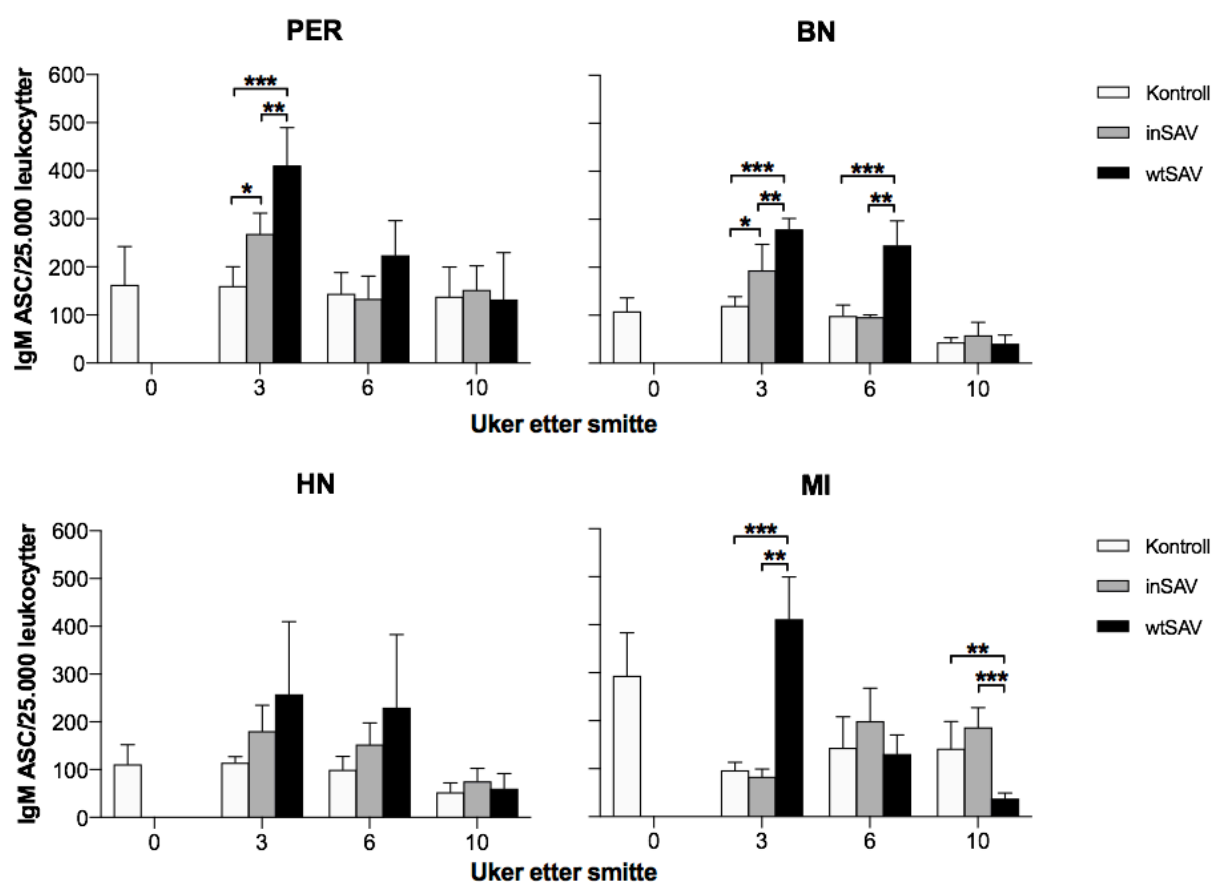


**Figur 19. Totalt antall leukocytter i bukhole, hodenyre, baknyre og milt fra atlantisk laks etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV. Leukocytter ble isolert fra bukhole (PER), hodenyre (HN), baknyre (BN) og milt (MI) 3, 6 og 10 uker etter ip injeksjon av inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV). Celler fra bukholen ble talt manuelt i tellekammer, mens celler fra de andre vevene ble talt i NucleoCounter™. Punktene viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=4-6). Signifikansnivå er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (\*), P<0,002 tilsvarer (\*\*), og P<0,001 tilsvarer (\*\*\*)**



## Resultater

Frekvensen av antall IgM ASC/25.000 leukocyttar i de ulike vevene over forsøksperioden er vist i Figur 20. Mens kontrollgruppen hadde tilnærmet lik IgM ASC frekvens utover forsøket, ble det observert en signifikant økning i antall IgM ASC for inSAV- og wtSAV-gruppene i bukhalen i forhold til kontrollgruppa 3 uker etter injeksjon på henholdsvis ~1,5 og ~2,5 ganger. Alle tre gruppene hadde tilnærmet likt målt antall IgM ASC ved uke 10. En lik trend ble observert i baknyren hvor en signifikant økning i frekvens IgM ASC ble observert for inSAV- og wtSAV-gruppen sammenlignet med kontrollgruppen ved 3 uker. I uke 6 var antallet IgM ASC fortsatt signifikant større for wtSAV-gruppen sammenlignet med de to andre gruppene, før alle gruppene igjen hadde tilnærmet likt antall IgM ASC ved uke 10.



**Figur 20.** Frekvens av antall IgM ASC/25.000 leukocyttar fra atlantisk laks i bukhal (PER), hodenyre (HN), baknyre (BN) og milt (MI) etter ip injeksjon av inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV). En ELISpot plate ble coatet med anti-laks IgM (1,5µg/0,1ml PBS) over natt før isolerte leukocyttar ble sådd ut i duplikater (6250-25 000 celler per brønn) til en 96-brønners ELISpot-plate og vidare fremkalt som beskrevet i materiale og metode. Punktene viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=4-6). Signifikansnivå er satt til 0,05 der P<0,05 tilsvarer (\*), P<0,002 tilsvarer (\*\*) og P<0,001 tilsvarer (\*\*\*).

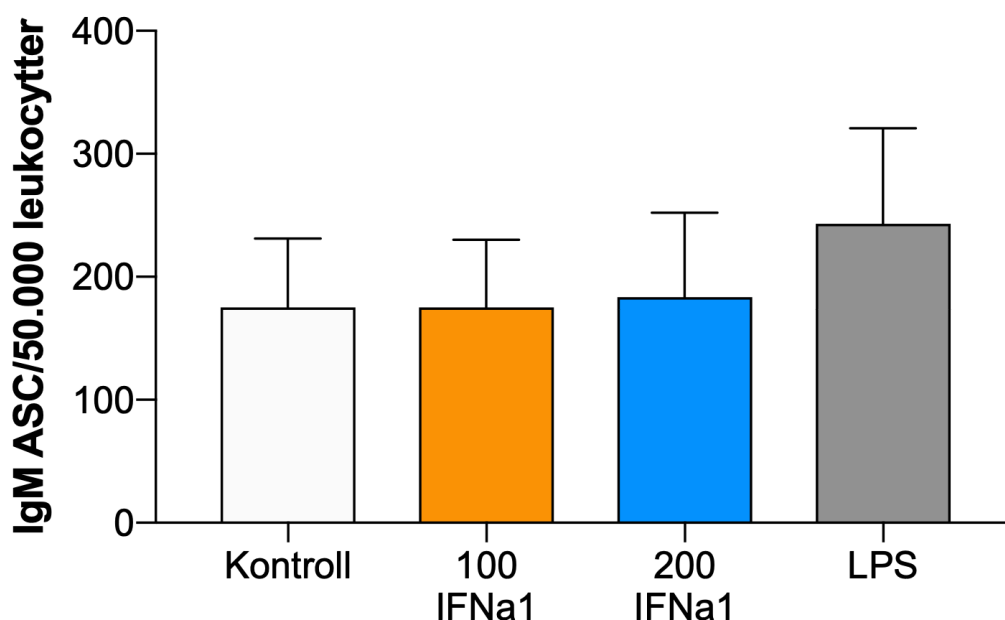
## Resultater

I hodenyren ble det ikke påvist signifikante endringer i IgM ASC frekvens i wtSAV eller inSAV-gruppene sammenlignet med kontroll. I milt sank antall IgM ASC drastisk for kontrollgruppen mellom dag 0 og uke 3 (fra 293 til 97), før det stabiliserte seg frem mot uke 10. Antall IgM ASC målt for inSAV-gruppen økte og stabiliserte seg etter uke 3 mot uke 10. Frekvensen av IgM ASC økte ~4 ganger som følge av SAV-smitte ved 3 uker sammenlignet med kontrollgruppen samme uke. Ingen endringer i inSAV-gruppen ble observert på samme tidspunkt. Ved 10 uker var det en signifikant reduksjon i IgM ASC-frekvens i wtSAV-gruppen sammenlignet med kontroll- og inSAV-gruppe.

## 3.2 ELISpot assay av type I IFN-stimulerte lakseleukocytter

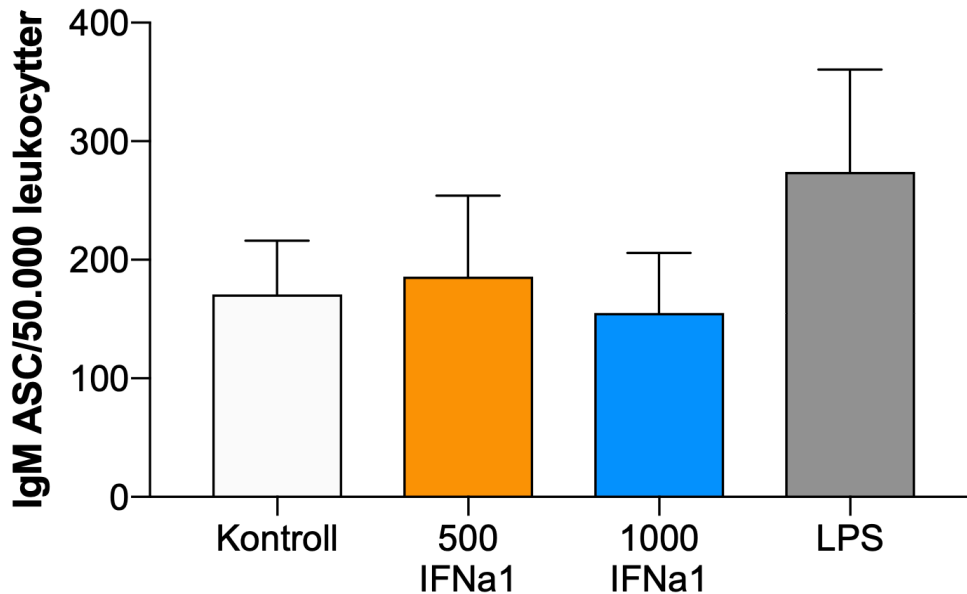
### 3.2.1 IFN $\alpha$ 1-stimulering av milt leukocytter fra laks – deteksjon av IgM ASC

I to innledende pilotforsøk ble den direkte effekten av type I IFNer på B-celler fra laks i kultur testet ved å måle antall IgM ASC ved slik behandling. I det første forsøket ble leukocytter fra milt isolert, sådd ut og stimulert med 100 og 200 enheter/ml IFN $\alpha$ 1 (Figur 21). Tidligere forsøk i vår gruppe (Wold 2018) har vist at LPS-stimulering av leukocytter i kultur gir økt antall IgM ASC, og denne behandlingen ble derfor inkludert som en positiv kontroll. Ubehandlete leukocytter var negativ kontrollgruppe. Cellene ble holdt i kultur i 48 timer, og deretter talt på nytt og sådd ut i ELISpot plater (50.000 per brønn i triplikater) og lest av etter 48 timer.



**Figur 21. Effekten av IFN $\alpha$ 1-stimulering av lakseleukocytter fra milt på antall IgM ASC.** Leukocytter isolert fra milt fra frisk, uvaksinert laks ble sådd ut i 48-brønners brett (50.000 celler) i triplikater og stimulert med 100 og 200 enheter/ml IFN $\alpha$ 1 og 100  $\mu$ g/ml LPS i 48 timer. Kontroller var celler tilsatt kun medium. En ELISpot plate ble coatet med anti-laks IgM (1,5 $\mu$ g/0,1ml PBS) over natt ved 4°C. Etter 48 timer i kultur ble leukocytene høstet og talt på nytt, 50.000 leukocytter ble tilsatt i triplikater til en 96-brønners ELISpot-plate og videre fremkalt som beskrevet i M&M. Punktene viser gjennomsnittsverdier  $\pm$  standardavvik (n=4).

## Resultater



**Figur 22. Effekten av IFNa1-stimulering av lakseleukocytter fra milt på antall IgM ASC.** Leukocytter isolert fra milt fra frisk, uvaksinert laks ble sådd ut i 48-brønners brett (50.000 celler) i triplikater og stimulert med 500 og 1000 enheter/ml IFNa1 og 100 µg/ml LPS i 48 timer. Kontroller var celler tilsatt kun medium. En ELISpot plate ble coatet med anti-laks IgM (1,5µg/0,1ml PBS) over natt ved 4°C. Etter 48 timer i kultur ble leukocytene høstet og talt på nytt, 50.000 leukocytter ble tilsatt i triplikater til en 96-brønners ELISpot-plate og videre fremkalt som beskrevet i M&M. Punktene viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=4).

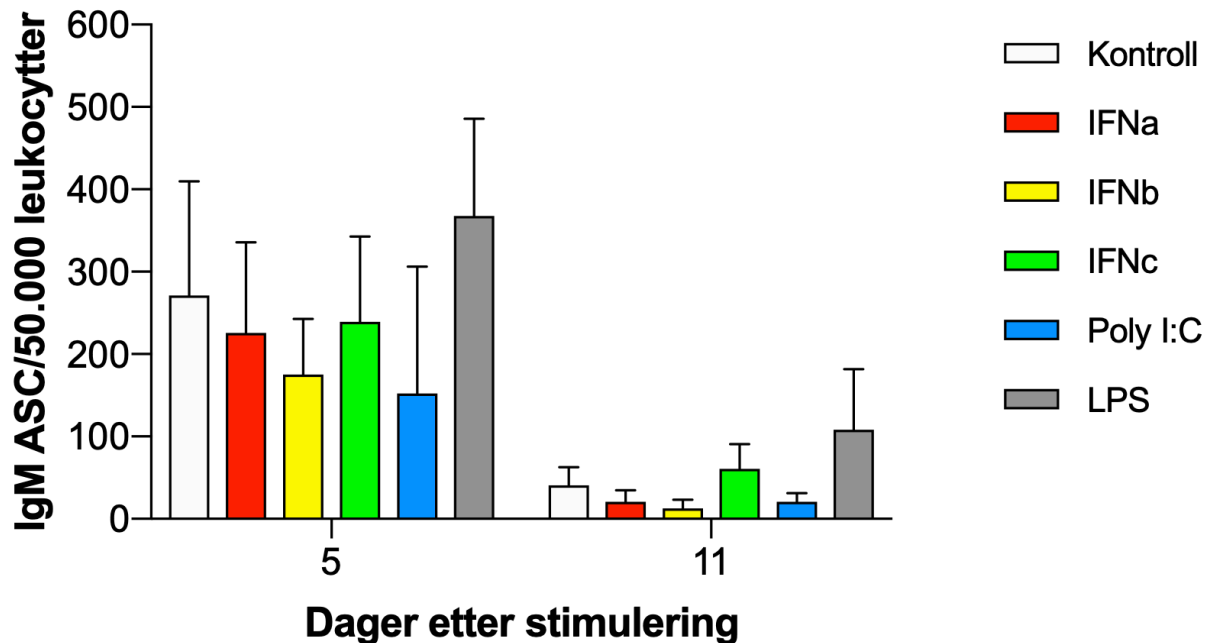
Stimulering av leukocytter fra milt med 100 og 200 enheter/ml IFNa1 gav ingen signifikante effekter sammenlignet med den negative kontrollen. Dette resultatet sees også i sammenheng med den positive LPS-kontrollen som også var satt opp i samme forsøk. Et nytt forsøk ble satt opp hvor leukocytter fra milt ble stimulert med høyere IFNa1 konsentrasjoner (500 og 1000 enheter/ml). Stimulering av leukocytter fra milt med 500 og 1000 enheter/ml IFNa1 gav heller ingen signifikante effekter sammenlignet med hverken negativ kontroll eller positiv LPS-kontroll (Figur 22).

### 3.2.2 Stimulering av IgM ASC fra laks med flere type-1 interferoner

Ett nytt forsøk ble satt opp for å undersøke effekten av flere type-1 IFNer hvor hodenyre leukocytter, i tillegg til IFNa1 i en konsentrasjon på 1000 enheter/ml, ble stimulert med to andre typer IFNer; IFNb og IFNc i konsentrasjoner på 1000 enheter/ml. I tillegg ble cellene stimulert med poly I:C (10 µg/ml) som er en syntetisk etterligning av dobbelttrådig RNA og induserer IFN-produksjon i celler. LPS (50 µg/ml) ble inkludert som positiv kontroll. I dette forsøket valgte vi også å forlenge den perioden cellene ble stimulert på til henholdsvis 5 og 11 dager.

## Resultater

Figur 23 viser effekten av stimulering med flere type-1 IFNer på hodenyre leukocytter. Antall IgM ASC/50.000 leukocytter gikk drastisk ned mellom dag 5 og 11. Sammenlignet med kontrollgruppen og LPS var det kun IFNc som gav en økt IgM ASC, men denne økningen var ikke statistisk signifikant. IFNa, IFNb og poly I:C ser ut til å ha en negativ effekt på IgM ASC frekvens sammenlignet med kontrollen. Denne effekten var heller ikke statistisk signifikant.



**Figur 23. Effekten av type 1 IFN-stimuleringer av lakseleukocytter fra hodenyre på antall IgM ASC.** Leukocytter isolert fra hodenyre fra frisk, uvaksinert laks ble sådd ut i 48-brønners brett (50.000 celler) i triplikater og stimulert med konsentrasjoner på 10  $\mu\text{g/ml}$  poly I:C, 50  $\mu\text{g/ml}$  LPS og 1000 enheter/ml av IFNa, IFNb og IFNc, i henholdsvis 5 og 11 dager ved 15°C. Kontroll var celler tilsatt kun L-15<sup>+</sup> medium. En ELISpot plate ble coatet med anti-laks IgM (1,5 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  PBS) over natt ved 4°C. Etter henholdsvis 5 og 11 dager i kultur ble leukocytene høstet og talt på nytt, 50.000 leukocytter ble tilsatt i triplikater til en 96-brønners ELISpot-plate og videre fremkalt som beskrevet i materiale og metode. Punktene viser gjennomsnittsverdier  $\pm$  standardavvik (n=4).

## 4 Diskusjon

Virussykdommer er sammen med avlusning og annen håndtering av oppdrettsfisk blant de største utfordringene i norsk lakseoppdrett. Vaksinerne som i dag benyttes mot virussykdommer gir bare en suboptimal beskyttelse i form av redusert dødelighet og antall utbrudd. De inneholder vanligvis hele inaktiverede virus som i kombinasjon med bakterielle antigener og en oljebasert adjuvans som injiseres ip og har som formål å aktivere immunmekanismer, både humorale og cellulære, for å indusere en langvarig beskyttelse. En slik vaksinemodell forutsetter at fisken, når den blir vaksinert, har et humoralt immunforsvar som produserer hukommelsesceller. Kunnskapen om slike spesifikke immunceller, hvordan de aktiveres og bidrar til langvarig beskyttelse er fortsatt begrenset for fisk. Siden vaksinerne administreres ip er det interessant å undersøke immunresponser i bukhule etter ip administrert injeksjon av inaktivert og levende SAV. Generelt er det mange uløste spørsmål om hva som skjer i laksen ved en virusinfeksjon eller ved administrering av virusvaksiner. Bedre forståelse av humorale immunresponser i det medfødte og adaptive forsvaret hos fisk under en infeksjon kan bidra til å utvikle bedre vaksinestrategier. Det mangler også mye informasjon om funksjonene bak humorale immunresponser i bukhule og systemiske organer i fisk før, under og etter en virusinfeksjon. Dette er motivasjonen i det vi nærmere undersøker leukocytall, tilstedeværelse av IgM ASC fra bukhule og systemiske organer fra kontrollfisk, fisk injisert med inaktivert SAV og smittet med levende SAV3.

## 4.1 Infeksjonsforløp i hjerte etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV

### 4.1.1 Påvisning av SAV infeksjon og vektreduksjon

Under en naturlig infeksjon med SAV antar man at viruset smitter fisken via gjeller, hud og tarm. Viremi antas også å oppstå i forkant av kliniske tegn til sykdom og histopatologiske forandringer (McLoughlin et al. 2007; Jansen et al. 2017). Ved ip smitte vil viruset bevege seg fra bukhulen via blodbanen til målorganene. Vanlige kliniske tegn til PD er apatisk oppførsel og redusert tilvekst, i tillegg til histopatologiske forandringer som degenerert og nekrotisk hjertevev og tap av pankreasvev og skjelettmuskulatur (Pettersen et al. 2013; Taksdal et al. 2015). Virus eller virus-RNA kan også påvises i ulike organer som for eksempel gjeller, hjerne, milt, nyre og pseudobrancer uten å gi histopatologiske forandringer i disse vevene (Christie et al. 2007; McLoughlin et al. 2007). Studier har vist at SAV-RNA påvises oftere i hjerte enn andre organer lengre tid etter smitte (Andersen et al. 2007), og ansees derfor som det best egnede organet for å måle uttrykk av SAV-RNA ved RT-qPCR.

I vårt forsøk ble hjertet valgt som målorgan for å følge SAV-infeksjonen i fiskegruppa injisert med levende virus (wtSAV). Det ble påvist lave mengder SAV-RNA (Ct 28,9-31,5) i hjerte 3 uker etter infeksjon av wtSAV-gruppa, mens det i uke 6 ble påvist høye verdier av SAV-RNA (Ct 23,9-24,7). Fra seks til ti uker etter smitte sank nivået av virus RNA betydelig. Lignende infeksjonsforløp er vist i eksperimentelle forsøk gjort ved ip SAV3 smitte på laks i sjøvann med høyt virusnivå frem mot uke 3-4 og deretter en langsom reduksjon i virustranskripter fra fire uker etter smitte (Taksdal et al. 2015). I dette forsøket var saliniteten på sjøvannet på  $32 \pm 1\text{‰}$  og hadde en temperatur på  $12^{\circ}\text{C}$  (Taksdal et al. 2015). Feltundersøkelser av SAV-smitte på post-smolt i sjøvann viser at både påvisning av SAV-RNA og kliniske tegn til sykdom observeres først 18 uker etter sjøsetting, og indikerer en potensielt lengre viremisk periode i laksen før utbrudd (Jansen et al. 2010). Våre resultater er ikke helt i samsvar med tidligere rapporterte eksperimentelle SAV-smitteforsøk på laks i ferskvann eller sjøvann. Årsaken til dette er ikke kjent, men siden fisken i vårt forsøk ble satt på sjøvann før smoltifisering, kan dette ha påvirket infeksjonsforløpet.

Vektreduksjon er også et vanlig symptom knyttet til SAV-smittet laks, og tidligere studier har påvist en betydelig lavere vekt hos SAV-smittet laks sammenlignet med usmittet laks i samme forsøk (Taksdal et al. 2015). Vi observerte en signifikant vektreduksjon i SAV3-smittet laks sammenlignet med de to andre gruppene. Denne endringen indikerte at fisken utviklet PD og var en viktig observasjon ettersom vi ikke gjennomførte histopatologi i vårt forsøk.

### 4.1.3 Antistoffresponser mot SAV

En viss tid etter smitte vil fiskens immunforsvar indusere humorale og antivirale prosesser for å bekjempe infeksjonen. En immunologisk respons i laks mot SAV-infeksjon ble først oppdaget når overlevende fisk etter utbrudd var beskyttet mot senere infeksjoner med samme virus (McVicar 1987). At laks produserer beskyttende antistoffer mot SAV ble bekreftet under passiv immunisering med antiserum fra infisert laks (Houghton et al. 1996). Mens noen studier har detektert nøytraliserende antistoffer mot SAV 11 dager etter infeksjon (Desvignes et al. 2002), har andre studier detektert nøytraliserende antistoffer mot SAV først 21 dager etter infeksjon (Christie et al. 2007). Fram til nylig har antistoffrespons mot SAV blitt målt som nøytraliserende antistoff i cellekultur. Denne metoden er svært arbeidskrevende og det har lenge vært ønskelig å etablere en SAV-spesifikk ELISA, men dette har vært utfordrende (J. Jørgensen pers. kom.). Nylig ble en ELISA med rekombinant SAV E2-protein produsert i *E. coli* som antigen tatt i bruk (Chang et al. 2017). I dette arbeidet ble en E2-spesifikk antistoffrespons i serum hos laks registrert 10 uker etter injeksjon av en DNA-vaksine som kodet for hele det strukturelle polyproteinet til SAV3 (pCSP). Ingen antigen-spesifikk antistoffrespons ble funnet i fiskegruppen injisert med inaktivert SAV (Chang et al. 2017). I vårt forsøk ble samme type ELISA benyttet og en signifikant økt antistoffrespons mot E2 ble observert i wtSAV-gruppen både 6 og 10 uker etter infeksjon, mens ingen respons ble påvist i gruppen injisert med inaktivert SAV. Dette er i samsvar med det nevnte studiet og viser i tillegg at levende virus gir en sterkere aktivering av den humorale immunresponsen sammenlignet med et inaktivert virus. Økt antistoffnivå 6 uker etter smitte kan bety at antistoffresponsene i immunforsvaret har bundet til virus og hindrer virusets evne til å replikere, dette sees også i sammenheng med reduksjonen i mengden virustranskripter 6 uker etter smitte.

Ettersom noen av dagens virusvaksiner er basert på vaksiner med inaktivert SAV er dette interessante resultater fordi ip injeksjon av inaktivert SAV ikke gav en antistoffrespons i fisken. Dette kan kanskje være forklaringen på at dagens vaksiner ikke klarer å redusere dødelighet og



antall utbrudd. Det er også gjennomført forsøk hvor laks ble vaksinert med inaktivert SAV med ulike adjuvanter, blant annet TLR-agonistene CpG og poly I:C. En kombinasjon av disse TLR-agonistene, sammen med inaktivert SAV, stimulerte en sterkere nøytraliserende antistoffrespons enn ved injeksjon av kun inaktivert SAV (Thim et al. 2014; Thim 2016).

### **4.2 Leukocyttdetall i bukhuale, hodenyre, baknyre og milt**

Leukocytter innbefatter en rekke forskjellige hvite blodceller som er en del av immunforsvaret, deriblant B- og T-lymfocytter. Vi har i dette studiet undersøkt leukocyttdetall i bukhuale, hodenyre, baknyre og milt over 10 uker hos fisk injisert med PBS, inaktivert SAV og levende SAV3. Tidligere studier gjort på ørret har vist en tilstrømming av leukocytter til bukhuale etter ip injisert bakterielt antigen, LPS eller viral hemorragisk septikemi virus (VHSV) 2 dager etter injeksjon (Korytar et al. 2013; Castro et al. 2017). Mens nevnte studie er et korttidsforsøk har vi gjort et langtidsforsøk. Vi observert en generell økning i celletall i bukhuale over forsøksperioden, og da spesielt seks og ti uker etter infeksjon med wtSAV. Denne økningen i celletall kan skyldes en lokal celledeling i bukhuale eller en tilstrømming av celler fra andre vev. Ved de samme tidspunktene så vi også en trend der celletallet i hodenyre og baknyre var redusert i wtSAV-gruppen. Dette sannsynliggjør at cellene migrerer fra de systemiske organene til bukhuale som en immunologisk respons på ip administrert injeksjon. Endringene i celletall i fiskegruppen som fikk injisert inaktivert SAV er ikke like uttalte som etter smitte med wtSAV, men i bukhuale og baknyre er det en signifikant økning for denne gruppen etter henholdsvis seks og tre uker. Cellepopulasjonene og funksjonen til baknyre i laks er svært lite utforsket. I ørret er det kjent at vevet inneholder flere delvis aktiverte B-celler og at det har en høy produksjon av plasmaceller (Zwollo et al. 2005). Siden ørret og laks er nært beslektet, er det sannsynlig at lakse B-celler innehar samme funksjon.

### **4.3 IgM ASC responser i ulike vev etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV**

Ettersom fisk mangler både beinmarg og lymfeknuter, er hodenyre og milt de organene hvor B-celle modning og differensiering foregår. Immunoglobuliner, eller antistoff, forekommer i to ulike former; membranbundet til en B-celle og referert til som BCR, eller utskilt fra plasmaceller som fritt-flytende i blodbanen. Hos fisk er tre typer immunoglobuliner isolert;

IgM, IgT og IgD. IgM B-celler er vist å være den dominerende B-celle populasjonen i nyre, blod og milt hos laks (Jenberie et al. 2018). Vår forskningsgruppe er de første til å påvise tilstedeværelsen av IgM ASC i bukhule hos laks (Styrvold 2018) og resultatene i min oppgave bekrefter dette. Foreløpig er B-cellepopulasjonen i bukhule hos laks fortsatt svært lite utforsket (Penaranda et al. 2019). Man har også lite kunnskap om IgM ASC i systemiske organer hos laks ved virusinfeksjoner. På grunnlag av dette har vi valgt å undersøke IgM ASC i bukhule og systemiske organer hos laks under tre ulike behandlinger; ip injisert med PBS, inaktivert SAV eller levende SAV3.

### 4.3.1 Bukhule

I bukhulen hos ørret eksisterer det en leukocyttopopulasjon, deriblant små mengder av myeloide celler og IgT B-celler, før stimulering (Zhang et al. 2011; Korytar et al. 2013). Den immunologiske responsen i bukhulen er rask og populasjonen av leukocytter i bukhulen endrer seg totalt over 48 timer etter infeksjon med bakterier, fra primært monocytter, makrofager og nøytrofiler til IgM B-celler. I vårt forsøk var første analysetidspunkt 3 uker etter forsøksstart. Ved uke 3 observerte vi en signifikant økning i frekvensen av IgM ASC etter injeksjon av inaktivert SAV og levende SAV3. Frekvens IgM ASC var markert høyere i wtSAV-gruppa, men man observerte også en signifikant økning i antall IgM ASC i inSAV-gruppa. Dette korrelerer med tidspunktet da vi først påviste SAV3 smitte i hjerteprøvene fra fisken. Økningen i IgM ASC indikerer at både inaktivert og levende SAV stimulerer humorale immunresponser i bukhulen, mens injisering av inaktivert SAV fører til en redusert respons. De infeksiøse egenskapene er fjernet hos et virus som er inaktivert og det er sannsynligvis derfor at immunresponsen er mer beskjeden mot inaktivert virus sammenlignet med et levende virus.

Den økte frekvensen av IgM ASC i bukhulen 3 uker etter henholdsvis ip injeksjon av inaktivert SAV eller levende SAV kan også skyldes tilstedeværelsen av T-celler i bukhulen. Det er tidligere påvist tilstedeværelse av CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-celler hos ørret ved infeksjoner administrert i bukhulen (Korytar et al. 2013). Samtidig som at viruset aktiverer det humorale immunforsvaret, vil CD4<sup>+</sup> T-celler bidra til å ytterligere aktivere det humorale immunforsvaret. At B- og T-cellene jobber sammen om å stimulere immunforsvaret vil videre øke tilstrømmingen av immunceller til bukhulen. Vi beregnet også totalt antall IgM ASC (Figur 1, Appendix) i bukhulen og sammenlignet dette med de systemiske organene. Selv om frekvens IgM ASC var høyest i bukhulen, var forekomsten av totalt antall IgM ASC betydelig lavere i

bukhulen sammenlignet med de andre organene. Dette samsvarer også med totalt antall leukocytter målt i de ulike vevene, hvor også her antallet leukocytter var målt størst i hodenyre og minst i bukhalen.

### 4.3.2 Systemiske organer

De systemiske organene er alle koblet sammen via blodbanen og forsynes med en bred variasjon av ulike immunceller både før og under en infeksjon. Fordelingen av disse immuncellene er riktignok ulik mellom alle organene. Hos fisk er hodenyre og tymus de primære lymfoide organene, mens hodenyre sammen med baknyre og milt fungerer som sekundære lymfoide organer (Uribe&Grier 2011). Ulike stadier av B-celler i blod, hodenyre, baknyre og milt hos ørret er fordelt svært ulikt og migrerer på tvers av hverandre via blodbanen (Figur 3). I ørret fins plasmaceller i større mengder i hodenyre og milt (spesielt under stimulering med LPS), mens baknyren er et område med stor plasmablast-populasjon (Zwollo et al. 2005). Hodenyre og milt er vist å inneholde store mengder IgM ASC, mens IgM<sup>+</sup> B-celler er hvilende og ikke sekreterende i blodbanen, og baknyren inneholder flere forskjellige B-celle populasjoner med ulik aktiveringsstatus (Zwollo et al. 2008; Ye et al. 2011).

I vårt forsøk ble det observert en statistisk signifikant økning i antall IgM ASC i både baknyre og milt allerede 3 uker etter infeksjon. En økning i antall IgM ASC ble også observert i hodenyre ved 3 uker i den infiserte gruppen, men denne var ikke statistisk signifikant på grunn av store individuelle forskjeller. Vi observerte også en økning i antall IgM ASC i alle vev, unntatt milt, for inSAV-gruppa 3 uker etter injeksjon; men denne var i utgangspunktet mindre uttalt enn for wtSAV-gruppa og ofte ikke statistisk signifikant sammenlignet med kontrollfisken. Frekvens av IgM ASC var signifikant økt i både bukhole og milt etter 3 uker. Det kan dermed se ut til at under en virusinfeksjon er bukhole og milt viktige vev med stor tilstrømming av IgM ASC. Etersom vaksinen administreres i bukhalen er det ikke uventet å se en sterk immunologisk respons lokalt i bukhalen.

At milten er et viktig organ for distribueringen av IgM ASC til andre vev under en virusinfeksjon i laks kan knyttes til det faktum at vevet allerede inneholder en betydelig plasmacelle-populasjon (Zwollo et al. 2005; Zwollo et al. 2008). Våre resultater i milt samsvarer også med nylige forsøk av Jenberie og medarbeidere (Jenberie et al. 2018), som fant en vesentlig større IgM-populasjon i milt og perifert blod sammenlignet med hodenyre og baknyre.

## Diskusjon

Som nevnt tidligere er baknyre hos benfisk et relativt utforsket organ og man vet lite om dets funksjon i humorale immunresponser. Derfor var det også spesielt interessant å undersøke dette organet. Studier gjort på leukocytter fra ustimulert ørret har foreslått at B-celler modner i hodenyre og migrerer til baknyre og milt der de aktiveres, og at baknyren inneholder det høyeste antallet av delvis aktiverte B-celler (Zwollo et al. 2005). Resultatene her støtter opp om at baknyren fungerer som et sekundært lymfoid organ hos benfisk. Studiet foreslår også at baknyren er et sekundært immunologisk område hvor modne B-celler migrerer til og aktiveres av APCs og T-celler (Zwollo et al. 2005).

I vårt forsøk observerte vi en signifikant økning av antall IgM ASC i baknyre 3 uker etter henholdsvis ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV. Denne økningen var mindre uttalt i inSAV-gruppa. Antall IgM ASC var også høyt i uke 6 i wtSAV-gruppa. Det kan derfor tenkes at APCs migrerer fra bukhule til baknyren under en virusinfeksjon, men det er usikkert hvorfor dette skjer. Hvilke T-celler som befinner seg i vevet er ikke kartlagt, men det kan foreslås at den langvarige humorale immunresponsen muligens induseres av CD4<sup>+</sup> T-hjelperceller. En slik respons kan muligens også knyttes til den signifikante økningen i totalt antall IgM ASC i baknyre vi observerte 3 uker etter ip injeksjon av inaktivert SAV. Selv om frekvens IgM ASC ble målt høyest i bukhule, viser det totale antallet IgM ASC i de ulike vevene (Figur 1, Appendix) at forekomsten av disse er størst i hodenyren og minst i bukhule. Generelt ser vi en nedgang i IgM ASC mellom 3 og 6 uker etter infeksjon, men denne er mindre uttalt i hodenyre og baknyre, blant inSAV- og wtSAV-gruppene. Dette ser ut til å samsvare med tidspunktet da vi påviste høy antistoffrespons mot SAV E2 henholdsvis 6 og 10 uker etter injeksjon.

Som tidligere nevnt er det totale antallet leukocytter påvist i baknyre og milt i wtSAV-gruppa redusert ved henholdsvis 6 og 3 uker etter smitte sammenlignet med kontrollgruppa. Vi vet at IgM B-celler er dominerende blant B-celle populasjonen i nyre og milt. Vi vet også baknyren hos ørret inneholder flere forskjellige B-celle populasjoner i ulike stadier, men at baknyren hos laks er svært lite utforsket. Et interessant funn kan knyttes til de signifikante økte IgM ASC nivåene i både baknyre og milt 3 uker etter SAV3-smitte, til tross for at vi ser en generell reduksjon i antall leukocytter i begge vev ved samme tidspunkt. Dette kan indikere enten en tilstrømming av IgM ASC til baknyren eller at baknyren muligens favoriserer produksjon av IgM ASC under en virusinfeksjon, eller kanskje en kombinasjon av disse. Antall IgM ASC i milt 3 uker etter SAV3-smitte var svært forøkt, noe som også forsterker teorien om at IgM ASC er viktig i beskyttelsen mot SAV. Nøytraliserende antistoffrespons er som nevnt økt ved 6 og

10 uker etter ip SAV3 smitte. Det vi også observerer er at IgM ASC øker allerede ved 3 uker. Hadde man benyttet seg av en spesifikk ELISpot ville man kunne sagt noe om hvor de cellene som produserer spesifikk IgM mot SAV befinner seg. Våre resultater gir bare en oversikt over tilstedeværelsen av total IgM ASC i de ulike vevene, og ikke de ASC som produserer IgM som spesifikt binder til SAV. I løpet av forsøket ble det gjort innledende studier for å etablere en spesifikk ELISpot for SAV, men metoden trenger videre utvikling (resultater ikke vist).

#### **4.4 *In vitro* type I IFN-stimulering av lakse-IgM ASC**

Interferoner har en svært viktig rolle i det medfødte forsvaret mot virus hos vertebrater, inkludert fisk, ved at de induserer antiviral aktivitet i ulike celler etter en virusinfeksjon. Senere forskning har vist at IFNer også kan bidra til økt adaptiv immunitet mot virus (Robertsen 2006, 2018) og undersøkelser i cellekultur på celler fra laks har vist at rekombinant IFNa, IFNb og IFNc hemmer replikasjonsveien til SAV3 (Chang et al. 2016). Også DNA vaksiner hvor man har ko-injisert antigen sammen med ulike IFN-I som adjuvans er vist å indusere en sterk og langvarig nøytraliserende antistoffrespons mot ILA i serum allerede 10 uker, og ut 22 uker, etter im. injeksjon hos laks (Robertsen et al. 2016). Hvordan IFNer bidrar til økningen av antistoff *in vivo* er fortsatt ukjent i laks. Med bakgrunn i dette ønsket vi å studere om tilsetning av IFNer til leukocytter fra laks i kultur ville påvirke B-cellenes evne til å produsere IgM.

Vi stimulerte først leukocytter fra milt med ulike konsentrasjoner av IFNa1 uten å kunne påvise en signifikant økning av IgM ASC. Også for leukocytter fra hodenyre stimulert med IFNa, IFNb og IFNc kunne vi ikke påvise en signifikant effekt. I dette forsøket hvor cellene ble stimulert i 11 dager før ELISpot avlesningen, fant vi at celler behandlet med IFNc gav noe økning i nivået av ASC sammenlignet med ubehandlet kontroll og de andre IFNene. Dette var en svært interessant tendens, men dessverre ble det ikke tid til å følge dette opp med flere forsøk for eventuelt å bekrefte eller avkrefte i den tiden jeg hadde til rådighet. For de andre IFNene ble det observert en negativ effekt av stimuleringene på antallet ASC både ved dag 5 og dag 11. De ulike IFNene har forskjellig biologisk aktivitet, men man vet lite om hvilke direkte funksjoner de har i immunsystemet utenom deres antivirale aktivitet. Det virker som at IFNc kan stimulere leukocytter på en annen måte enn de andre IFNene. En lignende forsinket effekt mot ILAV ble også observert etter ko-injeksjon av et plasmid som kodet for IFNc på laks, mens

IFN $\alpha$  og IFN $\beta$  ikke hadde denne effekten (Robertsen et al. 2016). Som positiv kontroll brukte vi LPS da dette er vist å indukere økt ASC in vitro tidligere (Zwollo et al. 2005).

Vår forskningsgruppe har tidligere ko-injisert TLR-agonistene CpG og poly I:C sammen med inaktivert SAV hvor vi observerte en økning i nøytraliserende antistoffer mot viruset (Thim 2016). Derfor ble poly I:C også inkludert i vårt forsøk, men heller ikke under poly I:C stimulering av lakseleukocytter kunne vi påvise en signifikant effekt på IgM ASC. Den manglende effekten av IFN på naive leukocytter i ELISpot assay kan skyldes at ELISpot ikke er korrekt optimalisert for bestemmelse av IFN-stimulerte leukocytter. Resultatene funnet i disse forsøkene er bare innledende studier på effekten av type I IFN stimulering av friske naive lakseleukocytter, fra henholdsvis milt og hodenyre, som det ikke ble tid til å følge opp videre.

## 4.5 Eksperimentelle betingelser og metode

### 4.5.1 Forsøksbetingelser

I in vivo-forsøket skulle fisken, som i alle tidligere forsøk i vår gruppe, stå på ferskvann under hele forsøksperioden. På grunn av tekniske feil ble vår forsøksfisk derimot satt på sjøvann, hvilket er problematisk på flere måter. Usikkerheten det fører med seg at fisken har stått på sjøvann er stor, og resultater fra dette forsøket kan derfor ikke direkte sammenlignes med tidligere forsøk vi har gjort på laks i ferskvann. En endring i miljø, eksempelvis flytting fra ferskvann til sjøvann før fisken er tolerant ovenfor saltvann, og smoltifisering virker stressende på fisk og øker kortisolnivået i blodplasma (Bjornsson et al. 1989; Wong et al. 2017). Vedvarende kronisk stress virker nedsettende på fiskens immunforsvar og fører til at fisken blir mer mottakelig for sykdom (Tort 2011). Immunsystemet hos anadrom fisk, som blant annet laks, er svært komplekst og varierer stort mellom fersk- og sjøvannsfasen. Det er vist at et økt kortisolnivå hemmer produksjonen av B-lymfocytter og IgM ASC responser hos anadrom fisk (Zwollo 2018) Videre er det foreslått av samme forfatter at langlevende plasmaceller med immunologisk hukommelse mest sannsynlig har en viktig rolle gjennom hele livssyklusen til anadrom fisk i beskyttelsen mot farlige mikroorganismer. I vårt forsøk observerte vi en generell nedgang i antall leukocytter etter at fisken ble flyttet på sjøvann, mest fremtredende var nedgangen i hodenyre hvor antallet ble redusert med 50%. Fisken hadde ikke smoltifisert og var mest sannsynlig heller ikke sjøvannstolerant. En markant økning i kloridnivå ble observert

i alle tre behandlingsgruppene 3 uker etter injeksjon og indikerer at fisken ikke klarte å skille ut overskuddet av salt i vannet (Figur 2, Appendix). Vi observerte også en endring i fordelingen av IgM ASC i de ulike vevene etter at fisken ble overført til sjøvann, der antallet IgM ASC i bukhule sank mens det økte i milt. Et lignende skift har også vært observert etter ip injeksjon av kortisol i karpe, hvor antall lymfocytter i bukhulen sank drastisk, mens antallet nøytrofile celler i blodet økte (Wojtaszek et al. 2002). Man vet fortsatt lite om effekten av kortisol på utviklingen av B-celler hos benfisk, men det finnes studier som har vist at et økt kortisolnivå kan nedregulere produksjonen av ASC etter infeksjon med vibriose (*Vibrio anguillarum*) i cellekultur (Maule et al. 1989).

### **4.5.2 Metodediskusjon – B-celle ELISpot for totale IgM ASC populasjoner**

Vi valgte å bruke et B-celle ELISpot assay for å kartlegge tilstedeværelse av og totalt antall IgM ASC i bukhule og systemiske organer etter ip injeksjon av inaktivert eller levende SAV. I tillegg brukte vi ELISA for å måle spesifikk antistoffrespons i serum mot SAV E2. En usikkerhet bak celletallene til hodenyre, baknyre, milt og bukhule vil være tilstede under hvert uttak. Hvor mange som gjennomfører uttakene, hvor store vevene i fisken er og hvor mye vev man får ut vil påvirke det endelige celletallet. For ELISpot assayet brukes levende celler fra flere grupper og uttakstidspunkt til å bestemme IgM ASC. Ved bruk av levende celler er riktig uttak, lagring og behandling under metodeutførelsen kritisk for å oppnå et godt resultat, spesielt når metoden innebærer veldig mange steg. Vi opplevde at celletallet i hodenyre ofte var betydelig større enn de andre vevene, mens celletallet i bukhulen alltid var for lavt til å telles i NucleoCounteren og måtte derfor telles manuelt. En annen ulempe med ELISpot metoden er bakgrunnsfarging av membranen. Ved for høy bakgrunnsfarging, som eventuelt kan skyldes en sprukket membran eller at substratet satt for lenge i brønnene, klarer ikke dataprogrammet å skille prikkene og bakgrunnen på grunn av for lav kontrast. Dette kan derimot løses med å manuelt telle prikkene i etterkant. For å unngå dette er det viktig at vaskeprosedyren gjøres så nøye som mulig slik at man unngår uspesifikk binding av IgM til membranen. Blokkering av platen med BSA før overføring av leukocytter for å hindre uspesifikk binding av IgM til membranen var også viktig for å unngå høy bakgrunnsfarging. I mine forsøk ble alle ELISpot resultatene analysert ved bruk av ImmunoSpot.

Tidligere i diskusjonen er det nevnt at en spesifikk ELISpot mot SAV ville vært nyttig for å si noe om hvor de cellene som produserer spesifikke IgM antistoffer mot SAV befinner seg. Ved å sammenligne spesifikke IgM mot SAV mot den totale IgM ASC populasjonen i de ulike vevene vil det være mulig å si noe om de humorale immunresponsene i hvert vev og hvorvidt noen av vevene er viktigere enn andre i bekjempelsen av nevnte virusinfeksjon. I ørret finnes det studier hvor man har brukt ELISpot for å påvise antigenspesifikke ASC (Bromage et al. 2004; Ma et al. 2013).

### **4.6 Videre forskning**

Videre studier på laks bør ta for seg kartlegging av antall SAV-spesifikke ASC distribuert i bukhule og systemiske organer i laksen. Etablering av en metode der en ELISpot-membran kan tildekkes med hele virus- eller bakteriepartikler vil utvilsomt være viktig for å videre kunne studere spesifikke B-celle responser hos fisk. Jørgensen-Jensen forskningsgruppa arbeider for tiden med å utvikle og optimalisere et slikt assay (pers. meddelelse Jorunn Jørgensen). Som nevnt vil et slikt assay kunne gi svar på distribusjonen av og antall SAV spesifikke IgM produserende celler i bukhule og systemiske organer, og dermed gi svar på hvilken rolle de ulike vevene har i bekjempelsen av en SAV-infeksjon.

En DNA-vaksine fra Elanko er nå på markedet i Norge, men man vet lite om betydningen B-celler har i denne typen vaksiner. Det vil derfor være interessant å bruke våre metoder til å studere dette. Nyelig eksperimentell bruk av DNA vaksiner med plasmider som koder for virale proteiner, og DNA vaksiner ko-injisert med plasmider som koder for IFN-I, er vist å stimulere immunforsvaret hos laks. Slike DNA-vaksiner, og deres påvirkning av B-celle responser i laks, er svært interessant å forske videre på. Videreutvikling av vaksiner med inaktivert SAV tilsatt TLR-ligander (Thim et al. 2014) og interferoner (Robertsen et al. 2016) som adjuvans vil også være viktig forskning for å gi fisken en bedre beskyttelse mot virussykdommer. Kartleggingen og forståelsen av smittedynamikken til SAV, og hvordan både humoral og cellemediert immunforsvar responderer i de ulike vevene hos laks under en slik virusinfeksjon vil bidra til å produsere bedre vaksiner mot SAV i fremtiden.



## 5 Konklusjon

- ◆ SAV3-smitte ip fører til redusert tilvekst hos laks.
- ◆ Lave mengder virustranskripter (nsP1) kan påvises i enkelte individer 3 uker etter ip SAV3 smitte hos laks i sjøvann. Ved 6 uker etter infeksjon påvises det høyeste nivået av virustranskripter, mens den i uke 10 er kraftig redusert.
- ◆ SAV E2-spesifikk antistoffrespons kan påvises i serum 6 og 10 uker etter smitte.
- ◆ SAV E2-spesifikk antistoffrespons i serum kunne ikke påvises hos fisk ip injisert med inaktivert SAV.
- ◆ Det var størst antall leukocytter i hodenyre og minst antall i bukhole hos naiv laks. Når fisken flyttes fra ferskvann til sjøvann før den har oppnådd saltvannstoleranse observeres en reduksjon i antall leukocytter i hodenyren som muligens kan knyttes til en stressrespons i fisken siden den ikke har saltvannstoleranse eller var smoltifisert før overføring.
- ◆ Ved ip SAV3-smitte økte antall leukocytter i bukhalen. Trolig som følge av migrasjon av leukocytter fra de systemiske organene til bukhalen siden dette sammenfalt med en nedgang i antall leukocytter i de systemiske organene.
- ◆ Frekvens IgM ASC økte i bukhole, milt og baknyre 3 uker etter smitte med SAV3. I hodenyre var ikke økningen like uttalt og det var store individuelle forskjeller i dette organet.
- ◆ Ved ip injisert inaktivert SAV hadde antall leukocytter økt 6 uker etter injeksjon, men effekten var ikke like langvarig som i gruppa smittet med levende SAV3.
- ◆ Frekvens IgM ASC etter ip injisert inaktivert SAV økte etter injeksjon, men generelt mindre uttalt og av kortere varighet enn for gruppen smittet med levende SAV3.
- ◆ Ingen økning i antall IgM-produserende celler, målt med ELISpot, kunne påvises i fornyre og milt leukocytter tilsatt ulike type I IFNer. Stimulering av leukocytter med IFNc gir en beskjeden effekt ved langtids inkubering av cellene.

## 6 Referanser

- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, David L. Baker, and Alexandra Baker. 2015. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (United States: Elsevier Health Science).
- Agius, C. 1980. 'Phylogenetic Development of Melano-Macrophage Centers in Fish', *Journal of Zoology*, 191: 11-31.
- Andersen, L., A. Bratland, K. Hodneland, and A. Nylund. 2007. 'Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *Arch Virol*, 152: 1871-83.
- Anderson, G., and Y. Takahama. 2012. 'Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection', *Trends Immunol*, 33: 256-63.
- Arkoosh, M. R., and S. L. Kaattari. 1991. 'Development of Immunological Memory in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*) .1. An Immunochemical and Cellular Analysis of the B-Cell Response', *Dev Comp Immunol*, 15: 279-93.
- Ashfaq, H., H. Soliman, M. Saleh, and M. El-Matbouli. 2019. 'CD4: a vital player in the teleost fish immune system', *Vet Res*, 50: 1.
- Bassity, E., and T. G. Clark. 2012. 'Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *PLoS One*, 7: e33196.
- Berg, A., T. Hansen, and P.G. Fjelldal. 2007. 'Bivirkninger av vaksinasjon', *Havforskningsinstituttet: Kyst og Havbruk*: 161-63.
- Bjornsson, B. T., G. Young, R. J. Lin, L. J. Deftos, and H. A. Bern. 1989. 'Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma calcium regulation, osmoregulation, and calcitonin', *Gen Comp Endocrinol*, 74: 346-54.
- Boster. 2019. 'ELISA Optimization: Checkerboard Titration'.
- Bowden, T. J., P. Cook, and J. H. Rombout. 2005. 'Development and function of the thymus in teleosts', *Fish Shellfish Immunol*, 19: 413-27.
- Bromage, E. S., I. M. Kaattari, P. Zwollo, and S. L. Kaattari. 2004. 'Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues', *J Immunol*, 173: 7317-23.
- Brudeseth, B. E., R. Wiulsrod, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K. E. Lokling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan, and K. Gravningen. 2013. 'Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming', *Fish Shellfish Immunol*, 35: 1759-68.
- Brun, E., A.B. Olsen, and L. Rørvik. 2005. 'Factors associated with outbreaks of pancreas disease in farmed Atlantic salmon.', *Abstract O-147*, 12th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, København, Danmark.
- Castro, R., B. Abos, L. Gonzalez, A. G. Granja, and C. Tafalla. 2017. 'Expansion and differentiation of IgM(+) B cells in the rainbow trout peritoneal cavity in response to different antigens', *Dev Comp Immunol*, 70: 119-27.
- Chang, C. J., J. Gu, and B. Robertsen. 2017. 'Protective effect and antibody response of DNA vaccine against salmonid alphavirus 3 (SAV3) in Atlantic salmon', *J Fish Dis*, 40: 1775-81.
- Chang, C. J., I. Jenssen, and B. Robertsen. 2016. 'Protection of Atlantic salmon against salmonid alphavirus infection by type I interferons IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\gamma$ ', *Fish Shellfish Immunol*, 57: 35-40.
- Chang, C. J., C. Robertsen, B. J. Sun, and B. Robertsen. 2014. 'Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFN $\gamma$  expression plasmid', *Vaccine*, 32: 4695-702.

- Chang, C. J., B. Sun, and B. Robertsen. 2015. 'Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model', *Vaccine*, 33: 2442-8.
- Chang, M. X., P. Nie, B. Collet, C. J. Secombes, and J. Zou. 2009. 'Identification of an additional two-cysteine containing type I interferon in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provides evidence of a major gene duplication event within this gene family in teleosts', *Immunogenetics*, 61: 315-25.
- Chaves-Pozo, E., P. Munoz, A. Lopez-Munoz, P. Pelegrin, A. Garcia Ayala, V. Mulero, and J. Meseguer. 2005. 'Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*', *Cell Tissue Res*, 320: 61-8.
- ChemoMetec. 2015. 'Brukerhåndbok for NucleoCounter NC-100'.
- Christie, K. E., D. A. Graham, M. F. McLoughlin, S. Villoing, D. Todd, and D. Knappskog. 2007. 'Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study', *Diseases of Aquatic Organisms*, 75: 13-22.
- CreativeDiagnostics. 2019. 'Innate and Adaptive Immunity: Immunobiology'.
- Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski. 1983. 'A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells', *J Immunol Methods*, 65: 109-21.
- Dahle, M. K., and J. B. Jorgensen. 2019. 'Antiviral defense in salmonids - Mission made possible?', *Fish Shellfish Immunol*, 87: 421-37.
- Deperasinska, I., P. Schulz, and A. K. Siwicki. 2018. 'Salmonid Alphavirus (SAV)', *J Vet Res*, 62: 1-6.
- Desvignes, L., C. Quantel, F. Lamour, and A. Le Ven. 2002. 'Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally infected with salmon pancreas disease virus (SPDV)', *Fish Shellfish Immunol*, 12: 77-95.
- Edholm, E. S., E. Bengten, J. L. Stafford, M. Sahoo, E. B. Taylor, N. W. Miller, and M. Wilson. 2010. 'Identification of two IgD<sup>+</sup> B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*', *J Immunol*, 185: 4082-94.
- Ellis, A. E. 1977. 'The leucocytes of fish: a review', *Journal of Fish Biology*, 11: 453-91.
- Evensen, O., and J. A. Leong. 2013. 'DNA vaccines against viral diseases of farmed fish', *Fish Shellfish Immunol*, 35: 1751-8.
- Felleskatalogen. 2016. 'Norvax Compact PD vet.', *Legemiddelindustrien, LMI.*, Kilde hentet April 2019.
- . 2017a. 'Alpha Ject micro 1PD', *Legemiddelindustrien, LMI.*, Kilde hentet April 2019.
- . 2017b. 'Aquavac PD7 vet.', *Legemiddelindustrien, LMI.*, Kilde hentet April 2019.
- . 2018. 'Clynav', *Legemiddelindustrien, LMI.*, Kilde hentet April 2019.
- Ferreira, V. L., H. H. L. Borba, A. F. Bonetti, L. P. Leonart, and R. Pontarolo. 2018. 'Cytokines and Interferons: Types and Functions', *Autoantibodies and Cytokines*.
- Fringuelli, E., H. M. Rowley, J. C. Wilson, R. Hunter, H. Rodger, and D. A. Graham. 2008. 'Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences', *J Fish Dis*, 31: 811-23.
- Graham, D. A., A. Brown, P. Savage, and P. Frost. 2012. 'Detection of salmon pancreas disease virus in the faeces and mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge', *J Fish Dis*, 35: 949-51.
- Granja, A. G., and C. Tafalla. 2019. 'Different IgM(+) B cell subpopulations residing within the peritoneal cavity of vaccinated rainbow trout are differently regulated by BAFF', *Fish Shellfish Immunol*, 85: 9-17.
- Gusel'nikov, S. V., K. O. Baranov, A. M. Najakshin, L. V. Mechetina, N. A. Chikaev, A. I. Makunin, S. V. Kulemzin, D. A. Andreyushkova, M. Stock, S. Wuertz, J. Gessner, W.

## Referanser

- C. Warren, M. Scharl, V. A. Trifonov, and A. V. Taranin. 2018. 'Diversity of Immunoglobulin Light Chain Genes in Non-Teleost Ray-Finned Fish Uncovers IgL Subdivision into Five Ancient Isotypes', *Front Immunol*, 9: 1079.
- Haugarvoll, E., I. Bjerkas, B. F. Nowak, I. Hordvik, and E. O. Koppang. 2008. 'Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon', *J Anat*, 213: 202-9.
- Hedfors, I. A., H. Bakke, K. Skjodt, and U. Grimholt. 2012. 'Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon', *Fish Shellfish Immunol*, 33: 1199-206.
- Hellebø, A., A. Stene, and V. Aspehaug. 2014. 'Potensielle reservoarer for SAV og PMCV på marine akvakulturanlegg.', *Møreforskning MARIN*, MA 14-07.
- Hjeltnes, B., B. Bang Jensen, G. Bornø, A. Haukaas, and Walde C S. (red). 2019. 'Fiskehelse rapporten 2018'.
- Hodneland, K., A. Bratland, K. E. Christie, C. Endresen, and A. Nylund. 2005. 'New subtype of salmonid alphavirus (SAV), Togaviridae, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway', *Diseases of Aquatic Organisms*, 66: 113-20.
- Hodneland, K., and C. Endresen. 2006. 'Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan)', *J Virol Methods*, 131: 184-92.
- Hordvik, I. 2015. 'Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*', *Biomolecules*, 5: 166-77.
- Hosteland, L. T. S. 2018. 'Elanco sin DNA-vaksine offisielt lansert', *Kyst*, Kilde sett April 2019.
- Houghton, G., and A. E. Ellis. 1996. 'Pancreas disease in Atlantic salmon: Serum neutralisation and passive immunisation', *Fish Shellfish Immunol*, 6: 465-72.
- Ichinohe, T., T. Miyama, T. Kawase, Y. Honjo, K. Kitaura, H. Sato, I. T. Shin, and R. Suzuki. 2018. 'Next-Generation Immune Repertoire Sequencing as a Clue to Elucidate the Landscape of Immune Modulation by Host-Gut Microbiome Interactions', *Front Immunol*, 9: 668.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. 'Virus interference. I. The interferon', *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147: 258-67.
- Jansen, M. D., B. Bang Jensen, M. F. McLoughlin, H. D. Rodger, T. Taksdal, H. Sindre, D. A. Graham, and A. Lillehaug. 2017. 'The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge', *J Fish Dis*, 40: 141-55.
- Jansen, M. D., T. Taksdal, M. A. Wasmuth, B. Gjerset, E. Brun, A. B. Olsen, O. Breck, and M. Sandberg. 2010. 'Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008', *J Fish Dis*, 33: 391-402.
- Jenberie, S., H. L. Thim, J. O. Sunyer, K. Skjodt, I. Jensen, and J. B. Jorgensen. 2018. 'Profiling Atlantic salmon B cell populations: CpG-mediated TLR-ligation enhances IgM secretion and modulates immune gene expression', *Sci Rep*, 8: 3565.
- Jensen, B. B., A. B. Kristoffersen, C. Myr, and E. Brun. 2012. 'Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture', *Diseases of Aquatic Organisms*, 102: 23-U33.
- Johansen, L. H., H. L. Thim, S. M. Jorgensen, S. Afanasyev, G. Strandskog, T. Taksdal, K. Fremmerlid, M. McLoughlin, J. B. Jorgensen, and A. Krasnov. 2015. 'Comparison of transcriptomic responses to pancreas disease (PD) and heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *Fish Shellfish Immunol*, 46: 612-23.
- Jorgensen, J. B., A. Johansen, B. Stenersen, and A. I. Sommer. 2001. 'CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

- leucocytes to produce supernatants with antiviral activity', *Dev Comp Immunol*, 25: 313-21.
- Karlsen, M., T. Tingbo, I. T. Solbakk, O. Evensen, A. Furevik, and A. Aas-Eng. 2012. 'Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family Togaviridae)', *Vaccine*, 30: 5688-94.
- Koppang, E. O., U. Fischer, L. Moore, M. A. Tranulis, J. M. Dijkstra, B. Kollner, L. Aune, E. Jirillo, and I. Hordvik. 2010. 'Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue', *J Anat*, 217: 728-39.
- Korytar, T., J. Jaros, M. Verleih, A. Rebl, G. Kotterba, C. Kuhn, T. Goldammer, and B. Kollner. 2013. 'Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Fish Shellfish Immunol*, 35: 1192-9.
- Kryvi, H., and T. Poppe. 2016. 'Fiskeanatomy', *Fagbokforl.*
- Le Bon, A., G. Schiavoni, I. D'Agostino, F. Gresser, F. Belardelli, and D.F. Tough. 2001. 'Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo', *Immunity*, 14: 461-70.
- Lewis, K. L., N. Del Cid, and D. Traver. 2014. 'Perspectives on antigen presenting cells in zebrafish', *Dev Comp Immunol*, 46: 63-73.
- Longhi, M. P., C. Trumpfheller, J. Idoyaga, M. Caskey, I. Matos, C. Kluger, A. M. Salazar, M. Colonna, and R. M. Steinman. 2009. 'Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4<sup>+</sup> Th1 immunity with poly IC as adjuvant', *J Exp Med*, 206: 1589-602.
- Lovoll, M., L. Austbo, J. B. Jorgensen, E. Rimstad, and P. Frost. 2011. 'Transcription of reference genes used for quantitative RT-PCR in Atlantic salmon is affected by viral infection', *Vet Res*, 42: 8.
- Ma, C., J. Ye, and S. L. Kaattari. 2013. 'Differential compartmentalization of memory B cells versus plasma cells in salmonid fish', *Eur J Immunol*, 43: 360-70.
- Magnadottir, B. 2006. 'Innate immunity of fish (overview)', *Fish Shellfish Immunol*, 20: 137-51.
- . 2010. 'Immunological control of fish diseases', *Mar Biotechnol (NY)*, 12: 361-79.
- Maule, A. G., R. A. Tripp, S. L. Kaattari, and C. B. Schreck. 1989. 'Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)', *J Endocrinol*, 120: 135-42.
- MBL. 2019. 'Indirect ELISA'.
- McLoughlin, M. F., and D. A. Graham. 2007. 'Alphavirus infections in salmonids--a review', *J Fish Dis*, 30: 511-31.
- McVicar, A. J. 1987. 'Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and early pathology', *Aquaculture*, 67: 71-78.
- Moriette, C., M. LeBerre, S. K. Boscher, J. Castric, and M. Bremont. 2005. 'Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the Sleeping disease virus, an aquatic alphavirus', *J Gen Virol*, 86: 3119-27.
- Munro, A. L. S., A. E. Ellis, A. H. Mcvicar, H. A. Mclay, and E. A. Needham. 1984. 'An Exocrine Pancreas Disease of Farmed Atlantic Salmon in Scotland', *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37: 571-86.
- Nakanishi, T., H. Toda, Y. Shibasaki, and T. Somamoto. 2011. 'Cytotoxic T cells in teleost fish', *Dev Comp Immunol*, 35: 1317-23.
- Nelson, R. T., M. F. Mcloughlin, H. M. Rowley, M. A. Platten, and J. I. McCormick. 1995. 'Isolation of a Toga-Like Virus from Farmed Atlantic Salmon *Salmo salar* with Pancreas Disease', *Diseases of Aquatic Organisms*, 22: 25-32.

- Olsen, A. B., and C. Wangel. 1997. 'An outbreak of PD-like disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Norway.', *European Association of Fish Pathologists 8th International Conference "Diseases of Fish and Shellfish"*, Edinburgh, Poster-062.
- Olsvik, P. A., K. K. Lie, A. E. Jordal, T. O. Nilsen, and I. Hordvik. 2005. 'Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon', *BMC Mol Biol*, 6: 21.
- Penaranda, M. M. D., I. Jensen, L. G. Tollersrud, J. A. Bruun, and J. B. Jorgensen. 2019. 'Profiling the Atlantic Salmon IgM(+) B Cell Surface Proteome: Novel Information on Teleost Fish B Cell Protein Repertoire and Identification of Potential B Cell Markers', *Front Immunol*, 10: 37.
- Petterson, E., M. Stormoen, O. Evensen, A. B. Mikalsen, and O. Haugland. 2013. 'Natural infection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants', *J Gen Virol*, 94: 1945-54.
- Press, C.M., and O. Evensen. 1999. 'The morphology of the immune system in teleost fishes.', *Fish Shellfish Immunol*, 9: 309-18.
- Reite, O. B., and O. Evensen. 2006. 'Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells', *Fish Shellfish Immunol*, 20: 192-208.
- Rezzani, R., L. Nardo, G. Favero, M. Peroni, and L. F. Rodella. 2014. 'Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview', *Age (Dordr)*, 36: 313-51.
- Robertsen, B. 2006. 'The interferon system of teleost fish', *Fish Shellfish Immunol*, 20: 172-91.
- . 2018. 'The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon', *Dev Comp Immunol*, 80: 41-52.
- Robertsen, B., V. Bergan, T. Rokenes, R. Larsen, and A. Albuquerque. 2003. 'Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity', *J Interferon Cytokine Res*, 23: 601-12.
- Robertsen, B., C. J. Chang, and L. Bratland. 2016. 'IFN-adjuvanted DNA vaccine against infectious salmon anemia virus: Antibody kinetics and longevity of IFN expression', *Fish Shellfish Immunol*, 54: 328-32.
- Rowley, A. F., and N. A. Ratcliffe. 1988. *Vertebrate blood cells* (Cambridge University Press: Cambridge ; New York).
- Salinas, I. 2015. 'The Mucosal Immune System of Teleost Fish', *Biology (Basel)*, 4: 525-39.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nat Protoc*, 3: 1101-8.
- Sobhkhez, M., A. Krasnov, and B. Robertsen. 2018. 'Transcriptome analyses of Atlantic salmon muscle genes induced by a DNA vaccine against salmonid alphavirus, the causative agent of salmon pancreas disease (PD)', *PLoS One*, 13: e0204924.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. 'How cells respond to interferons', *Annu Rev Biochem*, 67: 227-64.
- Stene, A., A. Hellebo, H. Viljugrein, S. E. Solevag, M. Devold, and V. Aspehaug. 2016. 'Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus?', *J Fish Dis*, 39: 531-7.
- Styrvold, M. 2018. 'Karakterisering av humoral immunrespons mot salmonid alphavirus 3 i atlantisk laks (*Salmo salar* L.)', *Masters thesis*: 53-66.
- Sun, B. J., I. Skjaeveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jorgensen, and B. Robertsen. 2011. 'Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon', *Journal of Virology*, 85: 9188-98.
- Sun, B., B. Robertsen, Z. Wang, and B. Liu. 2009. 'Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties', *Dev Comp Immunol*, 33: 547-58.

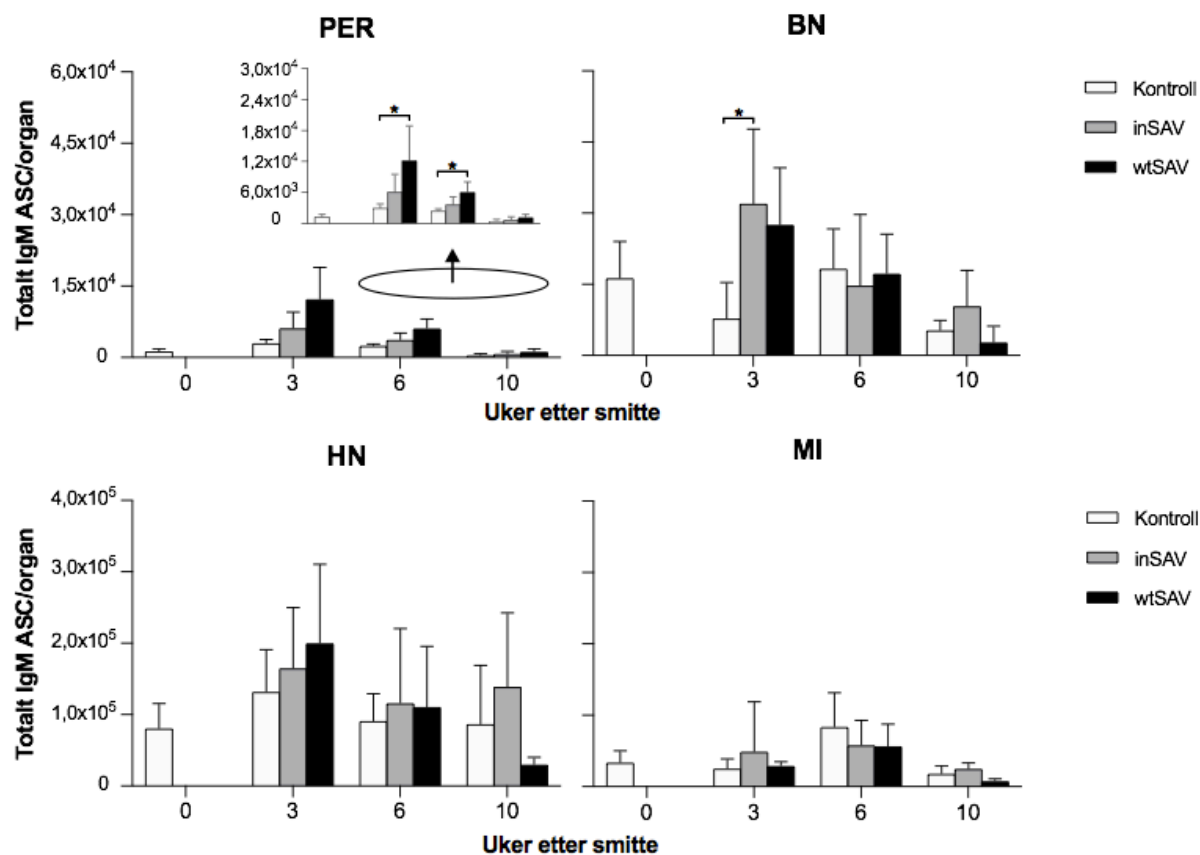
- Sunyer, J. O. 2013. 'Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system', *Nat Immunol*, 14: 320-6.
- Taksdal, T., B. B. Jensen, I. Bockerman, M. F. McLoughlin, M. J. Hjortaa, A. Ramstad, and H. Sindre. 2015. 'Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway', *J Fish Dis*, 38: 1047-61.
- Taksdal, T., A. B. Olsen, I. Bjerkas, M. J. Hjortaa, B. H. Dannevig, D. A. Graham, and M. F. McLoughlin. 2007. 'Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway', *J Fish Dis*, 30: 545-58.
- ThermoFisher. 2019. 'FluoroSpot Pre-Screening with Thermo Scientific Microplate Readers'.
- Thim, H. L. 2016. 'Adjuvant combinations with the Toll-like receptor ligand CpG', *A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor*.
- Thim, H. L., D. B. Iliev, K. E. Christie, S. Villoing, M. F. McLoughlin, G. Strandskog, and J. B. Jorgensen. 2012. 'Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant', *Vaccine*, 30: 4828-34.
- Thim, H. L., S. Villoing, M. McLoughlin, K. E. Christie, S. Grove, P. Frost, and J. B. Jorgensen. 2014. 'Vaccine Adjuvants in Fish Vaccines Make a Difference: Comparing Three Adjuvants (Montanide ISA763A Oil, CpG/Poly I:C Combo and VHSV Glycoprotein) Alone or in Combination Formulated with an Inactivated Whole Salmonid Alphavirus Antigen', *Vaccines (Basel)*, 2: 228-51.
- Tort, L. 2011. 'Stress and immune modulation in fish', *Dev Comp Immunol*, 35: 1366-75.
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, and G. Moran. 2011. 'Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review', *Veterinarni Medicina*, 56: 486-503.
- Uribe, M. C., and H. J. Grier. 2011. 'Oogenesis of microlecithal oocytes in the viviparous teleost *Heterandria formosa*', *J Morphol*, 272: 241-57.
- Weiland, G. 1978. '[The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)--a new serodiagnostic method for the detection of parasitic infections (author's transl)]', *MMW Munch Med Wochenschr*, 120: 1457-60.
- Weston, J., S. Villoing, M. Bremont, J. Castric, M. Pfeffer, V. Jewhurst, M. McLoughlin, O. Rodseth, K. E. Christie, J. Koumans, and D. Todd. 2002. 'Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection', *J Virol*, 76: 6155-63.
- Wojtaszek, J., D. Dziewulska-Szwajkowska, M. Lozinska-Gabska, A. Adamowicz, and A. Dzugaj. 2002. 'Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood', *Gen Comp Endocrinol*, 125: 176-83.
- Wold, M. F. 2018. 'The distribution, expression pattern and effects of TNF superfamily members BAFF and APRIL in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and salmon derived leukocytes', *Masters thesis*: 49-52.
- Wong, M. K. S., T. Tsukada, N. Ogawa, S. Pipil, H. Ozaki, Y. Suzuki, W. Iwasaki, and Y. Takei. 2017. 'A sodium binding system alleviates acute salt stress during seawater acclimation in eels', *Zoological Lett*, 3: 22.
- Xu, C., T. C. Guo, S. Mutoloki, O. Haugland, and O. Evensen. 2012. 'Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon', *Vet Res*, 43: 78.
- Xu, C., T. C. Guo, S. Mutoloki, O. Haugland, I. S. Marjara, and O. Evensen. 2010. 'Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro', *J Virol*, 84: 8903-12.

## Referanser

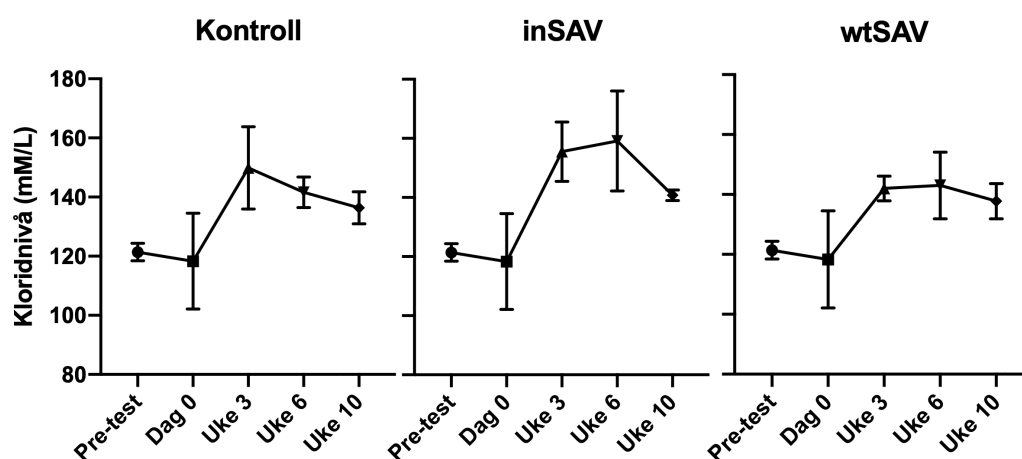
- Ye, J., I. Kaattari, and S. Kaattari. 2011. 'Plasmablasts and plasma cells: Reconsidering teleost immune system organization', *Developmental & Comparative Immunology*, 35: 1273-81.
- Zapata, A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutierrez-de Frias, and A. Cortes. 2006. 'Ontogeny of the immune system of fish', *Fish Shellfish Immunol*, 20: 126-36.
- Zhang, Y. A., I. Salinas, J. Li, D. Parra, S. Bjork, Z. Xu, S. E. LaPatra, J. Bartholomew, and J. O. Sunyer. 2010. 'IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity', *Nat Immunol*, 11: 827-35.
- Zhang, Y. A., I. Salinas, and J. Oriol Sunyer. 2011. 'Recent findings on the structure and function of teleost IgT', *Fish Shellfish Immunol*, 31: 627-34.
- Zou, J., B. Gorgoglione, N. G. Taylor, T. Summather, P. T. Lee, A. Panigrahi, C. Genet, Y. M. Chen, T. Y. Chen, M. Ul Hassan, S. M. Mughal, P. Boudinot, and C. J. Secombes. 2014. 'Salmonids have an extraordinary complex type I IFN system: characterization of the IFN locus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals two novel IFN subgroups', *J Immunol*, 193: 2273-86.
- Zou, J., and C. J. Secombes. 2011. 'Teleost fish interferons and their role in immunity', *Dev Comp Immunol*, 35: 1376-87.
- Zwollo, P. 2018. 'The humoral immune system of anadromous fish', *Dev Comp Immunol*, 80: 24-33.
- Zwollo, P., S. Cole, E. Bromage, and S. Kaattari. 2005. 'B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney', *J Immunol*, 174: 6608-16.
- Zwollo, P., A. Haines, P. Rosato, and J. Gumulak-Smith. 2008. 'Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers', *Dev Comp Immunol*, 32: 1482-96.



## Appendix



**Figur 1. Totalt antall IgM ASC målt i bukhole, hodenyre, bakenyre og milt etter ip injeksjon av inaktivert SAV eller levende SAV på atlantisk laks. Totalt antall IgM ASC i bukhole (PER), hodenyre (HN), bakenyre (BN) og milt (MI) før, og tre, seks og ti uker etter, ip injeksjon av inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV). Den innskutte grafen viser totalt antall IgM ASC i bukhole med egen y-akse skala.**



**Figur 2. Kloridnivå målt i serum fra atlantisk laks etter ip injeksjon av inaktivert SAV eller levende SAV. Kloridnivå (mM/L) i serum før injeksjon, og tre, seks og ti uker etter ip injeksjon av PBS (kontroll), inaktivert SAV (inSAV) eller levende SAV (wtSAV). Punktene viser gjennomsnittsverdier ± standardavvik (n=8).**