

Vaksinering og smoltifisering av atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

- *Betydning av sjøvannstoleranse for mottakelighet for infeksjøs pankreas nekrose (IPN)*

—

Mathias Overrein

Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)

November 2015

Forord

Arbeidet presentert i denne masteroppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø - Norges arktiske universitet og Havbruksstasjonen i Kårvika, i perioden november 2014 til november 2015.

Først vil jeg vise min takknemlighet til min hovedveileder, **Ingvill Jensen**, og min bi-veileder, **Tore Seternes**, for at dere introduserte meg til dette interessante prosjektet og ga meg mulighet til å skrive en så variert master. Ingvill, din tålmodighet, stoiske ro, og ikke minst faglige kompetanse har gjort dette året til et lærerikt og behagelig år for meg. Tore, ditt engasjement og dine ambisjoner for oppgaven har vært svært verdifull. I tillegg har jeg lært en del om dobbelt- og trippelsjekking av alt som kan gå galt. Døren har alltid vært åpen og latteren sittet løst.

Min eksterne bi-veileder, **Børge Nilsen Fredriksen**, fortjener også umåtelig med ros. Uten deg hadde jeg aldri fått muligheten til å være med på dette forsøket. Du har alltid tatt deg tid til å slå av en prat, og har gitt meg mange nyttige tilbakemeldinger gjennom hele masterprosessen. Det setter jeg veldig pris på.

*I would also like to express my gratitude towards **Shiferaw Jenberie** and **Baojian Sun** for all your help and guidance regarding ELISA and real-time qPCR. Our discussions have increased my knowledge significantly.*

Jeg vil også takke **Jan Eirik Jensen** og **Morten Marienborg** ved Havbruksstasjonen i Tromsø for verdifull hjelp med gjennomføring av forsøket. Jeg skylder også en takk til **Helge K. Johnsen** som lærte meg om klorid- og osmolalitätsanalyser.

Til alle mine medstudenter og venner på kontoret - jeg kommer til å savne dere alle! Spesielt **Iris Jensen** og **Renate Andersen**. Dere har gitt meg mye latter, livsvisdom og gode minner.

Mathias Overrein



Tromsø, november 2015

Sammendrag

Dødelighet hos smolt etter sjøutsett er et stort problem for lakseoppdrettsnæringen, og en betydelig del av all fisk som settes ut i havet når ikke konsum. Nøyte overvåking og analysering av smolten gjøres for å sikre at den skal håndtere overgangen fra ferskvann til sjøvann på best mulig måte. Tross dette har man ikke klart å kartlegge nøyaktig hvorfor så mange fisk dør i starten av sjøfasen, og skylden legges ofte på ”dårlig smolt”. I vinterperioden før utsett vaksineres fisken mot de mest vanlige sykdommene som kan ramme norske oppdrettsanlegg. Disse har stort sett veldig god effekt og skal ha mye av æren for den kraftige veksten i næringen de siste fem-og-tjue årene. Riktig nok ser man fortsatt utbrudd av sykdommer som, med tanke på vaksineeffekten sett i laboratorieforsøk, burde vært tilnærmet utryddet. Én av disse er virussykdommen infeksiøs pankreas nekrose (IPN) som er utbredt hos laksefisk langs hele kysten av Norge og store deler av Europa. For å bedre kunne forstå hva som skjer immunologisk med laksen under smoltifiseringen, og hva som kan påvirke overlevelse etter sjøutsett, er det naturlig å se på hvordan vaksinert og uvaksinert fisk reagerer på sykdom i ulike stadier av smoltifiseringen. Dette kan bidra til økt forståelse for når i smoltifiseringsprosessen fisken er mest følsom for sykdom, og om smoltstatus påvirker responsen til vaksinen.

I dette forsøket ble atlantisk laks (*Salmo salar* L.) utsatt for sommerstimuli i én, tre og seks uker før overføring til sjøvann. Disse tre smoltifiseringsregimene skulle framprovosere smolt med tre ulike grader av smoltifisering. Innenfor hvert regime var det to grupper: én uvaksinert gruppe og én gruppe vaksinert med en kommersielt tilgjengelig vaksine mot IPN. Fisken ble overført til sjøvann og smittet med infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV). Monitorering av dødelighet, samt prøvetaking av organer og blod, pågikk i syv uker etter smitte. Smoltindeks, osmolalitet- og kloridverdier i serum, vekstmålinger og Na^+/K^+ -ATPase aktivitet i gjellene viste at tre ulike grader av smoltifisering ble oppnådd. Dødelighetstallene viste at vaksinert fisk var godt beskyttet mot sykdommen, uavhengig av smoltstatus. For den uvaksinerte smolten var dødeligheten høyest hos den gruppen fisk som gjennomgikk antatt optimal smoltifisering og lavest hos den antatt dårligst smoltifiserte gruppen. Osmoregulatoriske problemer som følge av dårlig smoltifisering fører til økt stress og dårlig vekst hos fisken etter sjøutsett. Dette kunne man forvente ville økt mottakeligheten for IPN og dermed forhøyet dødeligheten hos antatt dårligst smoltifisert fisk, men resultatene viste det motsatte. Disse resultatene gir indikasjoner på at fysiologiske og immunologiske prosesser i laksen tidlig i smoltifiseringsprosessen beskytter den mot sykdom i større grad enn for antatt optimalt smoltifisert fisk. For å belyse årsakene til dette ble ELISA og *real-time* qPCR brukt for å måle antistoffrespons i blod, samt uttrykk av antivirale gener og tilstedeværelse av virus i hodenyre hos fisk fra alle forsøksgruppene.

Abstract

Smolt mortality after sea transfer is a considerable problem for the salmon farming industry, and a significant amount of fish does not reach human consumption. Thorough monitoring of the fish prior to transfer is done to ensure that they have the best possible chance for survival. Despite these efforts, no clear answer to explain the high rate of mortality has been discovered. During the winter period, smolts are vaccinated against the most common diseases seen along the Norwegian coast. These vaccines have revolutionized the farming industry and is largely the reason for the tremendous growth seen the last twenty-five or so years. This said, there are still outbreaks of diseases, and one of these is the virus-caused infectious pancreatic necrosis (IPN), endemic to most of Europe.

To better understand the immunological responses to the smoltification process, and the causes for mortality related to seawater transfer, it is important to investigate how vaccinated and unvaccinated fish respond to disease in different stages of the smoltification process. This could help toward a better understanding of the reasons for post-sea transfer mortality, and ultimately contribute to decreased disease outbreaks in the future.

In this experiment Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr were exposed to photo manipulation for one, three and six weeks to induce smoltification. These separated regimes would presumably produce smolt in three different stages of the smoltification process. Within each regime there were two groups: one unvaccinated and one vaccinated with a commercially available vaccine against IPN. The fish were then transferred to seawater and infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Mortality was monitored for seven weeks, and blood- and organ samples were collected weekly. The results showed that three different stages of smoltification in salmon were achieved. Mortality-data demonstrated a high degree of vaccine protection regardless of smoltification regimes. Amongst the unvaccinated fish the mortality was highest for the group that by all accounts was best smoltified and lowest for the group presumably worst smoltified. Osmoregulatory issues due to insufficient smoltification leads to stress and stunted growth after seawater transfer. Presumably this would lead to increased susceptibility to IPN, and thus elevated mortality in the worst smoltified group, but the results showed the contrary. There are thus indications of physiological and immunological changes being more beneficial for protection against IPN for smolt in early stages of the smoltification process compared to the presumed optimally smoltified fish. To further investigate this issue, ELISA and real-time qPCR was performed to measure production of antibodies in blood, as well as antiviral gene expression, and presence of virus in headkidney of fish from all groups.

Forkortelser

AJm6	ALPHA JECT micro 6	NK	Natural killer cells
Ala	Alanin	NKA	Na ⁺ /K ⁺ - ATPase
ANOVA	Analysis of variance	NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ kotransporter
APC	Antigen presenterende celler	nm	Nanometer
ATPase	Adenosin trifosfatase	NVI	Norges Veterinærinstitutt
AU	Antigenicity units	OD	Optisk tetthet
BCR	B-celle reseptor	PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
cDNA	Komplementært DNA	PBS	Fosfatbufret saltvann
CHSE	Chinook salmon embryo	PD	Pankreassykdom
CMS	Cardiomyopatisyndrom	PLGA	poly-lactic-glycolic-acid
Ct	Threshold cycle	ppm	Parts-per million
CTFR	Cystic fibrosis transmembrane regulator	Pro	Prolin
CTL	Cytotoksiske T-celler	PRR	Pattern recognition reseptorer
DC	Dendritiske celler	QTL	Quantitative trait loci
dsDNA	Dobbeltrådig DNA	RIG-1	Retinoic acid-inducible gene I
dsRNA	Dobbeltrådig RNA	RLR	retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) liknende reseptorer
ELFα1	Elongeringsfaktor-1 α	RPS	Relative percent survival
GH	Veksthormon/Growth hormone	RT qPCR	Kvantitativ real-time polymerase chain reaction
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse	SAV	Salmonid alfavirus
IFN	Interferon	SEM	Standard error of the mean
Ig	Immunoglobulin	ssDNA	Enkeltrådig DNA
IGF-1	Insulin-lignende vekstfaktor 1	ssRNA	Enkeltrådig RNA
IL-6	Interleukin 6	TH ₁	T-hjelpecelle /CD4+ T celle
ILA	Infeksiøs lakseanemi	Thr	Threonin
ILAV	Infeksiøs lakseanemi virus	TLR	Toll lignende reseptorer
ILV	Interbrakialt lymfoid vev	T ₃	Trijodtyronin
IPN	Infeksiøs pankreas nekrose	T ₄	Tyrosin
IPNV	Infeksiøs pankreas nekrose virus	Vig-1	Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) induced gene-1
ISG15	Interferon stimulated gene 15kDa	VP	Virus protein
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2	6L:18M	6 timer lys, 18 timer mørke
LPS	Lipopolisakkarid	12L:12M	12 timer lys, 12 timer mørke
MHC	Major histocompatibility complex	24L:0M	24 timer lys, 0 timer mørke
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5		

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
1.1 Introduksjon	1
1.2 Formålet med oppgaven	1
2. Bakgrunn	4
2.1 Infeksiøs pankreas nekrose (IPN)	5
2.1.1 Historikk og epidemiologi.....	5
2.1.2 Klinikk.....	6
2.1.3 Smitte og spredning i vert.....	7
2.1.4 Patologi	8
2.1.5 Dagens sykdomsbilde i Norge	10
2.2 Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV)	11
2.2.1 Kapsidproteinet VP2 og virulens.....	13
2.2.2 Vaksiner mot IPN.....	14
2.3 Smoltifisering hos laksefisk	15
2.3.1 Fysiologiske endringer	15
2.3.2 Morfologiske endringer	16
2.3.3 Atferdsendringer.....	17
2.3.4 Kommersiell produksjon av smolt	17
2.4 Immunforsvaret til beinfisk	20
2.4.1 Immunologiske organer og celler.....	20
2.4.2 Immunrespons mot virus	21
2.4.3 Humoral immunitet	22
2.4.4 Smoltifiseringens påvirkning på immunforsvaret	23
3. Materialer og metoder	25
3.1 Forsøksfisk	25
3.2 Forsøksoppsett	25
3.2.1 Gruppeinndeling og vaksinerings.....	25
3.2.2 Lysregime og smoltifisering	26
3.2.3 Smitte med IPNV.....	27
3.3 Prøveuttak	28
3.3.1 Organ- og bloduttak.....	28
3.3.2 Separering av serum/plasma fra blodcellene	29

3.4 Bestemmelse av smoltindeks	29
3.5 Sjøvannstest.....	29
3.6 Målinger av Na⁺/K⁺-ATPase aktiviteten i gjellevev.....	29
3.7 Måling av klorid og osmolalitet i serum.....	30
3.7.1 Kloridmålinger i serum.....	30
3.7.2 Måling av osmolalitet i serum.....	30
3.8 ELISA.....	31
3.8.1 Inaktivering og dialyse av IPNV	32
3.8.2 Utføring av ELISA	32
3.9 Kvantitativ <i>real-time</i> PCR	33
3.9.1 RNA-ekstraksjon fra hodenyre.....	34
3.9.2 cDNA syntese.....	35
3.9.3 RT qPCR	35
3.9.4 Primere.....	36
3.9.5 Behandling av data	37
3.10 Statistiske analyser og grafiske framstillinger	37
4. Resultater.....	38
4.1 Analyse av smoltstatus etter ulike lysbehandlingsregimer	38
4.2 Dødelighet etter kohabitantsmitte med IPNV.....	43
4.3 Antistoffrespons etter smitte med IPNV	46
4.4 Påvisning av virus	48
4.5 Uttrykk av antivirale gener hos smolt smittet med IPNV	49
5. Diskusjon.....	51
5.1 Dokumentering av smoltstatus	51
5.1.1 Smoltindeks og vekst.....	51
5.1.2 Kloridinnhold og osmolalitet i blod.....	52
5.1.3 ATPase-aktivitet i gjellevev	54
5.1.4 Oppsummering av smoltstatus.....	55
5.1.5 Alternative indikatorer for smoltifisering.....	56
5.2 Smoltifiseringsprosessens påvirkning på mottakelighet for IPN.....	56
5.2.1 Kan kortisol svekke immunforsvaret, men øke sjøvannstoleranse?	56
5.2.2 Oppregulering av immunforsvaret grunnet økt endokrinologisk aktivitet.....	58
5.2.3 Kommer vekst på bekostning av immunforsvaret?	59
5.3 Vaksinerespons nedreguleres ved igangsetting av smoltifisering	59

5.4 IPNVs påvirkning på uttrykk av antivirale gener	61
5.5 Vurdering av forsøksoppsettet og prøveuttak	63
5.6 Praktisk anvendelse av resultatene og videre forskning	64
5.7 Konklusjoner	66
6. Referanser	67
Appendiks	78

1. Innledning

1.1 Introduksjon

Innføring av vaksiner har vært uvurderlig for veksten i norsk lakseoppdrett, og skal ha mye av æren for at det i 2014 ble eksportert om lag 1 million tonn atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra Norge til utlandet. Dette tilsvarer 44 milliarder norske kroner i verdi (Norges Sjømatråd, 2014). På midten av 1970-tallet satte bakterielle sykdommer (vibriose, kaldtvannsvibriose og furunkulose) en effektiv stopper for økning i produksjonen, og store mengder antibiotika ble brukt for å bekjempe sykdommene. Effektive vaksiner med inaktiverede bakterieceller ble produsert og næringen økte kraftig (Hastein et al., 2005). Virussykdommer er nå en av de store utfordringene for oppdrettsnæringen, og det er regelmessig utbrudd av virussykdommene infeksiøs lakseanemi (ILA), pankreassykdom (PD), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og infeksiøs pankreas nekrose (IPN) (Bornø og Lie Linaker, 2015). Forskning på virusvaksiner har følgelig vært et stort satsningsområde for næringen, da noen virusvaksiner ikke har like god effekt i felt som vaksiner mot bakterielle sykdommer (Robertsen, 2011). Riktig nok kommer stadig nye vaksiner på markedet (spesielt for ILA og PD) med rapportert god effekt (Veterinærinstituttet, 2011, Nodland, 2015). Norsk oppdrettslaks har i mange år blitt vaksinert mot IPN, men sykdommen er fortsatt årsaken til betydelig økonomiske tap i form av dødelighet og dårlig tilvekst (Bornø og Lie Linaker, 2015). Spesielt er sykdommen et problem før startfôring og tiden like etter sjøsetting (B. N. Fredriksen, pers. com., 3 november, 2015). Årsakene er trolig sammensatte, men kan være knyttet til laksens smoltifiseringsprosess, og fokuset på ”dårlig smolt” har fått mer og mer oppmerksomhet de siste årene. Men hva er egentlig ”dårlig smolt”, og hvordan påvirker smoltifiseringsprosessen vaksineresponsen i fisken?

1.2 Formålet med oppgaven

Smoltifiseringsprosessen er en kritisk del av laksens livssyklus, og en nødvendighet for overlevelse i sjøvann (McCormick, 2013). Prosessen kan ta flere år, men selve vandringen til havet er gjort i løpet av et lite vindu på bare noen uker (Lundqvist og Eriksson, 1985, Staurnes et al., 1993, McCormick, 2013). Produksjon av smolt for kommersiell oppdrett handler om å tilrettelegge for et mest mulig naturlig livsforløp slik at alle fysiologiske prosesser i fiskens

tidlige fase av livet kan gjennomføres på best mulig måte. Dette er ikke alltid forenelig med høy produksjon og rask vekst. I dagens oppdrett ser man store problemer med dødelighet hos smolt etter overførsel til sjøvann og skylden legges ofte på dårlig smoltkvalitet. Mer forskning må til for å kunne utdype hva ”dårlig smolt” faktisk er.

Få studier har blitt gjort på vaksinerespons og sykdomsbeskyttelse hos smolt med ulik sjøvannstoleranse. Studier har sett på endringer i immunforsvaret til fisken under smoltifiseringsprosessen (Maule et al., 1987, Melingen et al., 1995) og smitteforsøk med infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV) har blitt gjort en rekke ganger (Stangeland et al., 1996, Taksdal et al., 1998, Ramstad et al., 2007, Munang'andu et al., 2013a, Munang'andu et al., 2013b), men en vinkling der man sammenfatter disse, og i tillegg bruker ulike smoltifiseringsregimer basert på standardiserte metoder for produksjon av smolt, er ikke gjort. Ved å smitte fisk som befinner seg på ulikt stadium i smoltifiseringsprosessen med IPNV kan man undersøke hvordan prosessen direkte påvirker evnen til å overleve sykdom både for uvaksinert og vaksinert fisk. En slik tilnærming kan øke kunnskapen rundt begrepet ”dårlig smolt”.

Hovedmål

- Undersøke hvordan ulike lysbehandlingsregimer påvirker humorale immunresponser og mottakelighet for IPN i vaksinert og uvaksinert atlantisk laks.

Delmål

1. Undersøke om tre ulike lysbehandlingsregimer kan gi ulik grad av smoltifisering hos laks.
2. Kartlegge grad av smoltifisering i fiskegruppene ved måling av osmolalitet og kloridinnhold i blodserum, Na⁺/K⁺-ATPase aktivitet i gjellene, vekt og lengde, samt undersøke ytre morfologiske markører.
3. Undersøke om ulike lysbehandlingsregimer påvirker mottakelighet for IPN i vaksinert og uvaksinert smolt.
4. Undersøke IPNV-spesifikk antistoffrespons i blodplasma (ved ELISA), og vurdere forskjeller mellom grupper eksponert for ulike lysbehandlingsregimer.
5. Undersøke tilstedeværelse av IPNV i hodenyre etter smitte, samt vurdere det relative genuttrykket av Mx, ISG15 og Viperin (ved *real-time* qPCR) i blod fra grupper fra tre ulike lysbehandlingsregimer.

2. Bakgrunn

Overføring av smolt fra ferskvann til sjøvann er en kritisk del av produksjonssyklusen og krever veldig mye av fisken. Så mye som 20% av all laks som sjøsettes når ikke til konsum, og om lag 20% av dette svignet er knyttet til dårlig smoltkvalitet (Hjeltnes, 2014). Fokuset på god smolt er følgelig stort. Det antas at en ufullstendig smoltifisert laks vil være ekstra sårbar for patogener og osmotisk stress og ikke vil ha samme tilvekst som en sjøvannsakklimatisert smolt. Laksens evne til å motstå virusinfeksjoner, som i utgangspunktet er veldig god (Robertsen, 2011), kan da trolig bli svekket.

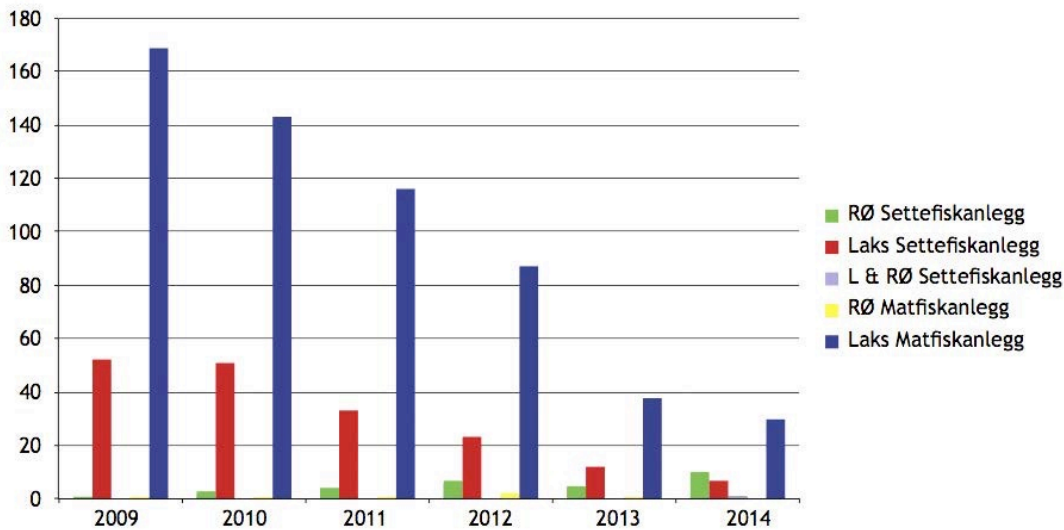
I ferskvannsfasen er det vanskelig å oppnå dødelighet ved eksperimentell smitte med IPNV. For uvaksinert parr på 19 gram har det blitt vist dødelighet på <10% ved badsmitte (B. N. Fredriksen, pers. com., 1 oktober, 2015) ved bruk av framgangsmåter kjent for å gi dødelighet (Taksdal, 1997, Santi et al., 2004). Dødeligheten ble derimot 85% ved kohabitantsmitte av den samme fiskebatchen i forbindelse med smoltifisering og sjøsetting (B. N. Fredriksen, pers. com., 1 oktober, 2015). Disse resultatene samsvarer med et studie av Johansen og medarbeidere (2009) som viste reaktivering av viruset og påfølgende økning i dødelighet etter overførsel til sjøvann (Johansen et al., 2009). Det er tydelig at noe skjer med fisken underveis i, eller etter, smoltifisering som påvirker dens evne til å overleve i sjøvannsfasen. Smitteforsøk etter overførsel til sjøvann har vist at selv smolt med god sjøvannstoleranse er mottakelig for sykdommen, og studiet demonstrerte dermed at dårlig sjøvannstoleranse ikke er nødvendig for å få dødelighet etter utsett (Taksdal et al., 1998). Samtidig ser man god beskyttelse mot sykdommen i vaksineforsøk (Ramstad et al., 2007), men fortsatt utbrudd i felt. Det er åpenbart at det er nødvendig å få en større forståelse for hva som skjer immunologisk i fisken når den utsettes for smittepress og osmoregulatorisk stress i forbindelse med smoltifisering, og om mulig anvende dette til å redusere svignet etter sjøutsett.

2.1 Infeksiøs pankreas nekrose (IPN)

IPN er en fiskesykdom forårsaket av det akvatiske birnaviruset IPNV (Dobos et al., 1979). IPN rammer et bredt spekter av fiskearter i ferskvann og sjøvann, deriblant laksefisk (Hill og Way, 1995). Sykdommen er vidt utbredt i alle lakseproduserende land og er regnet som endemisk i Europa, med unntak av Sverige (Ariel og Olesen, 2002).

2.1.1 Historikk og epidemiologi

IPN ble oppdaget allerede i 1941 hos bekkerøye (*Salvelinus fontinalis* L.) i Canada, da beskrevet som akutt katarralsk enteritt (M'gonigle, 1941). Først i 1955 ble det foreslått at sykdommen skyldtes et virus, og infeksiøs pankreas nekrose ble lagt fram som nytt navn på bakgrunn av histopatologiske funn (Wood et al., 1955). Wolf og medarbeidere (1960) isolerte agenset og beviste cytopatogen effekt hos fiskeceller (men ikke hos andre verter) selv med tilstedeværelse av antibiotika. IPNV var da det første isolerte fiskepatogene viruset (Wolf et al., 1960). I 1975 ble viruset isolert også i Norge, da fra oppdrettet regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* L.) på Vestlandet (Hastein og Krogsrud, 1976). Første utbrudd av sykdommen i Norge kom i 1985, og i siste halvdel av 1980-tallet dukket det opp stadig flere tilfeller av sykdommen hos post-smolt (Krogsrud et al., 1989). I 1991 ble 75% av alle matfiskanlegg i landet sjekket for sykdommen, og IPNV-positive prøver ble funnet på 95% av disse (oppsummert i *IPN-review* av Brun, 2003). Fra 1991 til 2002 ble det estimert at mellom 4,5-12% av all norsk smolt som ble sjøsatt døde som følge av IPN (Munro et al., 2011). Ukontrollert og åpen distribusjon av smolt fikk skylden for den raske spredningen av sykdommen, og i tidsrommet 1994-2000 var insidensen av smittede norske anlegg mellom 40-70% (Brun, 2003). Toppåret for sykdommen kom i 2009 hvor hele 223 utbrudd av sykdommen ble registrert (Figur 1), men siden da har det vært en tydelig nedgang i antall utbrudd (Bornø og Lie Linaker, 2015).



Figur 1. Antall utbrudd av IPN i settefiskanlegg og matfiskanlegg i Norge, fordelt på laks (L) og regnbueørret (RØ), i tidsrommet 2009-2014. Figuren er hentet fra Fiskehelsesrapporten 2014 (Bornø og Lie Linaker, 2015).

2.1.2 Klinik

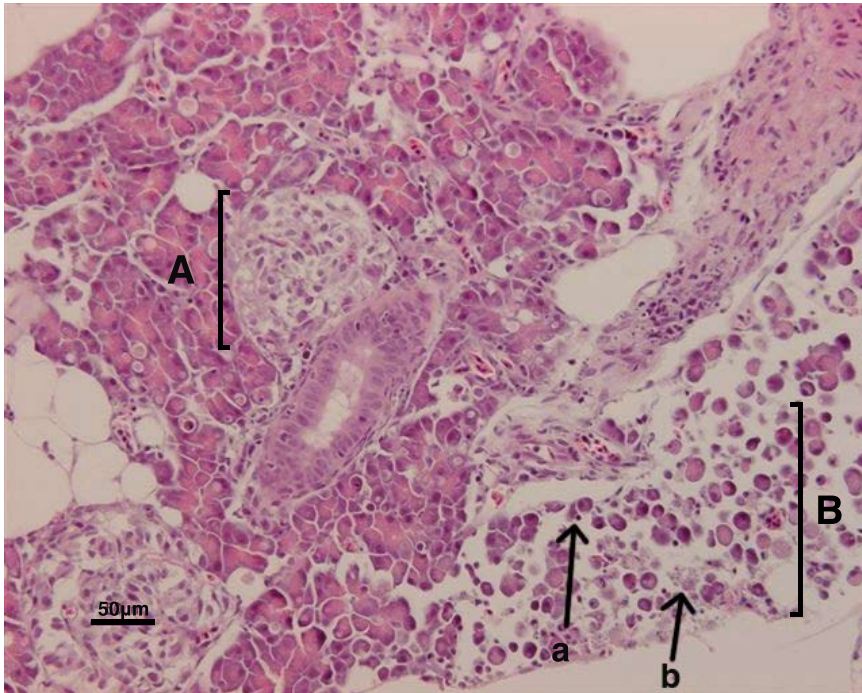
IPN ble først omtalt utelukkende som en yngelsykdom, men er nå bevist å kunne forårsake sykdomsutbrudd hos post-smolt av atlantisk laks med påfølgende dødelighet fra to uker til seks måneder etter sjøutsett (Smail et al., 1992, Bowden et al., 2002, Roberts og Pearson, 2005, Bang og Kristoffersen, 2015). Så mye som 93,6% av alle utbrudd skjer de første seks månedene etter utsett (Bang og Kristoffersen, 2015). Det er vanlig med 10-25% dødelighet hos post-smolt, men tilfeller med 50% dødelighet er påvist (Roberts og Pearson, 2005). Slike variasjoner i dødelighet har blitt vist eksperimentelt, med kohabitantsmitte i ulike kar, da satt i sammenheng med stress (Stangeland et al., 1996). Dødeligheten hos parr smittet med IPNV er rundt 10-20%, men kan komme opp i 90% hos små yngel (Roberts og Pearson, 2005). Et tidligere studie viste at viruset kan isoleres fra laksyngel 78 dager etter smitte, uten registrering av sykdomstegn (Swanson og Gillespie, 1979). Smittet smolt kan dermed tas for å være frisk fisk, overføres til sjø, med påfølgende sykdomsutbrudd som følge (Johansen et al., 2009). Faren for betydelig dødelighet er dermed tilstede både i ferskvanns- og sjøvannsfasen (Roberts og Pearson, 2005, Bruno et al., 2013).

2.1.3 Smitte og spredning i vert

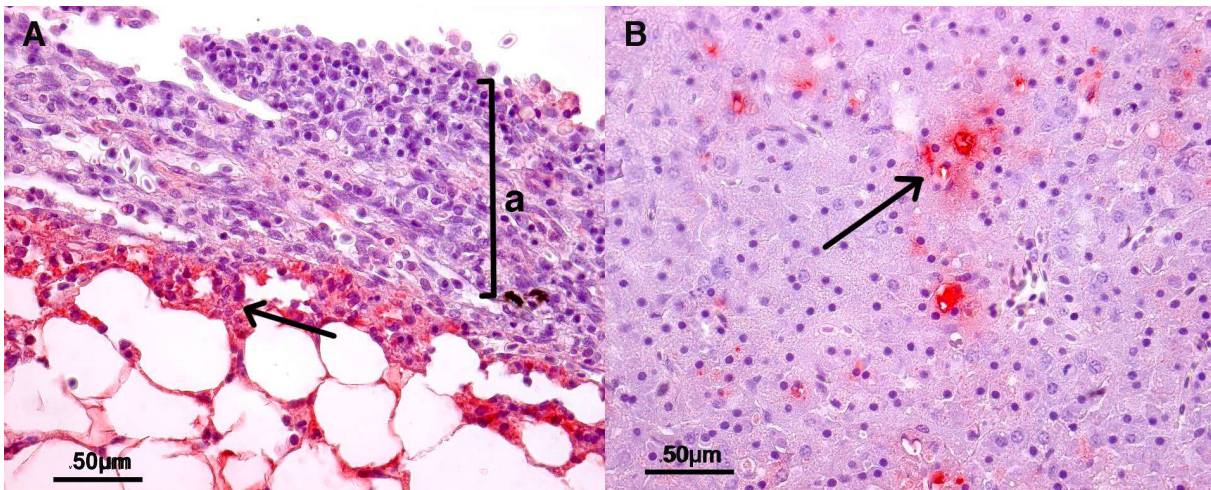
Innfallsporten for IPNV er over tarmmukosa, og trolig også gjeller (Biering, 2002), hvorpå viruset sprer seg med blodet til eksokrin pankreas for å replikere (Swanson og Gillespie, 1979, Swanson et al., 1982). Etter oral infisering av lakseyngel har viruset blitt påvist i pankreas etter tolv timer, med avgrenset degenerasjon av akinærcellene etter 3-9 dager (Swanson og Gillespie, 1979). Ved intraperitoneal injeksjon av IPNV i yngel av bekkerøye har viruset blitt påvist i akinærcellene i pankreas etter to dager, med økende grad av nekrotisering i vevet utover de første ukene (Swanson et al., 1982). Målorganet for viruset er eksokrin pankreas, men det kan spre seg til lever, milt, pylorus, nyrer, hjerte, ovarievæske og tarmer utover i sykdomsforløpet (Swanson og Gillespie, 1979, McAllister et al., 1993, Biering, 2002, Smail et al., 2006). Viruspartikler spres til nye verter horisontalt via urin og faeces som skilles ut i de frie vannmassene (Biering, 2002), hvor de kan være infektive i flere uker i ferskvann og opp til flere måneder i sjøvann (Toranzo og Hetrick, 1982). Viruset kan også spres vertikalt med kjønnsprodukter (Bootland et al., 1991). Viruspartiklene kan da befinne seg både utenpå og inne i rognkornene (ekstra- og intra-ovum), og kun virus som er utenpå rognkornene kan fjernes ved desinfisering. Viruspartikler inne i rognen er derfor en stor smittefare og kan kun avdekkes ved klinisk testing av avkommet (Bruno et al., 2013). Særs stor aktsomhet må dermed utvises av personell som jobber med stamfisk, da de kan stå ansvarlig for å spre viruset til store geografiske områder. Både injeksjon med IPNV og badsmitte har vist seg å gi bærertilstand hos bekkerøye, med varighet over sytten måneder (Bootland et al., 1991). Viruset oppnår trolig slik bærertilstand i tilsynelatende frisk laksefisk ved å ligge latent i leukocytter i blodet, makrofager i nyren- og hodenyren, samt i ovarievæske (McAllister et al., 1993, Johansen og Sommer, 1995, Munro et al., 2004, Munro et al., 2006).

2.1.4 Patologi

Lakseyngel med IPN vil i startfasen bli mørkere i huden, og framvise unormal svømmeadferd samt hyperventilasjon (Roberts og Pearson, 2005). Makroskopisk kan utstående øyne (eksoftalmus), blødninger på buken, samt laterale hevelser påvises (Bruno et al., 2013). Gule tråder fra fiskens gatt er vanlig, da mukosa i tarmen avstøtes. Leveren og milten kan bleknes og punktblødninger sees ofte i fettvevet rundt blindsekkene. Væske (ascites) i bukhulen forekommer. Nekrotisk vev i eksokrin pankreas kan påvises histopatologisk, da viruset angriper akinærcellene (Figur 2 og Figur 3). Her sees ofte tap av zymogen granuler, pyknose og karyorrhexis (Swanson og Gillespie, 1979). Nekrotisk fett- og levervev er ikke uvanlig, samt nekroser i tarmmukosa og hodenyren. Vakuolisering og vesikkeldannelse i levercellene (hepatocytter) forekommer. Etter overførsel til sjøvann vil smittet fisk kunne overleve i flere uker og måneder som mørke og tynne bærere av viruset, og utgjør da en stor smittefare (Robert og Pearson, 2005, Bruno et al., 2013).



Figur 2. Histopatologiske endringer i pankreas hos atlantisk laks med IPN. Figuren viser endokrin pankreas (Langerhanske øyer) med friskt eksokrint vev rundt (A) og nekrotisk vev i eksokrin pankreas (B). Tydelig pyknose (a) og karyorrhexis (b) kan sees (x10). Figur laget med tillatelse fra Trygve Poppe. Foto: Trygve Poppe.



Figur 3. IPNV i pankreas (A) og lever (B) hos atlantisk laks. Viruset er detektert i vevet ved bruk av immunhistokjemi. Figuren viser agenset (piler) i infiserte acinærceller i eksokrin pankreas (A) rundt adipocytterne (fettceller), samt i hepatocytter (B) i lever (x40). Pyknose kan sees hos noen celler. Lagvis akkumulering av betennelsesceller rundt pankreasvevet (a) forekommer på grunn av "vaksinitt" hos fisken (A). Figur laget med tillatelse fra Trygve Poppe. Foto: Trygve Poppe.

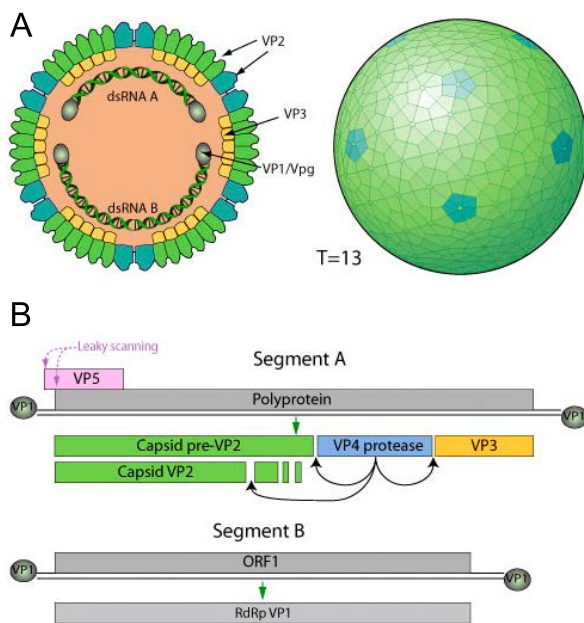
2.1.5 Dagens sykdomsbilde i Norge

Antall sykdomsutbrudd i Norge har etter lang tids forebyggende arbeid sunket, og i 2014 ble sykdommen påvist på kun 48 lokaliteter, hvorav 38 var på lokaliteter med laks (Bornø og Lie Linaker, 2015). Dette står i kontrast til 2009 da sykdommen ble påvist på hele 223 lokaliteter (Figur 1). Mye av grunnen til at antall utbrudd har stabilisert seg på et lavere nivå er systematisk avl av fisk med økt naturlig resistens mot viruset. Så mye som 10-90% variasjon i dødelighet har blitt registrert mellom ulike familier (Midtlyng et al., 2002), og laboratorieforsøk har vist at selektert avl for IPN-resistens er veldig effektivt (Storset et al., 2007, Wetten et al., 2007). AquaGen har siden starten av 1997 drevet avlsprogram for økt resistens mot IPN og i 2009 ble QTL-rogn kommersielt tilgjengelig (Wetten et al., 2007, AquaGen, 2015). QTL (*Quantitative trait loci*) er regioner på fiskens genom med spesielle antivirale egenskaper. Disse har blitt kartlagt og markert slik at man i dag kan avle fram avkom som er genetisk disponert for å kunne forsvare seg mot viruset (Midtlyng et al., 2002, Houston et al., 2008, Moen et al., 2009). Stor variasjon i genuttrykk for gener forbundet med innat immunitet, leukocyt-aktivering og antigenpresentasjon er vist for IPN-mottakelige og ikke-mottakelige familiegrupper (Reyes-López et al., 2015). Nedgangen i antall utbrudd fra 2009 til 2010 kan skyldes innføring av QTL-rogn. Et annet grep man har gjort for å bekjempe IPN i Norge er å bruke rogn fra områder som ikke har påvist IPN. Dette for å forhindre vertikal smitte.

Med færre utbrudd minker også de økonomiske tapene som følge av sykdommen. Damsgård og medarbeidere (1998) har vist at kun bærerfisk med høye konsentrasjoner av IPNV har redusert appetitt og vekst, noe som kan bety at lave infeksjoner av IPNV i et anlegg ikke utgjør store økonomiske trusler (Damsgard et al., 1998). I Norge i dag utgjør andre virussykdommer større økonomiske tap enn IPN, deriblant PD (Bornø og Lie Linaker, 2015).

2.2 Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV)

IPNV tilhører familien *Birnaviridae* og er en del av gruppen akvatiske birnavirus (Dobos et al., 1979, Villanueva et al., 2004). Viruset er nakent med genom bestående av to dobbeltrådig RNA-molekyler (dsRNA) som er beskyttet av et kapsid (lag av kapsidproteiner) som gir viruset sin ikosahedriske T=13 symmetri (Figur 4). Viruspartikkelen er mellom 60 og 70 nm i diameter og har en tetthet på 1.33 g/cm³ i CsCl (Dobos et al., 1977, Villanueva et al., 2004). Genomet består av to RNA-segmenter, A og B (Figur 4), som koder for fem virale proteiner (VP1-VP5). Segment B koder for RNA-polymerasen VP1, mens segment A koder for de resterende virale proteinene (Dobos et al., 1977, Duncan et al., 1987, Dobos, 1995, Villanueva et al., 2004, Skjesol et al., 2011). Tabell 1 viser en oversikt over de ulike virale proteinene, deres størrelse og funksjon.



Figur 4. Skjematisk framstilling av et IPNV og dets genom. Den ikosahedriske T=13 strukturen, med virusprotein 1 (VP1), virusprotein 2 (VP2) og virusprotein 3 (VP3), samt segment A og B er billedlig illustrert (A). I tillegg er hvert protein som kodes av segment A og segment B skjematisk framstilt (B). Hentet fra Viralzone (ViralZone, 2009).

Tabell 1. Oversikt over polypeptider hos IPNV. Gjenskapt fra (Fredriksen, 2006), modifisert etter (Dobos, 1995).

dsRNA segment	Protein	Mol. vekt ved PAGE	% masse i virion	Passering/funksjon
B	VP1	94 kDa	4	Indre, RNA polymerase
A	preVP2	62 - 58 kDa	-	-
A	VP2	57 - 54 kDa	62	Kapsidprotein
A	VP3	31 - 29 kDa	28	Indre strukturelt
A	VP3a	29 - 27 kDa	6	-
A	VP4	29 - 27 kDa	spor	Protease
A	VP4t	25 kDa	spor	Ukjent
A	VP5	17 kDa	ukjent	Ukjent, ikke strukturelt

Ulike serotyper av akvatiske birnavirus er funnet hos ulike verter (Hill og Way, 1995), hvor serotype Sp er den mest dominerende i norsk oppdrett (Melby og Christie, 1994) og som i forsøk har gitt dødelighet hos post-smolt (Smail et al., 1992). Innenfor serotype Sp har Norges Veterinærinstitutt (NVI) isolert flere nasjonale stammer med ulik grad av virulens (Santi et al., 2004).

Tabell 2. Ulike serotyper av akvatiske birnavirus med opprinnelsesland og vert. Gjenskapt fra (Fredriksen, 2006), modifisert etter (Hill og Way, 1995).

Serotype	Land	Opprinnelig vert
Serogruppe A		
West Buxton	USA	Regnbueørret
Sp	Danmark	Regnbueørret
Ab	Danmark	Regnbueørret
He	Tyskland	Gjedde
Te	Storbritannia	Musling
Can. 1	Canada	Atlantisk Laks
Can. 2	Canada	Atlantisk Laks
Can. 3	Canada	Røye
Jasper	Canada	Regnbueørret
Serogruppe B		
TV-1	Storbritannia	Skalldyr

2.2.1 Kapsidproteinet VP2 og virulens

VP2 (57-54 kDa) utgjør 62% av den totale mengden viralt protein og er følgelig det mest tallrike virusprotein i IPNV (Tabell 1). Det er regnet som det viktigste strukturelle proteinet for viruset (Dobos et al., 1977, Dobos, 1995, Heppell et al., 1995). Kapsidproteinet utgjør virusets ytre barriere, og dets plassering gjør at det er det viktigste proteinet for å framprovosere immunrespons hos verten (Heppell et al., 1995). VP2 prosesseres fra preVP2 når viruset modnes (Duncan et al., 1987, Villanueva et al., 2004). Studier har vist at VP2 trolig spiller en avgjørende rolle for virusets virulens (Bruslind og Reno, 2000, Santi et al., 2004).

Gensekvensanalyser av ulike IPNV-isolater har vist at VP2 trolig er avgjørende for virulensen til viruset da disse har distinkte forskjeller mellom ulike virusstammer (Santi et al., 2004, Song et al., 2005). Spesielt har aminosyrer (threonin, prolin og alanin) i posisjonene 199, 217, 221, 247, 314 og 500 på VP2 vist seg å variere. Denne variasjonen er knyttet opp mot ulik grad av virulens (Santi et al., 2004, Shivappa et al., 2004, Song et al., 2005, Munang'andu et al., 2013b, Julin et al., 2013). Thr₂₁₇ (threonin) og Ala₂₂₁ (alanin) har blitt påvist i alle høy-virulente IPNV-stammer, Pro₂₁₇ (prolin) og Ala₂₂₁ i stammer med moderat til lav-virulens, mens avirulente stammer har Thr₂₂₁ (Song et al., 2005, Skjesol et al., 2011, Julin et al., 2013). Et nyere studie av Julin og medarbeidere (2013) antyder at en endring fra isoleucine til valin i posisjon 314 også kan påvirke virulens (Julin et al., 2013). Fire vanlige aminosyre-varianter i VP2 er T₂₁₇A₂₂₁T₂₄₇, T₂₁₇T₂₂₁T₂₄₇, P₂₁₇A₂₂₁A₂₄₇ og P₂₁₇T₂₂₁A₂₄₇ (Song et al., 2005, Munang'andu et al., 2013b). I smitteforsøk har det ikke vært noen forskjell i beskyttelse mot IPN når stammer med ulik virulens har blitt brukt, og vaksinerings med en lav-virulent stamme gir beskyttelse mot en høy-virulent stamme av viruset (Munang'andu et al., 2012, Munang'andu et al., 2013b). Kapsidproteinet VP2 er nå nøye kartlagt og man vet hvilke aminosyrevariasjoner det er gunstig å bruke i vaksinerings, men optimal beskyttelse har enda ikke blitt oppnådd. Her kan smoltstatus spille en rolle.

2.2.2 Vaksiner mot IPN

Vaksiner mot IPN har vært på markedet i over tjue år, da stort sett som multivalente vaksiner sammen med bakterielle komponenter (*review* av Rimstad, 2014). Den viktigste viruskomponenten i vaksinene er VP2, enten som rekombinant protein (rVP2, uttrykt fra bakterien *Escherichia coli*) eller på overflaten til formalininaktiverte helviruspartikler (Frost og Ness, 1997, Gudding et al., 1999, Rimstad, 2014). I dag vaksineres all parr mot IPN, hovedsakelig for å forhindre sykdomsutbrudd i sjøfasen (Rimstad, 2014). Bruk av multivalente injeksjonsvaksiner har vist seg å gi beskyttelse både i felt og under kontrollerte smitteforsøk (Ramstad et al., 2007), men utbrudd av sykdommen forekommer fortsatt, så vaksinen har begrenset effekt ved start av sjøfasen. Frost og Ness (1997) viste at fisk vaksinert med rVP2 oppnådde veldig god beskyttelse mot IPN. Munang'andu og medarbeidere (2012) viste at inaktiverte helvirus formulert i en vann-i-olje emulsjon ga bedre beskyttelse enn vaksiner formulert med rVP2, helvirus i PLGA (*poly-lactic-glycolic-acid*) nanopartikler eller plasmid-DNA (Munang'andu et al., 2012). Det er ikke entydig resultater over hvilke variasjoner av vaksinen som gir best beskyttelse mot sykdommen. Forsøk med DNA-vaksiner med intramuskulære injeksjoner av plasmider (med hele, eller deler, av segment A) har også vist å gi beskyttelse mot IPN (Mikalsen et al., 2004), men veien til kommersiell tilgjengelighet er lang grunnet frykt for negative ettervirkninger for konsument og miljø.

Antigenet i vaksinene, den immunologiske komponenten som trigger immunforsvaret i fisken, blir blandet inn i en adjuvant som fungerer som en hjelpesubstans for immunforsvaret ved at den forsterker immunresponsen og hjelper til å holde antigenet samlet slik at det blir jevnt distribuert i verten over tid (Singh og O'Hagan, 2003, Tafalla et al., 2014). I kommersielle IPN-vaksiner består adjuvanten av vann-i-olje emulsjoner. Multivalente olje-adjuvant vaksiner har vist å gi redusert vekst, sammenvoksinger i bukhulen samt rygg- og vekstdeformiteter (Berg et al., 2006).

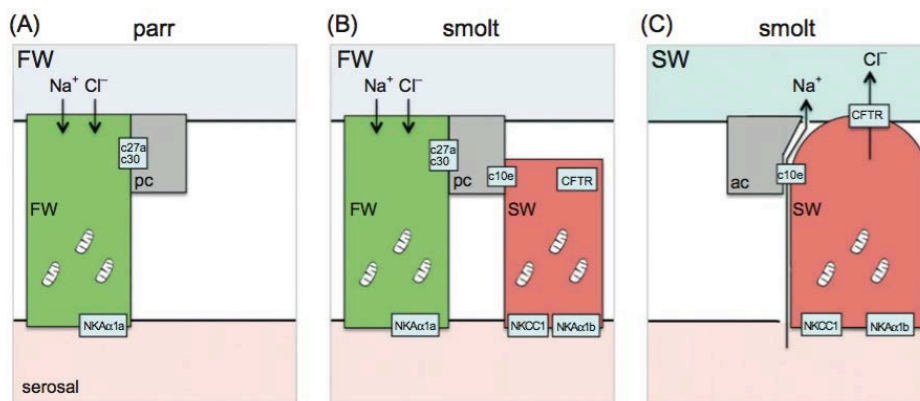
2.3 Smoltifisering hos laksefisk

Anadrom laksefisk gyter i ferskvann hvor det er mindre press fra predatorer, men vandrer ut i havet hvor det er et bredere og større utvalg av mat. I populasjoner hvor anadromi er den valgte livsstrategien har fisk som har vandret ut i havet økt mest i vekst, og har hatt størst suksess i videreføring av sine gener (Gross, 1987). Anadromi handler dermed om balansen mellom å øke reprodusiviteten og maksimerer vekst (Gross, 1987). Før parr hos anadrom laksefisk skal kunne gå fra et liv i ferskvann til en marin, pelagisk, tilværelse må de gjennomgå omfattende morfologiske, fysiologiske og atferdsmessige endringer (Folmar og Dickhoff, 1980, McCormick og Saunders, 1987, McCormick et al., 1998a, McCormick, 2013). Denne prosessen kalles smoltifisering, eller parr-smolt transformasjonen, og er svært krevende for fisken.

2.3.1 Fysiologiske endringer

Økt lysmengde på våren er trolig den viktigste faktoren for igangsetting av smoltifisering hos parr. Lysstimuli og økning i temperatur gir informasjon til hypothalamus og pinealkjertelen om tiden på året, som setter i gang en hormonell kaskadereaksjon via hypofysen som bestemmer de fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige endringene parren må igangsette (Cooke et al., 2011, Björnsson et al., 2011) McCormick, 2013). Som følge av dette øker mengde veksthormon (*growth hormone*, GH), insulin-lignende vekstfaktor 1 (IGF-1) og kortisol i fisken. Dette igangsetter endringer i metabolisme, vekst og sjøvannstoleranse (McCormick, 2013). Gjellene er området hvor ioneopptak foregår i ferskvann og hvor salter hovedsakelig sekreteres i sjøvann. Ionocytter (kloridceller) i gjellene øker i mengde og Na^+/K^+ -ATPase (NKA) aktiviteten oppreguleres for å kunne utskille store mengder salter (Langdon og Thorpe, 1985, McCormick, 2013, Sundh et al., 2014). $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporter (NKCC) i ionocytene er også essensiell ved at Na^+ pumpes fra fiskens blod over i vannet i bytte mot Cl^- , som da kan forlate blodet med den elektroniske gradienten gjennom spesifikke Cl^- -kanaler, kalt *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) (Figur 5, McCormick, 2013). Mengden NKA øker også i tarmen, og samarbeider med NKCC for å redusere det osmotiske trykket, slik at vann kan tas opp i blodet. Dette er en fysiologisk tilpasning som gjør at smolten kan drikke store mengder sjøvann for å kompensere for osmotisk vanntap, ved ione-koblet vanntransport over tarmveggen (Björnsson et al., 2011, Sundh et al., 2014). Overflødig salt i blodet, som følge av vannopptaket, blir aktivt pumpet ut over gjellene. Disse fysiologiske

tilpasningene gjør at smolten kan opprettholde normal salt- og vannbalanse i et hyperosmotisk miljø. Utskillelse av hormoner fra fiskens thyroidea (tyroksin, T_4 , og trijodtyronin, T_3) øker under smoltifiseringen (Redding et al., 1984). Disse er viktige for nedstrøms migrasjon, sølvfarging, atferdsendringer, metabolisme og tilbakevandring (Björnsson et al., 2011, McCormick, 2013). Med smoltifiseringen vil også hemoglobinet konformasjon endres til en isoform som har økt evne til binding av oksygen, en tilpasning til et liv med høyt aktivitetsnivå (Fyhn et al., 1991).



Figur 5. Skjematisk framstilling av gjelle hos laksefisk utsatt for ferskvann (FW) og sjøvann (SW) under smoltifisering. (A) Parr i ferskvann, (B) Smolt i ferskvann, (C) Smolt i sjøvann. Figuren viser at smolt i ferskvann, som gjør seg klar til sjøfasen, vil danne ionocytter med NKAA1b og innføre NKCC1 (B). I tillegg vil de danne spesifikke Cl⁻-kanaler for å pumpe Cl⁻ ut av blodet (CFTR). Smolt i SW (C) vil miste ionocytter med NKAA1a. Ionocytterne med NKAA1b vil øke i størrelse for å komme i kontakt med vannet. CFTR vil spesifikt pumpe Cl⁻ ut av blodet, mens NKCC1 effektivt pumper ut Na⁺ i bytte mot Cl⁻. NKA = Na⁺/K⁺ - ATPase, NKCC1 = Na⁺/K⁺/2Cl⁻ kontrasporter, CFTR = *cystic fibrosis transmembrane regulator*, pc = *pavement cell*, ac = *accessory cell*. Fra (McCormick, 2013) med tillatelse fra Stephen McCormick.

2.3.2 Morfologiske endringer

Parr som gjennomgår smoltifisering vil øke i lengde og generelt få en smalere, mer torpedoformet kroppsfasong, noe som medfører redusert kondisjonsfaktor (lengde-vekt raten). Dette gjør at smoltens svømmeegenskaper i åpent vann forbedres, noe som er viktig for å fange bytte og for å unngå predatorer (McCormick, 2013). Halefinneroten vil bli markant smalere og elongert (Winans og Nishioka, 1987), og det er en tydelig økning i gaffelform på halefinnen. Dette gjør svømming mer energieffektivt ved at det minker bevegelse mot sidene med hvert halefinneslag (Sfakiotakis et al., 1999). Størrelsen på bryst-, buk- og analfinne minsker relativ til størrelse på fisken utover i smoltifiseringen (Pelis og McCormick, 2003). Parr som gjennomgår smoltifisering vil miste parrmerkene sine og få et jevnt sølvfarget

ytre på grunn av økt deponering av purinene guanin og hypoxanthine i hud og skjell (Johnston og Eales, 1967). Fra å være parr med god kamuflasje mot ujevnt farget elvebunn, blir smolten markant mørkere på dorsalsiden samt på finnene og tilnærmet helt hvit på ventralsiden når den gjennomgår smoltifisering (Figur 6). Dette er på grunn av økt mengde melanoforer i huden (McCormick, 2013), og er typisk farging for pelagisk fisk. Smolten utvikler også flere tenner i munnen for å bli en mer effektiv predator (McCormick, 2013).



Figur 6. Morfologiske forskjeller mellom en parr (øverst) og en smolt (nederst) av atlantisk laks. Figur fra (McCormick, 2013) med tillatelse fra Stephen McCormick. Foto: Stephen McCormick.

2.3.3 Atferdsendringer

Fra å være veldig territoriell og aggressiv som parr vil smolten oppføre seg mer altruistisk, og stimoppførsel vil framvises instinktivt. Parr i ferskvann vil bruke de store brystfinnene sine til å ankre seg fast i elvebunnen for ikke å bli tatt av strømmen (Peake og McKinley, 1998). Positiv reotaksis (motstrøms retningsbevegelse) vil i stor grad opphøre hos smolt, som instinktivt vil migrere nedstrøms mot havet (McCormick, 2013). Smolten slipper seg ikke ned elva passivt før den er klar for det, og har stor evne til å svømme motstrøms (Peake og McKinley, 1998). Dette indikerer at den aktivt migrerer og ikke passivt blir tatt av strømmen.

2.3.4 Kommersiell produksjon av smolt

Da oppdrettsnæringen startet opp ble det kun produsert 1+ smolt, også kalt 1-åring. Denne smolten følger et tilnærmet naturlig smoltifiseringsforløp. Etter endt plommesekkperiode har fisken en lang naturlig vekstperiode fra vinter til vinter (Figur 7). Fisken blir så utsatt for

å overleve etter sjøutsett. Dødelighet hos smolt 0-3 måneder etter sjøutsett grunnet ”settefiskrelaterte faktorer” utgjorde i 2014 en veldig stor del av svignet i norsk oppdrett (Bleie og Skrudland, 2014), og utfordringene med storskala produksjon av smolt er tydelige. Riktig nok har produksjon av 0+ smolt vist seg å ikke være forbundet med økt dødelighet sammenlignet med 1+ smolt, til tross for nesten halvert tid før sjøutsett (Stefansson et al., 2005). Faktisk har 0+ smolt vist seg å ha bedre hypoosmoregulatoriske evner enn 1+ smolt, i tillegg til høyest vekstrate under like temperaturforhold (Lysfjord et al., 2004). Dette betyr at laksens modningsforløp er manipulerbart og kunstig lys fungerer. Tilveksten hos 0+ smolt er imidlertid noe lavere enn hos 1+ smolt under et vanlig, kommersielt utsett, da temperaturene utover høsten er lavere enn om våren/sommeren (Stefansson et al., 2005). I og med at 1+ smolt står en hel vinter i kar før utsett vil sjansen for finneskader (indirekte grunnet lave temperaturer) være høyere enn hos 0+ smolt (Stefansson et al., 2005).

Generelt anbefales det å vaksinere 1+ smolt i slutten av vekstperioden da fisken står på naturlig vinter med naturlig økende daglengde, men kalde temperaturer (Stefansson et al., 2005). For 0+ smolt vil vaksinering vanligvis finne sted i perioden med vinterstimuli (12L:12M) før igangsetting av sommerstimuli, 24L:0M (Stefansson et al., 2005). Temperaturen ved vaksinering av 0+ smolt vil som oftest være 8-12 °C da fisken ofte er innendørs, men vaksinering kan variere fra anlegg til anlegg (Ø. B. Markussen, pers. com., 29 oktober, 2015). Lave vanntemperaturer har vist seg å minske graden av sammenvoksinger i bukhulen, samt sjansene for ryggdeformiteter hos laks (Grini et al., 2011). Vaksinering for tett opp til start av smoltifisering kan påvirke smoltifiseringsprosessen negativt, men har ikke effekt på selve sykdomsbeskyttelsen (Eggset et al., 1999).

2.4 Immunforsvaret til beinfisk

Fisk innehar et komplekst forsvar mot patogener bestående av et innat- og et adaptivt immunforsvar, som har gitt dem enorm evolusjonær suksess (Tort et al., 2003, Magnadóttir, 2006).

2.4.1 Immunologiske organer og celler

Den største forskjellen på immunforsvaret til beinfisk og høyerestående virveldyr er at fisk mangler beinmarg og lymfeknuter (Press og Evensen, 1999). Deres oppgave utføres i stedet av hode- og baknyren, thymus, milt, samt mukosa-assosierte lymfoide vev bestående av tarm og hud i tillegg til et nylig oppdaget interbrankialt lymfoide vev (ILV) i gjellene (Press og Evensen, 1999, Morrison og Nowak, 2002, Zapata et al., 2006, Haugarvoll et al., 2008). Hodenryren, et av teleosters primære lymfoide organer, anses for å være ekvivalenten til beinmarg hos pattedyr og det er her modning av B-celler foregår (Kaattari og Irwin, 1985, Irwin og Kaattari, 1986, Hansen og Zapata, 1998). Studier har vist at baknyren og milten fungerer som sekundære lymfoide organer hos teleoster (Zwollo et al., 2005). Her kan modne B-celler vandre fra hodenryren og bli aktivert av antigen-presenterende celler (APC) og trolig også T-celler for videre differensiering til plasmaceller og plasmablaste (umodne plasmaceller), som kan produsere antistoffer på stedet eller transporteres med blodet. Langvarig immunitet, karakteristisk for det adaptive immunforsvaret, kan oppnås ved at plasmaceller vandrer tilbake til hodenryren som hukommelsesceller (Zwollo et al., 2005). T-celler modnes i thymus, og dette er det første primære lymfoide organet som differensieres under embryoutviklingen (Hansen og Zapata, 1998). Modne T-celler akkumuleres i milten og i ILV. Sistnevnte har i nyere tid vist seg å ha oppgaver assosiert med sekundære lymfoide organer, ikke ulogisk med tanke på mengden antigener gjellene kommer i kontakt med (Koppang et al., 2010).

De fleste immunologiske celler påvist hos pattedyr er også funnet hos fisk. En essensiell del av det medfødte immunforsvaret er fagocyttering av fremmede celler/partikler. Dette gjøres delvis av monocytter/makrofager og nøytrofile celler med produksjon av reaktive oksygenforbindelser som oksiderer invaderende organismer (Randelli et al., 2008). Disse er funnet hos fisk, i tillegg til uspesifikke cytotoksiske celler og *natural killer* (NK) liknende celler (Fischer et al., 2013). Hos regnbueørret har celler med like egenskaper som dendritiske celler (DC) hos pattedyr blitt funnet. Hypotesen er at disse fungerer som APC og indikasjonene på

at dette stemmer er entydige (Bassity og Clark, 2012). B-celler med fagocyterende egenskaper er funnet hos fisk og sammen med DC utgjør disse en kobling mellom det medfødte og adaptive immunforsvar (Li et al., 2006, Bassity og Clark, 2012). Nylig har også virus-spesifikke cytotoksiske T-celler (CTL) blitt funnet hos fisk. Deres egenskaper i å nøytralisere virusinfiserte celler er spesielt interessant med tanke på vaksineutvikling, da aktivering av slike celler vil kunne øke fiskens evne til å bekjempe sykdom (Somamoto et al., 2014). T- og B-celler utgjør de viktigste cellene i det adaptive immunforsvaret og aktiveres ved binding av fremmed antigen til *major histocompatibility complex* 1 og 2 (MHC) på overflaten av cellene, eller ved at antigen binder til frie- og/eller membranbundne immunoglobuliner (Ig).

2.4.2 Immunrespons mot virus

Fisk, og andre vertebrater, har effektive medfødte systemer for å gjenkjenne fremmede stoffer, deriblant virus. Spesifikke *pattern recognition reseptorer* (PRR) gjenkjenner fremmede patogener, såkalt *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), slik at et forsvar kan mobiliseres. Typiske PAMPs er polysakkarider og oligosakkarider (eksempelvis bakterielt lipopolisakkarid, LPS), flageliner, peptidoglykaner, CpG-DNA og dobbelt- og enkelttrådig viralt RNA (ssRNA) (Magnadóttir, 2010). Toll lignende reseptorer (TLR) er en gruppe godt studerte PRRer. Elleve ulike TLRer (TLR 1,2,3,5,7,8,9,14,21,22 og 23) har blitt funnet hos teleoster og disse gjenkjenner blant annet viralt arvestoff i ulike varianter, både intracellulært i endosomer og ekstracellulært på celleoverflater (Workenhe et al., 2010). Dobbelttrådig RNA fra IPNV kan for eksempel gjenkjennes av TLR 22 på overflaten til vertscellene (Matsuo et al., 2008). Også intracellulære reseptorer (i cytosol) er beskrevet hos teleoster og nylig ble disse funnet hos laksefisk (Chang et al., 2011). Disse er *retinoic acid-inducible gene* I (RIG-I) liknende reseptorer (RLR) og består av RIG-I, MDA5 og LGP2 som alle gjenkjenner viralt arvestoff i cytosol (Chang et al., 2011). Når viralt antigen er oppdaget starter produksjonen av en spesiell type proteiner, kalt interferoner (IFN), som trigger immunceller i fisken til å produsere antivirale proteiner. IFN type I (IFNa, b og c) er en av disse og vil bli produsert av infiserte celler (Svingerud et al., 2012). IFNa vil eksempelvis binde seg til spesifikke reseptorer på friske celler som vil føre til produksjon av antivirale proteiner via JAK/STAT signalveien (Samuel, 2001, Robertsen, 2006). Noen av disse antivirale proteinene er Mx, ISG15, Viperin/Vig-1 (Boudinot et al., 1999, Chin og Cresswell, 2001, Robertsen, 2006, Røkenes et al., 2007, Workenhe et al., 2010, Sun et al., 2011). IFN type I er foreslått å være den viktigste

igangsetteren for produksjon av Mx hos fisk (Nygaard et al., 2000). Flere typer IFNer er oppdaget, deriblant IFN γ (en IFN type II) som produseres av CD4+ T-celler (T-hjelpeceller, TH₁) og CD8+ T lymfocytter/cytotoksiske T-celler (CTL), og deres viktighet for cellediert beskyttelse mot virus er ikke neglisjerbar (Robertsen, 2006, Sun et al., 2009).

Studier har riktig nok vist at IPNV undertrykker IFN signalering hos regnbueørret og laks (Collet et al., 2007, Skjesol et al., 2009) og inhiberer uttrykk av Mx i cellelinjer fra laks (Jensen og Robertsen, 2002). Samtidig har andre studier dokumentert en fullverdig IFN-respons etter IPNV-smitte, med påfølgende produksjon av Mx i leukocytter og makrofager isolert fra hodenyre til laks (Collet et al., 2007). Dette gjør trolig at leukocytter og makrofager har bedre evne til å bekjempe viruset og unngå celledød, og kan dermed utgjøre et reservoar med langsomt replikerende virus, viktig for oppnåelse av bærertilstand (Collet et al., 2007).

2.4.3 Humoral immunitet

Immunoglobuliner (Ig), eller antistoffer, utgjør den humorale delen av det adaptive immunforsvaret og er essensiell i forsvaret mot mikroorganismer, enten fritt i vev, blod eller mucus, eller som B-celle reseptorer (BCR) på cellemembranen. De produseres av B-celler som har utviklet seg til plasmaceller eller plasmablaster (Salinas et al., 2011). Hittil er tre typer Ig funnet hos teleoster: IgM, IgT og IgD (Hansen et al., 2005, Hikima et al., 2011, Salinas et al., 2011). IgM⁺ B-celler dominerer i blod, milt og nyre, mens IgT⁺ B-celler er tallrike i mucosa-assosierte organer som tarm og galle. (Zhang et al., 2010, Salinas et al., 2011, Fillatreau et al., 2013). IgT⁺ B-celler er også dominerende i slimlaget på huden (Xu et al., 2013). Studier har vist at konsentrasjonen av IgM er om lag tusen ganger høyere enn konsentrasjonen av IgT i blodserum hos fisk. Denne forskjellen er langt mindre i tarm, hvor konsentrasjonen av IgT er om lag hundre ganger høyere enn i serum (Parra et al., 2013). IgD er tidligere ansett som membranbundet, men har i senere tid blitt påvist i sekretorisk form hos regnbueørret (Ramirez-Gomez et al., 2012). IgD⁺ plasmaceller er funnet i størst konsentrasjon i nyre og milt, men også i gjelle i lik konsentrasjon som IgM⁺ plasmaceller (Ramirez-Gomez et al., 2012). Dette indikerer at IgD, på lik linje med IgM, kan være et viktig Ig for førstelinjeforsvaret over gjellene. Forsøk med oral administrering av en VP2-kodende (IPNV) DNA-vaksine har gitt økte verdier av IgM, IgT og IgD i pylorus hos regnbueørret (Ballesteros et al., 2013), en indikasjon på deres humorale antivirale funksjon. Forsøk med bruk av

inaktiverte helviruspartikler i vaksinen har vist at beskyttelsen er korrelert med mengde antistoff produsert før smitte (Munang'andu et al., 2013a). Her ble antistoff målt i blod hos laks (ved *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), noe som bekrefter at IgM har en sentral rolle i beskyttelse mot IPNV.

2.4.4 Smoltifiseringens påvirkning på immunforsvaret

Det er ikke noen entydig svar på hvordan smoltifiseringen påvirker immunforsvaret til fisken. Noen studier antyder at immunforsvaret til laksefisk er svekket under smoltifiseringen (Maule et al., 1987, Melingen et al., 1995, Melingen et al., 2002). For 1+ smolt har en generell reduksjon i serumproteiner samt IgM blitt påvist under smoltifisering, med en påfølgende dobling av IgM tre måneder etter utført smoltifisering (Melingen et al., 1995). For 0+ smolt har IgM og serumprotein-nivåene vist seg å stige gradvis fra start av sommerstimuli til slutten av prøvetakingen, tre måneder etter sjøutsett (Melingen og Wergeland, 2000). Det kan tyde på at selve produksjonsmetoden for smolten påvirker immunforsvaret forskjellig.

Reduksjon i nøytrofile celler og økning i B-celler og polymorfnukleære celler (granulocytter) har blitt vist hos smolt som har fullført smoltifiseringen og blitt overført til sjøvann (Melingen et al., 2002). Reduksjon i lymfocytter (milt-assosiert og fritt i blodet) har blitt påvist hos smoltifiserende coho laks (*Oncorhynchus kisutch* L.), da i samsvar med forhøyede kortisolverdier (Maule et al., 1987). Hos karper (*Cyprinus carpio* L.) er det vist at forhøyede kortisolverdier grunnet kronisk stress fører til apoptose av B-celler i hodenyre og blod, samt nedregulering av immunforsvaret (Weyts et al., 1998, Verburg-van Kemenade et al., 1999). Hos ørret (*Salmo trutta* L.) har forhøyde kortisolverdier ført til abnormt lave verdier av sirkulerende lymfocytter (Pickering, 1984). Typisk ser man en økning i kortikosteroider (deriblant kortisol) hos laksefisk som gjennomgår smoltifisering (Specker og Schreck, 1982, Redding et al., 1984, Nilsen et al., 2008, McCormick, 2013). *In vitro* studier på maller (*Ictalurus punctatus* L.) har riktignok vist at kortisol i svært liten grad undertrykker lymfocytter (Ellsaesser og Clem, 1987) og Espelid og medarbeidere (1996) konkluderte med at kortisol kunne ha en umiddelbar negativ effekt på immunceller hos atlantisk laks, men det betød ikke at fisken nødvendigvis hadde redusert sykdomstoleranse eller fikk langvarige post stress problemer (Espelid et al., 1996). Økning i kortisol kommer som en følge av hormonets sentrale rolle i forbindelse med smoltifisering (da spesielt med tanke på osmoregulering), og

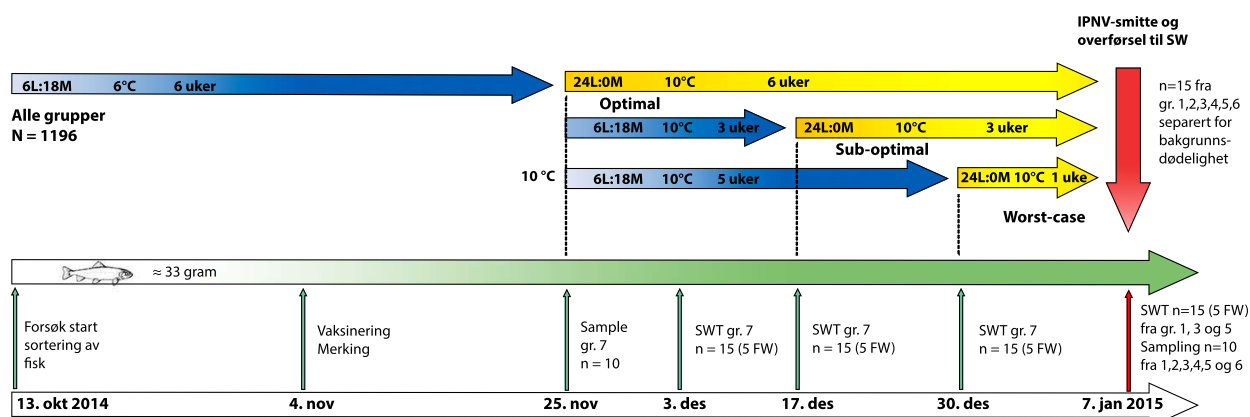
er en naturlig respons hos laks som gjør seg klar til sjøvann (McCormick, 2013). Studier viser ikke noe konkluderende svar på om kortisol har betydelig negativ virkning på immunforsvaret til fisken eller ikke. Smoltifiseringsprosessen fører til økt mengde GH og IGF-1 hos laksefisk (Dickhoff et al., 1997, Prunet et al., 1989, McCormick et al., 2009). Disse hormonene har blitt vist å ha direkte positiv virkning på immunforsvaret til teleoster ved at de reduserer inflammasjon, opprettholder produksjonen av IgM, stimulerer produksjonen av leukocytter og stimulerer til økt mengde superoksid anion (reaktiv oksidant) i leukocytter i hodenyren (Sakai et al., 1996, Yada et al., 1999, Yada, 2007). Vaksinerings tett opp til start av smoltifiseringsprosessen har ikke vist å gi redusert beskyttelse mot bakterielle sykdommer (Eggset et al., 1999), men konklusjonenes overførbarhet til virussykdommer er usikker.

3. Materialer og metoder

3.1 Forsøksfisk

I forsøket ble det brukt 1196 parr, alle IPN sensitive atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra AquaGen (Trondheim, Norge) holdt på Havbruksstasjonen i Kårvika, Tromsø. Gjennomsnittsverken ved vaksinerings var 32,7 gram (\pm 3,3). Fisken ble holdt i sirkulære kar med bruksvolum på 500 liter og føret *ad libitum* med Skretting Nutra Olympic 2 mm i ferskvannsfasen og Skretting Spirit 3 mm i sjøvannsfasen. Temperaturen i karene var 6 °C under sortering og tre påfølgende uker etter vaksinerings, og 10 °C ved smoltifiseringsstart og i smitteforsøket. Oksygenmetningen var 70% og vannstrømmen 40 l/min.

3.2 Forsøksoppsett



Figur 8. Forsøksoppsettet før smitte med IPNV. Skjematisk framstilling av prøvetaking, lysbehandlingsregime og temperatur for de ulike gruppene fram til smitte med IPNV. 6L:18M = seks timer lys og atten timer mørke per døgn, 24L:0M = 24 timer lys og null timer mørke per døgn, FW = *freshwater*, SWT = *seawater-test*, SW = *seawater*.

3.2.1 Gruppeinndeling og vaksinerings

Tre grupper á henholdsvis 142, 150 og 150 fisk ble vaksinerings ved intraperitoneal injeksjon med 0,05 ml ALPHA JECT micro 6 (produksjonsbatch 7764) fra PHARMAQ AS. Vaksinen er en 6-komponentsvaksine som inneholder inaktivert *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* RPS \geq 80 (*relative percent survival*), *Listonella anguillarum* serotype O1 RPS \geq 75, *Listonella anguillarum* serotype O2a RPS \geq 75, *Vibrio salmonicida* RPS \geq 90, *Moritella viscosa* RPS \geq 60,

IPNV serotype Sp 0,2 AU (*antigenicity units*). Adjuvanten er flytende parafin. Vaksinerings ble utført ved bruk av selv-fyllende Socorex sprøyter med 0,5 x 4 mm nåler fra Unimed (Medical Supplies, Inc.). Som uvaksinerte kontrollgrupper ble tre grupper á henholdsvis 142, 150 og 150 fisk injisert intraperitonealt med 0,05 ml PBS (fosfatbufret saltvann).

Før injeksjon ble fisk fra de ulike gruppene merket med *alkaline blue* ved bruk av en PanJet injector og/eller fettfinneklipping etter Havbruksstasjonens standard merkeskjema. All fisk ble bedøvet med én ml Benzoak (A.C.D Pharmaceuticals AS) i fem liter vann før injeksjon og merking og etterpå overført til opplivingskar. Gruppene ble så overført til separate kar for videre lysbehandling (Tabell 3).



Figur 9. Merking av fisk med *alkaline blue*. Ventral merking ved bruk av PanJet injector.

3.2.2 Lysregime og smoltifisering

Alle gruppene gikk på 6L:18M (vinterstimuli) tre uker før vaksinerings og tre uker etter vaksinerings (Figur 8). Temperaturen i vannet i perioden med vinterstimuli var 6 °C. Tre uker etter vaksinerings ble temperaturen økt til 10 °C for alle grupper, og dette var temperaturen gjennom resten av forsøksperioden også etter smitte. Seks, tre og én uke før smitte med IPNV ble én vaksinert (AJm6) og én uvaksinert (PBS) gruppe overført fra 6L:18M til 24L:0M (sommerstimuli). Dette ble gjort for å representere tre ulike smoltifiseringsregimer. Gruppe 1, 2 og 7 gikk seks uker på 24L:0M (420 døgngader) før smitte. Dette skulle legge til rette for optimal smoltifisering. Gruppe 3 og 4 gikk tre uker på 24L:0M (210 døgngader) før smitte. Dette skulle representere et sub-optimalt smoltifiseringsregime. Gruppe 5 og 6 gikk én uke på

24L:0M (70 døgngader), som skulle representere en *worst-case* smoltifisering (Figur 8). Se Tabell 3 for kar- og gruppeinndeling før smitte.

Tabell 3. Gruppering og lysbehandling av fisk før IPNV-smitte i sjøvann. Forsøksfisken ble delt inn i syv ulike grupper. Disse ble adskilt ved merking med alkaline blue, fettfinneklipping eller avklipping av høyre maxille. Lysregimet er inndelt i "1 uke lys", "3 uker lys" og "6 uker lys". AJm6 er fisk vaksinert med ALPHA JECT micro 6 vaksine, og PBS er kontrollfisk injisert med fosfatbufret saltvann. Gruppe 7 er fisk injisert med IPNV. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, dg = døgngader, 24L:0M = 24 timer lys og null timer mørke per døgn.

Gruppe	Navn	Lysregime
1	6 uker lys (PBS)	24L:0M 6 uker (420 dg)
2	6 uker lys (AJm6)	24L:0M 6 uker (420 dg)
3	3 uker lys (PBS)	24L:0M 3 uker (210 dg)
4	3 uker lys (AJm6)	24L:0M 3 uker (210 dg)
5	1 uke lys (PBS)	24L:0M 1 uke (70 dg)
6	1 uke lys (AJm6)	24L:0M 1 uke (70 dg)
7	IPNV-injiserte shedders	24L:0M 6 uker (420 dg)

3.2.3 Smitte med IPNV

IPNV fra NVI-015 stammen (Santi et al., 2004), med serotype Sp (Tabell 2), ble oppdyrket i CHSE-214 celler (*Chinook salmon embryo celler*) hos PHARMAQ AS. De ble fortyntet i PBS til et titer på $1,0 \times 10^8$ TCID₅₀/ml. Seks uker etter vaksinerings ble 312 fisk fra gruppe 7 (shedders) injisert intraperitonalt med 0,1 ml $1,0 \times 10^8$ TCID₅₀/ml IPNV. Samme dag ble alle grupper overført til sjøvann (35 ‰) ved 10 °C og fisken ble fordelt på tre kar som angitt i Tabell 4. IPNV-injiserte shedders ble fordelt på alle tre kar for å framprovosere kohabitantsmitte. Smittemodellen brukt i forsøket har i tidligere studier vist å gi høy dødelighet ved IPNV-smitte (Bowden et al., 2002, Ramstad et al., 2007, Munang'andu et al., 2013b). Kar 1 var uttakskaret hvor organ- og blodprøver ble tatt fra fisk hver uke i fem uker etter smitte. Kar 2 og 3 var kar for monitorering av dødelighet og ingen prøver ble tatt her. Overlevende fisk i kar 1 ble destruert fem uker etter smitte, mens kar 2 og 3 ble avsluttet syv uker etter smitte. Ved smitte ble femten fisk per gruppe overført til et eget kar med sjøvann for å monitorere bakgrunnsdødelighet forbundet med osmoregulatoriske problemer.

Etter endt smitteperiode ble RPS utregnet mellom vaksinert gruppe og korresponderende kontrollgruppe (injisert med PBS), utsatt for samme antall uker på 24L:0M.

$$RPS = 1 - \frac{(\% \text{ dødelighet i vaksinert gruppe})}{(\% \text{ dødelighet i kontrollgruppe})} \times 100 \quad (1)$$

Tabell 4. Gruppe- og karinndeling ved smitte. Ved smitte ble alle gruppene samlet i tre ulike kar. Kar 1 var uttakskaret, mens kar 2 og 3 var dedikert til monitorering av dødelighet og ble ikke rørt gjennom forsøket (utenom for håndtering av dødfisk underveis). PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Gruppe	Navn	Kar 1	Kar 2	Kar 3
1	Opt (PBS)	50	25	27
2	Opt (AJm6)	50	26	26
3	Sub-opt (PBS)	50	26	26
4	Sub-opt (AJm6)	50	27	26
5	Worst-case (PBS)	52	26	26
6	Worst-case (AJm6)	49	27	26
7	IPNV-injiserte shedders	61	82	83

3.3 Prøveuttak

3.3.1 Organ- og bloduttak

Før uttak av organer og/eller blod fra fisken ble den bedøvet med en overdose av Benzoak (1,5 ml/4 l sjøvann), og deretter påført et slag mot hodet. Én til to ml blod ble så tappet fra *Vena caudalis* ved bruk av BD Vacutainer nåler (0,7 x 25 mm og 0,7 x 32 mm), og samlet på røde Clot Activator Tubes (CAT) for osmolalitet- og kloridmålinger og grønne Sodium Heparin Tubes fra BD Vacutainer for antistoffanalyser.

Biter av gjeller, hud, hodenyre, milt, pylorus og lever ble overført til rør med 4% formalin og rør med RNAlater® (Ambion Inc., Austin, Texas). Prøvene på formalin var ca. 0,5 x 0,5 cm, mens prøvene på RNAlater® var noe mindre slik at stoffet skulle trenge godt inn i prøvene. Prøvene på RNAlater® ble lagret ved 4-8 °C ca. et døgn før videre langtidslagring ved – 20 °C. Formalinprøvene ble oppbevart ved 4-8 °C i ca. én uke før organprøvene ble overført til perforerte plastkassetter og 70% etanol (videre analyser av disse prøvene ble ikke gjort).

3.3.2 Separering av serum/plasma fra blodcellene

Blodprøvene ble sentrifugert samme dag som prøvetagning etter at de var holdt på is i maksimalt åtte timer. Prøvene ble sentrifugert ved 1,000 x g i 13 minutter (Heraeus, Multifuge 1 S-R). Serumet/plasmaet (serum til osmolalitet- og kloridmålinger, plasma til antistoffmålinger) som da hadde lagt seg som et lag (supernatant) over blodcellene, ble pipettert over på eppendorfrør og oppbevart ved – 20 °C for senere analyser.

3.4 Bestemmelse av smoltindeks

Ved bestemmelse av smoltindeks bedømmes fiskens parrmerker, sølvfarge og svartfarge på halefinnekanten på en skala fra 1-4, der fire er maksimalt morfologisk utviklet smolt. Gjennomsnittet av de tre verdiene utgjør smoltindeksen (PHARMAQ Analytiq, 2014). En antatt optimalt smoltifisert smolt vil ha fire på alle disse parameterne. Smoltindeks ble bedømt etter standard metoder brukt i kommersiell oppdrett (PHARMAQ Analytiq, 2014). Bedømmelse av smoltindeks kan være subjektivt, så de bestemte verdiene ble kontrollert av en andrepart.

3.5 Sjøvannstest

En, tre og fem uker etter at kontrollfisker (gruppe 7) ble satt på 24L:0M ble ti fisk overført fra ferskvann til sjøvann og holdt der i 24 timer. Dette for å følge med på smoltutviklingen. Ved smittetidspunkt ble ti fisk fra gruppe 1, 3 og 5 overført til sjøvann og holdt der i 24 timer. Etter utført sjøvannstest ble all fisk avlivet og blodprøver, samt lengde- og vektmålinger, tatt. Osmolalitet og kloridnivå i blodet til fisken reflekterer dens evne til å hypoosmoregulere og er en nyttig metode for å bestemme om fisken er klar for overførsel til sjøvann.

3.6 Målinger av Na⁺/K⁺-ATPase aktiviteten i gjellevev

For NKA-målinger ble prøver tatt fra gjellevev hos bedøvet fisk i forbindelse med bloduttak og vurdering av smoltindeks. Prøvene ble sendt til PHARMAQ Analytiq i Bergen for analyser. Vevet ble behandlet etter standardisert metode for gjellebiopsi og ATPase målinger hos laks (McCormick, 1993, Stefansson et al., 2005).

3.7 Måling av klorid og osmolalitet i serum

3.7.1 Kloridmålinger i serum

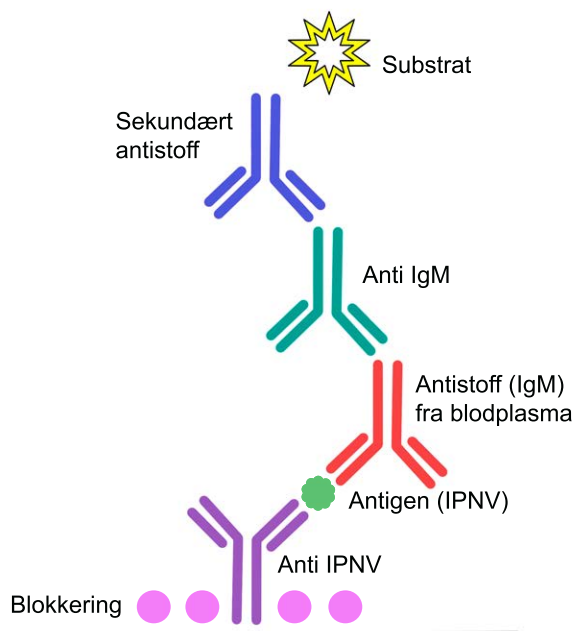
For målinger av kloridinnholdet i serumet til laks ble det brukt en 925 Chloride Analyzer (Ciba Corning, MA, USA). Instrumentet registrerer endringen i en væskes ledningsevne når kloridioner titreres fra væsken ved dannelse av sølvklorid (AgCl). Kloridet reagerer med sølv fra sølvelektroder nedsenket i væsken. Instrumentet har en nøyaktighet på ± 2.2 mM for en 100 mM løsning (CibaCorning, 1980). Fjorten ml med syrebuffer (CH_3COOH : <100g/L HNO_3 : 9g/L, Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, UK) ble fylt opp i et lite glassbeger. Dette ble plassert under sølvelektroden og ført opp slik at elektrodene ble suspendert i bufferløsningen. Løsningen ble primet med 2 x 20 μl Cl/l standard 100mM (MultiCal, Bayer HealthCare, Nederland) før den ble kondisjonert slik at maskinen viste 0,000. Deretter ble nye 20 μl Cl/l standard tilsatt og løsningen ble titrert. Displayet viste da 100 mM (± 3), men titreringen ble gjentatt et par ganger for å få tilnærmet 100mM som Cl/l standarden inneholder. Maskinen var nå klar til bruk. Etter en kort vortexing ble 20 μl serumprøve tilført. Kloridinnholdet ble målt to til fire ganger for hver prøve. Alle prøvene ble holdt på is under hele analysen.

3.7.2 Måling av osmolalitet i serum

Til osmolalitetmålingene i serumprøvene ble det brukt et Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, MA, USA). Maskinen bestemmer frysepunktdepresjonen (nedsenking av frysepunkt grunnet oppløste substanser) i en væske, og benytter sammenhengen mellom frysepunkt/smeltepunktet og konsentrasjonen av løste stoffer i en væske til å bestemme væskens osmolalitet. Instrumentet har en nøyaktighet på ± 4 mOsm (H. K. Johnsen, pers. com., 16 mars, 2015). Til dette brukes det en nål som nedsenkes i en spesiallaget tube (Advanced Instruments, Inc., MA, USA) som inneholder prøven man vil analysere. Maskinen ble kalibrert før bruk ved at nålen ble suspendert i 15 μl 290 (mOsm) standardløsning (Accuref 290, Fiske Associates, MA, USA) med påfølgende måling av osmolaliteten. Gjentatte målinger ble utført helt til målingene hadde stabilisert seg på 290 (mOsm, ± 3). Femten μl serum fra hver prøve ble så analysert hver for seg etter en kort vortexing. To til fire målinger ble gjort fra hver prøve for å kunne utelukke eventuelle kunstige avvik.

3.8 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ble brukt til å kvantifisere IPNV-spesifikke IgM antistoffer i plasma hos laks. Ved ELISA kan man måle antistoffresponser i en prøve ved å utnytte bindingsespesifisiteten til antistoffets spesifikke antigen (Gan og Patel, 2013). I dette forsøket ble det brukt sandwich ELISA (Figur 10). Brønnene dekkes med et ”capturing” antistoff spesifikt for antigenet (i dette tilfellet et anti IPNV antistoff). Deretter tilsettes et blokkeringsmedium med proteiner som forhindrer at antigen binder uspesifikt til sidene og bunnen av brønnen. Videre tilsettes antigenet (inaktivert IPNV). Prøven man ønsker å analysere (plasma fra laks) tilsettes og antistoffer som er spesifikke for antigenet vil da binde seg. Videre tilsettes primært antistoff (anti lakse IgM) og deretter sekundært enzymkoblede antistoff. Siste steg består av inkubering med substrat, hvor en positiv reaksjon fører til fargeforandring. Forandringen kan måles i spektrofotometer ved optisk tetthet (OD) og mengde antistoff i prøven kan kvantifiseres (Gan og Patel, 2013).



Figur 10. Sandwich ELISA. Oppsett for ELISA brukt i forsøket for måling av mengde antistoff mot IPNV i blodplasma hos smolt utsatt for ulike lysbehandlingsregimer. Illustrasjon: Mathias Overrein.

3.8.1 Inaktivering og dialyse av IPNV

Femti ml stockløsning med IPNV Sp (8×10^8 TCID₅₀/ml) fra PHARMAQ AS ble inaktivert ved å tilsette 270 µl 37% formaldehyd. Dette tilsvarer en fortyning på 2000 ppm. Løsningen ble inkubert i 72 timer ved 15 °C. For å fjerne formalin ble det inaktiverte viruset dialysert over i PBS. To Spectra/Por 4 dialyseslanger (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) med molekylvekt-cut off på 12 -14 kDa ble lagt i destillert vann (Milli-Q) i tretti minutter for å myknes. Deretter ble 25 ml inaktivert IPNV overført til slangene. Slangene ble sikret i topp og bunn med doble knuter og klemmer, og så overført til et reagensglass med 3500 ml 1 x PBS og satt på røring ved romtemperatur. Dialysen pågikk i 24 timer og det ble byttet PBS tre ganger underveis. Viruset ble fordelt på rør og oppbevart ved - 80 °C.

3.8.2 Utføring av ELISA

Nittiseks-brønns micro-titer plater (Nunc Maxisorp og *Gammairradiation microwell plates*, Roskilde, Danmark) ble coatet med 100 µl polyklonalt-anti-IPNV fra PHARMAQ AS (fortynnet 1:5000 i 0,1M karbonat buffer pH 9,6) og inkubert over natt på 4 °C. Platene ble så vasket med 300 µl PBST (1x PBS/0,05 % Tween 20) tre ganger, før 300 µl 5 % tørrmelk (Semper Mjölök 1% fett blandet i PBST) ble tilsatt hver brønn for blokkering. Platene ble inkubert over natt ved 4 °C. Etter vasking ble 100 µl inaktivert IPNV (fortynnet 1:10 med 1% tørrmelk) tilsatt hver brønn og inkubert to timer i romtemperatur. Platene ble vasket og plasma, fortynnet i 1 % tørrmelk, ble tilsatt med et totalvolum på 100 µl per brønn. Plasma ble fordelt i duplikater og fortyningene var 1:25, 1:50, 1:100 og 1:200. Kontrollplasma (negativt og positivt), samt *blanks* med kun 1% tørrmelk (i stedet for plasma), ble også tilsatt hver plate. Platene ble inkubert med plasmaprøvene over natt ved 4 °C. Etter vask ble platene tilsatt 100 µl mus-anti-ørret IgM, 4C10 (Thuvander et al., 1990), fortynnet til 1:3500 i 1% melk og inkubert én time i romtemperatur. Antistoffet er vist å kryssreagere med IgM fra laks (Thuvander et al., 1990). Platene ble vasket før 100 µl *polyclonal horseradish peroxidase* kanin anti-mus Ig (DAKO, Glostrup, Danmark) fortynnet 1:1000 i 1% melk ble tilsatt. Etter siste vask ble 200 µl substrat (Sigmafast OPD peroxidase substrate, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tilsatt hver brønn og inkubert i mørke tretti minutter før fargedannelse ble stoppet ved å tilsette 50 µl 3 M H₂SO₄ per brønn. OD ble så lest av på spektrofotometer (VersaMax Absorbance microplate reader, Molecular Devices, California, USA) ved bølgelengde på 492

nm. Til analyser av *pools* ble det brukt Maxisorp-plater mens gammaradierte plater ble brukt til individ-analyser.

OD-verdiene ble normalisert mot hverandre for å muliggjøre sammenligning mellom ulike plater. Gjennomsnittlig verdi av *blanks* (nullverdi) per plate ble trukket fra alle verdier på samme plate. Etter at nullverdien var trukket fra ble gjennomsnittet av alle positive kontroller for alle platene regnet ut. Denne verdien ble så delt på gjennomsnittet av positive kontroller for hver enkelt plate for å finne forholdstallet. Det spesifikke forholdstallet til hver plate ble ganget med hver enkelt prøve slik at OD-verdiene for hver plate ble normalisert mot hverandre. Gjennomsnittet av duplikater for hver prøve ble utregnet.

3.9 Kvantitativ *real-time* PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er et veldig nyttig verktøy for oppformering av spesifikke DNA-sekvenser. Kvantitativ *real-time* PCR (RT qPCR) baserer seg på denne metoden og kvantifiserer samtidig mengde uttrykk av et spesifikt gen ved bruk av et fluoriserende fargestoff. Fargestoffet vil binde til dobbeltrådig DNA (dsDNA) og øke i farge proporsjonalt med mengde PCR-produkter som produseres etter hver amplifiseringssyklus. Når det er signifikant økning i fluorescens sammenlignet med bakgrunnsstøyen vil en terskelverdi (*threshold*) settes. Amplifiseringssyklusen som fører til signifikant økning og dermed overstigning av thresholdet er thresholdsyklusen (C_t , *threshold cycle*). En lav C_t -verdi vil bety at genuttrykket i prøven overstiger thresholdet etter få amplifiseringskurver, og mengden komplementært DNA (cDNA) er følgelig høy i prøven. En høy C_t -verdi vil bety mindre cDNA i prøven, og dermed mindre uttrykk av genet. Metoden er et effektivt verktøy for å måle genuttrykk i "real-time" i vev, blod eller celler (Life Technologies, 2012).

En amplifiseringssyklus består av 1) denaturering, 2) amplifisering og 3) ekstensjon. Ved denaturering benyttes høy temperatur for å separere dsDNA til enkelttrådig DNA (ssDNA). Amplifisering gjøres for å gi komplementære DNA-sekvenser, og tilsatte primere, optimale forhold for å feste seg spesifikt til ønskelig gen. Ved ekstensjon økes temperaturen til optimal temperatur for enzymet DNA polymerase som påbegynner syntese av en ny DNA-tråd i 5'-3'-retning. Én forover og én revers primer er nødvendig for tilfesting av polymerasen til de komplementære ssDNA-trådene. Fluorokromet brukt i dette forsøket var SYBR® Green.

Fargestoffet avgir sterkere fluorescens når det er bundet til dsDNA, enn i ubundet form. For å utelukke uspesifikk binding av SYBR® Green kan en smeltepunktsanalyse benyttes. Etter avsluttet amplifisering økes temperaturen slik at PCR produktene dissosierer og fargestoffet løsner. Dette endrer fluorescensen. Endringen kan detekteres og framstilles grafisk slik at man kan sammenligne smeltekurver mot hverandre for å sammenligne gener uttrykt og utelukke uspesifikk binding (LifeTechnologies, 2012). RT qPCR består av RNA rensing, cDNA syntese og *real-time* qPCR.

3.9.1 RNA-ekstraksjon fra hodenyre

Til ekstraksjon av RNA ble det brukt RNeasy® Mini kit fra Qiagen. Vevsprøver lagret på RNAlater® ved -80 °C ble tint og ca. 30 mg vev fra hodenyre ble overført til rør med 300 µl RLT bufferløsning (Qiagen) med 1 % β-Merceptoetanol (Sigma-Aldrich). Rørene inneholdt keramiske kuler (vasket med RNase AWAY, Molecular BioProducts) som ved sentrifugering vil male opp vevsprøven til en homogen væske. Etanol (70%) ble tilsatt før lysatet ble blandet og overført til nye rør. Rørene ble sentrifugert i femten sekunder ved 8,000 x g, før 0,6 ml Ultra Pure vann (Biochrom GmbH) og 10 µl Proteinase K (New England BioLabs) ble tilsatt. Rørene ble inkubert ved 55 °C i ti minutter for å denaturere eventuelle proteiner i prøven. Rørene ble sentrifugert ved 10,000 x g i tre minutter, og supernatanten ble fjernet og blandet med halve volumet absolutt etanol. Deretter ble 700 µl prøve overført til RNeasy Mini spin kolonner og sentrifugert ved 8,000 x g i femten sekunder. RNAet i prøven ville da bli fanget i membranen i kolonnen, mens restvæsken ville samle seg i røret under. Denne ble fjernet før kolonnen ble sentrifugert en gang til. Åtti µl DNase-løsning (280 µl DNase buffer blandet med 40 µl DNase, Qiagen) ble tilsatt prøvene for å fjerne genomisk DNA. Prøvene ble behandlet i femten minutter. Vask ble så gjennomført to ganger, først ved å tilsette 700 µl RW1 buffer og deretter ved å tilsette 500 µl RPE buffer. Kolonnen ble så sentrifugert i ett minutt til for å tørke membranen. RNeasy Mini spin kolonnen ble overført til et nytt eppendorfrør og RNA ble eluert ved å tilsette 30 µl vann og sentrifugert ved 8,000 x g. Eluering ble gjentatt en gang til før RNA-konsentrasjonen ble målt ved bruk av Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Saveen Werner). Maskinen måler mengde RNA mot mengde protein ved å måle absorbansen ved 260 og 280 nm. En verdi på $\geq 1,8$ tilsier at prøven ikke er kontaminert med protein. RNA-prøvene ble fryst ved -80 °C over natt.

3.9.2 cDNA syntese

Til syntese av cDNA ble det brukt SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix Kit for RT qPCR (Invitrogen). Ti μl RT Reaction mix, 2 μl RT enzyme mix (Invitrogen), 1000 ng RNA og vann ble blandet opp til et totalvolum på 20 μl per rør. Rørene ble så inkubert ved 25 °C i ti minutter, 50 °C i tretti minutter og avsluttet ved 85 °C i fem minutter (Applied Biosystems GeneAmp® PCR Systems 2700). Rørene ble nedkjølt før prøvene med cDNA ble overført til lagring over natt ved – 20 °C.

3.9.3 RT qPCR

Prøvene med cDNA ble fortynnet 1:10 med vann. Primerne (Tabell 6) hadde en bruksløsning på 5 μM , som tilsvarer 0,25 μM per reaksjon. ROX reference dye (Invitrogen) ble brukt for å normalisere de fluoriserende signalene fra SYBR®Green. Mastermix ble blandet tilsvarende følgende per reaksjon:

- 10 μl Buffer (inneholder Platinum®SYBR® Green)
- 0,043 μl ROX Reference dye
- 1 μl Primer F
- 1 μl Primer R
- 3 μl Ultra Pure vann

Mastermix til IPNVsegB (VP1) ble blandet etter en annen protokoll, og tilsvarte følgende per brønn:

- 10 μl Buffer (Fast SYBR® Green Mastermix fra Applied Biosystems)
- 1 μl Primer F
- 1 μl Primer R

Femten μl av mastermix ble tilsatt hver brønn i en 96-brønnsplate (MicroAmp Fast Optical 96-well, Life Technologies) sammen med 5 μl cDNA, slik at totalvolumet per brønn var 20 μl . Det ble brukt én plate per målgen, og hver prøve ble analysert i duplikater. I to brønner ble cDNA erstattet med vann for å avdekke uspesifikk binding. For IPNVsegB (VP1) ble 12 μl mastermix blandet med 8 μl cDNA, til et totalvolum på 20 μl . IPNV-positive lakseceller ble brukt for positiv kontroll. Prøvene ble analysert ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Program for RT qPCR foreligger i Tabell 5.

Tabell 5. Program SYBR® Green Reagents for RT qPCR.

Steg	Temperatur (°C)	Varighet	Syklusantall
Pre-PCR avlesning	50	2 min	Hold
Denaturering	95	4 min	Hold
Denaturering	95	15 sek	40
Amplifisering og ekstensjon	60	30 sek	40
Smeltekurve	95	15 sek	Kontinuerlig
	60	60 sek	
	95	30 sek	
	60	15 sek	

3.9.4 Primere

Som referansegen ble elongeringsfaktor-1 α (ELF α 1) brukt. Dette har vist seg å ha mest stabilt genuttrykk og er derfor godt egnet som referansegen for atlantisk laks (Ingerslev et al., 2006).

Primereffektivitet for Mx ble hentet fra tidligere forsøk gjort på fakultetet etter metoder beskrevet av Pfaffl (2001). For de øvrige primerne (foruten VP1) ble det laget en firefolds fortyningsserie med seks fortyninger (fortynnet i Ultra Pure vann). Det ble så kjørt RT qPCR av hver fortyning med IPNV-positive lakseceller. C_t -verdiene for hvert gen ble så brukt til å lage en standardkurve og stigningstallet ("slope") kunne beregnes. Denne kan direkte settes inn i ligning 2 for utregning av primereffektiviteten (E). Den matematiske modellen er beskrevet av Pfaffl (2001).

$$E = 10^{[-1/slope]} \quad (2)$$

Tabell 6. Primersekvenser, genbanknumre og primereffektivitet. Tabellen viser informasjon om primere brukt i forsøket. Alle primere hadde en bruksløsningen på 5 μ M med brukskonsentrasjon på 0,25 μ M. Primerne er brukt til samme formål i tidligere studier (Sun et al., 2011, Svingerud et al., 2012, Munang'andu et al., 2013a).

Gen	Sekvens (5'-3')	Genbank nr.	Effektivitet
ELF α 1 - F	GCTGTGCGTGACATGAGG	AF321836	2
ELF α 1- R	ACTTTGTGACCTTGCCGC		
Mx- F	TGCAACCACAGAGGCTTTGAA	SSU66475	2
Mx- R	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT		
Viperin/Vig-1- F	TCCTTGATGTTGGCGTGGAA	BT047610	2,03
Viperin/Vig-1- R	GCATGTCAGCTTTGCTCCACA		
ISG15- F	CTGAAAAACGAAAAGGGCCA	AY926456.1	2,1
ISG15- R	GCAGGGACTCCCTCCTTGT		
IPNVsegB (VP1)- F	GACTGGAGGTAAAAGGCATCGA	AY379740	ikke testet
IPNVsegB (VP1)- R	CCGAACCTCCGACATGGTGTT		

3.9.5 Behandling av data

Data fra RT qPCR ble analysert ved bruk av metode utarbeidet av Pfaffl (2001). Ligning 3 brukes for å utregne et målgenes relative endring i forhold til et referansegen. Den matematiske modellen er avhengig av effektiviteten til et gitt referansegen (E_{ref}) og effektiviteten til et spesifikt målgen ($E_{mål}$). ΔC_t er differansen mellom gjennomsnittet av C_t -verdiene for referansegenet eller målgenet, og C_t -verdiene for hvert enkelt individ. ΔC_t settes inn i ligning 3 sammen med primereffektiviteten og man kan regne ut ratio for endring av genuttrykk av målgenet i forhold til referansegenet (Pfaffl, 2001).

$$Ratio = \frac{(E_{mål})^{\Delta C_t} mål^{(kontroll-prøve)}}{(E_{ref})^{\Delta C_t} ref^{(kontroll-prøve)}} \quad (3)$$

3.10 Statistiske analyser og grafiske framstillinger

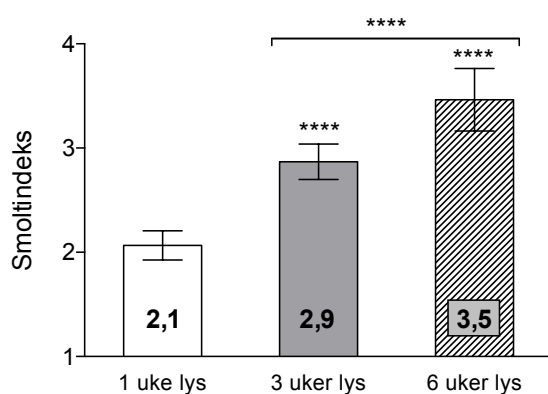
GraphPad Prism versjon 6 for Mac (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) ble brukt for å lage figurer/grafar samt for å gjennomføre statistiske analyser. Fisher's Exact test ble brukt for å avgjøre statistisk signifikans mellom dødelighetstallene for hver gruppe smitteforsøket (tilgjengelig på nett - <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Både enveis og toveis ANOVA (*analysis of variance*) ble brukt for å avgjøre statistisk signifikans for antistoffmålinger mellom behandlingsgrupper, og Tukey HSD post hoc test ble brukt for å undersøke statistiske forskjeller mellom gruppene ved ulike behandlingstidspunkt (se Appendiks 3, 4 og 5 for statistikk). Enveis ANOVA og Tukey HSD post hoc test ble også brukt til å avgjøre signifikante forskjeller i genuttrykk gruppene i mellom. Illustrasjoner og bilder ble behandlet og produsert ved bruk av Adobe Photoshop CC 2014 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) ble brukt for å strukturere og kategorisere data, samt for enkle regneoppgaver i datasettet.

4. Resultater

4.1 Analyse av smoltstatus etter ulike lysbehandlingsregimer

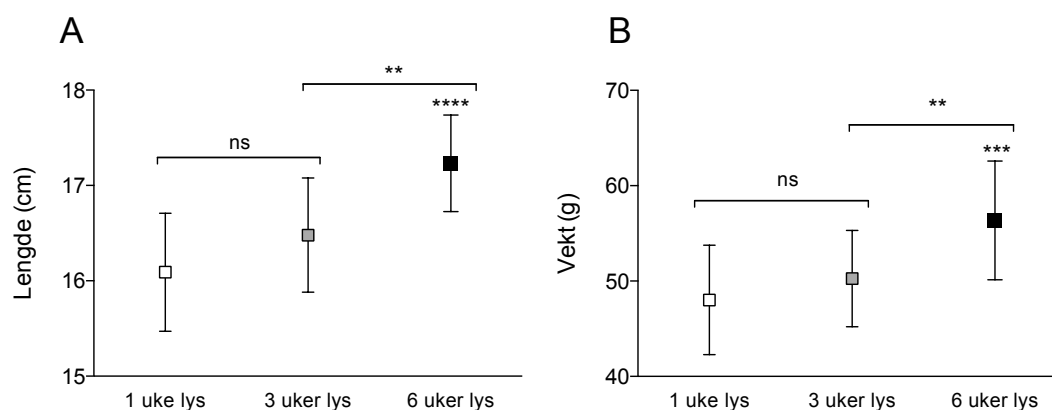
Smolt ble utsatt for tre ulike lysbehandlingsregimer for å framprovosere ulik grad av smoltifisering. De forskjellige regimene besto av én, tre og seks uker på 24L:0M. Fisken gikk på ferskvann (10 °C) gjennom lysbehandlingsperioden. Smoltindeks, vekst og serumklorid- og osmolalitetsnivå ble målt hos hver gruppe ved avslutning av lysbehandling/ved smittetidspunkt. Serumkloridnivå og osmolalitet ble i tillegg målt hos kontrollfisk (gruppe 7) fra start av 24L:0M til én uke før kohabitantsmitte (uke 0, uke 1, uke 3 og uke 5). Både fisk på ferskvann og fisk utsatt for 24 timer sjøvannstest ble prøvetatt. Vurdering av smoltindeks ble gjort på avlivet fisk i forbindelse med blod- og gjellevevuttak.

Figur 11 viser at den gjennomsnittlige smoltindeksen økte jo lengre fisken hadde vært eksponert for 24L:0M. Økt lengde på sommerstimuli ga fisken jevnere og kraftigere sølvfarging og parrmerker ble mer utydelige og forsvant helt hos flere fisk. Finnekantene ble svartere og mistet mye av gjennomsiktigheten. Etter én uke på lysstimuli var smoltindeksen 2,1, etter tre uker 2,9 og ved seks uker med 24 timer lys per døgn var verdien 3,5 av en maksimal score på 4. Det var signifikante forskjeller mellom alle gruppene (p-verdi $\leq 0,0001$).



Figur 11. Sammenlagt smoltindeks for tre grupper av uvaksinert smolt (PBS-injiserte) fra ulike lysbehandlingsregimer. 1 uke lys (n=5), 3 uker lys (n=10) og 6 uker lys (n=10). Smolten gikk på ferskvann (10 °C) da smoltindeksen ble vurdert. **** p $\leq 0,0001$. Standardavvik er indikert med feilmarginer. PBS = fosfatbufret saltvann.

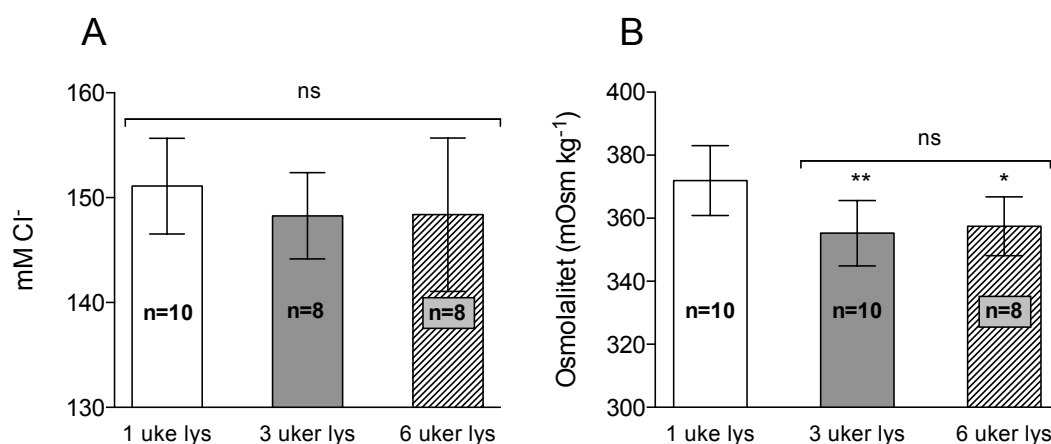
Lengdemålingene viste at smolten økte i lengde ved økt antall uker på 24L:0M. Smolt med 1 uke lys (16,1 cm) var signifikant kortere (p -verdi $\leq 0,0001$) enn smolten med 6 uker lys (17,2 cm). Smolt med 3 uker lys (16,5 cm) og 6 uker lys skilte seg mindre fra hverandre, men var også statistisk forskjellig (p -verdi $\leq 0,01$). Det var ikke forskjell i lengde mellom 1 uke lys og 3 uker lys. Smolten fra 6 uker lys var statistisk sett lenger enn de andre to gruppene (Figur 12A). Målingene av vekt viste at smolten veide mer jo lenger den hadde vært eksponert for 24L:0M. Smolten med 1 uke lys (48 g) veide signifikant mindre (p -verdi $\leq 0,001$) enn 6 uker lys (56,4 g). Smolt med 3 uker lys (50,3 g) og 6 uker lys var og statistisk ulike (p -verdi $\leq 0,01$). Det var ikke statistiske forskjeller mellom 1 uke lys og 3 uker lys. Smolten fra 6 uker lys veide statistisk sett mer enn de andre to gruppene (Figur 12B). Alle data for beregning av smoltindeks, vekt og lengde finnes i Appendiks 2 side 80 og 81.



Figur 12. Lengde (A) og vekt (B) hos uvaksinert smolt (PBS-injiserte) fra tre ulike lysbehandlingsregimer. 1 uke lys (n=15), 3 uker lys (n=20) og 6 uker lys (n=20). ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Vanntemperaturen var 10 °C. Standardavvik er indikert med feilmarginer. PBS = fosfatbufret saltvann, ns = *not significant*.**

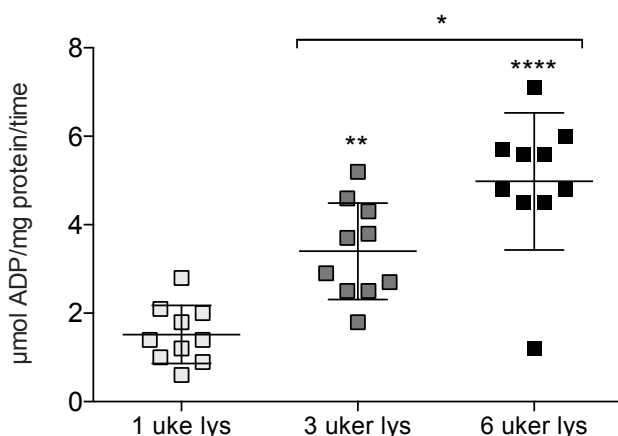
Måling av kloridverdier i serum viste ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Smolten på 1 uke lys hadde 151,1 mM Cl⁻ i serum til sammenligning med 3 uker lys og 6 uker lys som hadde henholdsvis 148,3 og 148,4 mM Cl⁻ (Figur 13A). Smolt eksponert for færrest uker med 24L:0M hadde høyest kloridinnhold i serum.

Osmolaliteten var derimot signifikant høyere for 1 uke lys (372 mOsm kg⁻¹) sammenlignet med 3 uker lys (355,3 mOsm kg⁻¹) og 6 uker lys (357,4 mOsm kg⁻¹) (p-verdi ≤ 0,05). Osmolaliteten i serum til smolt fra 3 uker lys og 6 uker lys skilte seg ikke statistisk fra hverandre (Figur 13B). Smolt utsatt for én uke med 24L:0M hadde høyere osmolalitet i serum enn smolt utsatt for tre og seks uker.



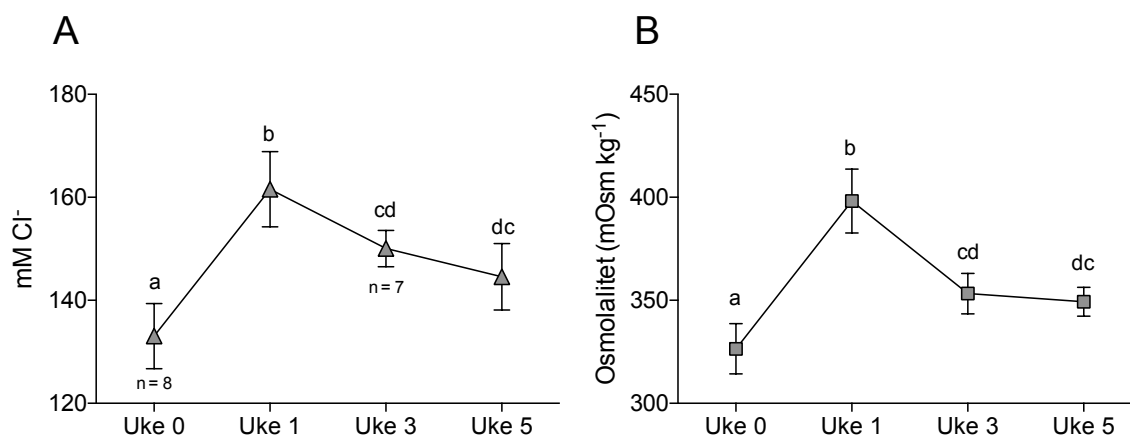
Figur 13. Kloridinnhold (mM) og osmolalitet (mOsm kg⁻¹) i serum til uvaksinert smolt (PBS-injiserte) fra tre ulike lysbehandlingsregimer, etter 24 timer sjøvannstest. (A) Kloridinnhold (B) Osmolalitet. Antall smolt som ble analysert per gruppe står angitt i figuren. Vanntemperaturen var 10 °C. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. Standardavvik er indikert med feilmarginer. PBS = fosfatbufret saltvann, ns = not significant.

Målingene av NKA-aktiviteten i gjelle hos smolt viste at fisk utsatt for én uke med 24L:0M hadde signifikant lavere ATPase-aktivitet enn de andre to gruppene som hadde blitt eksponert for 24L:0M i henholdsvis tre og seks uker (Figur 14). Smolt fra 6 uke lys (5 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$) hadde i overkant av tre ganger så høye NKA-verdier enn smolt fra 1 uke lys (1,52 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$) og gruppene skilte seg signifikant fra hverandre ($p\text{-verdi} \leq 0,0001$). Smolt fra 3 uker lys (3,4 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$) hadde mer enn dobbelt så høy NKA-aktivitet enn smolt fra 1 uke lys og gruppene skilte seg statistisk fra hverandre ($p\text{-verdi} \leq 0,01$). Det var også statistisk forskjell mellom 3 uker lys og 6 uker lys ($p\text{-verdi} \leq 0,05$). Smolt utsatt for seks uker med 24L:0M hadde signifikant høyere NKA-aktivitet i gjellene enn de andre gruppene.



Figur 14. Na^+/K^+ -ATPase aktivitet i gjelle (målt i $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$) hos smolt ($n=10$) utsatt for tre ulike lysbehandlingsregimer. Vanntemperaturen var $10\text{ }^\circ\text{C}$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,0001$. Standardavvik er indikert med feilmarginer. ADP = adenosintrifosfat.**

I forsøksgruppene (1 uke lys, 3 uker lys og 6 uker lys) ble klorid og osmolalitet i serum analysert på kun ett tidspunkt, ved avslutning av sommerstimuli (24L:0M). I kontrollgruppen (gruppe 7) ble klorid og osmolalitet analysert gjennom hele perioden med sommerstimuli på seks uker. Figur 15 viser endringer i kloridinnhold (A) og osmolalitet (B) i serum til kontrollgruppen ved start av 24L:0M samt én, tre og fem uker etter. Både kloridinnholdet ($133,1 \text{ mM Cl}^-$) og osmolaliteten ($326,5 \text{ mOsm kg}^{-1}$) i serum var signifikant lavere ($p\text{-verdi} \leq 0,0001$) ved start av 24L:0M (uke 0) enn etter én ukes lysstimuli ($161,6 \text{ mM Cl}^-$ og $398,2 \text{ mOsm kg}^{-1}$). Klorid- og osmolalitetsverdiene etter én uke og tre uker ($150,1 \text{ mM Cl}^-$ og $353,3 \text{ mOsm kg}^{-1}$) skilte seg også statistisk fra hverandre (henholdsvis ved $p \leq 0,01$ og $p\text{-verdi} \leq 0,0001$). Ingen signifikante forskjeller ble vist mellom uke tre og fem, hverken for klorid- eller osmolalitetmålingene.

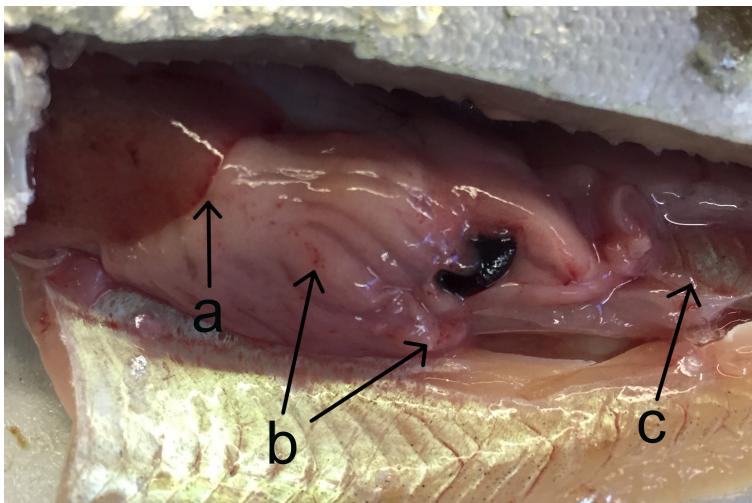


Figur 15. Kloridinnhold (mM) og osmolalitet (mOsm kg^{-1}) i serum til smolt fra kontrollgruppen ($n=10$) utsatt for 24 timer sjøvannstest, etter økende lengde sommerstimuli (24L:0M). (A) Kloridinnhold (B) Osmolalitet. Uke null indikerer parr som ikke ble utsatt for sjøvannstest når sommerstimuli ikke var igangsatt. Parren gikk da på ferskvann $6 \text{ }^\circ\text{C}$ med 6L:18M. Bokstaver indikerer statistiske forskjeller mellom gruppene. Standardavvik er indikert med feilmarginer. 6L:18M = seks timer lys og atten timer mørke per døgn.

4.2 Dødelighet etter kohabitantsmitte med IPNV

For å undersøke om ulik lengde på sommerstimuli påvirker laksens mottakelighet for IPN ble alle forsøksgruppene smittet med viruset og overført til sjøvann etter avsluttet lysbehandling. Dødelighet for hver gruppe ble registrert hver dag fra start av smitte (overførsel til sjøvann) og fram til avslutning av smitteforsøket, syv uker etter. Dødfisk ble samlet fra to ulike kar.

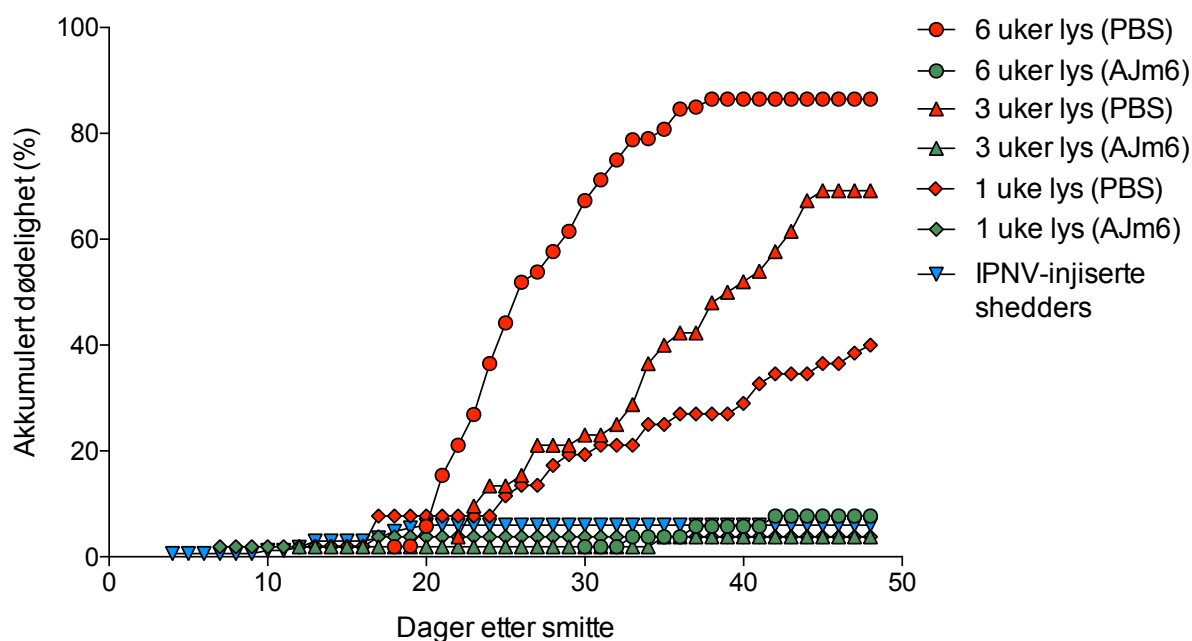
Fisk i prøvetakingskaret begynte å vise tegn til sykdom rundt den fjortende dagen etter smitte (Figur 16). Sykdomstegn var ikke synlig hos all fisk. Fisken viste ikke atferd som direkte kunne vitne om sykdom. Bildet brukt i Figur 16 er tatt av avlivet fisk i forbindelse med prøvetaking, og må ikke forveksles med dødfisk fra kar 2 og 3 (for monitorering av dødelighet).



Figur 16. Kliniske tegn til IPN hos smolt utsatt for kohabitantsmitte med IPNV i 21 dager. Bildet viser blødninger i lever (a), punktblødninger i pylorus (b) og ascites (væskedannelse) i bukshulen (c). Bildet er tatt i forbindelse med prøvetaking. Foto: Mathias Overrein.

Figur 17 viser at dødelighet startet ved dag fire, da hos IPNV-injiserte shedders. Dødeligheten holdt seg lav fram til sytten dager etter smitte da det begynte å dø fisk i de uvaksinerte gruppene. Av disse gruppene var det spesielt 6 uker lys (PBS) som utpekte seg, og etter tretti dager med smitte hadde gruppen rundt 60% dødelighet. På ti dager døde i overkant av 50% av all fisken i denne gruppen. For de to resterende uvaksinerte gruppene (1 uke lys og 3 uker lys) gikk dødeligheten gradvis oppover. For 3 uker lys (PBS) stagnerte dødeligheten på 69,2% (Tabell 7) ved dag 45. Det fortsatte å dø fisk hos 1 uke lys (PBS) helt til avslutning av forsøket og gruppen endte da på 40,4% dødelighet. For de vaksinerte gruppene var dødeligheten stabilt lavere gjennom hele smitteperioden. Gruppen med høyest dødelighet var 6 uker lys som endte med totalt 7,7% akkumulert dødelighet. For de to resterende vaksinerte gruppene var total dødelighet 3,8%. Dødeligheten hos IPNV-injisert fisk var lav gjennom hele smitteperioden (6,1%). Dødelighet i alle de vaksinerte gruppene var statistisk forskjellige fra de uvaksinerte gruppene ved $p\text{-verdi} \leq 0,00333$ (Tabell 7). Innad i de uvaksinerte gruppene var det statistisk signifikant forskjell mellom 6 uker lys og 1 uke lys ($p\text{-verdi} \leq 0,00333$). Det var ikke signifikante forskjeller innad i de vaksinerte gruppene (for all statistikk se Appendiks 3, side 82 og 83).

Femten fisk fra hver gruppe ble ved endt sommerstimuli overført til sjøvann (uten å bli smittet med IPNV), for å observere eventuell bakgrunnsdødelighet grunnet osmoregulatoriske problemer. Det ble ikke registrert noen dødelighet etter én uke og all fisk ble destruert.



Figur 17. Akkumulert prosentvis dødelighet for vaksinert og uvaksinert smolt (N=52-53) fra tre ulike lysbehandlingsregimer, etter kohabitantsmitte med IPNV i sjøvann. Rødt viser uvaksinert smolt (PBS), grønt vaksinert smolt (AJm6) og blått IPNV-injiserte shedders (N=165). Dødelighetstall fra to ulike kar er slått sammen. Temperaturen gjennom hele smitteperioden var 10 °C. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

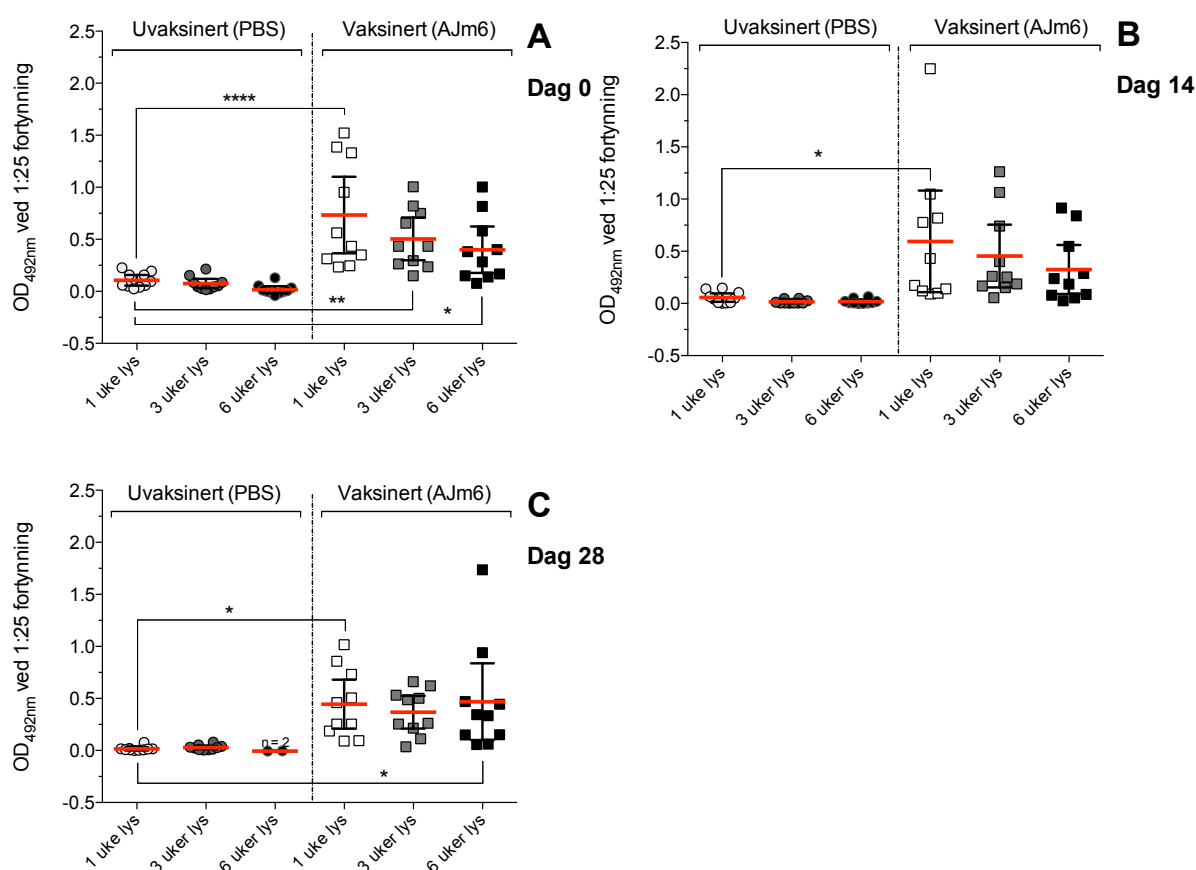
Tabell 7. Statistisk oversikt for grupper og dødelighet for vaksinert og uvaksinert smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer, samt IPNV-injiserte shedders, etter syv uker med IPNV-smitte i sjøvann. Dødelighetstall fra to ulike kar (2 og 3) er slått sammen. RPS er utregnet fra vaksinert gruppe og relevant kontrollgruppe. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, RPS = *relative percent survival*.

Grupper	N	RPS	Dødelighet (%)	p-verdi ift. relevant kontroll
6 uker lys (PBS)	52	-	86,5	-
3 uker lys (PBS)	52	-	69,2	-
1 uke lys (PBS)	52	-	40,4	-
6 uker lys (AJm6)	52	91,0	7,7	0,0001
3 uker lys (AJm6)	53	94,5	3,8	0,0001
1 uke lys (AJm6)	53	90,6	3,8	0,0001
IPNV-injiserte shedders	165	-	6,1	-

4.3 Antistoffrespons etter smitte med IPNV

Antistoffrespons mot IPNV ble målt i plasma til fisk fra alle grupper ved bruk av ELISA. Det ble analysert plasma ved overførsel til sjøvann/smitte (dag 0, usmittet fisk) og ved 14 og 28 dager etter smitte. Ti fisk per gruppe ble analysert per prøvetidspunkt.

Målingene for antistoffrespons ved dag 0 (smittetidspunkt, Figur 18A) viste at vaksinert fisk i gjennomsnitt hadde høyere konsentrasjon av antistoff mot IPNV i blodet (p -verdi $\leq 0,05$). Blant de vaksinerte gruppene var antistoffverdiene høyest hos smolten på 1 uke lys (AJm6) (OD 0,73), og de var i gjennomsnitt nesten to ganger så høy som hos 6 uker lys (OD 0,39). De vaksinerte gruppene hadde statistisk like høyt antistoffnivå. Hos de uvaksinerte gruppene var antistoffresponsen veldig lav og ingen signifikante forskjeller kunne sees gruppene i mellom.



Figur 18. Antistoffrespons mot IPNV ved tre ulike prøvetidspunkt for uvaksinert og vaksinert smolt (n=10) fra tre ulike lysbehandlingsregimer. Antistoffresponser ved smittetidspunkt (A), 14 (B) og 28 (C) dager etter smitte. Gjennomsnittet for hver gruppe er indikert med rød linje. Plasmaet ble fortennet 1:25. Vanntemperaturen ved prøvetaking var 10 °C. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$. Feilmarger indikerer 95% konfidensintervall. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Ved dag fjorten etter smitte (Figur 18B) hadde antistoffresponsen for de vaksinerte gruppene sunket og kun 1 uke lys (AJm6) skilte seg fra de uvaksinerte gruppene (p -verdi $\leq 0,05$). OD hos 1 uke lys var nå 0,59, for 3 uker lys 0,45 og for 6 uker lys 0,32. Det var ingen signifikant forskjell mellom de vaksinerte gruppene. Antistoffresponsen hos de uvaksinerte gruppene var uendret og fortsatt veldig lav.

Antistoffmålingene 28 dager etter smitte (Figur 18C) viste en nedgang i responsen hos de vaksinerte gruppene bortsett fra for smolten fra 6 uker lys som hadde en stigning i OD på 0,144. Gruppen skilte seg dermed statistisk fra de uvaksinerte gruppene (p -verdi $\leq 0,05$). Også vaksinert smolt fra 1 uke lys var statistisk forskjellig fra de uvaksinerte gruppene (p -verdi $\leq 0,05$). Det var ingen signifikant forskjell mellom de vaksinerte gruppene. Hos den uvaksinerte fisken var det ingen endringer i antistoffrespons.

De individuelle forskjellene for vaksinert fisk var store og OD-verdien kunne variere fra 2,2 til 0,1 (Figur 18B). Antistoffrespons for plasma-*pools* fra hver gruppe ($n=10$) ble også analysert (se Appendiks 5, side 87 og 88). Resultatene samsvarte med de individuelle resultatene. All statistikk for de individuelle antistoffverdiene, samt *pools* finnes i Appendiks 4 og 5.

4.4 Påvisning av virus

Biter av vevsprøver fra hodenyre til smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer ble analysert for tilstedeværelse av IPNV med RT qPCR.

Etter 21 dager med kohabitantsmitte med IPNV kunne det påvises uttrykk av VP1 (dermed tilstedeværelse av viralt arvestoff) i fisk i alle de uvaksinerte gruppene, men ikke alle de vaksinerte. For smolt fra 6 uker lys (PBS) var alle de fire undersøkte individene positive for viruset. For de to resterende uvaksinerte gruppene var prevalensen 75%. Det ble ikke IPNV hos smolt fra 6 uker lys (AJm6), men begge de andre vaksinerte gruppene var positive for viruset. Hos disse gruppene var prevalensen 50% for 3 uker lys og 75% for 1 uke lys.

Tabell 8. Påvisning av virus med RT qPCR hos vaksinert og uvaksinert smolt (n=4) fra tre ulike lysbehandlingsregimer etter 21 dager med kohabitantsmitte med IPNV. Tabellen viser prevalens for infisert smolt. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Gruppe	Antall IPNV positive/total	%
6 uker lys (PBS)	4/4	100%
6 uker lys (AJm6)	0/4	0%
3 uker lys (PBS)	3/4	75%
3 uker lys (AJm6)	2/4	50%
1 uke lys (PBS)	3/4	75%
1 uke lys (AJm6)	3/4	75%

IPNV ble forsøkt påvist i hodenyre etter fjorten dager med smitte (VP2 og VP1), men resultatene var svært uklare og kunne derfor ikke brukes. Dannelse av primer dimere (binding av primere til hverandre) gjorde at smeltepunkt kurvene var vanskelige å tolke.

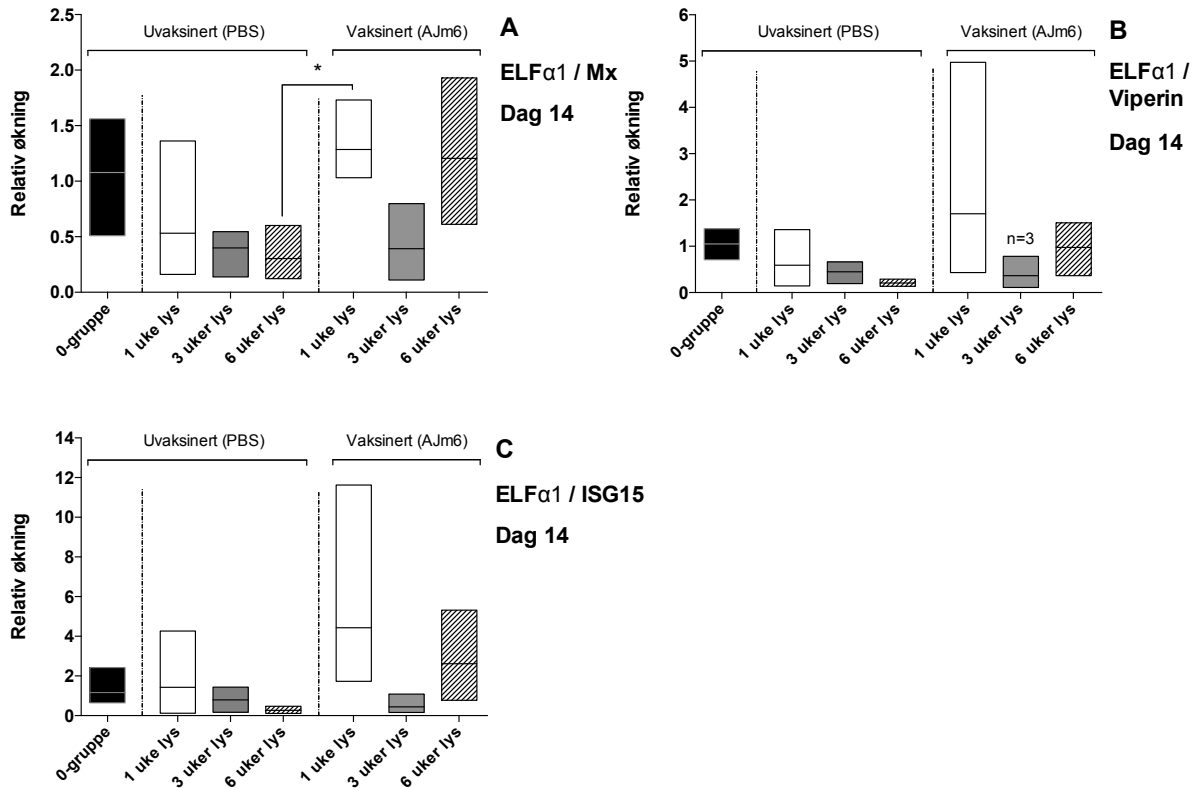
4.5 Uttrykk av antivirale gener hos smolt smittet med IPNV

Relativt genuttrykk for Mx, Viperin og ISG15 (i forhold til referansegenet ELFa1) ble målt i hodenyre hos fisk fra gruppene i forsøket ved SYBR® Green RT qPCR.

Relativ økning ved dag 14 viste at uvaksinert fisk i gjennomsnitt hadde om lag halvparten så høyt uttrykk av Mx enn 0-gruppen (ikke eksponert for smitte), men det var ingen signifikant forskjell mellom disse gruppene (Figur 19A). Den vaksinerte fisken hadde likt genuttrykk som 0-gruppen, og jevnt over høyere genuttrykk enn de uvaksinerte gruppene. Verdiene viste at genuttrykket for Mx var i overkant av dobbelt så høyt for vaksinert fisk på 1 uke lys enn for uvaksinert fisk med 6 uker lys ($p\text{-verdi} \leq 0,05$). Vaksinert smolt på 6 uker lys hadde i gjennomsnitt veldig likt uttrykk av Mx som vaksinert smolt på 1 uke lys, men variasjonen innad i denne gruppen var mye større. Innad i de vaksinerte gruppene var uttrykt Mx lavest for 3 uker lys.

Genuttrykket for Viperin ved dag 14 (Figur 19B) var lavt for alle gruppene i forsøket. Hos vaksinert fisk på 1 uke lys var gjennomsnittsverdiene noe høyere. Det var store variasjoner i genuttrykk for fisk innad i denne gruppen (over fire ganger så høyt uttrykk fra en fisk til en annen). Det var ingen signifikante forskjeller mellom noen av gruppene. Verdier for uttrykt ISG15 ved dag 14 (Figur 19C) var veldig likt uttrykket for Viperin og ingen signifikante forskjeller kunne sees mellom noen av gruppene. Fisken med høyest genuttrykk hadde om lag syv ganger høyere uttrykk av ISG15 enn fisken med minst uttrykk av genet.

Av de vaksinerte gruppene hadde 3 uker lys lavest genuttrykk for alle målgenene. En trend for alle genene var at uvaksinert fisk hadde lavere genuttrykk enn vaksinert fisk. Det var også en tendens til generell nedregulering av genuttrykk etter smitte for uvaksinert fisk. Ct-verdier for genuttrykk for hvert målgen finnes i Appendiks 6, side 89.



Figur 19. Relativ økning av genuttrykk (målt ved RT qPCR) for Mx, Viperin og ISG15 for uvaksinert og vaksinert smolt (n=4) fra tre ulike lysbehandlingsregimer ved dag 14 etter smitte med IPNV. (A) Mx, (B) Viperin og (C) ISG15. 0-gruppa var usmittet smolt injisert med PBS og utsatt for seks uker med 24L:0M. Vanntemperaturen ved prøvetaking var 10 °C. Relativ økning er regnet ut fra matematisk modell (ligning 3) beskrevet av Pfaffl (2001). Boksene indikerer høyest og lavest verdi samt gjennomsnitt. * $p \leq 0,05$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

5. Diskusjon

Dødelighet hos post-smolt er et stort problem for norsk lakseoppdrett, og et område av næringen som vies store mengder ressurser og innsats for å forbedre. Modernisering av klekkeri og settefiskanlegg, økt fokus på smittefare og renslighet, opplæring og utdanning av personell, testing av fisken før sjøfasen og nøye oppfølging etter utsett er viktige tiltak for å forsøke å minske dødeligheten. Til tross for dette står dødeligheten knyttet til dårlig smoltkvalitet for om lag 20% av all dødelighet sett hos oppdrettslaks etter sjøutsett (Hjeltnes, 2014). Årsaken til denne dødeligheten er ikke fullstendig kartlagt og kan skyldes osmoregulatoriske problemer, mottakelighet for sykdom, vaksinebivirkninger eller bare et naturlig svinn av svake individer. For å øke forståelsen er det viktig å forske på hva som påvirker smolten etter sjøutsett. I denne oppgaven ble det undersøkt om ulike smoltstatus kunne påvirke overlevelse ved horisontal smitte med IPNV. Dette ble gjort ved å utsette ulike grupper parr (vaksinert om uvaksinert) for forskjellige lysbehandlingsregimer (for å indusere smoltifisering), og deretter utsette de for kohabitantsmitte med IPNV i sjøvann. Deretter ble mottakelighet for IPN undersøkt, ved å observere dødelighet i syv uker. Antistoffrespons mot IPNV og uttrykk av antivirale gener ble så målt i henholdsvis blodplasma og hodenyre, ved bruk av ELISA og RT qPCR. Resultatene kan bidra til økt forståelse av immunologiske prosesser i smoltifiseringen, og hvordan disse prosessene påvirker respons til vaksiner og mottakelighet for sykdom.

5.1 Dokumentering av smoltstatus

En forutsetning for å kunne si noe om mottakelighet for IPN, og vaksinerespons hos smoltifiserende laks, er å få bekreftet at fisken faktisk har igangsatt smoltifiseringsprosessen, og undersøke om det er forskjeller mellom fiskegruppene som indikerer at de er på ulike stadier. I denne oppgaven ble det brukt godt etablerte metoder for bestemmelse av smoltstatus.

5.1.1 Smoltindeks og vekst

Den enkleste måten å observere parr-smolt transformasjonen på er å undersøke de morfologiske endringene fisken gjennomgår. Det ble påvist signifikante forskjeller i smoltindeks mellom gruppene i forsøket (Figur 11). Bedømmelse av smoltindeks er subjektivt

og kan variere fra person til person, så de bestemte verdiene ble kontrollert av en andrepert. Ut i fra smoltindeksen er det tydelig at fiskens tilpasning til en pelagisk tilværelse øker jo lenger den er utsatt for sommerstimuli (24L:0M). Endringene som vitnet om dette var ventral hvitfarge, dorsal svartfarge, lateral sølvfarge og mørke finner. Én uke på sommerstimuli var ikke nok for å framprovosere store morfologiske endringer da man tydelig kunne se parrmerker, lysebrune finner, laterale rødlige prikker og generelt et utseende tilpasset et liv i ferskvann. Vekt og lengde til fisken økte signifikant i takt med økt lengde på sommerstimuli (Figur 12), noe som er i samsvar med litteraturen (Boeuf et al., 1985, Boeuf og Prunet, 1985, McCormick, 2013). Fiskens kondisjonsfaktor (raten mellom vekt og lengde utregnet ved $\text{vekt}/\text{lengde}^3 \times 100$) minket noe utover i lysbehandlingen (Appendiks 2, side 81) og var en direkte effekt av smoltifiseringsprosessen. Man vet fra andre studier at smolt vanligvis har redusert kondisjonsfaktor sammenlignet med parr (Heggberget et al., 1992). Dette kommer som en følge av høyt energiforbruk gjennom smoltifiseringen og økt lengdevekst, som til sammen gir en slankere kropp, og bedre svømmeegenskaper i åpent vann (McCormick, 2013).

5.1.2 Kloridinnhold og osmolalitet i blod

Kloridinnhold i serum for uvaksinert fisk som ble utsatt for sjøvannstest etter tre og seks uker med sommerstimuli var på ca. 148 mM. Verdiene ligger dermed innenfor hva som betegnes som normalt for laks i sjøvann (Heggberget et al., 1992). Dette indikerer at smolten i disse forsøksgruppene hadde god evne til utskillelse av salter. Verdiene for kloridinnhold er faktisk lavere enn hva tidligere studier har vist (Eggset et al., 1999). I studiet til Eggset og medarbeidere (1999) var kloridinnhold i plasma hos uvaksinert atlantisk laks, utsatt for sjøvannstest og sommerstimuli i seks uker, stabilt på ca. 155 mM. Forsøket demonstrerte også at kloridverdier for vaksinert fisk var noe høyere enn hos uvaksinert fisk når sommerstimuli ble igangsatt samtidig som vaksinerings. Det var ikke forhøyede kloridverdier hos vaksinert fisk når vaksinerings fant sted noen uker før eller etter start av lysbehandling (Eggset et al., 1999). Forhøyede kloridverdier rett etter vaksinerings er også påvist i andre studier (Melingen og Wergeland, 2000). I dette forsøket ble ikke kloridanalyser av serum gjort på vaksinert smolt, men i og med at vaksinerings i vårt tilfelle fant sted tre uker før igangsetting av lysbehandling er det ingen grunn til å tro at kloridverdiene hos den vaksinerte fisken ville avvike fra de verdiene som ble målt hos uvaksinert smolt.

De høye kloridverdiene etter sjøvannstest hos smolt holdt kun én uke på sommerstimuli (Figur 13A og 15A) skyldtes at fisken ikke hadde fått nok tid på 24 timer lys per døgn til å utvikle de fysiologiske responser som er nødvendig for å kvitte seg med overflødig salt etter sjøvannseksponering. Dette kunne sees i 1 uke lys-gruppen, men var spesielt tydelig for kontrollfisk (gruppe 7) etter én uke på sommerstimuli. Dette er i samsvar med tidligere studier (Folmar og Dickhoff, 1981, Eggset et al., 1999). De påfølgende ukene utover i lysbehandlingen sank kloridverdiene og viste at økt lengde med sommerstimuli gjorde fisken mer klar for sjøvann. Tidligere studier tatt i betraktning (Melingen og Wergeland, 2000) kunne det forventes at 3 uker lys-gruppen skulle hatt lavere kloridverdier enn 6 uker lys-gruppen, grunnet lengre tid på sommerstimuli. Årsakene til at disse gruppene ikke skiller seg fra hverandre er ikke klare, men kan skyldes at 24 timers sjøvannstest på 10 °C ikke er en spesielt belastende test for fisken (E. Jørgensen, pers. com., 11 november, 2015). Trolig ville eventuelle forskjeller i hypoosmoregulatorisk evne hos smolt som hadde fått tre og seks ukers sommerstimuli kunne sees om den hadde blitt gitt en lengre sjøvannstest.

Etter sjøvannstest var osmolaliteten for uvaksinert smolt, som hadde blitt holdt tre og seks uker på sommerstimuli, på ca. 355 mOsm kg⁻¹. Disse gruppene hadde signifikant lavere osmolalitet i blodet sammenlignet med 1 uke lys-smolten som hadde en osmolalitet i serum på 371 mOsm kg⁻¹. Dette var samme trend som for kloridmålingene, nemlig at fisk holdt på tre og seks uker sommerstimuli ikke skilte seg stort fra hverandre med henhold til hypoosmoregulatorisk kapasitet. Normale osmolalitetsverdier for laks i sjøvann er 320-350 mOsm kg⁻¹ (Heggberget et al., 1992). Dette er riktig nok for smolt akklimatisert til sjøvann over lengre tid. Osmolalitet i serum til kontrollfisken i vårt forsøk var 349 mOsm kg⁻¹ etter fem uker med sommerstimuli og kan derfor regnes for å være innenfor normalen. Som Figur 15B viser steg osmolaliteten i serum til kontrollfisken i løpet av den første uken, men minket gradvis med økende antall uker på sommerstimuli. Dette samsvarer med resultater fra tidligere studier der osmolaliteten har vist seg å synke gradvis fra januar til mai (McCormick et al., 2009). Verdiene har da vært helt nede på ca. 315 mOsm kg⁻¹ (McCormick et al., 2009). Generelt ligger osmolalitetsverdiene i dette forsøket i det høyere sjiktet av hva som kan regnes for normalt. Det kan tenkes at injeksjon av PBS kan ha påvirket osmolaliteten hos forsøksgruppene i form av økt stress, og at dette kan være årsaken til at den er høyere enn for kontrollfisken som ikke var injisert. Riktig nok har kontrollfisken fått klipt av høyre maxille,

som også kan gi økt stressrespons. Denne ville imidlertid vart i verste fall bare noen dager (E. Jørgensen, pers. com., 11 november, 2015), så her er det vanskelig å si noe håndfast. Når dette er sagt er ikke 355 mOsm kg^{-1} oppsiktsvekkende høye osmolalitetsverdier, så det er liten grunn til å betvile at fisken var klar for et liv i sjø, alle de andre indikasjonene på smoltifisering tatt i betraktning.

Forskjellen i kloridinnhold og osmolalitet i serum sett etter sjøvannstest mellom smolt fra én, tre og seks uker sommerstimuli kan påvirke fisken i sjøvannsfasen. I forsøk har det blitt vist at vekst kan stagnere hos parr som eksponeres for høye saliniteter (McCormick et al., 1989, Duston, 1994). Rask økning i dødelighet hos parr etter overførsel til sjøvann er dokumentert, med påfølgende minkende dødelighetstall når fisken akklimatiserer til saltinnholdet (Duston, 1994). I dette forsøket ble det registrert veldig liten dødelighet etter sjøeksponering hos vaksinert smolt som bare hadde fått én uke sommerstimuli, noe som indikerer at fisken tolererer den bråe overgangen fra ferskvann til sjøvann bra, tross ufullstendig smoltifisering. Det ble imidlertid registrert at smolt eksponert for kun én uke med sommerstimuli generelt vokste lite gjennom smitteperioden. Smolt utsatt for flest uker med sommerstimuli hadde best vekst med henhold til vekt og lengde. Dette var spesielt tydelig for vaksinert fisk (se Appendiks 2, side 81). Dette kan tyde på at fisken som var best smoltifisert hadde få ione- og osmoregulatoriske problemer sammenlignet med fisk som var dårligere smoltifisert. Vekt og lengdemålinger gjennom smitteperioden ble tatt fra prøvetakingskaret og en kan tenke seg at disse kan avvike fra de i smittekarene, men det er lite sannsynlig. For å utelukke bakgrunnsdødelighet som følge av osmoregulatoriske problemer, ble femten fisk fra hver gruppe overført til sjøvann uten å bli smittet med IPNV. Ingen dødelighet ble registrert hos denne fisken etter én uke og fisken ble destruert. Dette viser at alle gruppene klarte å håndtere den økte saliniteten, i hvert fall én uke.

5.1.3 ATPase-aktivitet i gjellevev

En rekke studier har vist at måling av NKA-aktivitet i gjeller hos smoltifiserende atlantisk laks er et godt verktøy for bestemmelse av smoltstatus (Zaugg og Wagner, 1973, McCartney, 1976, Boeuf et al., 1985, Boeuf og Prunet, 1985, Stefansson et al., 2005) og metoden er i dag kommersiell standard (av eksempelvis PHARMAQ Analytiq). Under naturlige lysforhold har enzymaktiviteten i gjellene vist seg å stige jo lenger ut i smoltifiseringen fisken kommer.

Verdier fluktuerer mellom 10 og 20 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ i april-mai, for så å gradvis reduseres utover sommeren om fisken blir holdt tilbake i ferskvann slik at den desmoltifiserer (Zaugg og Wagner, 1973, Boeuf et al., 1985, Boeuf og Prunet, 1985, Handeland et al., 2003, McCormick et al., 2009). NKA-verdier har vist seg noe lavere hos vill fisk enn hos oppdrettsfisk (Handeland et al., 2003). Med gjennomsnittlig enzymaktivitet på 5 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ for fisken som hadde vært lengst på sommerstimuli var våre resultater veldig lave i forhold til det som er dokumentert tidligere. Dette skyldes trolig at gjelleprøvene ble lagret på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i nesten seks måneder før de ble analysert. Det er kjent at frysing kan påvirke mikrostrukturen til proteinene slik at de denaturer (Arakawa et al., 1993, Cao et al., 2003). Enzymer kan dermed miste aktiviteten sin etter bare seks uker på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tamiya et al., 1985). ATPase aktiviteten til myosin i muskel hos karper har sågar vist seg å forsvinne helt etter bare seksten dager på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Akahane et al., 1981). Et studie av enzymet *aryl hydrocarbon hydroxylase* i lever hos rotter viste at enzymaktivitet var tilstede før og etter frysing på $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, men at aktiviteten var redusert med om lag 70% på litt over fire måneder (Idoine et al., 1976). De lave NKA-verdiene presentert i denne oppgaven er dermed ikke overraskende. Lagring på $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hadde trolig vært fordelaktig, men helst burde prøvene blitt analysert i løpet av få dager etter prøvetaking. Riktig nok viser Figur 14 signifikante forskjeller mellom de ulike smoltgruppene og trenden i resultatene var som forventet ut i fra hva man vet om smoltifiserende laksefisk. I og med at alle prøver fikk samme behandling er det ingen grunn til å tro at forskjellene ikke er reelle, til tross for de lave verdiene.

5.1.4 Oppsummering av smoltstatus

Ut ifra smoltindeks, klorid- og osmolalitätsanalysene i serum, NKA-verdier og vekstdata fra de ulike gruppene, er det tydelig at de forskjellige lysbehandlingsregimene hadde effekt og at smolten var i ulike stadier av smoltifiseringsprosessen ved overførsel til sjøvann og start av kohabitantsmitte med IPNV. Ved produksjon av millioner av smolt vil ikke alle være i samme stadium, og variasjoner i de målte parameterne vil kunne påvises på individnivå. Dette er trolig en del av årsaken til at det blir produsert mye ”dårlig smolt” i kommersiell lakseoppdrett.

5.1.5 Alternative indikatorer for smoltifisering

Det er ettertrykkelig dokumentert at produksjonen av GH og IGF-1 øker med økt daglengde og at hormonene er veldig viktige for fiskens evne til å hypoosmoregulere etter overførsel til sjøvann (Prunet et al., 1989, McCormick, 1996, Björnsson, 1997, Dickhoff et al., 1997, Handeland et al., 2000, Handeland et al., 2003, McCormick et al., 2009). Undersøkelser av mengde sirkulerende GH og IGF-1 hos de ulike gruppene brukt i dette forsøket hadde dermed kunne bidratt til å belyse eventuelle forskjeller framprovosert av lysbehandling med sommerstimuli, samt evne til utskillelse av salter gruppene imellom.

5.2 Smoltifiseringsprosessens påvirkning på mottakelighet for IPN

Smolt med ulik grad av hypoosmoregulatorisk kapasitet ble overført til sjøvann og eksponert for horisontal smitte med IPNV. Dødelighet ble registrert daglig gjennom hele smitteperioden. Akkumulert prosentvis dødelighet syv uker etter IPNV-smitte i sjøvann viste at den uvaksinerte fisken hadde størst mottakelighet for sykdommen (Tabell 7). Av de uvaksinerte gruppene kunne man observere at det var gruppen som hadde kommet lengst i smoltifiseringsprosessen (6 uker lys), og som var klar for overførsel til sjøvann, som hadde høyest dødelighet. Den gruppen som håndterte smittepresset best av de uvaksinerte gruppene var den som kun hadde hatt én uke med sommerstimuli før smitte. Disse resultatene kan bety flere ting. Fullstendig smoltifisering kan ha negativt effekt på fiskens evne til å motstå IPN ved at immunforsvaret svekkes gjennom smoltifiseringen. Alternativt kan ufullstendig smoltifisering gjøre at fisken igangsetter fysiologiske mekanismer som øker beskyttelsen mot sykdommen. En kombinasjon av disse hypotesene kan også være årsaken til dødeligheten sett i forsøket. Det er lite litteratur tilgjengelig på endring i immunforsvaret under smoltifiseringen og resultatene presentert i denne oppgaven antyder at dette er noe som bør forskes mer på.

5.2.1 Kan kortisol svekke immunforsvaret, men øke sjøvannstoleranse?

Forhøyede kortisolverdier er forventet hos laksefisk som gjennomgår smoltifisering (Specker og Schreck, 1982, Redding et al., 1984, Nilsen et al., 2008, McCormick, 2013). Hormonet fører til en økning i NKA-aktiviteten i gjellene og øker fiskens evne til hypoosmoregulere (Nichols og Weisbart, 1985, Bisbal og Specker, 1990). Hos regnbueørret har det blitt påvist forhøyede kortisolverdier etter seksti dager med 24L:0M og påfølgende to måneder etter avslutning av

lysbehandlingen (Leonardi og Klempau, 2003). Kortisol er også en indikator på stress, og studier har vist raske økninger i sirkulerende kortisolnivåer som følge av ulike stressorer hos forskjellige typer laksefisk (Gamperl et al., 1994, McCormick et al., 1998b). Med tanke på at studier har koblet økte kortisolverdier til reduksjon i antall sirkulerende lymfocytter hos en rekke laksefisk (Pickering, 1984, Maule et al., 1987, Espelid et al., 1996), kan hormonets økning i fisken være en "trade-off" mellom essensielle fysiologiske endringer knyttet til regulering av ione- og osmoregulatoriske mekanismer og en svekkelse av immunforsvaret. Nedregulering av IFN type I, T-cellemarkøren CD3 og MHC-1 hos IPNV-smittet smolt etter injeksjon med kortisol er vist (Niklasson et al., 2014), noe som er en indikator på hormonets immunosuppressive egenskaper. Hos karper har forhøyde kortisolverdier ført til apoptose av B-celler og en generell nedregulering av immunforsvaret (Weyts et al., 1998, Verburg-van Kemenade et al., 1999). Fisken vil dermed kunne takle endringer i saltinnhold, men ikke nødvendigvis tilstedeværelse av et aggressivt patogent agens. Når coho laks utsettes for sjøvann før de er ferdig smoltifisert har det blitt vist en rask økning i kortisolverdier i blodet (Young et al., 1995). Samme grad av økning etter overførsel til sjøvann har ikke blitt sett hos fisk som er ferdig smoltifisert (Young et al., 1995). Det er nærliggende å tro at voldsomme økninger i kortisolverdier kan føre til raske endringer i NKA-aktiviteten i gjellene til fisken, slik at den kan overleve i sjøvann selv om smoltifiseringen ikke er gjennomført. Behandling med kortisol har ført til økt salttoleranse og saltutskillelse i gjellene og magen hos fisk (McCormick, 2001). Dette vil i så fall kunne være en forklaring på at 1 uke lys-gruppen ikke døde som følge av osmotiske problemer. Samtidig kan en økning i kortisol kunne føre til en svekkelse av immunforsvaret som da igjen kan gi viruset et overtak, og man burde forvente større dødelighet etter IPNV-smitte sammenlignet med de andre gruppene. Økt dødelighet i 1 uke lys-gruppen er ikke tilfelle i vårt forsøk og kan bety at en rask økning i kortisolnivå etter overførsel til sjøvann ikke svekker immunforsvaret nok til at det alene er årsaken til dødelighetsforskjellene man ser mellom gruppene, men heller øker fiskens evne til raskt å omstille til hypoosmotisk osmoregulering. Dette er mekanismer som man vet lite om og som burde studeres videre.

5.2.2 Oppregulering av immunforsvaret grunnet økt endokrinologisk aktivitet

Kortisol, sammen med T₄, GH, IGF-1 og prolaktin, er ansett som viktige hormoner for regulering av metabolisme og smoltifisering hos laksefisk (Sheridan, 1986, Sheridan, 1989, Vijayan og Leatherland, 1989, Young et al., 1995, Dickhoff et al., 1997, McCormick, 2013). Overførsel til sjøvann vil typisk føre til en ytterligere økning i mengde GH i plasma hos smoltifiserende coho og atlantisk laks (Young et al., 1995, Boeuf et al., 1989). Denne hormonelle stigningen fører til økt vekst (Dickhoff et al., 1997), og økt vekst er igjen koblet til økt daglengde. Vårt forsøk viste at lengden på sommerstimuli har positiv påvirkning på veksten til fisken (Figur 12). I vev fra laks er det vist at mengden oppspart lipid og glyserol minker og lipase-aktiviteten øker utover i smoltifiseringen (Sheridan, 1989). Det er kjent at GH og IGF-1 stimulerer til vekst men hormonene har også positiv effekt på immunforsvaret til teleoster (Sakai et al., 1996, Yada et al., 1999, Yada, 2007). Ettersom fisken vokser og når et punkt der den er ”ferdig” smoltifisert vil mengden av disse hormonene minke (Dickhoff et al., 1997, Prunet et al., 1989, McCormick et al., 2009). Smolt eksponert for seks uker med sommerstimuli kan da ha nådd et punkt med tilstrekkelig vekst og hormoner assosiert med vekst kan da ha minket i mengde. Dette kan ha påvirket immunforsvaret negativt og ført til økt sykdomsmottakelighet. Hos gruppene som var eksponert for sommerstimuli over en kortere periode kan dermed GH- og IGF-1-konsentrasjonene fortsatt være høye ved start av smitte, grunnet ufullstendig smoltifisering. McCormick og medarbeidere (1998) har vist en rask økning i GH og IGF-1 opp til fire og åtte timer etter stress (McCormick et al., 1998b). Fisk som er ufullstendig smoltifisert kan oppleve mer stress enn de andre gruppene, noe som kan ha ført til oppregulering av immunforsvaret. GH fører til økt uttrykk av IGF-1 i gjeller, og med tanke på at gjellene inneholder store ansamlinger av lymfocytter (Haugarvoll et al., 2008) kan GH/IGF-1 aksen være svært viktig for bekjempelse av patogener over gjellene (Yada, 2007). Dødeligheten sett i forsøket kan reflektere mengden hormoner knyttet til smoltifiseringsprosessen, og gruppen med kun én uke på sommerstimuli kan ha størst endokrinologisk aktivitet i og med at den er helt i starten av smoltifiseringen. Endokrinologi kan stå sentralt i å belyse hva ”dårlig smolt” faktisk er. Ut i fra denne resoneringen er det nærliggende å tro at smoltifiseringsprosessen ikke bare stimulerer til vekst, men også oppregulerer immunforsvaret. Fra et biologisk ståsted kan det være logisk å mobilisere forsvaret når man går gjennom en så kritisk del av livssyklusen som smoltifiseringen er. I

tillegg vil det være gunstig for fisken å forberede seg på overgangen til et nytt miljø med en annen flora av mikroorganismer. Når smoltifiseringsprosessen er over kan immunforsvaret trappe ned og fisken blir mer mottakelig for patogener. I retrospekt hadde det vært interessant å målt kortisol, GH- og IGF-1-nivåer i blodet til fisken i vårt forsøk.

5.2.3 Kommer vekst på bekostning av immunforsvaret?

En annen måte å tolke resultatene på er å si at økt metabolisme og vekst i forbindelse med smoltifisering går på bekostning av immunforsvaret. En rekke metabolske gener i tillegg til gener forbundet med vekst er oppregulert under smoltifiseringen (Seear et al., 2010). Smoltifiseringen er kanskje så energikrevende at fiskens immunforsvar blir nedprioritert. Dette kan ha ført til økt dødelighet hos den best smoltifiserte gruppen, og bidratt til at den antatt dårligst smoltifiserte fisken overlevde. En slik vinkling vil indirekte bety at økt endokrinologisk aktivitet vil svekke immunforsvaret over tid, da en rekke hormoner utskilles for å igangsette vekst hos fisken under smoltifiseringen (McCormick, 2013). Få, om noen, studier viser en direkte kobling mellom økt vekst og nedprioritering av immunforsvar, og videre forskning må gjøres for å bekrefte eller avkrefte denne koblingen.

5.3 Vaksinerespons nedreguleres ved igangsetting av smoltifisering

Mengde antistoff (IgM) mot IPNV i plasma reflekterer hvor godt det humorale immunforsvaret til fisken har evnet å respondere på vaksinen. Økte antistoffverdier etter vaksinerings vil gi fisken et fortrinn ved infeksjon (Munang'andu et al., 2013a, Munang'andu et al., 2014). Resultatene fra antistoffanalysene viste tydelig at vaksinert smolt hadde høyere antistoffrespons enn uvaksinert smolt (Figur 18). Forskjellene var størst mellom 1 uke lys-gruppen (vaksinert) og 6 uker lys-gruppen (uvaksinert) for alle prøvetidspunktene, men spesielt ved dag 0 (overførsel til sjøvann og start av kohabitantsmitte). Denne fisken ble satt på lys fem og to uker etter de andre vaksinerte gruppene, og hadde kun hatt én uke med sommerstimuli før smitte. Resultatene fra antistoffanalysene indikerte også at 6 uker lys-smolten var den vaksinerte gruppen som hadde jevnt lavest antistoffrespons gjennom forsøket, bortsett fra ved dag 28. I og med at alle indikatorer på smoltifisering viste at denne fisken var bedre smoltifisert enn 1 uke lys-gruppen, men hadde lavere antistoffnivå, var det sterke indikasjoner på at smoltifiseringsprosessen ble prioritert over respons på vaksinen. Resultatene for plasma-pools viste samme trend (se Appendiks 5, side 87). Ved start av

sommerstimuli vil fisken trolig favorisere smoltifisering framfor å respondere på vaksinen, ved å produsere antistoffer mot IPNV. Fisken ble vaksinert på samme tidspunkt og siden sommerstimuli ble igangsatt flere uker senere for 1 uke lys-gruppen enn for de to resterende gruppene vil immunforsvaret til denne smolten trolig ha rukket å produsere en fullverdig antistoffrespons mot sykdommen, før smoltifisering ble startet. Det var riktig nok ikke noen store forskjeller i dødelighet mellom de vaksinerte gruppene og overlevelsen for all vaksinert smolt var veldig høy. Resultater fra *pools* (se Appendiks 5, side 87) viser heller ingen signifikante forskjeller i antistoffrespons mellom de vaksinerte gruppene. Dette betyr at selv om smoltifiseringen trolig kan påvirke vaksineresponsen er det ikke nok til å påvirke mottakeligheten for IPN hos de vaksinerte gruppene. Dette betyr at all vaksinert fisk var beskyttet mot IPN, uavhengig av smoltstatus. RT qPCR viste at færre vaksinerte smolt var positive for IPNV ved 21 dager etter smitte, enn uvaksinerte smolt. Ingen IPNV-positive individer ble registrert fra 6 uker lys-gruppen (vaksinert). Hos 1 og 3 uker lys-gruppen (vaksinert) var henholdsvis 75 og 50% av smolten positive for viruset, tross den høye antistoffresponsen. Dette er overraskende, og man ville forvente at all vaksinert smolt som viste beskyttelse mot sykdommen ville være tilnærmet fri for virus (Munang'andu et al., 2013a). Dette kan skyldes at den dårligst smoltifiserte fisken må drikke mer sjøvann for å opprettholde vannbalansen grunnet osmoregulatoriske problemer og dermed utsetter seg selv for økt infeksjonsfare over tarmveggen. Immunforsvaret kan allikevel klare å hanske med viruset, noe dødelighetstallene og antistoffresponsene bekrefter. Når dette er sagt, burde flere fisk enn fire blitt undersøkt for å styrke resultatene.

For 1 og 3 uker lys-gruppene (vaksinert) sank antistoffverdiene utover i forsøket. Dette skyldtes trolig at antistoffene ble brukt for å nøytralisere viruset (Munang'andu et al., 2013a, Munang'andu et al., 2014). Antistoffet vil da ikke kunne bli målt med ELISA selv om det er tilstede i plasma. Dermed er det naturlig at mengden antistoff minker utover i smitteforløpet (Munang'andu et al., 2013a, Munang'andu et al., 2014). Mengden antistoff hos 6 uker lys-gruppen (vaksinert) fulgte ikke samme trend (se resultater fra plasma-*pools* i Appendiks 5, side 87). Dette kan skyldes at produksjonen av antistoff etter vaksinerings ikke har vært tilstrekkelig til å nøytralisere viruset slik at fisken har måttet oppregulere produksjonen etter den sekundære infeksjonen. Dette vil også indikere at smoltifiseringen påvirker vaksineresponsen, i og med at denne fisken kun hadde tre uker inkubasjonstid før den ble satt

på sommerstimuli. Det er viktig å påpeke at det er store individuelle forskjeller innad i hver gruppe og gjennomsnittet kan bli dratt veldig opp, og ned, på grunn av ekstremverdier. Slike store antistoff-variasjoner kan i teorien skyldes ulik deponering av vaksinen i fisken, men kan også bare reflektere naturlige forskjeller mellom individer. Et større utvalg fisk burde blitt analysert for å tatt høyde for store individvariasjoner.

Resultatene fra antistoffanalysene avdekket ikke noen store forskjeller i antistoffrespons innad i de uvaksinerte gruppene, noe som kunne vært med på å forklare den tydelige forskjellen i dødelighet gruppene i mellom. Antistoffmålinger i *pools* viste en antydning til økte verdier for 6 og 3 uker lys-gruppene ved dag 0, men forskjellene var så små at det er vanskelig å konkludere med noe (Appendiks 5, side 87 og 88).

5.4 IPNVs påvirkning på uttrykk av antivirale gener

For å undersøke eventuelle forskjeller i det innate immunforsvaret mellom smoltgrupper fra ulike lysbehandlingsregimer smittet med IPNV, ble uttrykk av gener forbundet med innat immunitet målt. Mx, ISG15 og Viperin er alle antivirale proteiner som induseres av IFNer (Workenhe et al., 2010). En virusinfeksjon vil typisk føre til produksjon av ulike typer IFNer slik at verten kan forsvare seg mot viruset (Robertsen, 2006). Våre resultater antydnet at Mx ble nedregulert fjorten dager etter smitte for uvaksinert smolt og viste at 6 uker lys-gruppen (uvaksinert) hadde lavest genuttrykk av Mx (Figur 19A). Jensen og Robertsen (2002) viste at infeksjon med IPNV ikke førte til produksjonen av Mx hos en type cellelinje (TO-celler) fra leukocytter i hodenyre til atlantisk laks. Samtidig har andre studier vist oppregulering av Mx i hodenyren etter eksperimentell smitte med IPNV, *in vivo* (Skjesol et al., 2011). Julin og medarbeidere (2014) viste økning i Mx-verdier i hodenyre hos laks etter tre uker smitte med et lavvirulent IPNV-isolat (Thr₂₁₇ – Thr₂₂₁) (Julin et al., 2014). Typisk vil Mx være nedregulert helt til viruset blir oppdaget (Haller et al., 2007). Trolig reflekterer de lave Mx-verdiene sett i vårt forsøk virusmengde i fisken, og indikerer at det ved dag fjorten etter smitte ikke var tilstrekkelig høy konsentrasjon av viruset for å indusere en fullverdig IFN-respons. Endringene i genuttrykk mellom gruppene i vårt forsøk var ubetydelige i forhold til hva andre studier med IPNV-smitte har vist (Skjesol et al., 2011, Munang'andu et al., 2013a, Niklasson et al., 2014) og noen slutninger kan derfor ikke trekkes.

En oppregulering av IFN og Mx i forbindelse med smoltifisering, spesielt rett før sjøutsett og påfølgende syv dager etter sjøutsett, er vist i et tidligere studie (Das et al., 2007). Våre resultater for uttrykk av antivirale gener viser en antydning til at 1 uke lys-gruppen har høyere genuttrykk enn de andre gruppene, både for vaksinert og uvaksinert smolt. Dette kan skyldes at de var helt i starten av smoltifiseringsprosessen grunnet kun én uke på sommerstimuli før smitte. Disse økningene kan igjen være knyttet til en generell hormonell økning ved smoltifisering som man vet kan ha positiv effekt på immunforsvaret til teleoster (Sakai et al., 1996, Yada et al., 1999, Yada, 2007). Igjen må det påpekes at den relative økningen i genuttrykk var lav og ingen konklusjoner kan trekkes ut i fra resultatene. At kun fire fisk ble undersøkt svekker også resultatets troverdighet. Disse svakhetene i resultatet tatt i betraktning, er det overraskende at vaksinert smolt hadde høyest uttrykk av antivirale gener. En effektiv vaksinerespons vil føre til at viruset replikerer med lav frekvens og følgelig vil det antivirale genuttrykket ikke oppreguleres (Munang'andu et al., 2013a). Det kan dermed forventes en oppregulering av virusspesifikke gener hos uvaksinert smolt på grunn av høye viruskonsentrasjoner. Dette er vist for Mx, samt for IFN γ , hos uvaksinert laks smittet med IPNV (Skjesol et al., 2011). All uvaksinert smolt var positive for IPNV, men genuttrykket ved dag fjorten var allikevel lavt for alle målgenene. Samtidig viste resultatene fra RT qPCR at 6 uker lys-gruppen (vaksinert) hadde høyere uttrykk av antivirale gener enn tilsvarende uvaksinert gruppe, tross ingen påvisning av IPNV. Generelt var det ingen logisk sammenheng mellom infisert fisk i hver gruppe og uttrykk av antivirale gener. Disse resultatene er overraskende, men kan stå i sammenheng med at kun fire fisk ble undersøkt, samt at prøver fra dag fjorten etter smitte ble analysert. Virustiter og Mx-uttrykk har vist seg å være høyest 21 dager etter smitte med IPNV ved bruk av den samme smitte modellen som i dette forsøket (Munang'andu et al., 2013a), og analyser av genuttrykk ved dette tidspunktet kunne gitt andre resultater.

Resultatene for relativ økning i uttrykk av antivirale gener hos smolt fra de ulike gruppene fjorten dager etter start av kohabitantsmitte med IPNV viste få forskjeller gruppene i mellom. Det kan se ut til at 1 uke lys (vaksinert) har generelt høyere uttrykk av antivirale gener enn de andre gruppene, samt at uvaksinert fisk har en generell nedregulering i forhold til 0-gruppen, men ingen klare konklusjoner kan trekkes grunnet de moderate endringene.

5.5 Vurdering av forsøksoppsettet og prøveuttak

Smittemodellen brukt i forsøket egner seg godt for forsøk med IPNV. Dødelighet ble oppnådd (Figur 17 og Tabell 7), agenset ble påvist i prøver fra fisken (Tabell 8), og kliniske tegn på sykdommen ble registrert i løpet av smitteperioden (Figur 16). I og med at virus blir spredt i vannet via injiserte shedders (horisontal smitte) vil smittemodellen etterligne et naturlig utbrudd, og virus vil kunne trenge inn i verten via naturlige inngangsporter (gjeller, tarm og hud). Inngangsportens viktighet for viruset er tydelig ved å se på den lave dødeligheten sett hos virusinjiserte shedders. Trolig vil ikke viruset klare å nå de organene og cellene det trenger for replikasjon ved *bypass* av de naturlige inngangsportene. Lav dødelighet for virusinjiserte shedders er også sett i tidligere studier (Taksdal et al., 1998, Ramstad et al., 2007).

Etter endt sommerstimuli ble femten fisk fra hver gruppe overført til sjøvann, for monitorering av dødelighet knyttet til osmoregulatoriske problemer, uten å bli smittet med IPNV. Ingen dødelighet ble registrert hos denne fisken etter én uke og fisken ble destruert. For å kunne utelukke bakgrunnsdødelighet helt burde flere fisk gått på sjøvann uten smitte gjennom hele smitteforsøket. Én uke på sjøvann er trolig ikke nok til å kunne konkludere med at fisk ikke hadde død som følge av osmoregulatoriske problemer, og man kan ikke utelukke at noe dødelighet i smittekarene skyldtes dette. Man kan dog utelukke akutt dødelighet som følge av osmoregulatoriske problemer. I tillegg vil den vaksinerte fisken fungere som en slags kontroll for bakgrunnsdødelighet, og svært lite fisk døde i disse gruppene.

Prøvetaking ble først startet opp ved igangsetting av smoltifisering, samtidig som den første gruppen ble satt på sommerstimuli. Dette var tre uker etter at all fisk ble vaksinert. Blodprøver samt organprøver på RNAlater® av denne gruppen ble tatt. I retrospekt burde det også blitt tatt prøver av fisk ved vaksinering da dette vil være den naturlige nullgruppen. Etter vaksinering igangsettes immunologiske responser og mange fysiologiske endringer skjer i fisken som man ikke har full oversikt over. Tre uker etter vaksinering vil fisken ha gjennomgått mange endringer på grunn av vaksinen og kan dermed ikke anses som ubehandlet nullgruppe. Det burde derfor blitt tatt prøver av fisk ved start av vaksinering i tillegg til start av sommerstimuli.

Analysene for uttrykk av antivirale gener ble gjort fjorten dager etter smitte. Den akutte fasen for IPNV er vist å være etter 21 dager og organer fra dette tidspunktet burde derfor blitt analysert (Munang'andu et al., 2013a). Virus ble forsøkt detektert fjorten dager etter smitte ved bruk av primere spesifikke for kapsidproteinet VP2 og RNA-polymerasen VP1, uten at noen konklusjoner kunne trekkes. Smeltepunktsskurvene var svært vanskelige å tolke (trolig grunnet dannelse av primer dimere), og fravær av positive kontroller gjorde de vanskelige å analysere. Generelt høye C_t -verdier (31-34) indikerte også at det var svært lite virus tilstede i prøvene. Lave virustiter er ikke uvanlig fjorten dager etter smitte, og vanligvis ser man mye høyere konsentrasjoner av viruset etter 21 dager med smitte (Munang'andu et al., 2013a). Dette ble underbygget av våre resultater. En optimalisering av assayet brukt til RT qPCR burde gjøres for videre analyser av prøvematerialet.

5.6 Praktisk anvendelse av resultatene og videre forskning

Dødelighetstallene i forsøket viste at vaksinerings av parr (35-45 gram) med ALPHA JECT micro 6 mot IPNV ga god beskyttelse mot IPN etter sjøutsett uavhengig av smoltstatus (Figur 17 og Tabell 7). Høyest vekst kunne sees hos fisk som var optimalt smoltifisert (Figur 12 og Appendiks 2, side 81). Dette betyr at selv om oppdretter ikke klarer å produsere smolt som er i ”smoltvinduet” ved utsett, vil vaksineeffekt trolig fremdeles være tilfredsstillende. For vaksinert smolt var det 3,9% mer dødelighet for 6 uker lys-gruppen enn de resterende gruppene. Dette utgjør ikke en stor forskjell ved smitteforsøk som dette, men i et kommersielt utsett kan det ha betydelige økonomiske konsekvenser.

Det er indikasjoner på at dårlig smoltifisering kan være en årsak til stagnert vekst etter sjøutsett (Appendiks 2, side 81). I og med at forsøket ble avsluttet etter syv uker er det uvisst hvordan vekstforløpet til fisken ville vært utover i produksjonssyklusen, men fisken kunne blitt uegnet for slakt. Akklimatisering til sjøvannet utover i produksjonssyklusen kan føre til at mange individer gjenopptar veksten og blir slakteklar, dog trolig med lavere vekt enn den optimalt smoltifiserte fisken. Fisken vil trolig være beskyttet mot IPN i perioden rett etter sjøutsett, men det er uvisst hvordan et utbrudd av IPN flere uker, eller måneder, etter sjøutsett vil påvirke mottakeligheten for sykdommen. Vekststagnasjon og osmoregulatoriske problemer kan føre til at fisken aldri blir aktuell for konsum (og blir såkalte ”tapere”) selv om mottakeligheten for IPN er lav.

Framtidige studier med samme smittemodell bør brukes for å sammenligne 0+ smolt med 1+ smolt, ved kohabitantsmitte med IPNV. Et slikt studie kan avdekke eventuelle forskjeller mellom to kommersielle produksjonsregimer, og belyse om resultatene påvist i dette forsøket også stemmer for 1+ smolt som har hatt et lengre vekst- og smoltifiseringsforløp. Alternativt kan man undersøke smitte med andre patogene agens opp mot smoltifisering, da for eksempel infektiøs lakseanemi virus (ILAV) og salmonid alfavirus (SAV), sistnevnte forbundet med PD. Da bør organuttak skje før lysbehandling og vaksinerings, samt gjennom hele lysbehandlingsperioden opp til smitte. Dette for å studere immunforsvaret før og etter smoltifisering, samt avdekke eventuelle endringer underveis.

5.7 Konklusjoner

- Parr i ferskvannsfasen ble eksponert for sommerstimuli (24L:0M) i én, tre og seks uker før overførsel til sjøvann. Undersøkelser av smoltindeks, vekst, serum klorid- og osmolalitetsverdier, samt NKA-aktivitet i gjellevev, på et utvalg fisk per lysbehandlingsregime, viste at ulik grad av smoltifisering var oppnådd.
- Smolt eksponert for seks uker med sommerstimuli (24L:0M) hadde høyere dødelighet etter smitte med IPNV enn smolt eksponert for én og tre uker. Dette kan indikere at smoltifiseringsprosessen gjør smolten mer mottakelig for IPN.
- Smolt vaksinert med ALPHA JECT micro 6 var godt beskyttet mot IPN, uavhengig av lengde på sommerstimuli (24L:0M).
- Antistoffmålinger viste at vaksinert smolt hadde høyere produksjon av spesifikke antistoffer mot IPNV enn uvaksinert smolt.
- Antistoffrespons mellom vaksinert smolt eksponert for ulik lengde på sommerstimuli (24L:0M) viste ingen signifikante forskjeller, men det var indikasjoner på at smolt eksponert for seks uker med sommerstimuli hadde lavest respons.
- Få forskjeller i uttrykk av antivirale gener ble observert mellom smolt eksponert for ulik lengde på sommerstimuli (24L:0M) etter fjorten dager med IPNV-smitte.
- Det ble påvist IPNV-positive smolt etter 21 dager med kohabitantsmitte med IPNV. Ingen sikker påvisning av viruset ble gjort fjorten dager etter smitte.

6. Referanser

- Akahane, T., Tsuchiya, T. & Matsumoto, J. J. (1981) Freeze denaturation of carp myosin and its prevention by sodium glutamate. *Cryobiology*, **18** (4), 426-435.
- AquaGen (2015) Historie. AquaGen AS. Tilgjengelig <http://aquagen.no/om-aquagen/historie/>. (accessed 20.04.15).
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C. & Carpenter, J. F. (1993) Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **10** (1), 1-28.
- Ariel, E. & Olesen, N. J. (2002) Finfish in aquaculture and their diseases - A retrospective view on the European Community. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **22** (2), 72-85.
- Ballesteros, N. A., Castro, R., Abos, B., Saint-Jean, S. S. R., Pérez-Prieto, S. I. & Tafalla, C. (2013) The pyloric caeca area is a major site for IgM+ and IgT+ B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout. *PLoS One*, **8** (6), e66118.
- Bang, J. B. & Kristoffersen, A. B. (2015) Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, **114** (3), 177-187.
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012) Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One*, **7** (3), e33196.
- Berg, A., Rødseth, O. M., Tangerås, A. & Hansen, T. (2006) Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **69** (2-3), 239-248.
- Biering, E. (2002) Infeksiøs pankreasnekrose. In Poppe, T. (Ed.) *Fiskehelse og Fiskesykdommer*. 2 ed. Oslo, Universitetsforlaget.
- Bisbal, G. A. & Specker, J. (1990) Cortisol stimulates hypoosmoregulatory ability in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, **39**, 421-432
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O. & McCormick, S. D. (2011) Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, **170** (2), 290-298.
- Björnsson, B. T. (1997) The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, **17** (1-6), 9-24.
- Bleie, H. & Skrudland, A. (2014) Tap av laksefisk i sjø. Mattilsynet. Tilgjengelig http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/tap_av_laksefisk_i_sjo_rapport.15430/binary/Tap%20av%20laksefisk%20i%20sj%C3%B8%20rapport. (accessed 12.11.15).
- Boeuf, G., Le Bail, P. & Prunet, P. (1989) Growth hormone and thyroid hormones during Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolting, and after transfer to seawater. *Aquaculture*, **82** (1), 257-268.
- Boeuf, G., Le Roux, A., Gaignon, J. & Harache, Y. (1985) Gill (Na⁺-K⁺)-ATPase activity and smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in France. *Aquaculture*, **45** (1), 73-81.
- Boeuf, G. & Prunet, P. (1985) Measurements of Gill (Na⁺-K⁺)-ATPase Activity and Plasma Thyroid-Hormones during Smoltification in Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L.). *Aquaculture*, **45** (1-4), 111-119.
- Bootland, L. M., Dobos, P. & Stevenson, R. M. W. (1991) The Ipnv Carrier State and Demonstration of Vertical Transmission in Experimentally Infected Brook Trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10** (1), 13-21.
- Bornø, G. & Lie Linaker, M. (2015) Fiskehelserapporten 2014. In Hjeltnes, B. (Ed.) Harstad.
- Boudinot, P., Massin, P., Blanco, M., Riffault, S. & Benmansour, A. (1999) vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoeA family. *Journal of Virology*, **73** (3), 1846-1852.
- Bowden, T., Smail, D. & Ellis, A. (2002) Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **25** (9), 555-563.

- Brun, E. (2003) Epidemiology. In Skjelstad, B., Brun, E., Jensen, I. (Eds.) *IPN in salmonids – a review*. Trondheim, VESO & FHL, 49-51.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A. & Poppe, T. T. (2013) Viral Diseases. *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. 2nd ed., Springer Science & Business Media, 53-56.
- Bruslind, L. D. & Reno, P. W. (2000) Virulence comparison of three buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, **12** (4), 301-315.
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z. & Foster, P. R. (2003) Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, **82** (6), 684-690.
- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J. & Zou, J. (2011) Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*, **85** (16), 8403-8412.
- Chin, K. C. & Cresswell, P. (2001) Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98** (26), 15125-15130.
- CibaCorning (1980) 925 Chloride Analyzer Instruction Manual. Massachusetts, USA, Ciba Corning.
- Collet, B., Munro, E. S., Gahlawat, S., Acosta, F., Garcia, J., Roemelt, C., Zou, J., Secombes, C. J. & Ellis, A. E. (2007) Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, **22** (1), 44-56.
- Cooke, S. J., Crossin, G. T. & Hinch, S. G. (2011) Fish Migrations | Pacific Salmon Migration: Completing the Cycle. In Farrell, A. P. (Ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego, Academic Press, 1945-1952.
- Damsgard, B., Mortensen, A. & Sommer, A. I. (1998) Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, **163** (3-4), 185-193.
- Das, B. K., Collet, B., Snow, M. & Ellis, A. E. (2007) Expression of interferon type I and II, Mx and γ IP genes in the kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar*, is induced during smolting. *Fish and Shellfish Immunology*, **23** (3), 514-520.
- Dickhoff, W. W., Beckman, B. R., Larsen, D. A., Duan, C. & Moriyama, S. (1997) The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry*, **17** (1-6), 231-236.
- Dobos, P. (1995) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, **5**, 25-54.
- Dobos, P., Hallett, R., Kells, D. T. C., Sorensen, O. & Rowe, D. (1977) Biophysical Studies of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Virology*, **22** (1), 150-159.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. & Teninges, D. (1979) Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology*, **32** (2), 593-605.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P. J. & Dobos, P. (1987) Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *Journal of Virology*, **61** (12), 3655-3664.
- Duston, J. (1994) Salmonid Smoltification IV Effect of salinity on survival and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts. *Aquaculture*, **121** (1), 115-124.
- Eggset, G., Mortensen, A. & Loken, S. (1999) Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and during smoltification: effects on smoltification and immunological protection. *Aquaculture*, **170** (2), 101-112.
- Ellsaesser, C. F. & Clem, L. (1987) Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **87** (2), 405-408.
- Espelid, S., Løkken, G. B., Steiro, K. & Bøgwald, J. (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar*L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **6** (2), 95-110.

- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O. & Boudinot, P. (2013) The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, **4**, 1-14.
- Fischer, U., Koppang, E. O. & Nakanishi, T. (2013) Teleost T and NK cell immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, **35** (2), 197-206.
- Folmar, L. C. & Dickhoff, W. W. (1980) The Parr-Smolt Transformation (Smoltification) and Seawater Adaptation in Salmonids - a Review of Selected Literature. *Aquaculture*, **21** (1), 1-37.
- Folmar, L. C. & Dickhoff, W. W. (1981) Evaluation of some physiological parameters as predictive indices of smoltification. *Aquaculture*, **23** (1), 309-324.
- Fredriksen, B. N. (2006) Karakterisering av tre ulike feltisolater av infeksjøs pankreasnekrose virus (IPNV). Institutt for Marin Bioteknologi, Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Frost, P. & Ness, A. (1997) Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, **7** (8), 609-619.
- Fyhn, U. E. H., Clarke, W. C. & Withler, R. E. (1991) Hemoglobins in smoltifying chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, subjected to photoperiod control. *Aquaculture*, **95** (3-4), 359-372.
- Gamperl, A., Vijayan, M. & Boutilier, R. (1994) Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **4** (2), 215-255.
- Gan, S. D. & Patel, K. R. (2013) Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, **133** (9), e12.
- Grini, A., Hansen, T., Berg, A., Wargelius, A. & Fjelldal, P. (2011) The effect of water temperature on vertebral deformities and vaccine - induced abdominal lesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **34** (7), 531-546.
- Gross, M. R. (1987) Evolution of diadromy in fishes. *American Fisheries Society Symposium*, **1**, 14-25.
- Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, O. (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **72** (1-2), 203-212.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G. (2007) Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, **89** (6-7), 812-818.
- Handeland, S., Arnesen, A. & Stefansson, S. (2003) Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture*, **220** (1), 367-384.
- Handeland, S., Berge, Å., Björnsson, B. T., Lie, Ø. & Stefansson, S. (2000) Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture*, **181** (3), 377-396.
- Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (19), 6919-6924.
- Hansen, J. D. & Zapata, A. G. (1998) Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews*, **166** (1), 199-220.
- Hastein, T., Gudding, R. & Evensen, O. (2005) Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Developmental Biology*, **121**, 55-74.
- Hastein, T. & Krogsrud, J. (1976) Infectious Pancreatic Necrosis - 1st Isolation of Virus from Fish in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **17** (1), 109-111.
- Haugarvoll, E., Bjerås, I., Nowak, B. F., Hordvik, I. & Koppang, E. O. (2008) Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*, **213** (2), 202-209.
- Heggberget, T., Staurnes, M., Strand, R. & Husby, J. (1992) Smoltifisering hos laksefisk. *NINA Forskningsrapport*, **31**.
- Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L. & Arella, M. (1995) Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, **214** (1), 40-49.

- Hikima, J. I., Jung, T.S. & Aoki, T. (2011) Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, **35** (9), 924-936.
- Hill, B. J. & Way, K. (1995) Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, **5**, 55-77.
- Hjeltnes, B. (2014) Fiskehelserapporten 2013. In Hjeltnes, B. (Ed.) Oslo, Veterinærinstituttet.
- Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J. & Bishop, S. C. (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics*, **178** (2), 1109-1115.
- Idoine, J. B., Elliott, J. M., Wilson, M. J. & Weisburger, E. K. (1976) Ratliver cells in culture: Effect of storage, long-term culture, and transformation on some enzyme levels. *In Vitro*, **12** (8), 541-553.
- Ingerslev, H. C., Pettersen, E. F., Jakobsen, R. A., Petersen, C. B. & Wergeland, H. I. (2006) Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, **43** (8), 1194-1201.
- Irwin, M. J. & Kaattari, S. L. (1986) Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **12** (1), 39-45.
- Jensen, I. & Robertsen, B. (2002) Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology*, **13** (3), 221-241.
- Johansen, L. H., Eggset, G. & Sommer, A. I. (2009) Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr: recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts. *Aquaculture*, **290** (1-2), 9-14.
- Johansen, L. H. & Sommer, A. I. (1995) Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **18** (2), 147-156.
- Johnston, C. E. & Eales, J. G. (1967) Purines in the Integument of the Atlantic Salmon (*Salmo salar*) During Parr-Smolt Transformation. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **24** (5), 955-964.
- Julin, K., Johansen, L. H., Sommer, A. I. & Jorgensen, J. B. (2014) Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **38** (11), 1005-1019.
- Julin, K., Mennen, S. & Sommer, A. I. (2013) Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway. *Journal of Fish Diseases*, **36** (2), 89-102.
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Aune, L., Jirillo, E. & Hordvik, I. (2010) Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, **217** (6), 728-739.
- Krogsrud, J., Håstein, T. & Rønningen, K. (1989) Infectious pancreatic necrosis virus in Norwegian fish farms. In Ahne, W., Krustak, E., (Eds.) *Viruses of Lower Vertebrates*. Springer-Verlag, 284-291.
- Kaattari, S. L. & Irwin, M. J. (1985) Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental & Comparative Immunology*, **9** (3), 433-444.
- Langdon, J. S. & Thorpe, J. E. (1985) The Ontogeny of Smoltification - Developmental Patterns of Gill $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, Sdh, and Chloride Cells in Juvenile Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L. *Aquaculture*, **45**, 83-95.
- Leonardi, M. & Klempau, A. (2003) Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture*, **221** (1), 581-591.

- Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y. A., Boshra, H., Gelman, A. E., LaPatra, S., Tort, L. & Sunyer, J. O. (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, **7** (10), 1116-1124.
- LifeTechnologies (2012) Real-time PCR Handbook. Tilgjengelig <http://www.genequantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. (accessed 12.11.2015).
- Lundqvist, H. & Eriksson, L. O. (1985) Annual Rhythms of Swimming Behavior and Seawater Adaptation in Young Baltic Salmon, *Salmo Salar*, Associated with Smolting. *Environmental Biology of Fishes*, **14** (4), 259-267.
- Lysfjord, G., Jobling, M. & Solberg, C. (2004) Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. *Aquaculture*, **237** (1), 191-205.
- M'gonigle, R. (1941) Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Transactions of the American Fisheries Society*, **70** (1), 297-303.
- Magnadóttir, B. (2010) Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, **12** (4), 361-379.
- Magnadóttir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, **20** (2), 137-151.
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M. & Seya, T. (2008) Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *The Journal of Immunology*, **181** (5), 3474-3485.
- Maule, A. G., Schreck, C. B. & Kaattari, S. L. (1987) Changes in the immune system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-to-smolt transformation and after implantation of cortisol. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **44** (1), 161-166.
- McAllister, P., Schill, W., Owens, W. & Hodge, D. (1993) Determining the prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic brook trout *Salvelinus fontinalis*: a study of clinical samples and processing methods. *Diseases of Aquatic Organisms*, **15** (3), 157-162.
- McCartney, T. H. (1976) Sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase activity in gills and kidneys of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **53** (4), 351-353.
- McCormick, S. D. (1993) Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50** (3), 656-658.
- McCormick, S. D. (1996) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, **101** (1), 3-11.
- McCormick, S. D. (2001) Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, **41** (4), 781-794.
- McCormick, S. D. (2013) Smolt Physiology and Endocrinology. In Farrell, A. P., Brauner, C. J., (Eds.) *Euryhaline Fishes*. Amsterdam, Academic Press, 199-251.
- McCormick, S. D., Hansen, L. P., Quinn, T. P. & Saunders, R. L. (1998a) Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55** (S1), 77-92.
- McCormick, S. D., Lerner, D. T., Monette, M. Y., Nieves-Puigdoller, K., Kelly, J. T. & Björnsson, B. T. (2009) Taking it with you when you go: how perturbations to the freshwater environment, including temperature, dams, and contaminants, affect marine survival of salmon. *American Fisheries Society Symposium*, **69**, 195-214.
- McCormick, S. D. & Saunders, R. L. (1987) Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *American Fisheries Society Symposium*, **1**, 211-229.
- McCormick, S. D., Saunders, R. L. & MacIntyre, A. D. (1989) The effect of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, **82** (1-4), 173-180.

- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Carey, J. B., O'Dea, M. F., Sloan, K. E., Moriyama, S. & Björnsson, B. T. (1998b) Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, **168** (1-4), 221-235.
- Melby, H. P. & Christie, K. E. (1994) Antigenic Analysis of Reference Strains and Norwegian Field Strains of Aquatic Birnaviruses by the Use of 6 Monoclonal-Antibodies Produced against the Infectious Pancreatic Necrosis Virus N1 Strain. *Journal of Fish Diseases*, **17** (4), 409-415.
- Melingen, G., Stefansson, S., Berg, A. & Wergeland, H. (1995) Changes in serum protein and IgM concentration during smolting and early post-smolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **5** (3), 211-221.
- Melingen, G. O., Pettersen, E. F. & Wergeland, H. I. (2002) Leucocyte populations and responses to immunization and photoperiod manipulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 0+ smolt. *Aquaculture*, **214** (1-4), 381-396.
- Melingen, G. O. & Wergeland, H. I. (2000) Serum protein and IgM profiles in connection with the smolting and vaccination of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **188** (1), 189-201.
- Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A., Graham, W. D. & Thorpe, J. E. (1989) Early social status and the development of life-history strategies in Atlantic salmon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **236** (1282), 7-19.
- Midtlyng, P. J., Storset, A., Michel, C., Slierendrecht, W. J. & Okamoto, N. (2002) Breeding for disease resistance in fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **22** (2), 166-172.
- Mikalsen, A. B., Torgersen, J., Alestrom, P., Hellemann, A. L., Koppang, E. O. & Rimstad, E. (2004) Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, **60**, 11-20.
- Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K. & Kjøglum, S. (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*, **10** (1), 368.
- Morrison, R. N. & Nowak, B. F. (2002) The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, **11** (1), 46-54.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T. Y., Marjara, I. S., Dalmo, R. A. & Evensen, O. (2012) Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*, **30** (27), 4007-4016.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A. & Evensen, O. (2013a) Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary Research*, **44**, 7.
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S. & Evensen, O. (2014) Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Developmental & Comparative Immunology*, **43** (2), 184-196.
- Munang'andu, H. M., Sandtro, A., Mutoloki, S., Brudeseth, B. E., Santi, N. & Evensen, O. (2013b) Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*, **8** (1), e54263.
- Munro, E., Gahlawat, S. & Ellis, A. (2004) A sensitive non-destructive method for detecting IPNV carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by culture of virus from plastic adherent blood leucocytes. *Journal of Fish Diseases*, **27** (3), 129-134.
- Munro, E. S., Gahlawat, S. K., Acosta, F. & Ellis, A. E. (2006) In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus. *Journal of Fish Diseases*, **29** (1), 43-48.
- Munro, E. S., Midtlyng, P. J., Woo, P. & Bruno, D. (2011) Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. *Fish Diseases and Disorders*, **3**, 1-48.

- Nichols, D. J. & Weisbart, M. (1985) Cortisol dynamics during seawater adaptation of Atlantic salmon *Salmo salar*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **248** (6), 651-659.
- Niklasson, L., Sundh, H., Olsen, R. E., Jutfelt, F., Skjødt, K., Nilsen, T. O. & Sundell, K. S. (2014) Effects of cortisol on the intestinal mucosal immune response during cohabitant challenge with IPNV in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*, **9** (5), e94288.
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O., Kilerich, P., Björnsson, B. T., Madsen, S. S., McCormick, S. D. & Stefansson, S. O. (2008) Endocrine systems in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*): seasonal development and seawater acclimation. *General and Comparative Endocrinology*, **155** (3), 762-772.
- Nodland, E. (2015) Få vaksinerer fisken mot ILA. iLaks. Tilgjengelig <http://www.ilaks.no/fa-vaksinerer-fisken-mot-ila/>. (accessed 05.11 2015).
- Norges Sjømatråd (2014) Månedstatistikk. Årstall 2014 med desember 2014. Norges Sjømatråd. Tilgjengelig <http://www.seafood.no/Markedsinformasjon/Statistikk> (accessed 18.02.15).
- Nygaard, R., Husgard, S., Sommer, A. I., Leong, J. A. C. & Robertsen, B. (2000) Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish and Shellfish Immunology*, **10** (5), 435-450.
- Parra, D., Takizawa, F. & Sunyer, J. O. (2013) Evolution of B Cell Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, **1**, 65-97.
- Peake, S. & McKinley, R. S. (1998) A re-evaluation of swimming performance in juvenile salmonids relative to downstream migration. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55** (3), 682-687.
- Pelis, R. M. & McCormick, S. D. (2003) Fin development in stream- and hatchery-reared Atlantic salmon. *Aquaculture*, **220** (1-4), 525-536.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29** (9), e45-e45.
- PHARMAQ Analytiq (2014) Vurdering av smoltindeks. Høyteknologisenteret i Bergen, PHARMAQ Analytiq. Tilgjengelig http://www.pharmaq-analytiq.com/sfiles/75/1/file/v6_prosedyre_010601_vurdering_av_smoltindeks.pdf. (accessed 15.06.15).
- Pickering, A. (1984) Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, **53** (2), 252-259.
- Press, C. M. & Evensen, Ø. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*, **9** (4), 309-318.
- Prunet, P., Boeuf, G., Bolton, J. P. & Young, G. (1989) Smoltification and Seawater Adaptation in Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*) - Plasma Prolactin, Growth-Hormone, and Thyroid-Hormones. *General and Comparative Endocrinology*, **74** (3), 355-364.
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J. D., Costa, G., Kataria, P. & Bromage, E. S. (2012) Discovery and Characterization of Secretory IgD in Rainbow Trout: Secretory IgD Is Produced through a Novel Splicing Mechanism. *Journal of Immunology*, **188** (3), 1341-1349.
- Ramstad, A., Romstad, A. B., Knappskog, D. H. & Midtlyng, P. J. (2007) Field validation of experimental challenge models for IPN vaccines. *Journal of Fish Diseases*, **30** (12), 723-731.
- Randelli, E., Buonocore, F. & Scapigliati, G. (2008) Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish and Shellfish Immunology*, **25** (4), 326-340.
- Redding, J. M., Schreck, C. B., Birks, E. K. & Ewing, R. D. (1984) Cortisol and its effects on plasma thyroid hormone and electrolyte concentrations in fresh water and during seawater acclimation in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, **56** (1), 146-155.

- Reyes-López, F. E., Romeo, J. S., Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Sandino, A. M., Tort, L., Mackenzie, S. & Imarai, M. (2015) Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Developmental & Comparative Immunology*, **53** (1), 210-221.
- Rimstad, E. (2014) Vaccination against Infectious Pancreatic Necrosis. In Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, O. (Eds.) *Fish Vaccination*. NJ, USA, John Wiley & Sons.
- Roberts, R. J. & Pearson, M. D. (2005) Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **28** (7), 383-390.
- Robertsen, B. (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, **20** (2), 172-191.
- Robertsen, B. (2011) Can we get the upper hand on viral diseases in aquaculture of Atlantic salmon? *Aquaculture Research*, **42** (1), 125-131.
- Røkenes, T. P., Larsen, R. & Robertsen, B. (2007) Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology*, **44** (5), 950-959.
- Sakai, M., Kobayashi, M. & Kawauchi, H. (1996) Mitogenic effect of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leukocytes in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **53** (1), 185-189.
- Salinas, I., Zhang, Y.-A. & Sunyer, J. O. (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35** (12), 1346-1365.
- Samuel, C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** (4), 778-809.
- Santi, N., Vakharia, V. N. & Evensen, O. (2004) Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, **322** (1), 31-40.
- Seear, P. J., Carmichael, S. N., Talbot, R., Taggart, J. B., Bron, J. E. & Sweeney, G. E. (2010) Differential Gene Expression During Smoltification of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): a First Large-Scale Microarray Study. *Marine Biotechnology*, **12** (2), 126-140.
- Sfakiotakis, M., Lane, D. M. & Davies, J. B. C. (1999) Review of fish swimming modes for aquatic locomotion. *Ieee Journal of Oceanic Engineering*, **24** (2), 237-252.
- Sheridan, M. A. (1986) Effects of Thyroxine, Cortisol, Growth-Hormone, and Prolactin on Lipid-Metabolism of Coho Salmon, *Oncorhynchus-Kisutch*, during Smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, **64** (2), 220-238.
- Sheridan, M. A. (1989) Alterations in lipid metabolism accompanying smoltification and seawater adaptation of salmonid fish. *Aquaculture*, **82** (1), 191-203.
- Shivappa, R., Song, H., Yao, K., Aas-Eng, A., Evensen, O. & Vakharia, V. (2004) Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, **61**, 23-32.
- Singh, M. & O'Hagan, D. T. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal of Parasitology*, **33** (5-6), 469-478.
- Skjesol, A., Skjaeveland, I., Elnaes, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B. N., Jorgensen, S. M., Krasnov, A. & Jorgensen, J. B. (2011) IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal*, **8**, 396.
- Skjesol, A., Aamo, T., Hegseth, M. N., Robertsen, B. & Jorgensen, J. B. (2009) The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research*, **143** (1), 53-60.
- Smail, D. A., Bain, N., Bruno, D. W., King, J. A., Thompson, F., Pendrey, D. J., Morrice, S. & Cunningham, C. O. (2006) Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *Journal of Fish Diseases*, **29** (1), 31-41.

- Smail, D. A., Bruno, D. W., Dear, G., Mcfarlane, L. A. & Ross, K. (1992) Infectious Pancreatic Necrosis (Ipn) Virus Sp Serotype in Farmed Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, Post-Smolts Associated with Mortality and Clinical-Disease. *Journal of Fish Diseases*, **15** (1), 77-83.
- Somamoto, T., Koppang, E. O. & Fischer, U. (2014) Antiviral functions of CD8+ cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **43** (2), 197-204.
- Song, H., Santi, N., Evensen, O. & Vakharia, V. N. (2005) Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of Virology*, **79** (16), 10289-10299.
- Specker, J. L. & Schreck, C. B. (1982) Changes in plasma corticosteroids during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, **46** (1), 53-58.
- Stangeland, K., Hoie, S. & Taksdal, T. (1996) Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, post-smolts. *Journal of Fish Diseases*, **19** (4), 323-327.
- Staurnes, M., Lysfjord, G., Hansen, L. & Heggberget, T. (1993) Recapture rates of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) related to smolt development and time of release. *Aquaculture*, **118** (3), 327-337.
- Stefansson, S. O., Bæverfjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., Rosten, T., Toften, H. & Havardsson, B. (2005) Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt. Tilgjengelig <http://www.vkm.no/dav/c22a3c08fe.pdf>. (accessed 10.08.15).
- Storset, A., Strand, C., Wetten, M., Sissel, K. & Rarnstad, A. (2007) Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **272**, 62-68.
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z. & Liu, B. (2009) Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental & Comparative Immunology*, **33** (4), 547-558.
- Sun, B., Skjaeveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jorgensen, J. & Robertsen, B. (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** (17), 9188-9198.
- Sundh, H., Nilsen, T. O., Lindstrom, J., Hasselberg-Frank, L., Stefansson, S. O., McCormick, S. D. & Sundell, K. (2014) Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, **85** (4), 1227-1252.
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L., Kileng, O., Greiner-Tollersrud, L. & Robertsen, B. (2012) Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues. *Journal of Immunology*, **189** (12), 5912-5923.
- Swanson, R., Carlisle, J. & Gillespie, J. (1982) Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), following intraperitoneal injection. *Journal of Fish Diseases*, **5** (6), 449-460.
- Swanson, R. N. & Gillespie, J. H. (1979) Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **36** (5), 587-591.
- Tafalla, C., Bøgvold, J., Dalmo, R. A., Munang'andu, H. M. & Evensen, O. (2014) Adjuvants in fish vaccines. In Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, O. (Eds.) *Fish Vaccination*. NJ, USA, John Wiley & Sons.
- Taksdal, T. (1997) Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon *Salmo salar* and brook trout *Salvelinus fontinalis* by bath challenge of fry with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, **28**, 39-44.
- Taksdal, T., Ramstad, A., Stangeland, K. & Dannevig, B. (1998) Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post - smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *Journal of Fish Diseases*, **21** (3), 193-204.

- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T. & Matsumoto, J. J. (1985) Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, **22** (5), 446-456.
- Thuvander, A., Fossum, C. & Lorenzen, N. (1990) Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: Characterization and applicability in immunoassays. *Developmental & Comparative Immunology*, **14** (4), 415-423.
- Toranzo, A. E. & Hetrick, F. M. (1982) Comparative Stability of 2 Salmonid Viruses and Poliovirus in Fresh, Estuarine and Marine Waters. *Journal of Fish Diseases*, **5** (3), 223-231.
- Tort, L., Balasch, J. & Mackenzie, S. (2003) Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, **22** (3), 277-286.
- Verburg-van Kemenade, B., Nowak, B., Engelsma, M. & Weyts, F. (1999) Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. *Fish and Shellfish Immunology*, **9** (5), 405-415.
- Veterinærinstituttet (2011) PD-vaksine gir færre døde og bedre vekst. Veterinærinstituttet. Tilgjengelig <http://www.vetinst.no/Nyheter/PD-vaksine-gir-faerre-doede-og-bedre-vekst>. (accessed 05.11 2015).
- Vijayan, M. & Leatherland, J. (1989) Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, **67** (11), 2746-2750.
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. & Sandino, A. M. (2004) Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal Virology*, **78** (24), 13829-13838.
- ViralZone (2009) Birnaviridae. Swiss Institute of Bioinformatics. Tilgjengelig http://viralzone.expasy.org/all_by_species/162.html. (accessed 15.05.2015).
- Wetten, M., Aasmundstad, T., Kjoglum, S. & Storset, A. (2007) Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **272** (1-4), 111-117.
- Weyts, F., Flik, G., Rombout, J. & Verburg-van Kemenade, B. (1998) Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Developmental & Comparative Immunology*, **22** (5), 551-562.
- Winans, G. A. & Nishioka, R. S. (1987) A multivariate description of change in body shape of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Aquaculture*, **66** (3-4), 235-245.
- Wolf, K., Snieszko, S. F., Dunbar, C. E. & Pyle, E. (1960) Virus Nature of Infectious Pancreatic Necrosis in Trout. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **104** (1), 105-108.
- Wood, E. M., Snieszko, S. F. & Yasutake, W. T. (1955) Infectious Pancreatic Necrosis in Brook Trout. *Archives of Pathology*, **60** (1), 26-28.
- Workenhe, S. T., Rise, M. L., Kibenge, M. J. & Kibenge, F. S. (2010) The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, **47** (16), 2525-2536.
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y. A., von Gersdorff Jørgensen, L., Heinecke, R. D., Buchmann, K., LaPatra, S. & Sunyer, J. O. (2013) Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110** (32), 13097-13102.
- Yada, T. (2007) Growth hormone and fish immune system. *General and Comparative Endocrinology*, **152** (2), 353-358.
- Yada, T., Nagae, M., Moriyama, S. & Azuma, T. (1999) Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, **115** (1), 46-52.
- Young, G., McCormick, S. D., Björnsson, B. T. & Bern, H. A. (1995) Circulating growth hormone, cortisol and thyroxine levels after 24 h seawater challenge of yearling coho salmon at different developmental stages. *Aquaculture*, **136** (3), 371-384.

- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C. & Cortes, A. (2006) Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, **20** (2), 126-136.
- Zaugg, W. S. & Wagner, H. (1973) Gill ATPase activity related to parr-smolt transformation and migration in steelhead trout (*Salmo gairdneri*): influence of photoperiod and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **45** (4), 955-965.
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J. & Sunyer, J. O. (2010) IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, **11** (9), 827-835.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. & Kaattari, S. (2005) B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, **174** (11), 6608-6616.

Appendiks

Appendiks 1: Liste over reagenser brukt i forsøket.

Appendiks 2: Smoltindeks, klorid- og osmolalitetsverdier i serum, lengde/vekt-målinger og kondisjonsfaktor hos fisk i forsøket eksponert for tre ulike lysbehandlingsregimer. Vekt og lengdemålinger gjennom hele smitteperioden.

Appendiks 3: Dødelighetstall og statistikk mellom grupper innad i hvert smittekar, og smittekar sammenlignet mot hverandre.

Appendiks 4: Statistikk og fortynningsrekker for individmålinger av antistoffrespons i plasma.

Appendiks 5: Antistoffrespons i plasma-*pools* for hver gruppe eksponert for ulike lysbehandlingsregimer. Hver *pool* inneholder plasma fra ti individer. Statistikk for antistoffmålingene.

Appendiks 6: C_t -verdier for uttrykk av ELFA1, Mx, Viperin og ISG15 hos alle gruppene fjorten dager etter smittestart.

Appendiks 1

Reagenser

Reagenser	Produsent	Lot/Batchnr
Accuref™ 290	Fiske Associates	0403010
ALPHA JECT micro 6	PHARMAQ AS	7764
Benzoak Vet. (200 mg benzokain/ml 20%)	A.C.D Pharmaceuticals AS	519389
Combined acid buffer	Sherwood Scientific Ltd	587542
Etanol (99,8%)	Arcus kjemi	0607040694
Fast SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems	1406113
MultiCal™	Bayer HealthCare	1231329
Mus-anti-laks IgM, 4C10	Veterinærinstituttet	-----
PBS (fosfatbufret saltvann)	NFH	-----
Platinum ®SYBR®Green	Invitrogen	-----
Polyclonalt Rabbit anti-mouse Ig (HRP)	DAKO	20007340
Polyklonalt anti-IPNV	fra PHARMAQ AS	-----
Primere	Sigma-Aldrich	-----
Proteinase K	New England BioLabs	0171207
RNase AWAY	Molecular BioProducts	13501155
RNAlater® Solution	Ambion	1411061
RNase free DNase set	Qiagen	151037275
RNeasy® Mini kit	Qiagen	148011051
ROX Reference dye	Invitrogen	1345230
RT Enzyme mix	Invitrogen	1245563
RT Reaction mix	Invitrogen	1301203
Sigmafast OPD peroxidase substrat	Sigma-Aldrich	SLBJ7806V
Tween ® 20	Sigma-Aldrich	SZBC0470W
Tørrmelk (1% fett)	Semper	-----
Ultra Pure Water	Biochrom GmbH	0659
β-Merceptoetanol	Sigma-Aldrich	BCBF9538V

Appendiks 2

Smoltifiseringsdata

Tabell A1. Lengde, vekt, osmolalitet og kloridinnhold i serum samt kondisjonsfaktor (vekt/lengde³ x 100) for smolt fra 1 uke lys-gruppen etter 24 timer sjøvannstest.

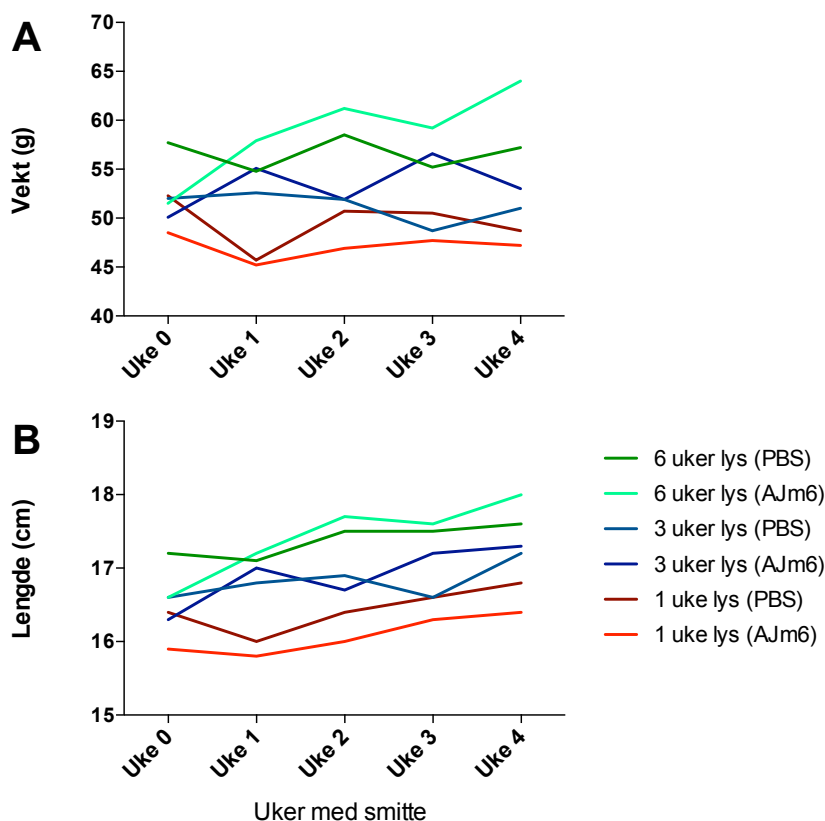
Fisk (1 uke lys)	Vekt	Lengde	Osmolalitet (mOsm kg-1)	Serum klorid (mM)	Smoltindeks
1	42,3	15,2	362,5	148,5	ikke tatt
2	45,9	16,2	374,5	144,7	ikke tatt
3	38,8	15,0	354,0	145,5	ikke tatt
4	45,5	16,1	379,5	153,5	ikke tatt
5	44,5	16,0	385,0	155,5	ikke tatt
6	46,2	15,9	374,0	151,5	ikke tatt
7	53,1	16,8	388,5	150	ikke tatt
8	49,1	16,0	366,5	148,3	ikke tatt
9	46,0	16,0	375,0	154,5	ikke tatt
10	51,7	16,5	360,0	159,0	ikke tatt
11	64,5	17,7	ikke målt	ikke målt	2
12	46,1	15,8	ikke målt	ikke målt	2
13	52,0	16,6	ikke målt	ikke målt	2
14	47,2	16,2	ikke målt	ikke målt	2
15	55,1	16,6	ikke målt	ikke målt	2,33
16	47,0	15,9	ikke målt	ikke målt	2,33
17	51,0	16,1	ikke målt	ikke målt	2
18	41,0	15,2	ikke målt	ikke målt	2
19	50,6	16,5	ikke målt	ikke målt	2
20	42,8	15,5	ikke målt	ikke målt	2
Gjennomsnitt	48,02	16,09	371,95	151,1	2,07
STD.AVV.	5,73	0,62	11,08	4,56	0,14
Kondisjonsfaktor	1,15				

Tabell A2. Lengde, vekt, osmolalitet og kloridinnhold i serum samt kondisjonsfaktor (vekt/lengde³ x 100) for smolt fra 3 uker lys-gruppen etter 24 timer sjøvannstest.

Fisk (3 uker lys)	Vekt	Lengde	Osmolalitet (mOsm kg-1)	Serum klorid (mM)	Smoltindeks
1	47,5	16,4	344,0	145,0	ikke tatt
2	51,4	16,5	353,0	150,5	ikke tatt
3	38,6	15,0	369,0	--	ikke tatt
4	49,1	16,4	341,5	142,5	ikke tatt
5	57,8	17,2	344,5	152,0	ikke tatt
6	52,2	16,6	356,0	154,0	ikke tatt
7	58,5	17,5	362,5	150,2	ikke tatt
8	51,6	16,6	353,5	144,0	ikke tatt
9	38,7	15,1	372,0	148,0	ikke tatt
10	52,0	16,5	356,5	--	ikke tatt
11	52,0	16,8	ikke målt	ikke målt	2,67
12	54,8	17,1	ikke målt	ikke målt	3
13	49,5	16,7	ikke målt	ikke målt	2,67
14	47,4	16,3	ikke målt	ikke målt	3
15	49,3	16,5	ikke målt	ikke målt	3
16	52,9	16,6	ikke målt	ikke målt	3
17	51,6	16,6	ikke målt	ikke målt	3
18	52,8	16,9	ikke målt	ikke målt	2,67
19	45,9	15,9	ikke målt	ikke målt	3
20	51,7	16,4	ikke målt	ikke målt	2,67
Gjennomsnitt	50,27	16,48	355,25	148,28	2,87
STD.AVV.	5,04	0,6	10,35	4,1	0,17
Kondisjonsfaktor	1,12				

Tabell A3. Lengde, vekt, osmolalitet og kloridinnhold i serum samt kondisjonsfaktor (vekt/lengde³ x 100) for smolt fra 6 uker lys-gruppen etter 24 timer sjøvannstest.

Fisk (6 uker lys)	Vekt	Lengde	Osmolalitet (mOsm kg ⁻¹)	Serum klorid (mM)	Smoltindeks
1	54,1	17,1	345,5	153,5	ikke tatt
2	50,8	17,0	340,0	138,5	ikke tatt
3	53,2	16,9	366,0	150,0	ikke tatt
4	60,3	17,4	363,0	145,5	ikke tatt
5	52,6	17,0	--	--	ikke tatt
6	50,8	16,8	359,5	149,5	ikke tatt
7	62,7	17,7	363,0	161,0	ikke tatt
8	58,1	17,6	--	--	ikke tatt
9	56,8	17,4	362,0	149,5	ikke tatt
10	55,5	17,3	360,0	139,5	ikke tatt
11	73,3	18,6	ikke målt	ikke målt	4
12	58,3	16,9	ikke målt	ikke målt	3,33
13	53,7	17,0	ikke målt	ikke målt	3,33
14	46,8	16,4	ikke målt	ikke målt	3,33
15	58,4	17,4	ikke målt	ikke målt	3,33
Gjennomsnitt	56,36	17,23	357,38	148,38	3,47
STD.AVV.	6,23	0,51	9,36	7,32	0,3
Kondisjonsfaktor	1,10				



Figur A1. (A) Vekt (g) og (B) lengde (cm) hos vaksinert og uvaksinert smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer, fra start av kohabitantsmitte med IPNV til avslutning av prøvetaking. Alle forsøksgruppene er representert. Tallene er fra prøvetakingskaret. PBS = fosfatbufret saltvann: AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Appendiks 3

Dødelighetstall og statistikk for dødelighet mellom karene

Tabell A4. Prosentvis dødelighet i kar 2 og 3. Karene ble brukt til å monitorere dødelighet. RPS er utregnet fra vaksinert gruppe og relevant kontrollgruppe. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, RPS = *relative percent survival*.

Grupper KAR 2	N	Døde	Overlevende	Dødelighet (%)	RPS
Opt (PBS)	25	22	3	88	-
Sub-opt (PBS)	26	14	12	53,8	-
Worst-case (PBS)	26	12	14	46,2	-
Opt (AJm6)	26	3	23	11,5	86,9
Sub-opt (AJm6)	27	1	26	3,7	93,1
Worst-case (AJm6)	27	1	26	3,7	92,0
IPNV-shedders	82	6	76	7,3	-
Grupper KAR 3	N	Døde	Overlevende	Dødelighet (%)	RPS
6 uker lys (PBS)	27	23	4	85,2	-
3 uker lys (PBS)	26	22	4	84,6	-
1 uke lys (PBS)	26	9	17	34,6	-
6 uker lys (AJm6)	26	1	25	3,8	95,5
3 uker lys (AJm6)	26	1	25	3,8	95,5
1 uke lys (AJm6)	26	1	25	3,8	89,0
IPNV-shedders	83	4	79	4,8	-

Tabell A5. Statistikk for dødelighet i kar 2, alle grupper mot hverandre, ved Fisher's exact test. Siden det er seks grupper blir det totalt femten målinger. P-verdien må da være $\leq 0,00333$ (0,05/15) for at 0-hypotesen skal forkastes. 0-hypotesen er at det ikke er forskjell på gruppene. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6 = ns: *not significant*.

Grupper sammenlignet (Fisher's exact test)	p-verdi	Signifikans?
6 uker lys (PBS) : 6 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (PBS)	0,0128	ns
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,0025	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (PBS)	0,0025	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (AJm6)	0,3507	ns
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0128	ns
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	0,3507	ns
3 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,7819	ns
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0003	Ja
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	1	ns
1 uke lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0003	Ja

Tabell A6. Statistikk for dødelighet i kar 3, alle grupper mot hverandre, ved Fisher's exact test. Siden det er seks grupper blir det totalt femten målinger. P-verdien må da være $\leq 0,00333$ (0,05/15) for at 0-hypotesen skal forkastes. 0-hypotesen er at det ikke er forskjell på gruppene. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6 = ns: *not significant*.

Grupper sammenlignet (Fisher's exact test)	p-verdi	Signifikans?
6 uker lys (PBS) : 6 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (PBS)	1	ns
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,0002	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (PBS)	0,0001	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (AJm6)	1	ns
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0109	ns
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	1	ns
3 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,0005	Ja
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0109	ns
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	1	ns
1 uke lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0109	ns

Tabell A7. Statistikk for dødelighet fra kar 2 og 3 slått sammen, alle grupper mot hverandre, ved Fisher's exact test. Siden det er seks grupper blir det totalt femten målinger. P-verdien må da være $\leq 0,00333$ (0,05/15) for at 0-hypotesen skal forkastes. 0-hypotesen er at det ikke er forskjell på gruppene. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6 = ns: *not significant*.

Grupper sammenlignet (Fisher's exact test)	p-verdi	Signifikans?
6 uker lys (PBS) : 6 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (PBS)	0,0573	ns
6 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,0001	Ja
6 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (PBS)	0,0001	Ja
6 uker lys (AJm6) : 3 uker lys (AJm6)	0,437	ns
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0002	Ja
6 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	0,437	ns
3 uker lys (PBS) : 3 uker lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (PBS)	0,0055	ns
3 uker lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (PBS)	0,0001	Ja
3 uker lys (AJm6) : 1 uke lys (AJm6)	1	ns
1 uke lys (PBS) : 1 uke lys (AJm6)	0,0001	Ja

Tabell A8. Statistiske forskjeller mellom kar 2 og kar 3 sammenlignet gruppe mot gruppe ved Fisher's exact test. P-verdi $\leq 0,05$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, ns = *not significant*.

Grupper sammenlignet (Fisher's exact test)	p-verdi	Signifikans?
6 uker lys (PBS) kar 2 : 6 uker lys (PBS) kar 3	1	ns
3 uker lys (PBS) kar 2 : 3 uker lys (PBS) kar 3	0,0337	Ja
1 uke lys (PBS) kar 2 : 1 uke lys (PBS) kar 3	0,5725	ns
6 uker lys (AJm6) kar 2 : 6 uker lys (AJm6) kar 3	0,6098	ns
3 uker lys (AJm6) kar 2 : 3 uker lys (AJm6) kar 3	1	ns
1 uke lys (AJm6) kar 2 : 1 uke lys (AJm6) kar 3	1	ns

Appendiks 4

ELISA – Statistikk og fortynningsrekker individuelle plasmaprøver

Tabell A9. Statistiske analyser av gjennomsnittlig antistoffrespons mot IPNV i plasma hos vaksinert og uvaksinert smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer, ved smittetidspunkt (dag 0). Plasmaet er fortynnet 1:25. Analysene er gjort med enveis ANOVA og Tukey's HSD post-hoc for å skille gruppene fra hverandre. Tabellen akkompagnerer Figur 18A. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, ns = *not significant*.

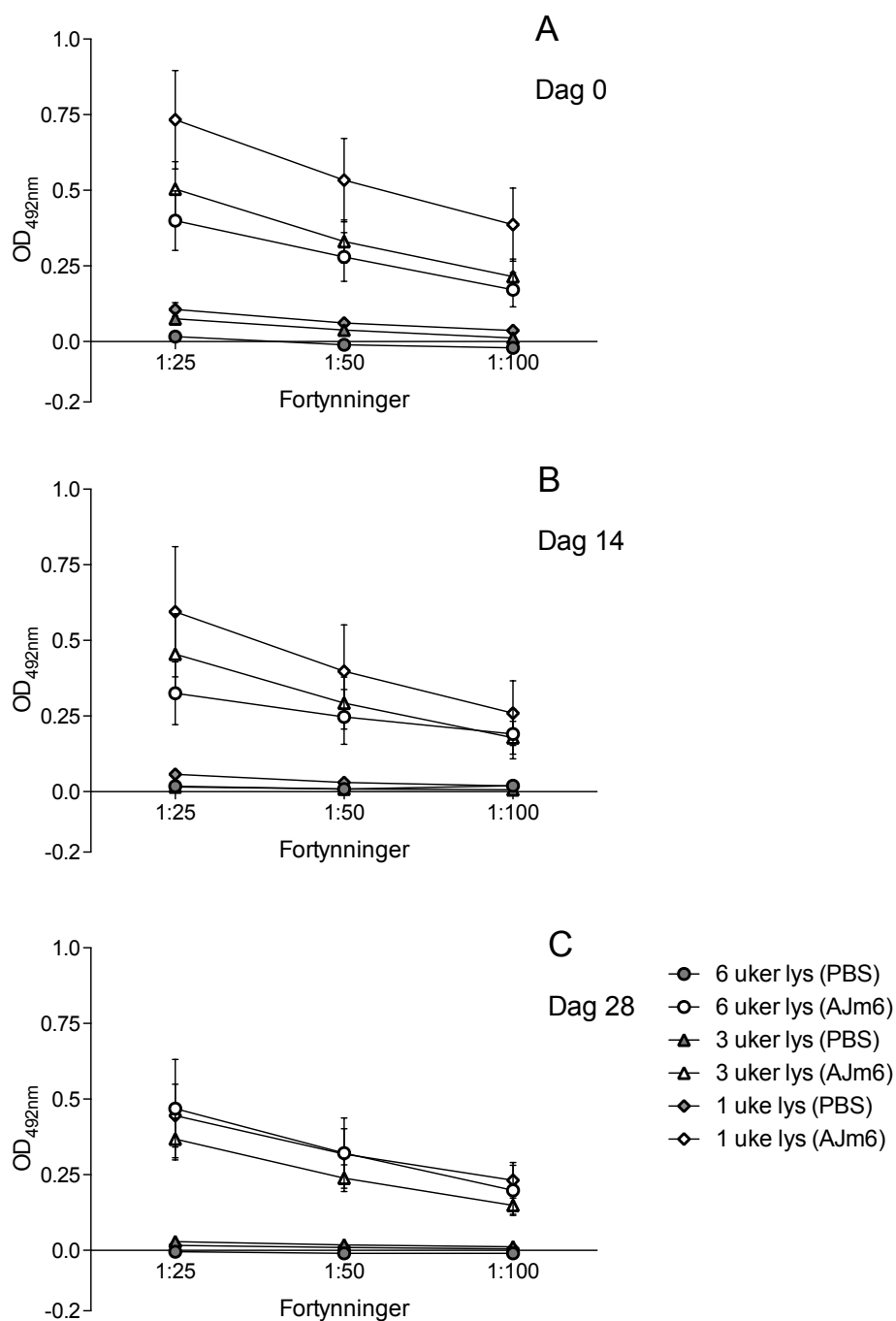
Tukey's HSD post-hoc test	Snitt Diff.	95% CI av diff.	Signifikans?	Styrke
6 uker lys (PBS) vs. 6 uker lys (AJm6)	-0,3835	-0,7476 to -0,01928	Ja	*
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (PBS)	-0,05907	-0,4233 to 0,3051	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,4876	-0,8518 to -0,1235	Ja	**
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	-0,08997	-0,4542 to 0,2742	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,7169	-1,081 to -0,3527	Ja	****
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (PBS)	0,3244	-0,03979 to 0,6886	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,1042	-0,4684 to 0,2600	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,2935	-0,07069 to 0,6577	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,3335	-0,6976 to 0,03072	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,4286	-0,7928 to -0,06439	Ja	*
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	-0,0309	-0,3951 to 0,3333	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,6579	-1,022 to -0,2937	Ja	****
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,3977	0,03349 to 0,7619	Ja	*
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,2293	-0,5935 to 0,1349	ns	ns
1 uke lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,627	-0,9911 to -0,2628	Ja	****

Tabell A10. Statistiske analyser av gjennomsnittlig antistoffrespons mot IPNV i plasma hos vaksinert og uvaksinert smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer, 14 dager etter smitte. Plasmaet er fortynnet 1:25. Analysene er gjort med enveis ANOVA og Tukey's HSD post hoc for å skille gruppene fra hverandre. Tabellen akkompagnerer Figur 18B. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, ns = *not significant*.

Tukey's HSD post-hoc test	Snitt Diff.	95% CI av diff.	Signifikans?	Styrke
6 uker lys (PBS) vs. 6 uker lys (AJm6)	-0,3073	-0,7751 to 0,1605	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (PBS)	0,002384	-0,4654 to 0,4702	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,4365	-0,9043 to 0,03128	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	-0,03892	-0,5067 to 0,4289	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,5766	-1,044 to -0,1088	Ja	**
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (PBS)	0,3097	-0,1581 to 0,7775	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,1292	-0,5970 to 0,3386	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,2684	-0,1994 to 0,7362	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,2693	-0,7370 to 0,1985	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,4389	-0,9067 to 0,02889	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	-0,0413	-0,5091 to 0,4265	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,579	-1,047 to -0,1112	Ja	**
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,3976	-0,07020 to 0,8654	ns	ns
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,1401	-0,6079 to 0,3277	ns	ns
1 uke lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,5377	-1,005 to -0,06988	Ja	*

Tabell A11. Statistiske analyser av gjennomsnittlig antistoffrespons mot IPNV i plasma hos vaksinert og uvaksinert smolt fra tre ulike lysbehandlingsregimer, 28 dager etter smitte. Plasmaet er fortynnet 1:25. Analysene er gjort med enveis ANOVA og Tukey's HSD post hoc for å skille gruppene fra hverandre. Tabellen akkompagnerer Figur 18C. * $p \leq 0,05$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, ns = *not significant*.

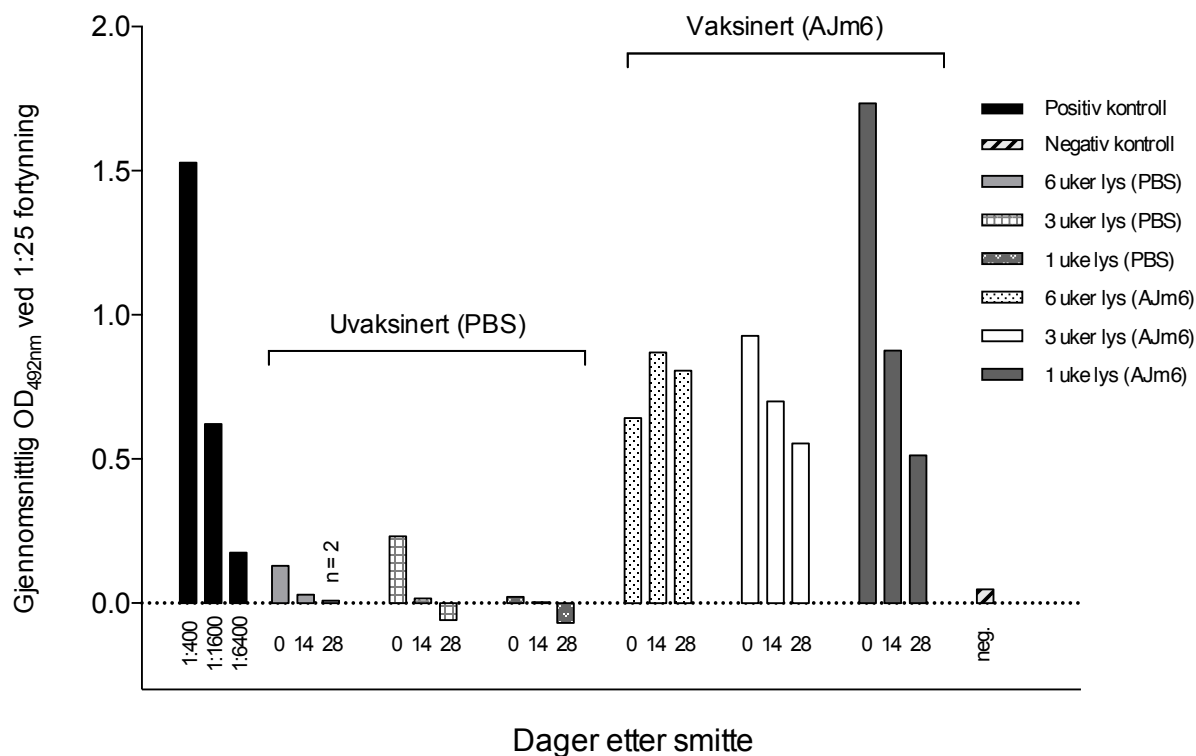
Tukey's HSD post-hoc test	Snitt Diff.	95% CI av diff.	Signifikans?	Styrke
6 uker lys (PBS) vs. 6 uker lys (AJm6)	-0,4735	-1,137 to 0,1895	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (PBS)	-0,03342	-0,6965 to 0,6296	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,3724	-1,035 to 0,2906	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	-0,02119	-0,6842 to 0,6418	ns	ns
6 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,4499	-1,113 to 0,2131	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (PBS)	0,4401	0,05731 to 0,8229	Ja	*
6 uker lys (AJm6) vs. 3 uker lys (AJm6)	0,1011	-0,2817 to 0,4839	ns	ns
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,4523	0,06954 to 0,8351	Ja	*
6 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	0,02359	-0,3592 to 0,4064	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 3 uker lys (AJm6)	-0,339	-0,7218 to 0,04381	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (PBS)	0,01223	-0,3706 to 0,3950	ns	ns
3 uker lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,4165	-0,7993 to -0,03372	Ja	*
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (PBS)	0,3512	-0,03158 to 0,7340	ns	ns
3 uker lys (AJm6) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,07753	-0,4603 to 0,3053	ns	ns
1 uke lys (PBS) vs. 1 uke lys (AJm6)	-0,4287	-0,8116 to -0,04595	Ja	*



Figur A2. Fortynningsrekker (1:25, 1:50 og 1:100) av gjennomsnittlig antistoffrespons mot IPNV i plasma hos uvaksinert og vaksinert smolt (n=10) fra tre ulike lysbehandlingsregimer, ved tre ulike prøvetidspunkt etter smitte. (A) Dag 0, (B) dag 14 og (C) dag 28. 6 uker lys (PBS) har kun to individer på dag 28. Figuren akkompagnerer Figur 18. Feilmarginer indikerer SEM. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Appendiks 5

ELISA – Antistoffrespons i plasma-pools



Figur A3. Antistoffrespons mot IPNV i plasma-pools fra vaksinerte og uvaksinerte grupper fra tre ulike lysbehandlingsregimer ved forskjellige prøvetidspunkt. Prøvene var fortennet 1:25. Dager etter smitte viser de tre ulike prøvetidspunktene (dag 0, 14 og 28). Hver *pool* består av ti smolt. Positiv kontroll (ved tre ulike fortyninger) og negativ kontroll er tatt med, hhv. til venstre og høyre side av figuren. Vanntemperaturen ved prøvetaking var 10 °C. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

Tabell A12. Rådata for plasma-pools fra vaksinert og uvaksinert smolt (n=10) ved fire ulike fortynninger. Hver verdi er gjennomsnittet av duplikater. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.

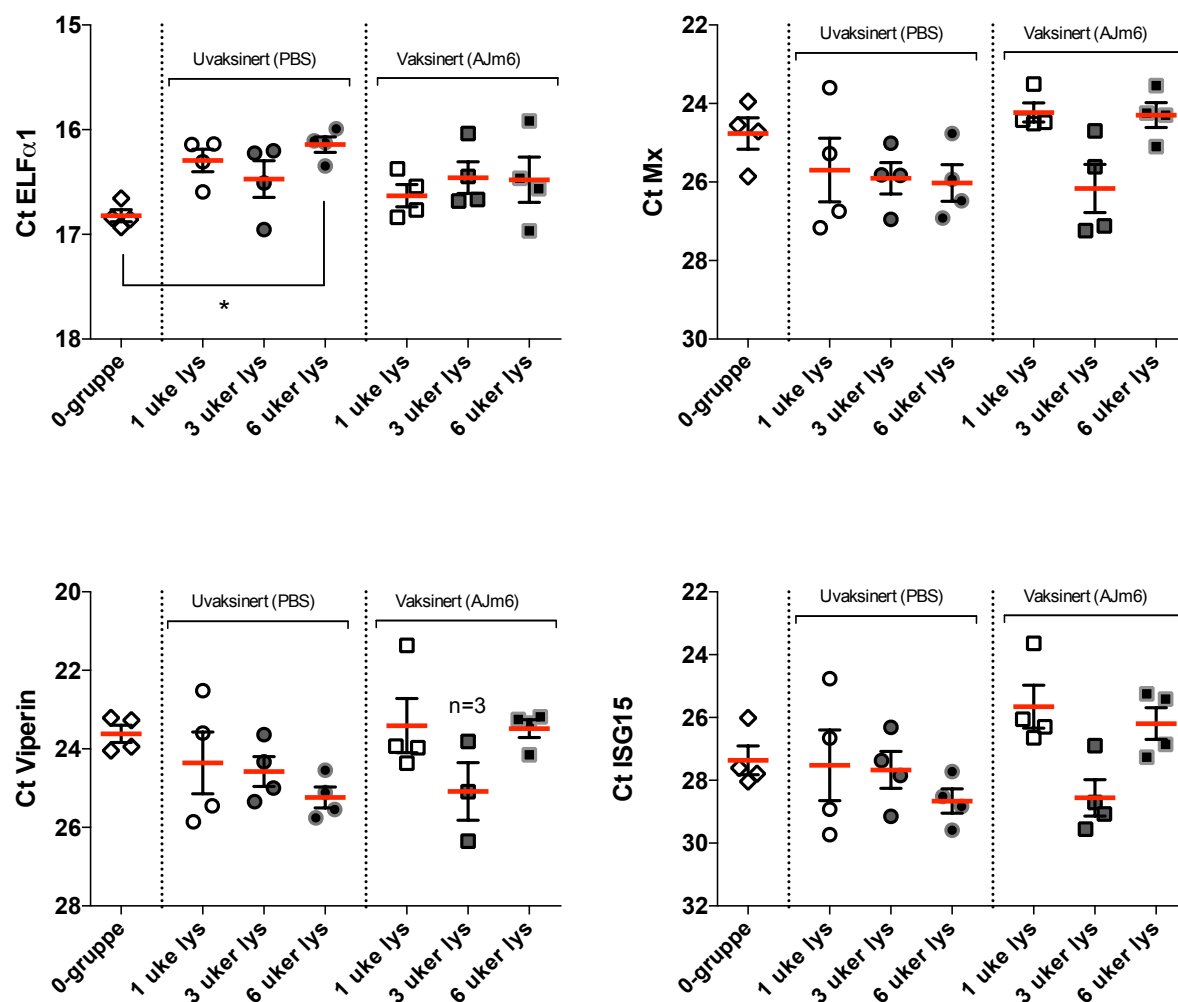
	6 uker lys (PBS)				6 uker lys (AJm6)		
	dag 0	dag 14	dag 28		dag 0	dag 14	dag 28
1:25	0,130	0,029	0,008	1:25	0,642	0,870	0,806
1:50	0,076	0,015	0,000	1:50	0,514	0,490	0,556
1:100	0,047	0,021	0,003	1:100	0,315	0,285	0,301
1:200	0,026	0,015	0,002	1:200	0,182	0,141	0,153
	3 uker lys (PBS)				3 uker lys (AJm6)		
	dag 0	dag 14	dag 28		dag 0	dag 14	dag 28
1:25	0,232	0,016	-0,059	1:25	0,927	0,700	0,554
1:50	0,147	0,011	-0,065	1:50	0,552	0,436	0,325
1:100	0,064	0,013	-0,080	1:100	0,284	0,206	0,141
1:200	0,038	-0,003	-0,087	1:200	0,115	0,280	0,034
	1 uke lys (PBS)				1 uke lys (AJm6)		
	dag 0	dag 14	dag 28		dag 0	dag 14	dag 28
1:25	0,022	0,003	-0,069	1:25	1,734	0,877	0,513
1:50	-0,026	-0,045	-0,059	1:50	1,162	0,464	0,348
1:100	-0,054	-0,071	-0,078	1:100	0,851	0,299	0,171
1:200	-0,071	-0,071	-0,086	1:200	0,498	0,151	0,068

Tabell A13. Statistiske analyser av gjennomsnittlig antistoffrespons mot IPNV i plasma-pools hos vaksinert og uvaksinert smolt fra seks ulike lysbehandlingsregimer. Hver pool består av ti smolt. Plasmaet ble fortynnet 1:25. Analysene er gjort med to-veis ANOVA og Tukey's HSD post-hoc for å skille gruppene fra hverandre. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6, ns = *not significant*.

Statistiske forskjeller	Dag 0	Dag 14	Dag 28
1 uke lys (AJm6) vs 6 uker lys (PBS)	*	ns	ns
1 uke lys (AJm6) vs 3 uker lys (PBS)	*	ns	ns
1 uke lys (AJm6) vs 1 uke lys (PBS)	**	ns	ns
Øvrige prøver	ns	ns	ns

Appendiks 6

Ct-verdier for uttrykk av målgener for hver gruppe fjorten dager etter smitte



Figur A4. Individuelle Ct-verdier for referansegen (ELFa1) og antivirale gener (Mx, Viperin og ISG15) ved SYBR® Green RT qPCR i hodenyre hos smolt (n=4) fra ulike lysbehandlingsregimer, etter 14 dager kohabitantsmitte med IPNV. Figuren inneholder både vaksinert og uvaksinert smolt, samt 0-gruppe som ikke er utsatt for smitte. * $p \leq 0,05$. PBS = fosfatbufret saltvann, AJm6 = ALPHA JECT micro 6.