



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2023
Akvamedisin

Effekt av vaksinasjon mot lakselus- (*Lepeophtheirus salmonis*) infestasjon – antistoffrespons og lusepåslag hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Effects of vaccination against sea lice
(*Lepeophtheirus salmonis*) infestation – antibody
response and severity of lice infestation in atlantic
salmon (*Salmo salar* L.)

Elise Fure
Erik Andreas Lie
Jenny Ottesen Stone
Marie Amundsen Wold

Innhold

Forord	4
Sammendrag	5
Definisjoner og forkortelser	7
Innledning.....	9
Hva er lakselus - livssyklus, levevis og miljø	9
Effekter på fisken (patogenitet) samt faktorer av betydning for motstandsdyktighet.....	14
Lakselusas betydning for norsk oppdrettsnæring	15
Behandling og forebygging	17
Vaksinasjon mot lakselus – teoretisk bakgrunn og tidligere forsøk.....	22
Vaksineutvikling – hva er tidligere blitt gjort?	24
Immunsystemet hos beinfisk (teleoster) – medfødt og adaptiv immunitet	25
Immunresponser ved lusepåslag.....	30
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay	32
Formål	36
Materiale og metoder	36
Fiskemateriale	36
ELISA.....	39
Spesifikk ELISA	40
Total ELISA	44
Resultater.....	47
Lusetall.....	47
Nivå av lusespesifikke antistoffer	53
Nivå av totale antistoffer	57
Sammenheng mellom antistoffnivå og lusetall	60

Diskusjon.....	63
Tolkning av resultater.....	63
Feilkilder	66
Øvrige refleksjoner.....	67
Generaliserbarhet	69
Konklusjon	71
Takk til bidragsyttere.....	71
Summary	72
Referanser.....	74
Vedlegg	80
Vedlegg 1: gj. og SD for spesifikk Ig.....	80
Vedlegg 2: Spesifikk ELISA protokoll	80
Vedlegg 3: Total ELISA protokoll.....	82

Forord

Lakselus er blant de største utfordringene oppdrettsnæringen i Norge står ovenfor, og utgjør betydelige kostnader og tap knyttet til behandling. Det ses også store dyrevelferdsmessige konsekvenser av hyppige avlusningsbehandlinger. Dette gjelder særlig de mekaniske metodene, som har fått større betydning i senere tid grunnet økende utbredelse av resistens mot kjemiske midler. Parasittinfestasjonene kan føre til problemer med osmoregulering og morbiditet hos laksen. Vilde laksestammer må beskyttes mot smittepress fra oppdrettslaksen, og maksgrenser for tillatt mengde lus og påfølgende obligatoriske lusebehandlinger skal etterse dette. Da man per i dag mangler fullgode løsninger for å få bukt med problemet, kombinert med at lakselus kanskje er den fremste begrensende faktoren for vekst og utbygging av oppdrettsnæringen til havs i Norge – vil en effektiv vaksine være å anse som et lenge ettertraktet gjennombrudd. Forebygging er alltid bedre enn behandling, og vi synes det er veldig spennende å ha vært med på et forsøksprosjekt hvor man tester ut effekten av vaksinasjon mot lakselus.

Som mulig fremtidig dyrehelsepersonell innen oppdrettsnæringen fremstod derfor denne oppgaven med sin dagsaktuelle problemstilling som attraktiv for oss, trolig med relevant læringsutbytte uavhengig av prosjektets utfall.

Sammendrag

Tittel: Effekt av vaksinasjon mot lakselus- (*Lepeophtheirus salmonis*) infestasjon – antistoffrespons og lusepåslag hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Forfattere: Elise Fure, Erik Andreas Lie, Jenny Ottesen Stone og Marie Amundsen Wold.

Veileder: Professor Øystein Evensen og forsker Koestan Gadan,
Institutt for parakliniske fag.

I denne fordypningsoppgaven har vi studert effekter av en prototypevaksine mot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) hos atlantisk laks. Vaksinen består av en homogenisert blanding av ulike livsstadier av parasitten, formulert som en vann-i-olje adjuvans-basert vaksine. Atlantisk laks ble injisert intraperitonealt eller subkutant eller en kombinasjon av disse administrasjonsmetodene, og de forskjellige gruppene fikk ulik dosering av vaksinen. Blodprøver ble analysert ved ELISA for å måle nivå av spesifikke antistoffer mot parasitten og nivå av immunglobuliner (ikke-spesifikke). Lusetall hos fisken etter smitte med infektive copepoditter ble registrert. Blodprøver og lusetelling ble utført og registrert ved ulike tidspunkter etter smitteeksponering, fra 2 til 28 dager etter smitte.

Resultatene viste en signifikant reduksjon i antall lus hos flere av de vaksinerte gruppene sammenlignet med kontrollgruppene. Det ble ikke registrert noen økning i nivå av luse-spesifikke antistoffer hos de vaksinerte gruppene. Ved 4 uker etter smitteeksponering ses høyest nivå av lusespesifikke antistoffer hos kontrollgruppene samt hos en av vaksinasjonsgruppene. Det påvises ingen korrelasjon mellom antall lus og relativ OD-verdi for luse-spesifikke antistoffer.

Enkelte av parprøvene analysert ved ELISA hadde nokså høye differanseverdier for luse-spesifikke antistoffer, og det er mulig at dette kan ha påvirket validiteten av studien og

tilhørende resultater. Dette kan indikere suboptimal pipettering eller andre forhold knyttet til gjennomføringen av ELISA metoden.

Vi kan konkludere med at vaksinen kan ha en beskyttende effekt mot påslag av lakselus, men at den underliggende årsaken ikke er knyttet til økte nivå av spesifikke antistoffer mot parasitten. Det er mulig at vaksinen har induisert medfødte lokale immunresponser eller systemiske responser som ikke avleses ved nivå av sirkulerende antistoffer, noe som kan være et viktig moment for videre forskning.

Definisjoner og forkortelser

AGD	Amoebic gill disease
APC	Antigen presenterende celle
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HCl	Saltsyre
HPI	Hours post infection
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IP	Intraperitoneal
IMM	Ikke-medikamentelle metoder
MAC	Membrane attack complex
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MHC	Major histocompatibility complex
NCCs	Non specific cytotoxic cells
NK-celler	Natural killer cells

OD	Optical density
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PBS/T	Phosphate buffered saline with tween
PRRs	Pattern recognition receptors
rpm	Omdreining per minutt
SC	Subkutan
TMB	Tetramethylbenzidine
WPI	Weeks post infection

Innledning

Hva er lakselus - livssyklus, levevis og miljø

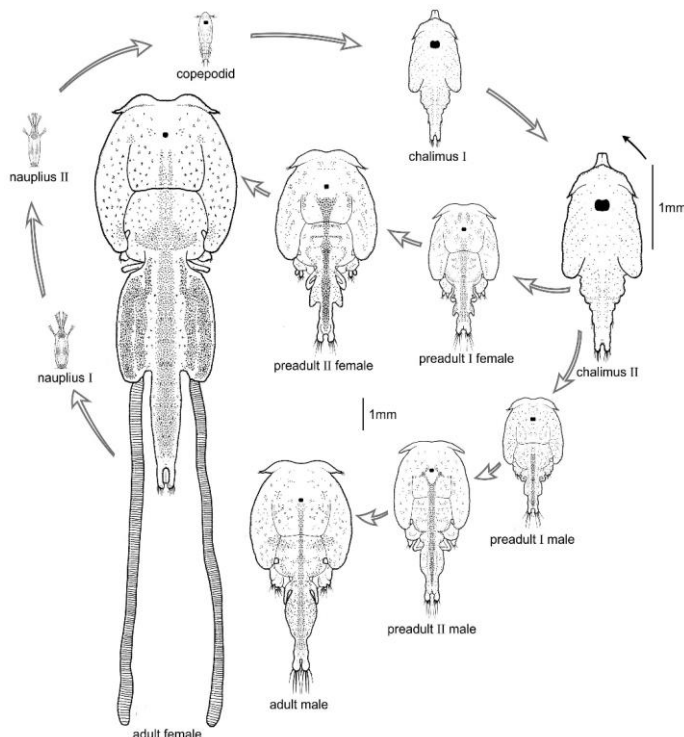
Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er et parasittisk krepsdyr på laksefisk (laks, ørret og røye), som finnes naturlig i alle havområder på den nordlige halvkule (Dalvin et al., 2018). Taksonomisk tilhører lakselus riket Animalia (dyreriket), rekken Arthropoda (leddyr), underrekke Crustacea (krepser), klasse Copepoda (hoppekrepser), orden Siphonostomatoida, familie Caligidae (sea lice) og slekt *Lepeophtheirus* (Artsdatabanken, u.å.). Lakselus er den vanligste ektoparasitten hos norsk oppdrettslaks (atlantisk laks, *Salmo salar* L.), og den største utfordringen for næringen. Omfanget av lus har økt betraktelig i takt med oppdrettsnæringen (Dalvin et al., 2018). *L. salmonis* er tilpasset et liv i åpent hav med store avstander mellom tilgjengelige verter. Lakselus er obligat parasittær, og adulte hunnlus produserer hundrevis av egg for å øke sannsynligheten for at avkommet lokaliserer en vert og formerer seg. Ved oppdrettsanlegg er tilgjengeligheten av verter en helt annen enn den vi finner under naturlige forhold, og tettheten kan overstige én million laks på ett anlegg (Sea Lice Research Centre, u.å.).

Lus som problem i oppdrettssammenheng omfatter flere arter parasittiske krepsdyr (Paulsen, 2018), hvor vi i nasjonal sammenheng også må nevne skottelus (*Caligus elongatus*) som en prevalent art hos atlantisk laks. Taksonomisk kan skottelus klassifiseres på samme vis som lakselus, men tilhører annen slekt (*Caligus*) og følgelig annen art (*elongatus*) (Artsdatabanken, u.å.). I motsetning til lakselusa, som bare infiserer fisk i laksefamilien, er skottelusa lite artsspesifikk og kan leve av mange ulike fiskearter, deriblant rognkjeks, sild og lodde samt fisk fra lakse- og torskfamilien (Dalvin, 2018). Da skottelus er mindre av

størrelse enn lakselus har det også vært antatt at den forårsaker mindre skade (Paulsen, 2018).

Skottelus er mest utbredt i Nord-Norge (Dalvin, 2018).

Tidligere delte man livssyklusen til *L. salmonis* inn i ti ulike utviklingsstadier. Nylig har man kommet frem til at chalimusstadiet kun består av to stadier, chalimus I og II, fremfor fire stadier slik man tidligere antok (Hamre et al., 2013). Lakselus gjennomgår altså åtte utviklingsstadier, etter dagens klassifisering (Sea Lice Research Centre, u.å.). De tre første stadiene er frittlevende (nauplius I, nauplius II, copepoditt), de to påfølgende stadiene (chalimus I, chalimus II) er fastsittende, mens de tre siste stadiene (preadult I, preadult II, adult hann/adult hunn med eggstrenger) er mobile (Dalvin et al., 2018). Figur 1 illustrerer størrelse og utseende til de ulike livsstadiene.



Figur 1: Livssyklus, *L. salmonis*. Sea Lice Research Centre, 2020, “SLRC - life cycle of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*)”. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.18710/GQTYYL>,

DataverseNO, VI.

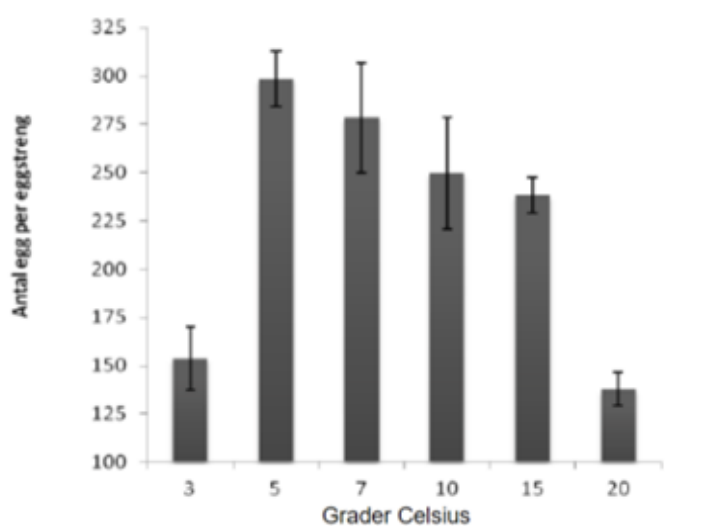
Livssyklusen begynner idet frittlevende naupliuslarver klekker fra eggstrengene, som er festet til genitalsegmentet hos den adulte hunnlusen. Larvene har en plommesekk, bestående av proteiner og fett, som de benytter som energikilde inntil de finner en egnet vert. Fra naupliusstadiet til det infektive copepodittstadiet gjennomgår lusa store morfologiske endringer (Sea Lice Research Centre, u.å.). Naupliuslarver og copepoditter sprer seg med kyst- og havstrømmene, henholdsvis i de øvre vannmassene (Dalvin et al., 2018). De søker mot lyset (fototaktiske) og unngår vann med lav salinitet. Frittlevende copepoditter tiltrekkes av trykkbølger fra svømmende fisk. Idet copepoditten kommer i kontakt med verten fester den seg ved hjelp av små kroker kalt sekundære antenner. Typiske predileksjonssteder er ved finnene, og med mindre lusa valgte feil vert vil den deretter etablere seg på fisken. Før den utvikler seg videre danner copepoditten et kort filament som festes til verten for å hindre at den faller av ved skallskifte mellom de ulike utviklingsstadiene. *L. salmonis* har et rigid eksoskjelett bestående av kitinpolymerer med begrenset evne til å utvide seg. Etter hvert som den vokser må lusa dermed lage et nytt eksoskjelett samt kvitte seg med det gamle, i en prosess kalt ekdysis. Ekdysis styres av særskilte veksthormoner, og små feil i denne prosessen kan være fatalt for lusen (Sea Lice Research Centre, u.å.). Copepoditten gjennomgår ekdysis og utvikler seg til chalimus, som i likhet med den etablerte copepoditten også er festet til fisken ved hjelp av et frontalfilament. Chalimus utvikler seg videre til preadulte stadier, som er mobile og kan bevege seg fritt på laksen (Gjerde, 2011). Etter to preadult-stadier når lusa omsider adult-stadiet og blir kjønnsmoden. Hannlus når kjønnsmodning raskere enn hunnlus, og adulte hanner kan pare seg opp med pre-adult II hunner for å bli den første til å fertilisere hunnen (Sea Lice Research Centre, u.å.). Hannene sementerer en sædpakke rundt kjønnsåpningen til hunnlusa ved paring. Denne kan befrukte inntil elleve sett med eggstrenger. Hunnene produserer egg som lagres i to eggstrenger festet til genitalsegmentet.

Ubefruktede eggstrenger har et lyst utseende mens befruktede eggstrenger er mørkebrune (Stormoen, 2023). Én eggstreng kan inneholde flere hundre egg, og til sammen kan ett par eggstrenger inneholde inntil tusen egg (Hamre et al., 2019; Samsing et al., 2016; Sea Lice Research Centre, u.å.). Eggstrengene klekker mens de fortsatt sitter fast på hunnlusa, og når ett sett eggstrenger klekker ligger det allerede et nytt sett klart i bakkroppen til hunnlusa (Stormoen, 2023).

Utviklingshastigheten til *L. salmonis* er nært knyttet opp mot vanntemperatur (Hamre et al., 2019; Samsing et al., 2016). Vanntemperatur er en viktig faktor for utvikling av alle lusestadiene, men er spesielt viktig for de frittlevende larvestadiene som kun lever på energireserver for å overleve og finne seg en vert (Samsing et al., 2016; Tucker et al., 2000). Ved varmere vanntemperaturer vil utviklingen til infektive copepoditter gå raskere, men de er levedyktige i en kortere periode siden de også bruker opp energireservene sine raskere. I kaldere vann er situasjonen omvendt - luselarvene bruker lenger tid på å utvikle seg til copepoditter og kan dermed fraktes over lengre avstander (Samsing et al., 2016; Pike & Wadsworth 1999). Hamre et al 2019 undersøkte i hvilken grad temperatur påvirker utviklingshastigheten fra det infektive stadiet til adult-stadiet. De registrerte at utvikling ble alvorlig hemmet ved 3 og 24 grader celsius, men at lus utviklet seg normalt mellom 6 og 21 grader. Ved 6 grader brukte lakselusa 72 dager (432 døgngrader) på å utvikle seg fra copepoditter til voksne hunnlus, sammenlignet med kun 13 dager (271 døgngrader) ved 21 grader.

Temperatur synes også å påvirke antall egg produsert, med økt antall ved lavere vanntemperaturer (Samsing et al., 2016). Voksne hunnlus produsert ved 3 eller 20 grader hadde 40% kortere eggstrenger med 40-50% færre egg (Stormoen, 2023), i tråd med funn som

viser at utviklingen blir alvorlig hemmet ved både meget lav og meget høy vanntemperatur/ytterliggående verdier (figur 2). Altså vil både svært lav eller svært høy temperatur virke negativt på egglegging. Det ser ut til at eggproduksjonen er størst rundt 5-15 grader.



Figur 2: Illustrerer sammenhengen mellom eggproduksjon og vanntemperatur. Stormoen, M. (2023).

Klekkesuksess er også temperaturavhengig. Ved 3 grader er det observert 50% klekkesuksess. Ved henholdsvis 5, 7 og 10 grader er det observert 75% klekkesuksess, mens det ved 15-20 grader er observert 100% klekkesuksess (Stormoen, 2023). Utfra dette er det tydelig at optimumstemperaturen for klekking er ved høyere vanntemperaturer (15-20 grader). Altså kan en slå fast at lakselus utvikler seg raskest ved høyere vanntemperaturer og at klekkesuksessen her er størst. Utviklingen går tregere ved lavere vanntemperaturer og klekkesuksessen er her lavest – det kan virke sannsynlig at den økte eggproduksjonen ved lave vanntemperaturer derved er en kompensatorisk tilpasningsmekanisme for å sikre reprodutiv suksess.

Effekter på fisken (patogenitet) samt faktorer av betydning for motstandsdyktighet

Lakselus lever av slim, epitelceller og blod fra verten. Det er særlig adulte stadier som suger blod, især adulte hunnlus i forbindelse med utvikling av eggstrenger (Dalvin et al., 2018). Det er hovedsakelig de mobile stadiene som er assosiert med hudskader på fisken (Sea Lice Research Centre, u.å.; Hamre et al., 2019; Grimnes & Jakobsen, 1996). Infestasjonens alvorlighetsgrad avhenger av antall parasitter på fisken, vertens størrelse og allmenntilstand (Veterinærinstituttet, u.å.). Parasittene ødelegger epitelbarrieren hos fisken og gjør den derved mer utsatt for sekundærinfeksjoner med bakterier, virus eller sopp (Dalvin et al., 2018). Fisken vil også kunne få problemer med osmoregulering som følge av ione- og vannlekkasje inn/ut av fisken gjennom den brutte epitelbarrieren. Store lusepåslag kan være dødelige (Veterinærinstituttet, u.å.).

I tillegg til å disponere fisken for sekundærinfeksjoner samt problemer med osmoregulering på grunn av lesjonene som oppstår, vil lusa i de tidlige parasittære stadiene nedregulere den lokale inflammatoriske responsen i huden hos laksen. Dette øker sannsynligheten for at lusa overlever og vokser opp til å bli adulte lus, som igjen påfører verten størst vevsskade (Caballero-Solares et al., 2022). Infestasjon påvirker også appetitt og tilvekst hos fisken i negativ grad, noe som i sin tur ytterligere svekker fiskens immunsystem og disponerer for sekundærinfeksjoner (Evensen et al., u.å.).

Flere faktorer påvirker laksens motstandsdyktighet mot luseinfestasjon, deriblant vertens immunstatus, fôring, stress og genetisk bakgrunn. For øvrig er det veldig variabelt hvor mottakelig ulike arter er for infestasjon, hvor for eksempel slekten *Onchorynchus* (stillehavslaks) har vist seg å være langt mindre mottakelig for parasittering sammenlignet

med atlantisk laks. Dette er sannsynligvis grunnet en svakere inflammatorisk respons, og muligens svakere immunrespons, hos atlantisk laks sammenlignet med stillehavslaks (Evensen et al., u.å.). FHF har i samarbeid med Nofima et pågående prosjekt som går ut på å kartlegge genetiske egenskaper og mekanismer for lakselusresistens hos stillehavslaks, for potensiell overføringsverdi til atlantisk laks (FHF, u.å.).

Lakselusas betydning for norsk oppdrettsnæring

Til tross for at lakselus er en naturlig forekommende parasitt i norske farvann, har forekomsten økt betraktelig i takt med den hurtige veksten oppdrettsnæringen har sett siden dens spede begynnelse på 60- og 70-tallet. Den høye tettheten av laks i merdene gir parasitten ubegrenset tilgang på verter, og de store mengdene naupliuslarver som klekkes vil kunne fraktes med havstrømmene og deretter infisere nærliggende lokaliteter.

Lusa utgjør i utgangspunktet ikke et stort helsemessig problem for laksen når smittepresset er lavt, men ved stort lusepåslag vil laksen potensielt kunne utvikle større lesjoner i huden som derved blir en direkte innfallspurt for patogener og disponerer for sekundærinfeksjoner med bakterier, virus eller sopp. Laksen blir også indirekte mer mottagelig for sekundærinfeksjoner grunnet lusas immunsuppressive effekt. Lesjonene vil som nevnt også kunne medføre osmoreguleringsproblemer hos laksen, som potensielt kan bli dødelig. Lusepåslag reduserer også appetitt og tilvekst hos fisken. Alle disse helse- og dyrevelferdsmessige konsekvensene som følge av lakselusproblematikk medfører tapte produksjonsinntekter for produsentene, og kombinert med et problematisk omdømme bidrar dette til næringens sterke motivasjon for å få bukt med problemet.

Det er også store kostnader knyttet til avlusningsbehandling, både i forbindelse med selve behandlingene samt på grunn av tap av fisk som følge av stress og skader påført i forbindelse med lusebehandling. På grunn av økende resistens hos lusa mot de fleste medikamentelle

behandlingsmetoder er det i stor grad mekaniske metoder som børsting, trykkspyling eller termisk avlusning som stort sett benyttes i dag. Ferskvannsbehandling i brønnbåt benyttes også. De medikamentelle metodene har mindre negativ effekt på fisken i form av stress, skader og dødelighet som følge av behandlingen enn dagens dominerende avlusningsmetoder, men er til gjengjeld knyttet opp mot miljøproblematikk i forbindelse med utslipp av medikamenter til omgivelsene. Et velkjent eksempel her er bruken av kitinsyntesehemmere som hemmer skallskifte hos lusa, som viste seg å også påvirke lokale skalldyrpopulasjoner på samme vis.

En annen faktor av betydning for trusselbildet er betydningen den vesle parasitten har for ville laksestammer i Norge. Villaksen vandrer ut fra fødeelva som smolt på våren, og returnerer om høsten et par år senere som kjønnsmoden laks for å gyte. Det er i disse migrasjonsperiodene at laksen er utsatt for parasittering som følge av høyt smittepress fra nærliggende oppdrettslokaliteter den må passere på sin ferd.

Det er utarbeidet en egen forskrift for bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg, som er gjeldende i Norge. Formålet med denne forskriften er å redusere forekomsten av lakselus slik at skadevirkningene på fisk minimaliseres, både fisk i akvakulturanlegg og viltlevende bestander av laksefisk. Videre skal forskriften bidra til å redusere og bekjempe resistensutvikling hos lakselus. Forskriften gjør det lovpålagt å telle lus minimum hver 7. dag ved vanntemperaturer ≥ 4 grader, eventuelt hver 14. dag ved vanntemperaturer < 4 grader. Det er også fastsatte maksgrenser for lusenivå, hvor grensen er 0,5 kjønnsmodne hunnlus per fisk. Grensen er satt lavere om våren (0.2 kjønnsmodne hunnlus per fisk) når viltlevende laksesmolt migrerer fra fødeelva (Forskrift om lakselusbekjempelse, 2012). Dersom anlegget ikke klarer å holde seg under lusegrensen, kan Mattilsynet pålegge oppdretteren å sette i verk tiltak eller å slakte ut fisken. Ved langvarige overskridelser kan lokaliteter bli pålagt å redusere produksjonen (Mattilsynet, 2016). Av hensyn til villaksen er lusegrensa satt lavere

enn det den ville vært dersom den var bestemt utfra helse- og dyrevelferdshensyn hos oppdrettslaksen alene. Dette medfører i sin tur at oppdrettslaksen utsettes for hyppige og sterkt belastende lusebehandlinger.

Trafikklyssystemet er et system som regulerer produksjonskapasiteten av oppdrettet laksefisk, og som bygger på miljøpåvirkningen av lakselus og resultatene av kontinuerlig overvåkning av lakselus (Fagerbakke, 2020). Systemet skal sikre en bærekraftig produksjon i forhold til risiko for lakselusindusert dødelighet hos utvandrende vill laksesmolt (Sommerset et al., 2023). Norskekysten er inndelt i tretten produksjonsområder, og hvert område får et trafikklys etter en toårig syklus, som avgjør de neste to årene for anlegg i området. Grønn farge indikerer at sonen kan få 6% økning i produksjonen, gul farge indikerer at sonen ikke kan øke produksjonen, mens rød farge indikerer at sonen må redusere produksjonen i området med 6% (Fagerbakke, 2020). Dette illustrerer hvor avgjørende betydning lakselus har for veksten i oppdrettsnæringen.

Behandling og forebygging

Det finnes mange ulike bekjempelsesstrategier i kampen mot lakselus. Som nevnt har man tradisjonelt benyttet medikamentelle midler mot lakselus, men utbredt resistens har ført til redusert bruk og tvunget næringen i retning ikke-medikamentelle metoder (Helgesen et al., 2022). Det foreligger nå bekymring for om det muligens også kan oppstå resistens mot ikke-medikamentelle metoder, og at IMM seleksjon kan endre den økologiske nisjen til parasitten og ha negative effekter på villakspopulasjoner (Coates et al., 2021).

Antiparasittære legemidler mot lakselus kan gis både som badebehandling og via fôret.

Det er sett nedsatt følsomhet og resistens mot alle kjemiske midler langs norskekysten, med unntak av kitinsyntesehemmere. Hydrogenperoksid ser også ut til å ha god effekt i visse

områder. For å motvirke ytterligere resistensutvikling er det viktig at følsomheten for legemiddelet som skal benyttes alltid testes på lus ved det enkelte anlegg i forkant av behandling. Generelt sett bør man vektlegge forebyggende tiltak fremfor behandling. Man bør også tydeliggjøre fokuset på behandling av enkeltmerder og fremme utslakting som et mulig alternativ (Nærings og fiskeridepartementet, 2017). Et annet problematisk aspekt ved kjemisk/medikamentell behandling er bekymring for miljøpåvirkning, bioakkumulering og effekt på marine økosystemer (Barrett et al., 2020a).

Felles for de ikke-medikamentelle metodene er at de krever håndtering av fisken, og dette utgjør en betydelig velferdsutfordring (Sommerset et al., 2023). Fisken må trenes sammen for så å pumpes inn i avlusningssystemene, før de omsider føres tilbake til merdene. Dette anses som stressende for fisken og er trolig en stor påkjenning i seg selv. I fiskehelserapporten 2022, ble skader relatert til avlusninger rangert på førsteplass av fiskehelsepersonell som årsak til redusert velferd for laks og regnbueørret i sjøfasen. Det er i all hovedsak tre ulike prinsipper som brukes: termisk, mekanisk og bruk av ferskvann, i tillegg til ulike kombinasjoner av disse (Sommerset et al., 2023).

Ved termisk avlusning blir lus utsatt for varmebehandlet sjøvann som fører til at de mister evnen til å suge seg fast og dermed faller av laksen. Øvre grense for det tempererte sjøvannet er mellom 28- 34 grader og behandlingen skal ikke pågå lenger enn 30 sekunder.

Temperaturdifferansen er av avgjørende betydning for effekten av behandlingen, og metoden bør derfor ikke benyttes dersom det er høy temperatur i sjøvannet fra før av (Stormoen, 2023). Det finnes to ulike avlusningssystemer ved termisk avlusning, kalt Thermolicer og Optilicer, og forskjellen på disse ligger i systemets utforming. I en Thermolicer pumpes fisken gjennom et gjennomstrømmingssystem, mens den i en Optilicer føres i et åpent bad (Holan et al.,

2017). Det har lenge blitt stilt spørsmål omkring fiskevelferd og bruk av termisk avlusning. Mye tyder på at fisken opplever den høye temperaturen som smertefull, og det registreres også funn av alvorlige skader på laksen i etterkant av behandling (Grøntvedt et al., 2015).

Ved mekanisk avlusning benyttes maskiner som spylere, børster eller bruker turbulens for å fjerne lakselus. Det er tre mekaniske avlusningssystemer på markedet: SkaMik, FLS-avlusersystem og Hydrolicer (Holan et al., 2017). Ved mekanisk avlusning er det svært viktig at man påser at fisken har god skinnhelse i forkant av avlusning, i tillegg til riktig spyletrykk under behandling. Det bør heller ikke være for lave temperaturer i sjøen ved behandlingstidspunktet.

Ferskvannsbehandling bygger på lusas følsomhet for lav salinitet (Dalvin et al., 2018). Laksen må holdes i ferskvannsbrønner i rundt 8 timer for effekt (Stormoen, 2023). Det er spesielt viktig å ha godt fokus på vannkvalitet under behandling, både for å optimalisere fiskevelferd og behandlingseffekt. Ved optimal gjennomføring anses metoden som relativt skånsom for fisken med samtidig god behandlingseffekt. *Paramoeba perurans* tåler heller ikke ferskvann, og problemer med AGD kan derfor understøtte eventuell ferskvannsbehandling mot lakselus (Hytterød et al., 2017). På en annen side kan det være ressurskrevende og dyrt å få tak i nok ferskvann, i tillegg til at det er en påkjenning for fisken å trenge slik over lengre tid.

En type ikke- medikamentell metode uten håndtering, er bruk av rensfisk. Rognkjeks og berggylt er de fremste artene som benyttes som rensfisk i norsk oppdrettsnæring. I 2021 ble det satt ut over 45 millioner rensfisk i norske merder, både oppdrettet og villfanget (Fiskeridirektoratet, 2022). Rensfisken fungerer som en “kontinuerlig avlusningsmetode”

ved at den i variabel grad spiser de største stadiene av lus. Dette anses som skånsomt for laksen, men man vet foreløpig svært lite om rensfiskens behov samt at den faktiske effekten mot lus er meget tvilsom (Barrett et al., 2020a; Overton et al., 2020; Barrett et al., 2020b). Dødeligheten hos rensfisk kan være så høy som 100% (Mattilsynet, 2019), og i fravær av betydelig bevisbar effekt bør man nok stille spørsmål ved om målet helliger midlet.

Laser er en annen metode, med varierende effekt. Her vil man kontinuerlig fjerne lus på laksen mens den svømmer i merdene. Dette skjer ved hjelp av laserstråler, et spesielt kamera kalt stereokamera og en programvare som detekterer lus (Holan et al., 2017).

Det er helt klart en fordel å forebygge, framfor behandling. Av de forebyggende metodene finnes det både luseskjørt, snorkelmerd og nedsenkbare merder. Disse danner ulike fysiske barrierer som skal beskytte laksen mot luselarvene. Teknologien baserer seg på kunnskapen om at copepoditter tiltrekkes av lys og befinner seg derfor i størst antall i de øverste vannmassene. Luseskjørt består av et lusetett materiale som omslutter den øverste delen av merden. Bruken av luseskjørt er utbredt og effekten som et forebyggende tiltak ser ut til å være god. Det er viktig å passe på oksygenmetningen i sjøvannet ved bruk av metoden, samt sikre at skjørtet holdes på plass. Nedsenkede merder befinner seg under luseskjørtet i vannet og er dekket av et nettingtak. Dette tilsier at fisken bør føres under vann og at merden fra tid til annen må heves til overflaten slik at fisken kan fylle svømmeblæren. Nedsenkbare merder er av nyere teknologi enn luseskjørt, og man vet derfor mindre om effekten. Snorkelmerd er en hybrid av de to metodene. Snorkelmerd har også et tak som holder laksen under luseskjørtet, men har i tillegg en snorkel med lusetett materiale. Effekten av snorkelmerd er godt dokumentert, men er avhengig av hvor dypt merden er senket. Nedsenk på 3-4 meter ser ut til

å være tilstrekkelig i kystnære områder, mens dypere merder trengs innover i fjordene der det kan dannes brakkvannslag (Holan et al., 2017).

Et annet forebyggende alternativ er fôr som gir fysiologiske fordeler utover det grunnleggende ernæringsbehovet. Disse kalles gjerne for funksjonelle fôr og er blitt stadig mer utbredt innen oppdrett (Barret et al., 2020a). Tanken er at tilførsel av ulike næringsstoffer eller tilsetningsstoffer blant annet kan ha en positiv effekt på lusepåslaget. Mulige mekanismer er at de funksjonelle fôrene kan være med å styrke fiskens hudbarriere, øke mucusproduksjon, bedre immunforsvaret, ha en gifteffekt på lusen etter påslag, eller kamuflere kjemiske signaler fra fisken som tiltrekker lus. Blant de tre største fôrproducentene oppgis det en effekt på 20- 30%. Problemet er at mye av forskingen som er blitt gjort på dette feltet er finansiert og gjennomført av fôrleverandørene selv. Det er i tillegg ofte manglende informasjon vedrørende fôrresept som er blitt brukt i de ulike forsøkene. Effekt er vanskelig å måle da de funksjonelle fôrene gjerne må brukes over flere uker, og det kan være utfordrende å skille effekten fra andre forebyggende tiltak (Holan et al., 2017).

Avl kan også fungere som et forebyggende tiltak. Gjennom avlsarbeid kan man endre egenskaper hos et individ i ønsket retning. Man vet at variasjon i motstandsdyktighet mot lakselus hos atlantisk laks trolig har en arvelig komponent (Barret et al., 2020a). Det finnes derfor et stort potensiale i å utvikle en laks med økt motstandskraft gjennom seleksjon. Avlsarbeid er på den andre siden tidskrevende, kostbart og vil føre til mindre vektlegging av andre genetiske egenskaper (Holan et al., 2017).

Vaksinasjon mot lakselus – teoretisk bakgrunn og tidligere forsøk

Det er flere faktorer som gjør det utfordrende å lage en vaksine mot lakselus. Parasitten har en kompleks livssyklus og omfanget av antigener uttrykt ved hvert trinn er noen av faktorene som gjør vaksineutvikling vanskelig (Holm, 2016). Dette nødvendiggjør en annen tilnærming enn for bakterier og virus, hvor en vaksine mot lakselus er tiltenkt å være ett av mange hjelpemidler i kampen mot parasitten. Trolig vil man aldri kunne oppnå en fullgod vaksine, men en effekt på over 50% vil kunne redusere infestasjonspresset og behandlingsbehovet betraktelig (Evensen et al., u.å). Vaksinen må enten gi redusert lusepåslag eller medføre redusert overlevelse eller reproduksjonsrate (Eichner, 2022).

Hensikten med vaksinasjon er å stimulere det adaptive immunsystemet til å utvikle en immunrespons mot et gitt antigen, som så vil beskytte vertsorganismen ved fremtidige eksponeringer ovenfor det samme antigenet (Munang'andu & Evensen, 2015). Vaksiner kan inneholde levende, attenuerte antigener eller inaktiverte antigener. Inaktiverte vaksiner replikerer ikke i vertsorganismen og man vil kun oppnå en humoral immunrespons som beskytter mot ekstracellulære patogener. Attenuerte vaksiner vil derimot replikere og man oppnår både en humoral og en cellulær respons, og dermed beskyttelse mot ekstracellulære og intracellulære patogener (Berg et al., 2006).

Vaksiner brukt i akvakultur er vanligvis inaktiverte, grunnet sikkerhet med tanke på spredning av sykdom. Ved bruk av levende vaksiner kan man risikere at agenset forårsaker sykdom hos andre fiskearter i nærmiljøet (Evensen, 2021). De inaktiverte vaksinene har dog en dårligere effekt, og en må derfor benytte større doser antigener, i tillegg til behov for adjuvans. Som regel brukes oljebaserte adjuvanser ved vaksinasjon av fisk. En adjuvans er av vesentlig betydning fordi den trigger og forsterker den lokale inflammatoriske reaksjon, og igangsetter

immunresponsen etter vaksinasjon (Evensen, 2009). Virkningsmekanismene av adjuvans er ikke fullstendig klarlagt, men man vet at adjuvanset gir en depoteffekt. Antigen frigjøres gradvis, noe som forlenger effekten av vaksinen og reduserer behovet for en boosterdose (Koppang et al., 2012). Adjuvans er essensielt for å forsterke en ellers laber respons induert av et inaktivert antigen alene.

Immunisering av fisk foregår hovedsakelig ved hjelp av intraperitoneal injeksjon. Denne metoden krever at fisken er anestesert og tas opp fra vannet. Dette er både tidkrevende og kostbart samt belastende for fisken. På stikkstedet oppstår det ofte bivirkninger som adheranser i bukhulen og ryggdeformiteter. Likevel dominerer denne vaksinasjonsmetoden grunnet pålitelig og stabil effekt. Alternative administrasjonsveier er vaksinasjon over slimhinnene i form av dypp eller bad, eventuelt oral vaksinasjon. Fordelen med disse metodene er at man kan vaksinere et stort antall fisk samtidig og det er en mindre påkjenning for fisken. Tidligere har dette vært vanlig i bruk, men grunnet dårligere effekt benyttes metoden kun dersom fisken er for liten for injeksjonsvaksine (Berg et al., 2006).

Tidspunkt for vaksinerings er en annen faktor av avgjørende betydning for grad av effekt. Laksen vaksineres normalt i settefiskperioden, rundt 2-3 måneder før sjøsett. Vanntemperatur vil kunne ha innvirkning på optimalt vaksinasjonstidspunkt, og en bruker derfor begrepet "døgngrader" for å bestemme dette. Normalt anbefales det å vaksinere ved mellom 400-600 døgngrader for de fleste vaksiner. Fiskens størrelse er også av betydning med tanke på treffsikkerhet ved stikkvaksinerings. I dag foregår vaksinerings både manuelt og ved hjelp av maskiner. En anser en vekt på mellom 35-50 gram hos laksen som gunstig. Ved stikkvaksinerings er det viktig at kanylen har korrekt lengde og tykkelse og at den treffer riktig innstikkssted, som er kranialt for bukfinnen så nær midtlinjen som mulig (Evensen, 2021).

Som tidligere beskrevet finnes det flere problematiske aspekter ved stikkvaksinerings.

Håndtering i form av trenging, pumping og fysisk håndtering medfører stress som kan bidra til redusert tilvekst og promotere sykdomsutvikling hos laksen. Videre vil selve vaksinen med adjuvans gi bivirkninger i form av moderat til uttalt peritonitt, som kan sees som adheranser av fibrintråder i bukhulen. I tillegg kan det oppstå pigmentflekker i muskelvevet som et resultat av betennelsen og påfølgende ansamling av melanomakrofager som produserer melanin. Ved feilstikk kan man risikere å treffe andre organer, som også kan gi patologi og smerte hos laksen. Vaksinerings kan også påvirke skjelettutviklingen, og ryggdeformiteter som forkortede ryggvirvler har blitt observert (Berg et al., 2006).

Vaksineutvikling – hva er tidligere blitt gjort?

Det finnes i dag kun et fåtall vaksiner som beskytter mot ektoparasitter. Den første vellykkede vaksinen var mot asiatisk blåflått (*Rhipicephalus microplus*) (Carpio et al., 2011).

Vaksinen retter seg mot antigenet Bm86, som er et membranbundet glykoprotein bundet til overflaten på flåttens epitelceller i tykktarm. Når antistoffer produsert etter vaksinerings binder til antigen i parasittens tarm vil det øke permeabiliteten i tarmen, gi lysis av celler og dermed nedsatt overlevelse for parasitten (Willadsen et al., 1992). Man har lenge forsøkt en lignende tilnærming i utvikling av en vaksine mot lakselus, noe som skulle tilsi at det finnes både anatomiske og fysiologiske likhetstrekk mellom de to ektoparasittene. Dette har foreløpig ikke lyktes, og en potensiell årsak er at *L. Salmonis* har en litt annen biokjemi og struktur i tarmen. Et annet viktig poeng er at inntak av blod ikke er av avgjørende betydning for lakselusas ernæring sammenlignet med flåttens. På tross av at voksne hunnlus suger blod i større grad sammenlignet med andre utviklingsstadier, er blodopptaket fortsatt betydelig mindre enn hos flåttens. Det antas at mengden blodopptak er avgjørende for parasittens inntak

av antistoffer, og dermed også effekten av en mulig vaksine (Raynard et al., 2002; Evensen, 2014).

I senere tid har fokus også blitt rettet mot en annen tilnærming, nemlig å øke den lokale inflammatoriske responsen mot *L. Salmonis* med fokus på det medfødte immunforsvaret (Evensen et al., u.å.). Et eksempel på dette er forskning på antigenet My32. Genet er hentet fra *Caligus rogercresseyi*, som er den dominerende caligid i Chile. My32 ble benyttet fordi det har store likheter med akirin-2. Akirin er en gruppe proteiner som er viktige for den medfødte immunresponsen hos flere flått og insektarter. Rekombinant My32 ble brukt for å immunisere atlantisk laks og studien viste en signifikant reduksjon i antall lus per fisk 24 dager etter smitte, noe som indikerer at My32 kan være et lovende kandidat-antigen (Carpio et al., 2011). Likevel har det enda ikke kommet noen effektiv My32-basert vaksine på markedet.

Immunsystemet hos beinfisk (teleoster) – medfødt og adaptiv immunitet

Sammenlignet med landdyr utsettes fisk for svært tett og kontinuerlig kontakt med potensielle patogener i sitt nærmiljø, via hud, gjeller og gastrointestinaltraktus. I likhet med pattedyr består fiskens immunsystem av en medfødt og en ervervet komponent. Immunsystemet hos fisk er imidlertid karakterisert av en sterk og predominerende medfødt komponent, det er lite variasjon i antistoffene og det eksisterer ingen isotype-svitsj (antistoffproduksjonen hos plasmacellene kan ikke endres fra én type immunoglobulin til en annen) (Makesh & Rajendran, 2022). Beinfisk har også andre immunoglobuliner enn pattedyr, henholdsvis IgM, IgD og IgT (Mashoof & Criscitiello, 2016). IgT er unikt for fisk, og anses å ha tilsvarende betydning for fisk slik IgA har for pattedyr, nemlig slimhinneassosiert immunitet. I likhet med pattedyr er IgM det predominerende antistoffet i plasma hos fisk, og IgM har derfor en nøkkelrolle i

systemiske immunresponser. Det ervervede immunsystemet anses for å være mindre komplekst hos fisk sammenlignet med høyerestående vertebrater (Krogdahl et al., 2023). Medfødt immunitet genererer en hurtig og generell (uspesifikk) immunrespons og er relativt upåvirket av vanntemperatur. Det ervervede immunsystemet utløser en spesifikk, men treg immunrespons. Responsen er temperaturavhengig, der lavere temperaturer fører til en tregere utvikling. Som vekselvarm organisme er fisken derfor i stor grad prisgitt en velutviklet medfødt immunitet (Krogdahl et al., 2023).

Lymfocytene dannes og modnes i de primære lymfoide organer, som hos fisk omfatter hodenyret og thymus. B-celler dannes i hodenyret, som er analogt til beinmargens funksjon hos pattedyr, mens T-celler modnes i thymus. Fisk mangler lymfeknuter, og de modne lymfocytene fra de primære lymfoide organene finner vi henholdsvis i: milten, nyret, interbranchialt lymfoid vev (ansamling av lymfocytter i gjellene sett hos flere beinfisk), slimhinneassosiert lymfoid vev/mucosa associated lymphoid tissue (MALT) samt den nylig oppdagede lymfoide bursa i analregionen hos atlantisk laks. Både nyret og milten har populasjoner av melanomakrofager - såkalte melanomakrofagsentra. Disse cellepopulasjonene antas å ha tilsvarende funksjon som lymfeknuter har hos pattedyr. MALT er diffust spredte lymfocytter i slimhinnene hos fisk og finnes henholdsvis i hud, gjeller, gastrointestinaltraktus samt i luktepitelgropen/nesehulen (Krogdahl et al., 2023).

Det medfødte immunforsvaret omfatter løselige komponenter som blant annet: cytokiner, kjemokiner, interferoner, komplementproteiner, antimikrobielle peptider, proteaseinhibitorer, naturlige antistoffer og transferrin. Det cellulære forsvaret utgjøres her av makrofager, melanomakrofager, dendritiske celler, NK-celler, nonspecific cytotoxic cells (NCCs), granulocytter (nøytrofile, eosinofile, basofile) og mastceller. Makrofager og nøytrofile

eliminere mikrober via fagocytose, mens NK-celler og NCCs er involvert i uspesifikk cellemediert cytotoxicitet (Makesh & Rajendran, 2022).

De ytre epitelkledte barrierene danner førstelinjeforsvaret mot invaderende mikrober, og epitelet hos fisk er dekket av slim. Dette slimet danner en fysisk barriere mot mikrober, og det produseres og byttes ut kontinuerlig. Det inneholder også beskyttende stoffer som antimikrobielle peptider og lysozym. Dersom en mikrobe trenger gjennom huden vil den aktivere såkalte pattern recognizing receptors (PRRs), som finnes enten membranbundet eller i cytosol hos fagocytter, dendritiske celler og flere andre celletyper. PRRs gjenkjenner såkalte pathogen associated molecular patterns (PAMPs) hos mikroben. PAMPs er konserverte molekylære mønstre som er felles for ulike klasser patogener (bakterier, virus, sopp, parasitter). PAMPs er essensielle for mikrobens overlevelse – den kan derved ikke endre genuttrykket av disse som strategi for å unngå å bli oppdaget. Binding av PAMPs til PRRs fører til produksjon av cytokiner og kjemokiner, som tiltrekker leukocytter til infeksjonsstedet via kjemotakse og fører til lokal økt kapillærpermeabilitet. Den økte permeabiliteten mobiliserer vevsvæske, plasmaproteiner og celler til infeksjonsstedet, og inflammasjonsprosessen er i gang. Makrofager og andre antigenpresenterende celler fra infeksjonsstedet vil etter hvert sirkulere gjennom melanomakrofagsentra i hodenyre og milt, hvor de vil kunne presentere aktuelt antigen ovenfor lymfocytter og aktivere dem.

Beinfisk har et velutviklet og mer variert komplementsystem enn pattedyr, med mange isotyper komplementproteiner som kan binde mange ulike patogener (Makesh & Rajendran, 2022). Hovedfunksjonene til komplementsystemet er opsonisering (merke mikrober for fagocytose), inflammasjon og dannelse av membrane attack complex (MAC).

Komplementsystemet aktiveres på tre ulike måter - klassisk aktivering, alternativ aktivering eller lectin-aktivering. Aktivering av komplementsystemet utløser en kaskadereaksjon som

ender i dannelsen av MAC, som lyserer og derved dreper målcellen (Kania & Buchmann, 2022).

I likhet med pattedyr utgjør B- og T-lymfocytter det adaptive immunsystemet hos fisk. Det adaptive immunsystemet kjennetegnes av to fundamentale karakteristika: spesifikk gjenkjenning av antigener og utvikling av immunologisk minne. De spesifikke antigenene presenteres av APCs og gjenkjennes av B-cellerreseptorer og T-cellerreseptorer. Ved binding av antigen vil lymfocytene aktiveres, for så å proliferere og differensiere. B- og T-lymfocytene differensierer til å bli effektorceller – henholdsvis antistoffproduserende plasmaceller, CD4+ T-hjelpeceller og CD8+ cytotoksiske T-lymfocytter. Ved lymfocyttaktivering dannes det hos pattedyr også en andel hukommelsesceller.

Hukommelsescellene vil ha immunologisk minne og organismen vil derved kunne respondere raskere med lymfocyttproliferasjon ved påfølgende eksponeringer ovenfor det spesifikke antigenet (Abós et al., 2022). Dette er grunnen til at den adaptive immunresponsen ved førstegangseksponering ovenfor et antigen er treg, mens den ved senere anledninger vil være hurtigere og mer effektiv. Hensikten med vaksinasjon er å utvikle et slikt immunologisk minne.

Den humorale immunresponsen i adaptiv immunitet medieres av antistoffer produsert av modne plasmaceller. B-celler aktiveres, prolifererer og differensierer til å bli plasmaceller når de binder antigener. B-celleaktivering kan være T-celleavhengig eller T-celleuavhengig. Ved T-celleavhengig B-celleaktivering vil B-cellen binde antigen som presenteres på MHC-II til CD4+ T-hjelpeceller. B-cellene kan også binde antigen i sin native konformasjon, det vil si uprosesserte antigener som binder direkte til immunoglobulinreseptorer på B-cellen og aktiverer den. Dette kaller vi T-celleuavhengig B-celleaktivering. De modne plasmacellene skiller ut antistoffer som bekjemper ekstracellulære patogener ved opsonisering og

nøytraliserende, i tillegg til at antistoffer kan aktivere komplementkaskaden (Krogdahl et al., 2023).

Den cellemedierte immunresponsen i adaptiv immunitet bekjemper intracellulære mikrober og koordineres av T-celler. Naive T-celler aktiveres når T-cellerreseptoren binder antigen som presenteres av MHC-II på APCs. Dette fører til proliferering og differensiering av T-cellene, som enten differensierer til CD4⁺ T-hjelpeceller eller CD8⁺ cytotoksiske T-celler. CD4⁺ T-hjelpeceller binder antigener presentert på MHC-II, mens CD8⁺ cytotoksiske T-celler binder antigener presentert på MHC-I. MHC-II finnes på APCs, og antigenene som presenteres på MHC-II stammer fra proteiner tatt inn i cellen ved endocytose. MHC-I finnes på alle kjerneholdige celler, og antigenene som presenteres på MHC-I stammer fra proteiner i cytosol. CD4⁺ T-hjelpeceller skiller ut ulike cytokiner som instruerer andre leukocytter til mikrobedrap, mens CD8⁺ cytotoksiske T-celler kan destruere infiserte celler (Abbas et al., 2015). Hos pattedyr finnes det ulike subtyper T-hjelpeceller, henholdsvis Th1-, Th2-, Th17- og T-regulatoriske celler. Th1-celler produserer cytokinene IFN- γ , TNF- α og IL-2 som bidrar til å bekjempe intracellulære infeksjoner ved promotering av fagocytosemediert mikrobedrap. Th2-celler produserer cytokinene IL-4, IL-5 og IL-13 som bidrar til antistoffproduksjon og derved motstand mot ekstracellulære patogener. Th17-celler produserer cytokinene IL-17, IL-21 og IL-22 som induserer inflammasjonsreaksjoner som dreper ekstracellulære bakterier og sopp. T-regulatoriske celler produserer de inhibitoriske cytokinene TGF- β og IL-10 som hemmer proliferasjon av T-celler og bidrar til immuntoleranse. Det er usikkert om man kan kategorisere T-hjelpecellene i de samme subtypene hos beinfisk, men de ulike gruppernes signaturcytokiner er imidlertid blitt påvist (Krogdahl et al., 2023).

Immunresponser ved lusepåslag

Som nevnt tidligere vil lusa indukere en lokal immunsuppressiv effekt hos laksen, og det er ikke fullstendig klarlagt nøyaktig hvilke mekanismer som står bak. En kan trolig trekke paralleller til ektoparasitter generelt og deres effekt på verten, hvor en vellykket parasittering er avhengig av at parasitten kan undertrykke eller minimere vertens immunreaksjon, hemostase (for blodsugende ektoparasitter) og smertereaksjon. Disse mekanismene er knyttet opp mot komponenter i parasittens spytt (Evensen et al., u.å.).

Gener involvert i uspesifikk immunrespons, deriblant gener som koder for IL-1, IL-10 og matrix-metalloproteaser, blir nedregulert hos laksen i de tidlige parasittære stadiene. Derimot, i overgangen fra chalimus- til preadult-stadiet ses det en ny topp i immunrespons hos laksen med en økning i transkripsjon av disse genene. Tidligere studier beskriver en økt konsentrasjon av arginase-1, IL-10 og TNF ved infestasjon med *L. salmonis* hos atlantisk laks, og dette er forenelig med Th2-respons og påfølgende antistoffproduksjon. Til tross for at atlantisk laks utvikler antistoffrespons ved infestasjon med lakselus, så er ikke dette assosiert med verken redusert påslag eller økt avstøting av lus, trolig grunnet at antistoffresponsen er svak. Det antas at en god Th1-respons (fremfor Th2-respons) kombinert med en sterk uspesifikk immunrespons vil kunne gi effektiv immunitet mot *L. salmonis* (Evensen et al., u.å.).

Som tidligere nevnt vil en Th1-respons produsere cytokiner som bidrar til å bekjempe intracellulære infeksjoner ved promotering av fagocytosemediert mikrobedrap (cellemediert immunitet). Videre vil en Th2-respons føre til en cytokinproduksjon som promoterer antistoffproduksjon (humoral immunrespons), og derved motstand mot ekstracellulære patogener. Th2-respons indukeres hos pattedyr ved parasittangrep og promoterer IgE-, mastcelle- og eosinofil-mediert destruksjon av parasittene (Abbas et al., 2015). Cytokiner

produsert av Th1-celler klassifiseres som typisk proinflammatoriske cytokiner, mens for eksempel IL-10 produsert av Th2-celler har en antiinflammatorisk effekt (Berger, 2000). Th1- og Th2- respons motvirker hverandre, og ettersom en overdreven proinflammatorisk Th1- respons kan føre til vevsskade er et velfungerende immunsystem avhengig av en optimal balanse mellom disse. I hvilken retning (Th1 versus Th2) denne balansen bør forskyves avhenger av den enkelte immunologiske utfordring. Det er blitt sett i flere studier at immunresponsen hos atlantisk laks ved luseinfestasjon er forskjøvet mot en Th2-respons. En kan med rimelighet anta at dette er knyttet opp mot en vevsbevarende reaksjon, som et resultat av genetisk seleksjon over tid hvor de antiinflammatoriske responsene trolig har vært mer hensiktsmessig enn de proinflammatoriske responsene. Med andre ord har atlantisk laks en vevsbevarende reaksjon med økt toleranse ovenfor lusa. Dette lar den leve med litt høyere lusetall, fremfor å reagere med kraftig Th1-respons som antagelig ville gitt bedre immunitet mot luseinfestasjon, men også samtidig vevsskade grunnet proinflammatorisk respons. Individuer med en proinflammatorisk respons får mindre lusepåslag, og dette er sett hos for eksempel Coho-laks (Evensen, 2023). Under naturlige forhold hvor smittepresset med luselarver er langt lavere enn i områder med oppdrettsanlegg fremstår det sannsynlig at den antiinflammatoriske responsen mot lakselus sett hos atlantisk laks kan være en hensiktsmessig tilpasning. Men med det sterke smittepresset sett i oppdrettsnæringen er en proinflammatorisk respons å foretrekke, og en slik endring vil kun være mulig ved genetisk seleksjon. Ettersom det er flere gener involvert vil seleksjon for resistens ta lang tid.

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA er en analysemetode først utviklet ved Stockholm Universitet i 1971 (Lequin, 2005).

ELISA kan benyttes for å detektere og kvantifisere løselige substanser som antistoffer, hormoner, peptider og proteiner, ved å måle interaksjonen mellom antigen og antistoff (Thermofisher, u.å.). ELISA ble utviklet ved å modifisere radioimmunoassay (RIA), ved å konjugere merkede antigen/antistoff med enzymer fremfor radioaktiv jod (Alhajj & Farhana, 2023).

En kan dele ELISA-metoden inn i fire grunnleggende trinn (Alhajj & Farhana, 2023).

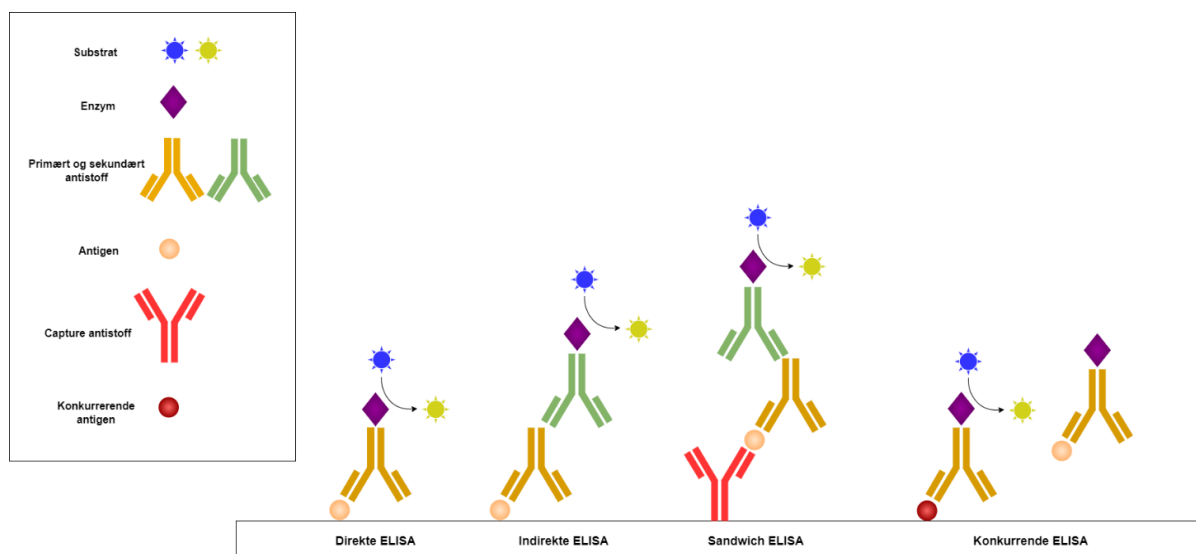
1. **Coating:** Brønnene dekkes med antigen eller antistoff, komplementært til det man ønsker å måle.
2. **Blokkering:** Tilsetting av relevant protein eller annet molekyl som dekker overflater i brønnen hvor antigen/antistoff fra coatingen ikke har festet seg. Dette reduserer risikoen for uspesifikke bindingsreaksjoner som kan gi falsk positiv resultater.
3. **Deteksjon:** Tilsetting av enzymkonjugert-antistoff og substrat vil gi en fargeendring som korrelerer med konsentrasjonen av antigen/antistoff i prøven.
4. **Avlesning:** Reaksjonen avleses ved hjelp av et spektrofotometer.

Mellom hvert trinn vaskes platene med vaskebuffer. Det er vanlig å bruke PBS/T, som er en blanding av fosfat-buffret saltvann og tween. Tween 20 er en detergent og benyttes ofte som komponent i ulike laboratorieteknikker, for eksempel Western blotting, immunhistokjemi, ELISA og PCR (Sigma-Aldrich, u.å.).

Det finnes flere enzym-markører for bruk i ELISA, men de vanligst benyttede er HRP (horseradish peroxidase) og AP/ALP (alkaline phosphatase). Det er også mange substratløsninger som kan brukes til ELISA med HRP og AP/ALP konjugat, og valget avhenger av

ønsket sensitivitet og avlesningsinstrumentet du har tilgjengelig (Alhajj and Farhana, 2023; Thermofisher, u.å.).

De fire vanligste typene ELISA er direkte, indirekte, sandwich og konkurrerende. De ulike variantene er illustrert i figur 3. Direkte ELISA er den enkleste metoden. Metoden krever et antigen og et enzym-konjugert antistoff spesifikk for antigenet (Lin, 2015). Indirekte ELISA ligner den direkte metoden, men har totalt to trinn med deteksjonsantistoffer. Det primære deteksjonsantistoffet binder til antigenet mens det sekundære er enzym-konjugert og binder til det primære deteksjonsantistoffet (Alhajj and Farhana, 2023). Sandwich ELISA er den vanligst benyttede metoden for kvantitativ deteksjon av antigener. Antistoffer med affinitet til antigenet i prøven binder til bunnen av brønnen, før tilsetning av prøven med ukjent konsentrasjon av antigenet. Den frie andelen av antigener vaskes vekk, før det sekundære antistoffet, som er konjugert med enzym, tilsettes. Det er viktig at antistoffene binder seg til ulike epitoper på antigenet, slik at sekundære antistoffer har ledige epitoper å binde seg til (Abbas et al., 2018). Det finnes både direkte og indirekte sandwich ELISA (Bio-rad, u.å.). Konkurrerende ELISA brukes ofte for å måle konsentrasjonen av antigen i en prøve, men kan også brukes til å kvantifisere mengde antistoff. Antigen/antistoff i prøven konkurrerer mot en referanse om å binde en begrenset mengde merket antistoff/antigen. Med økende konsentrasjon av antigen/antistoff vil signalet fra testen bli svakere (Bio-rad, u.å.; Abcam, u.å.).

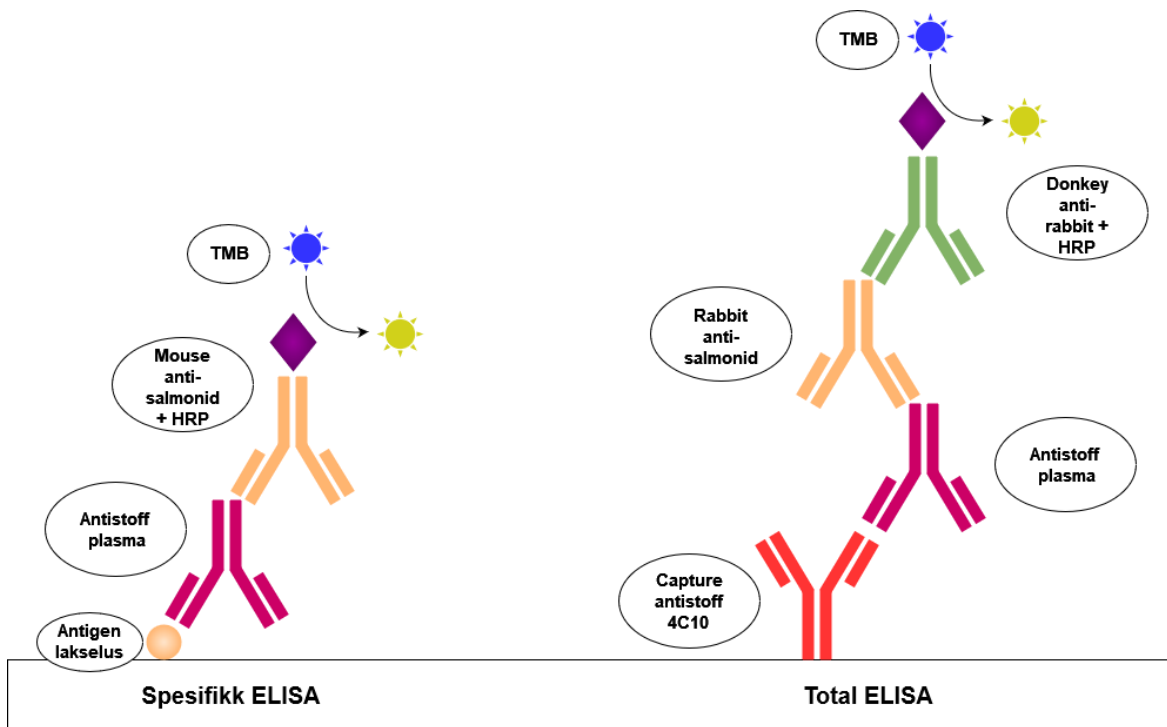


Figur 3: Oversikt over de vanligste variantene av ELISA. Direkte ELISA benytter et enzymkonjugert primærantistoff som binder direkte til antigenet. Indirekte ELISA bruker et enzymkonjugert sekundærantistoff med affinitet til primærantistoffet. Sandwich ELISA benytter to antistoffer med affinitet til to ulike epitoper på antigenet. Ved konkurrerende ELISA konkurrerer tilsatt enzymkonjugert antistoff med tilsvarende antistoff fra prøven, slik at forventet fargeutslag blir svakere ved positiv prøve.

Spesifikk og total ELISA

For å måle den humorale immunresponsen hos laksen, kvantifiseres både den totale mengden antistoffer i serumet og andelen spesifikke antistoff mot lakselus, gjennom to separate ELISA-protokoller. For totalt antistoff benyttes en sandwich assay som kvantifiserer den totale mengden antistoff, mens for å måle den lakselus-spesifikke andelen antistoff ble det benyttet et indirekte assay (figur 4). Ved et tidligere vaksineforsøk mot Salmonid alphavirus ble det dokumentert både generell og spesifikk antistoffrespons (Bakke, 2021). Teoretisk sett kan en generell økning i uspesifikk immunaktivitet føre til en tilsynelatende økning i spesifikk humoral aktivitet. For å utelukke dette scenarioet, måles begge verdiene og resultatene sammenliknes.

Da det foretas målinger ved ulike tidspunkter etter infestasjon, vil resultatene forhåpentligvis bidra til økt innsikt i hvordan immunresponsen varierer mellom de ulike vaksine- og kontrollgruppene, samt hvordan immunresponsen utvikler seg over tid.



Figur 4: Oversikt over komponentene som benyttes i henholdsvis den spesifikke og den totale ELISA-protokollen.

Formål

Hensikten med studien var å karakterisere systemiske immunresponser etter vaksinasjon mot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) hos atlantisk laks.

Det spesifikke målet for oppgaven var å sammenligne antistoffresponser (IgM-nivå i plasma) hos atlantisk laks etter vaksinasjon med hel-lus antigener med antall lus hos fisken etter påfølgende eksperimentell smitte med infektive copepoditter.

Det var i utgangspunktet planlagt å karakterisere lokale (hud), medfødte immunresponser etter vaksinasjon ved hjelp av PCR-metoder, men dette ble sløyet grunnet tidsaspekt samt arbeidsmengde.

Materiale og metoder

Fiskemateriale

I forsøket ble det brukt atlantisk laks (*Salmo salar* L.) med en gjennomsnittlig vekt på 60 gram ved start. Den 07.06.22 ble fisken merket med Pit Tag og vaksinert. Fisken ble inndelt i 8 grupper med ulike vaksineadministrering og dose (se tabell 1). Det var 60 fisk i hver gruppe, og alle ble injisert med 0,1 ml vaksine. Vaksinen ble gitt intraperitonealt, subkutan eller som en kombinasjon disse. I tillegg til ulike vaksinasjonsmetoder testet man ulike konsentrasjoner av vaksinen. Gruppe 1-3 fikk en vaksinedose på 2 µg/g levende vekt, mens gruppe 4-6 fikk en vaksinedose på 0,2 µg/g levende vekt. Fisk som ble gitt både intraperitoneal og subkutan injeksjon fikk samme dose ved hvert innstikkssted. Eksempelvis fikk fisk i gruppe tre 2 µg/g intraperitonealt og 2 µg/g subkutan. Det var også to kontrollgrupper som kun ble injisert med PBS. Den ene kontrollgruppen fikk PBS intraperitonealt, mens den andre kontrollgruppen fikk subkutan injeksjon.

Fiskegruppe	Vaksinemetode	Forkortelse
Gruppe 1	Vaksine gitt intraperitonealt. Dose på 2 µg.	IP 2 µg
Gruppe 2	Vaksine gitt subkutant. Dose på 2 µg.	SC 2 µg
Gruppe 3	Vaksine gitt intraperitonealt og subkutant / i huden. Dose på 2 µg.	IP&SC 2 µg
Gruppe 4	Vaksine gitt intraperitonealt. Dose på 0,2 µg.	IP 0,2 µg
Gruppe 5	Vaksine gitt subkutant. Dose på 0,2 µg.	SC 0,2 µg
Gruppe 6	Vaksine gitt intraperitonealt og subkutant. Dose på 0,2 µg.	IP&SC 0,2 µg
Gruppe 7	Kontrollgruppe. Kun gitt PBS* intraperitonealt.	PBS-IP
Gruppe 8	Kontrollgruppe. Kun gitt PBS* subkutant.	PBS-SC

Tabell 1: Tabellen viser en oversikt over gruppene, hvordan vaksinen ble administrert samt i hvilken dose. * = fosfatbufret saltvann.

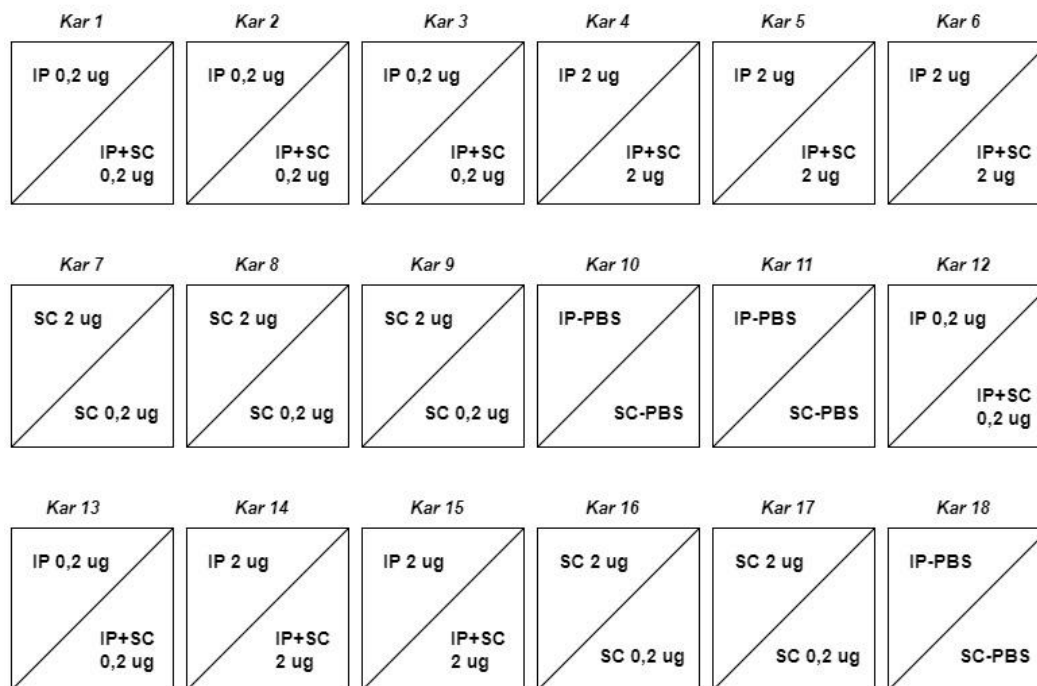
Vaksinen består av ulike livsstadier av lakselus som er homogenisert og frysetørket hver for seg. Dette inkluderer chalimus, preadult, adulte og eggstrenger. Vaksinen har en vann-i-olje-formulering, med en adjuvans som ifølge produsenten skal gi langvarig immunrespons.

Adjuvanset er en non-mineralolje kalt ISA 763 fra produsenten Seppic (Seppic, u.å.).

Den 06.07.22, omtrent en måned etter merking og vaksinerings, ble fisken flyttet fra NMBU til Solbergstrand. Etter flyttingen ble fisken akklimatisert over en periode på 7-10 dager. En begynte med en konsentrasjon på 9 ‰ sjøvann og oppjusterte gradvis til 32 ‰ sjøvann. Fisk ble overvåket daglig og dødfisk ble fjernet. Tilhørende kar ble vedlikeholdt og miljøparametere ble overvåket hver dag. Unormal eller uforventet oppførsel, tap av appetitt eller unormalt økt dødelighet ble registrert.

Den 19.07.22 ble fiskegruppene blandet sammen, for så å smittes med infektive copepoditter. Gruppene som ble blandet var henholdsvis: gruppe 1 og 3, gruppe 2 og 5, gruppe 4 og 6 samt gruppe 7 og 8. Se figur 5 for oversikt over oppsettet. Copepodittene ble levert kjølt på is fra

ILAB Bergen. Smittedosen var på omkring 20 copepoditter per fisk. Fisken ble eksponert for copepodittene i 30 minutter under lufting av vannet, før vannflow ble tilbakestillt til normalverdi (1,2-2,2 l/kg/min) etter smitten/challenge.



Figur 5: Oversikt over karene etter blanding av fiskegruppene før smitteintroduksjon.

Det ble tatt blodprøver i forbindelse med smitteeksponeringen (dette tidspunktet refereres senere til som nullpunkt). Videre ble det tatt blodprøver og telt lus ved 48 timer, 1 uke, 2 uker og 4 uker etter smitte/nullpunkt. Analysedata i form av lusetall og plasmaprøver stammer altså fra disse tidspunktene. Ved prøvetaking og lusetelling ble fisken flyttet fra karet og over i en tank med benzocain (10 ml/100L). Lusetelling foregikk ved at alle stadier som befant seg på fisken ble registrert. Blodprøvene ble tatt med vacutainer, på glass tilsatt heparin. Kort tid etter uttak ble prøven sentrifugert i 15 min ved 3500 rpm, deretter ble plasma aspirert og overført til 2 ml Eppendorf-rør og lagret ved -80°C frem til bruk.

ELISA

For å analysere plasmaprøvene ble det benyttet både spesifikk- og total-ELISA. Før prøvene ble analysert optimaliserte vi protokollene med hensyn til antistoff-fortynninger og TMB-inkuberingstider.

ELISA-analysene ble utført på 96-brønns ELISA-plater (NUN-96ft nundon 96 flat transparent). Hver plate inkluderte 2-5 individuelle prøver fra hver fiskegruppe, slik at alle gruppene ble representert ved hver analyse. Alle plater hadde i tillegg fire blanke brønner, to positive og to negative kontroller. Figur 6 viser eksempler på benyttede plateoppsett. Brønner betegnet som blank gjennomgikk identisk prosedyre, men ble tilsatt fortynningsbuffer fremfor plasmaprøve. Positiv kontroll inneholdt plasma fra fisk vaksinert mot lakselus som i tillegg var kjent å ha utviklet antistoffrespons. Negativ kontroll inneholdt plasma fra naiv fisk som verken var vaksinert mot eller smittet med lakselus.

Totalt ble det analysert 311 plasmaprøver, fordelt på 10 plater for både spesifikk- og total-ELISA.

Plate 3 (48 t pi)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	72	72	81	81	156	156	165	165	Blank			
B	73	73	82	82	157	157	166	166	Blank			
C	74	74	83	83	158	158	167	167	Blank			
D	75	75	84	84	159	159	168	168	Blank			
E	240	240	249	249	13	13	19	19				
F	241	241	250	250	14	14	20	20				
G	242	242	251	251	15	15	21	21				
H	243	243	252	252	pos	pos	neg	neg				

Gruppe 1 - IP 2 u _g	Gruppe 2 - SC 2 u _g	Gruppe 3 - IP&SC 2 u _g	Gruppe 4 - IP 0,2 u _g	Gruppe 5 - SC 0,2 u _g	Gruppe 6 - IP&SC 0,2 u _g	Gruppe 7 - kontroll	Gruppe 8 - kontroll
-----------------------------------	-----------------------------------	---	-------------------------------------	--	---	------------------------	------------------------

Figur 6: Eksempel på plateoppsett til ELISA-kjøring for plasmaprøver tatt 48 timer etter copepoditt-smitte. Alle gruppene er representert på platen, i tillegg til fire blanke brønner, to positive kontroller og to negative kontroller.

Spesifikk ELISA

Alle reagenser ble klargjort på forhånd slik at de var klare til bruk. Informasjon om de enkelte reagenser er oppgitt i tabell 2.

Coating buffer (500 ml)	Bikarbonatbuffer: 0,795 g Na ₂ CO ₃ + 1,465 g NaHCO ₃ + 500 ml destillert vann. pH-justering er ikke nødvendig, og bufferen er stabil i minst 2 uker ved 4 grader celsius.
10 X Phosphate buffered saline (PBS)	1,6 g NaH ₂ PO ₄ X H ₂ O 9,8 g HPO ₄ X 2H ₂ O 81 g NaCl Destillert vann tilsettes til et totalt volum på 1 L.
Washing buffer (PBS/T)	100 ml 10X PBS 900 ml destillert vann 0,5 ml Tween 20 (0,05%)
Blocking buffer / blokkeringsbuffer (5% fat free dry milk in PBS/T)	2,5 g fat free dry milk 50 ml PBS/T
Diluent buffer / fortynningsbuffer (1% fat free dry milk in PBS/T)	0,5 g fat free dry milk 50 ml PBS/T
Substrat solution / substratløsning	TMB
Stop solution / stoppløsning	1 M HCl

Tabell 2: Oversikt over ulike reagenser og hva de inneholder.

Gjennomføring av ELISA-protokoll tar tre døgn. Prosessen kan inndeles i fem hovedtrinn: coating, blokkering, plasmatilsetting, deteksjon og avlesning. Vedlagt følger benyttet protokoll, kalt «Spesifikk ELISA protokoll».

Vi benyttet ikke alle brønnene på platene, og lagde derfor et begrenset overskudd av reagenser for videre å unngå overforbruk av prøvemateriale. Det er likevel nødvendig å beregne litt ekstra ettersom noe svinn må påregnes, eksempelvis ved bytting av pipettespisser.

For coating lagde vi coating-buffer i henhold til opplysningene i tabell 2. Deretter ble luseantigen tilsatt bufferen i et forhold på 1:1000. 100 µl av denne fortynningen tilsettes i hver av de aktuelle brønnene. Vi coater ytterligere 4-8 ekstra brønner som reserve i tilfelle eventuelle feil skulle oppstå ved plasmatilsetting. Platen inkuberes så over natten i kjøleskap som holder 4 grader celsius.

Neste trinn i protokollen er blokkering. Før selve blokkeringen vaskes platen ved hjelp av en Biochrom Asys Atlantis Microplate Washer, som vasker i tre sykluser med 250 µl vaskebuffer. Etter vask slås resterende vaskebuffer ut ved å banke platen mot en hard flate. Videre tilsettes 250 µl blokkeringsbuffer til brønnene og platen inkuberes deretter i to timer ved romtemperatur.

Det er flere runder med vask av platen i en ELISA-protokoll, og hver vask utføres av samme maskin ved likt vaskeprogram. En testplate brukes før hver vask for å kontrollere at maskinen vasker likt i de ulike brønnene.

Etter inkubasjonsperioden på to timer, utføres ELISA-vask på ny før 100 µl fortynnete plasmaprøver tilsettes i henhold til det aktuelle plateoppsettet. Plasmaprøvene må tines fra fryselagret tilstand, vortexes og spennes ned. Plasma blandes med fortynningsbuffer i forholdet 1:200, og overføres til brønnene. Tilsvarende fremgangsmåte benyttes også for positiv og negativ kontroll. De blanke brønnene tilsettes kun fortynningsbuffer. Platen inkuberes deretter i kjøleskap over natten.

Ved dag tre utføres deteksjon og avlesning. Platene vaskes før 100 µl mouse-antisalmonid-HRP (blandet med fortynningsbuffer i forholdet 1:1000) tilsettes de aktuelle brønnene.

Deretter inkuberes platene i 1 time ved romtemperatur.

Etter inkubering gjenstår avlesning av platene. Platene vaskes igjen før 75 µl temperert TMB-substratløsning tilsettes til de enkelte brønnene. Platene inkuberes så i 20 minutter under mørke forhold ved romtemperatur. Etter inkubering tilsettes 50 µl HCl i hver brønn. Deretter avleses platene ved hjelp av spektrofotometri, med en absorbans på 450 nm.

Avlesningsinstrumentet som ble brukt, er en mikroplate-avleser produsert av Tecan Spark®.

Fortynningsrekke spesifikk ELISA

For å optimalisere protokollen lagde vi en fortynningsrekke av plasmaprøver og hel-lus-antigen med det formål å undersøke hvilken plasmafortynning som var best egnet for avlesning av resultater. Hel-lus-antigen ble fortynnet i forholdene 1:200, 1:400, 1:800 og 1:1000, og tilsvarende fortynninger ble laget for plasmaprøvene. Totalt ble fire typer plasma undersøkt i fortynningsrekken - IP-plasma, SC-plasma, IP-kontrollplasma og SC-kontrollplasma.

For å unngå påvirkning av eventuelle avvikende verdier fra enkeltindivider, ble plasma fra tre ulike individer fra samme gruppe blandet. Plasma fra kontrollgruppen stammet fra fisk kun vaksinert med PBS. Plasmaprøvene ble tatt ut 4 uker etter smitte med copepoditter. Vi analyserte to plater - én med IP-plasma og IP-kontrollplasma, og en annen med SC-plasma og SC-kontrollplasma.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Antistoff									
	Fortynn		1:200	1:200	1:400	1:400	1:800	1:800	1:1000	1:1000		
Antigen	1:200	A									Blank	Blank
	1:400	B									Pos	Pos
	1:800	C									Neg	Neg
	1:1000	D										
	1:200	E										
	1:400	F										
	1:800	G										
	1:1000	H										

IP/SC	
Kontroll	

Figur 7: Plateoppsett - fortynningsrekke spesifikk ELISA

Fortynningsrekken ble gjennomført i henhold til ELISA-protokollen, foruten antigen- og plasmafortynningene. Det ble brukt fortynningsrekker både ved coating (antigen) og ved tilsetning av plasmaprøver (antistoff), i tråd med oppsettet som vises i figur 7.

Inkuberingstid med TMB ble fastsatt ved å undersøke ulike fortynninger av både antigen og antistoff, med varierende virketid for TMB. Antigenfortynninger ble testet i forholdene 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000, 1:2000 og 1:4000, hvor det ble fastslått at 1:1000 var den mest optimale fortynningen for protokollen. Antistofffortynninger ble testet i forholdene 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 og 1:1000, hvor 1:200 gav best resultat. Deretter ble fortynningene undersøkt med ulike inkubasjonstider for TMB. Vi testet optimal inkubasjonstid for å sikre at lave antistoffverdier ville bli tilstrekkelig farget og derved registrert, samt for å unngå at høye antistoffverdier mettete TMB-løsningen fullstendig. Standard inkubasjonstid er angitt å være 5 minutter, men på grunn av svakt fargeutslag testet vi inkubasjonstider på 10, 20 og 30 minutter. Dette ble gjort ved å lese av samme plate ved de ulike tidspunktene uten tilsetning av HCl. Absorbansen ble deretter målt ved 370nm.

Total ELISA

Reagensene ble klargjort på tilsvarende måte som for spesifikk ELISA, og detaljert informasjon er oppgitt i tabell 2. Prosedyren for total ELISA skiller seg fra spesifikk ELISA ved at man benytter 4C10 for coating, samt at det tilsettes et sekundært deteksjonsantistoff. En oversikt over prosedyren er vedlagt («Total ELISA protokoll»).

Platene vaskes på samme måte som for spesifikk ELISA, ved hjelp av en Biochrom Asys Atlantis Microplate Washer som vasker i tre sykluser med 250 µl vaskebuffer. En testplate brukes før hver vask for å kontrollere at maskinen vasker likt i de ulike brønnene. Etter vask slås resterende vaskebuffer ut ved å banke platen mot en hard flate.

Protokollen kan inndeles i fem trinn og tar totalt tre dager å gjennomføre. Det første trinnet er coating, hvor aktuelle brønner tilsettes 100 µl 4C10 fortynnet med coatingbuffer i forholdet 1:200. Deretter inkuberes platene over natten i kjøleskap ved 4°C.

Dagen etter utføres trinn to, som er blokkering. Først vaskes platene før det så tilsettes 250 µl blokkeringsbuffer i hver brønn. Deretter inkuberes platene i 2 timer ved romtemperatur.

Trinn tre innebærer vasking og tilsetting av plasmaprøver. Etter inkuberingen vaskes platene før 100 µl fortynnet plasma tilsettes. Plasmaprøvene må tines fra fryselagret tilstand, vortexes og spennes ned. Plasma blandes med fortynningsbuffer i forholdet 1:200, og overføres til brønnene. Tilsvarende fremgangsmåte benyttes også for positiv og negativ kontroll. De blanke brønnene tilsettes kun fortynningsbuffer. Platen inkuberes deretter i kjøleskap over natten.

Ved dag 3 utføres trinn 4 og 5 i protokollen, som består av tilsetting av deteksjonsantistoff og avlesning av resultatene. Platen vaskes, og deretter tilsettes deteksjonsantistoff i form av 100 µl rabbit anti-salmonid Ig, fortynnet til 1:2000 i fortynningsbuffer. Platen inkuberes så i 1 time ved romtemperatur. Platen vaskes igjen før det tilsettes sekundært deteksjonsantistoff i form av 100 µl anti-rabbit HRP fortynnet 1:2000 i fortynningsbuffer. Videre inkuberes platene i 1 time ved romtemperatur.

Før avlesning vaskes platene og tilsettes deteksjonsløsning i form av 75 µl temperert TMB-substratløsning. Inkuberingen foregår i totalt mørke ved romtemperatur over en periode på 10 minutter. Deretter tilsettes 50 µl HCl-stoppløsning til hver brønn. Avslutningsvis avleses resultatene av en Tecan Spark® mikroplate-avleser med en absorbans satt til 450 nm.

Fortynningsrekke total-ELISA

I forkant av gjennomføring av total ELISA-protokoll lagde vi en fortynningsrekke for plasmaprøvene og undersøkte optimal eksponeringstid for TMB. Et tilfeldig utvalg av plasmaprøver ble benyttet og fortynnet til 1:100, 1:200, 1:400 og 1:800. TMB-inkubasjonstid ble målt ved 5, 10, 15 og 20 minutter ved hjelp av ELISA-spektrofotometri.

Fortynning #1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1:100		1:200		1:400		1:800			
A	126									pos	pos
B	135									neg	neg
C	210									blank	blank
D	219									blank	blank
E	294										
F	303										
G	49										
H	54										

Fortynning #2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1:100		1:200		1:400		1:800			
A	76									pos	pos
B	85									neg	neg
C	160									blank	blank
D	169									blank	blank
E	244										
F	253										
G	16										
H	22										

Figur 8: Plateoppsett ved fortynningsrekke total ELISA. Det ble testet fire ulike fortynninger av 16 ulike plasmaprøver. Positiv og negativ kontroll samt blank er med på alle platene.

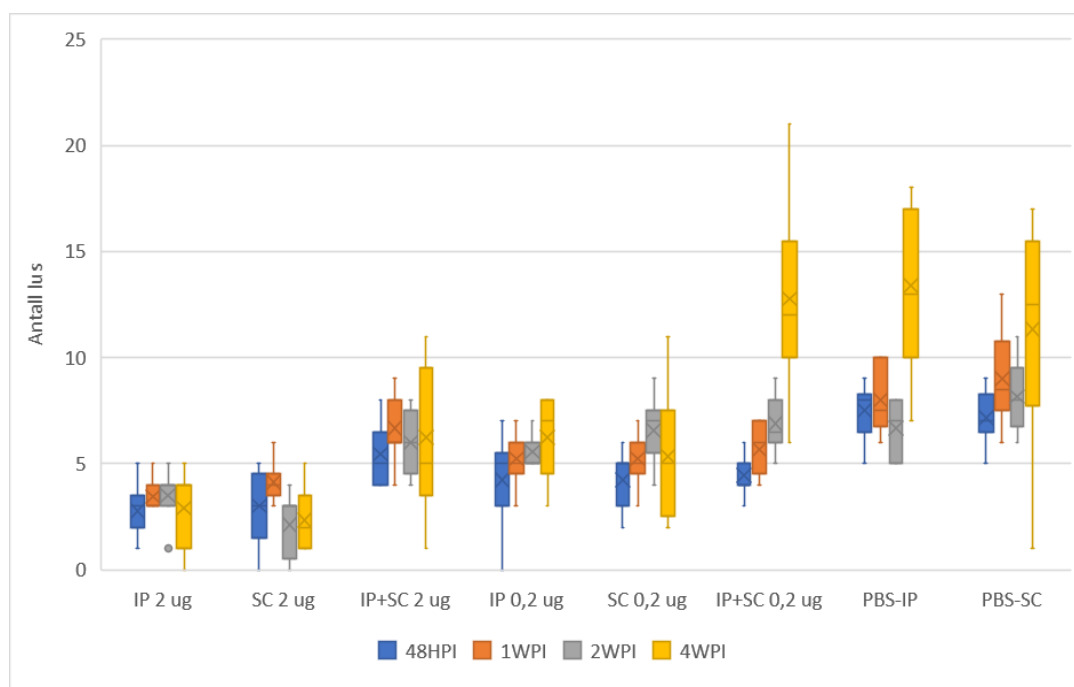
Fortynningsrekker ble etablert i henhold til figur 8. Etter tilsetning av TMB-substratløsning ble platene inkubert under mørke forhold, med avlesning hvert femte minutt ved en absorbans på 370nm. Etter 20 minutters inkubering ble det tilsatt HCl-stoppløsning og avlesning ble deretter utført ved en absorbans på 450 nm.

Resultater

Lusetall

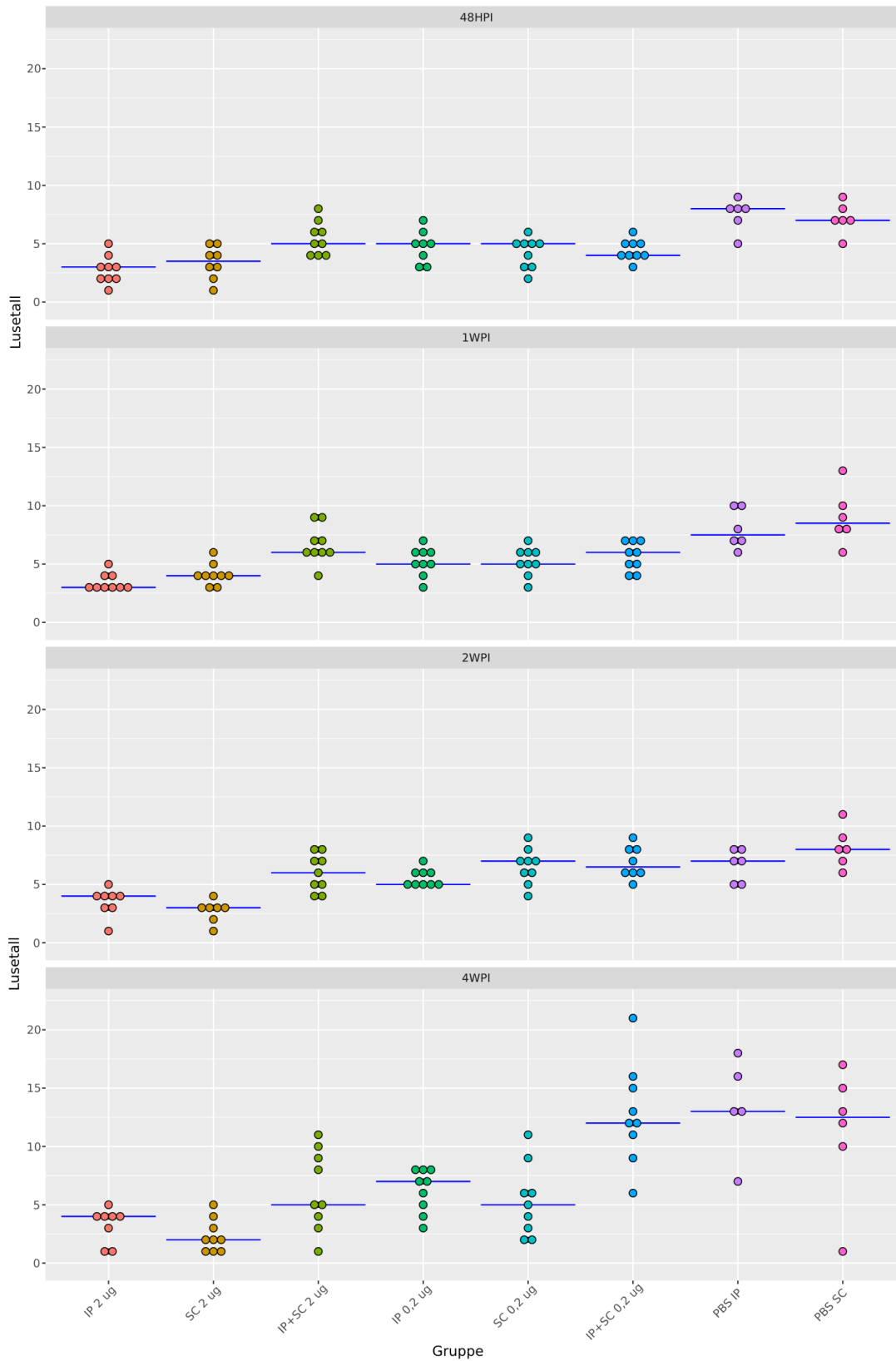
For å få en god oversikt over lusetallene har vi valgt å presentere resultatene i et boxplot (figur 9). Vi har da tatt hensyn til vaksinasjonsgrupper og tidspunkt for lusetelling.

Diagrammet viser at vaksinasjonsgruppene IP 2 μ g og SC 2 μ g har lavere lusepåslag enn øvrige vaksinasjonsgrupper og kontrollgrupper. I tillegg er lusetallet hos disse to gruppene mer stabilt over tid. Ved fire uker etter smitteintroduksjon observeres en økning i lusetall hos IP&SC 0,2 μ g og de to kontrollgruppene.



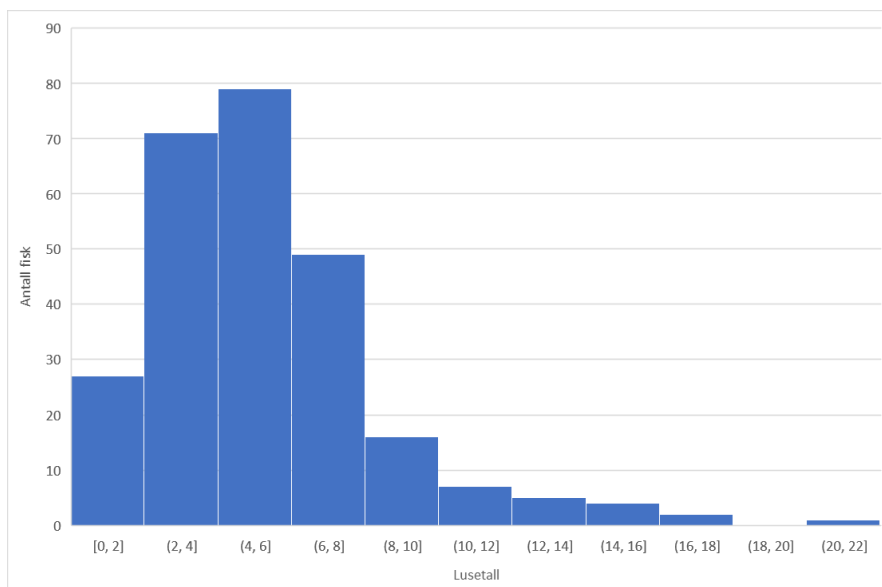
Figur 9: Lusetall er her illustrert ved et box-plot. Antall lus er representert ved y-aksen, mens x-aksen viser de ulike vaksinasjonsgruppene. Tidspunktet for lusetelling etter smitteeksponering er illustrert med ulike farger på boksene. Selve boksen avgrensner 25- og 75-prosentilen, altså 50% av observasjonene fra medianen. Medianen er markert i boksen som en strek, mens gjennomsnitt angis ved et kryss. Strekene på hver side av boksen viser variasjonen (whiskers), mens prikkene er uteliggere.

Lusetall er også lagt inn i et column scatter plot (figur 10), noe som tydeliggjør individuelle verdier og i tillegg gjør det lettere å sammenligne vaksinasjonsgruppene ved de ulike tidspunktene. Antall lus i vaksinasjonsgruppene er lavere enn i kontrollgruppene ved 48HPI, og det er minst forskjell mellom vaksinerte og kontroller på dag 14 etter smitte. Gruppene gitt 2 µg IP eller SC er gjennomgående lavere enn de andre gruppene og kontrollene.



Figur 10: Viser lusetall hos enkeltindivider. Det er ett diagram for hvert tidspunkt ved lusetelling, fra 48 timer til 4 uker etter smitteeksponering. Alle gruppene er representert ved x-aksen og antall lus ved y-aksen. Hver prikk representerer ett individ, og den blå streken er medianen.

Histogrammet i figur 11 viser fordelingen av lusetall. Verdiene følger ikke en normalfordeling. Delvis på bakgrunn av variasjon i naturlig motstandsdyktighet, men også fordi vår studiepopulasjon består av individer der et større antall individer er vaksinert.



Figur 11: Viser fordeling av lusetall. X-aksen viser antall lus, mens y-aksen viser antall fisk representert ved det aktuelle intervallet.

For å undersøke hvorvidt forskjellene i lusetall var signifikante, ble resultatene analysert ved hjelp av poisson regresjonsanalyse etter anbefaling fra veileder. Dette ble gjort i statistikkprogrammet SPSS. IP 2 μ g, IP&SC 2 μ g og IP 0,2 μ g har signifikant lavere lusetall ($p < 0,001$) sammenlignet med IP-kontrollgruppen ved 4 uker (tabell 3). Dersom man ikke tar med tid (t) som en forklaringsvariabel (avhengig variabel), er det signifikant forskjell mellom de vaksinerte gruppene og kontrollgruppene med p-verdi $< 0,001$. Unntaket er IP&SC 0,2 μ g, som registreres med ikke-signifikante p-verdier på henholdsvis 0,632 og 0,053

Referansegruppe	Sammenligningsgruppe	Sig. Kun 4WPI / alle tidspunkt samlet
PBS-IP	IP 2,0 µg	<0,001
	IP 0,2 µg	<0,001
	IP&SC 2,0 µg	<0,001
	IP&SC 0,2 µg	0,632 / 0,053
PBS-SC	SC 2,0 µg	<0,001
	SC 0,2 µg	0,003 / <0,001
	IP&SC 2,0 µg	0,012 / 0,001
	IP&SC 0,2 µg	0,582 / 0,025

Tabell 3: Signifikanstesting ved bruk av poisson-regresjon i SPSS. Kontrollgruppene blir sammenlignet med tilhørende vaksinegrupper. Signifikansnivået er undersøkt for resultater ved 4WPI og for resultater uten å ta hensyn til tid.

For vaksinasjonsgruppene som fikk subkutan injeksjon, er det signifikant forskjell for SC 2 µg, IP&SC 2 µg og SC 0,2 µg sammenlignet med PBS-SC kontrollgruppen (p-verdier på henholdsvis < 0,001, 0,012 og 0,003) ved 4 uker etter smitteintroduksjon (tabell 3). Dersom man ikke tar med tid (t) som en forklaringsvariabel (avhengig variabel), er det signifikant forskjell mellom de vaksinerte gruppene og kontrollgruppene med p-verdi <0,001. Det er i tillegg signifikant forskjell mellom IP&SC 0,2 µg og kontrollgruppen, med en p-verdi på 0,025.

Vaksinasjonsgrupper med samme administrasjonsvei ble sammenlignet for å undersøke effekten av endring i dosen (tabell 4). For vaksinegruppen som fikk 2 µg enten intraperitonealt eller subkuttant registreres det en signifikant endring i lusetall fra tilsvarende vaksinegrupper som mottok en lavere dose (p<0,001). For IP&SC 2,0 sammenlignet med IP&SC 0,2 er signifikansverdien nær valgt grenseverdi for signifikans (p=0,05). Resultatene kan antyde en

dose-respons-sammenheng, men dette er ikke entydig da det ikke måles en signifikant forskjell mellom IP&SC 2,0 og vaksinasjonsgruppene IP 0,2 og SC 0,2.

Referansegruppe	Sammenligningsgruppe	Sig.
IP 2,0 µg	IP 0,2 µg	<0,001
SC 2,0 µg	SC 0,2 µg	<0,001
IP&SC 2,0 µg	IP&SC 0,2 µg	0,055
	IP 0,2 µg	0,167
	SC 0,2 µg	0,304

Tabell 4: Signifikanttesting med poisson regresjonsanalyse i SPSS. Det ikke tatt hensyn til blodprøvetidspunkt. Her testes vaksinasjonsgrupper med lik administrasjonsvei, men ulik dose.

Det er ikke signifikante forskjeller når det kommer til administrasjonsmåte, når man sammenligner intraperitoneal og subkutan injeksjon ved de samme dosene (tabell 5). Det er derimot signifikante forskjeller mellom gruppene, hvis man sammenligner de som både har fått subkutan og intraperitoneal injeksjon mot de som kun har fått ett sted.

Referansegruppe	Sammenligningsgruppe	Sig.
IP 2,0 µg	SC 2,0 µg	0,682
IP 0,2 µg	SC 0,2 µg	0,723
IP&SC 2 µg	IP 2 µg	<0,001
	SC 2 µg	<0,001
IP&SC 0,2 µg	IP 0,2 µg	<0,001
	SC 0,2 µg	0,003

Tabell 5: Signifikanttesting med poisson regresjon i SPSS. Det ikke tatt hensyn til blodprøvetidspunkt. Her sammenlignes det om det er signifikante forskjeller mellom administrasjonsmetode.

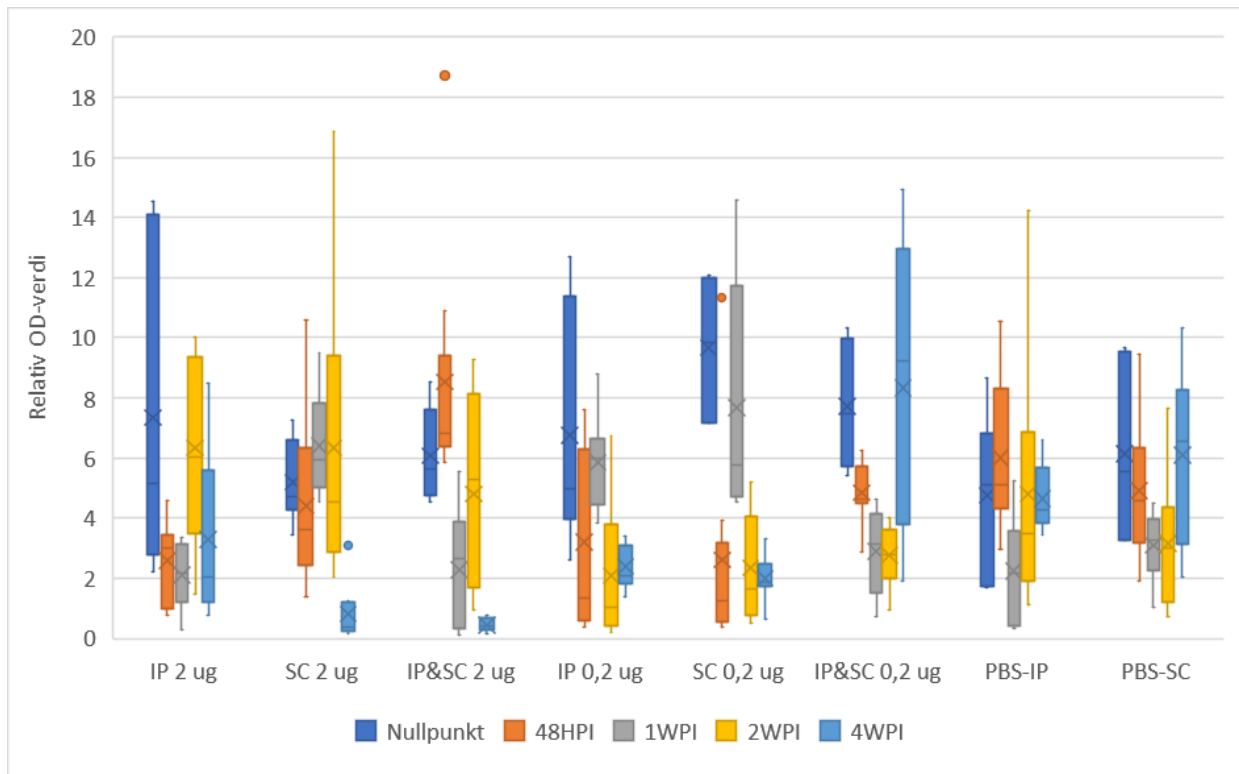
Nivå av lusespesifikke antistoffer

Vi har valgt å bruke relativ OD-verdi for å illustrere grad av antistoffrespons. OD-verdien beregnes ved å først korrigere for bakgrunnsstøy før antistoffverdiene deretter normaliseres. Bakgrunnsstøy elimineres ved å subtrahere blank verdi fra alle parprøvene. Videre normaliseres prøvene ved å dividere parprøvene med negativ kontroll fra samme plate.

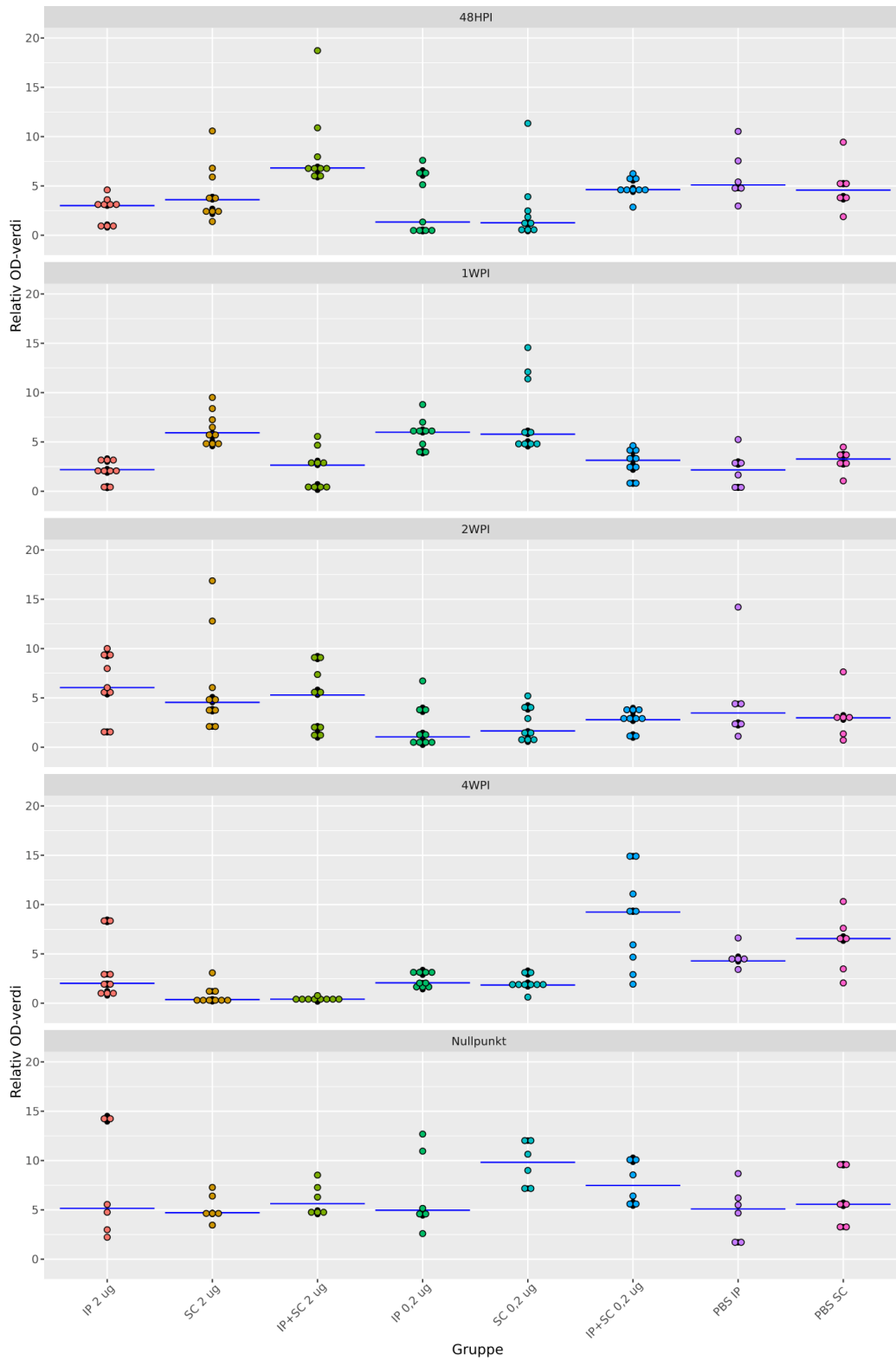
For å danne en god oversikt over den spesifikke antistoffresponsen mot luseantigen, har vi valgt å presentere resultatene ved hjelp av box-plot (figur 12) og column scatter plot (figur 13). Box-plot tar hensyn til de ulike vaksinasjonsgruppene og tidspunkt for blodprøvetaking. Det fremkommer ingen tydelig trend fra box-plottet, og det kan derfor se ut til at den spesifikke antistoffresponsen er mer eller mindre uavhengig av vaksinasjon.

Column scatter plot tar også hensyn til de ulike vaksinasjonsgruppene og tidspunkt for blodprøvetaking. Diagrammet tydeliggjør de individuelle OD-verdiene samt hvorvidt målingene er samlet eller spredt. Enkelte grupper har mer enhetlige resultater, men det er gjennomgående en del variasjon innad blant individer i samme gruppe. Flere grupper har én eller flere målinger som avviker en del fra medianen.

Tabell som viser gjennomsnitt og standardavvik for de ulike gruppene er lagt under vedlegg.

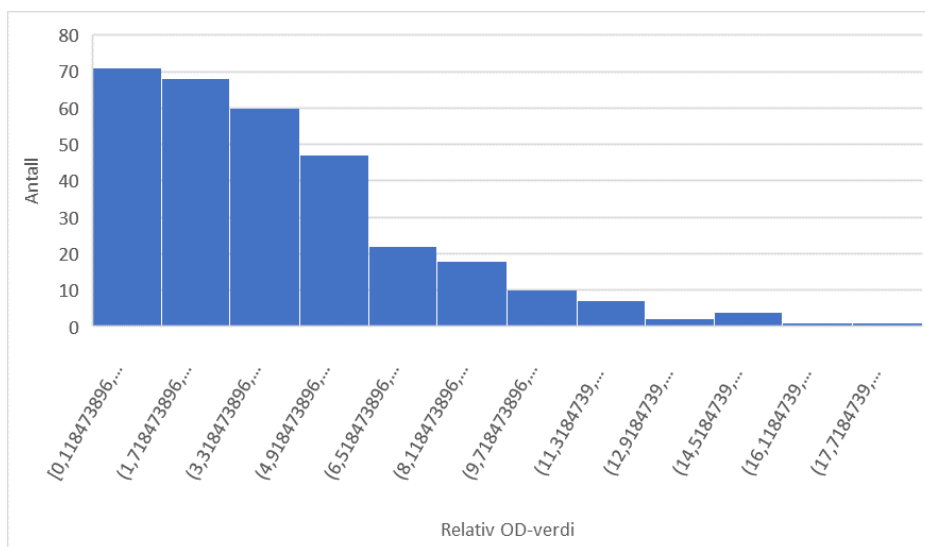


Figur 12: Viser relativ OD-verdi for spesifikke antistoffer målt med indirekte ELISA. Y-aksen viser relativ OD-verdi, mens x-aksen viser de ulike vaksinasjonsgruppene. Tidspunkt for blodprøvetaking etter smitteeksponering er illustrert ved ulike farger på boksene. Selve boksen avgrensner 25- og 75-prosentilen, altså 50% av observasjonene fra medianen. Medianen er markert i boksen som en strek, mens gjennomsnitt angis ved et kryss. Strekene på hver side av boksen viser variasjonen (whiskers), mens prikkene er uteliggere.



Figur 13: Viser relativ OD-verdi for spesifikk antistoffrespons. Resultatene fra de ulike tidspunktene for blodprøvetaking er representert ved hvert sitt diagram. Y-aksen viser relativ OD-verdi, mens x-aksen viser de ulike vaksinasjonsgruppene. Hver prikk representerer ett individ, mens medianen er illustrert med blå strek.

Histogrammet i figur 14 viser fordeling av relative OD-verdier for lusespesifikke antistoffer. Verdiene er ikke normalfordelt, men det var heller ikke forventet. Grafen har en asymmetrisk distribusjon med en høyresidig forskyvning.



Figur 14: Viser fordelingen av verdier for relativ OD for spesifikk antistoffrespons. X-aksen viser relativ OD-verdi, mens y-aksen viser antall prøver innen hvert intervall på x-aksen.

Etttersom distribusjonen av OD-verdier ikke følger en normalfordeling har vi valgt å benytte en Kruskal-Wallis test, kombinert med Dunn's post hoc test samt Bonferroni korreksjon. Gruppene er utregnet separat etter SC- og IP-inndeling med respektive kontroller. Grupper med både IP- og SC-injeksjon er inkludert i begge utregninger. Analysene er utført på nettsiden "Statistics kingdom" (u.å.).

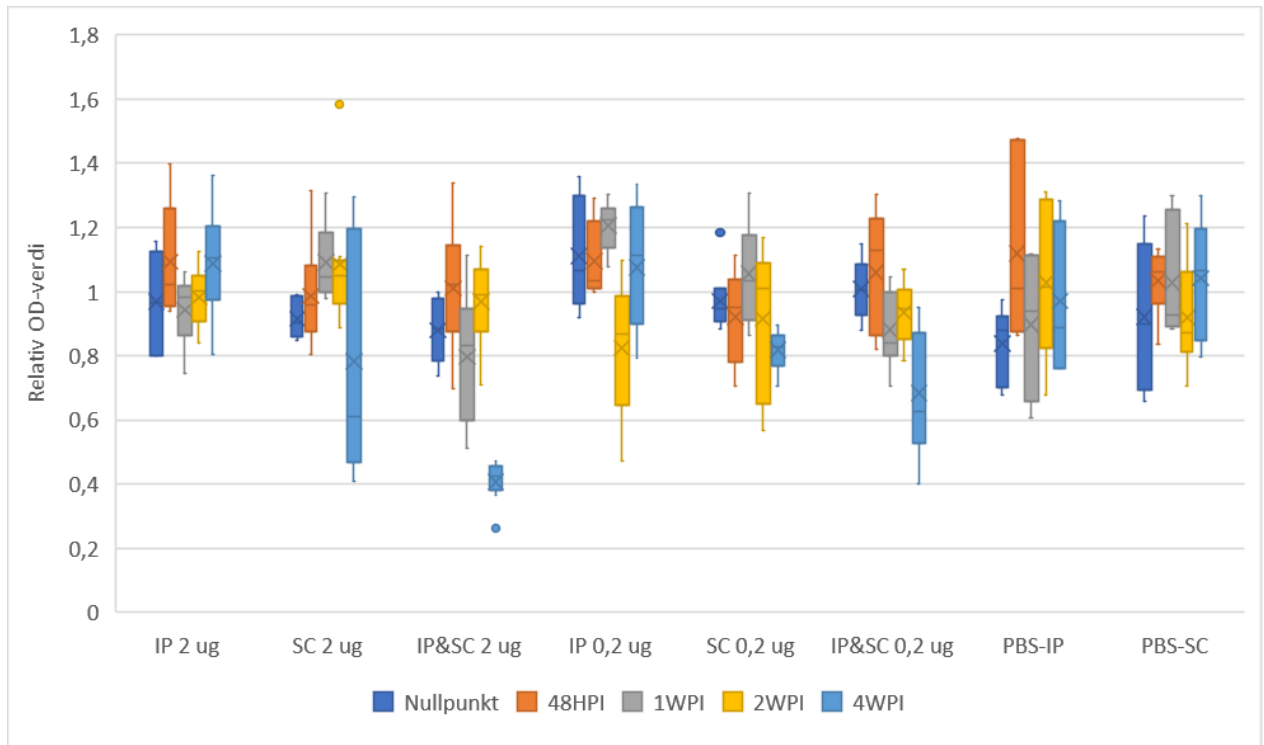
Ved å se på de ulike vaksinasjonsgruppene uten å ta hensyn til blodprøvetidspunktet, registreres ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Det er ingen signifikante forskjeller når vi sammenligner vaksinasjonsgruppene mot kontrollgruppene, men heller ingen signifikante forskjeller mellom vaksinasjonsgruppene.

Ved å kun se på tidspunkt for blodprøvetaking, og ikke de ulike vaksinasjonsgruppene, registreres det signifikante forskjeller mellom enkelte av tidspunktene ved Post-Hoc Dunn's test med en Bonferroni korrigeret alfa på 0,005. Relativ OD-verdi målt ved nullpunkt er signifikant høyere enn ved alle de andre tidspunktene, med samtlige p-verdier på <0,001. Det var også signifikant forskjell mellom resultatene ved 48HPI og 4WPI (p-verdi på 0,002), hvor 48HPI hadde signifikant høyere antistoffnivå enn 4WPI.

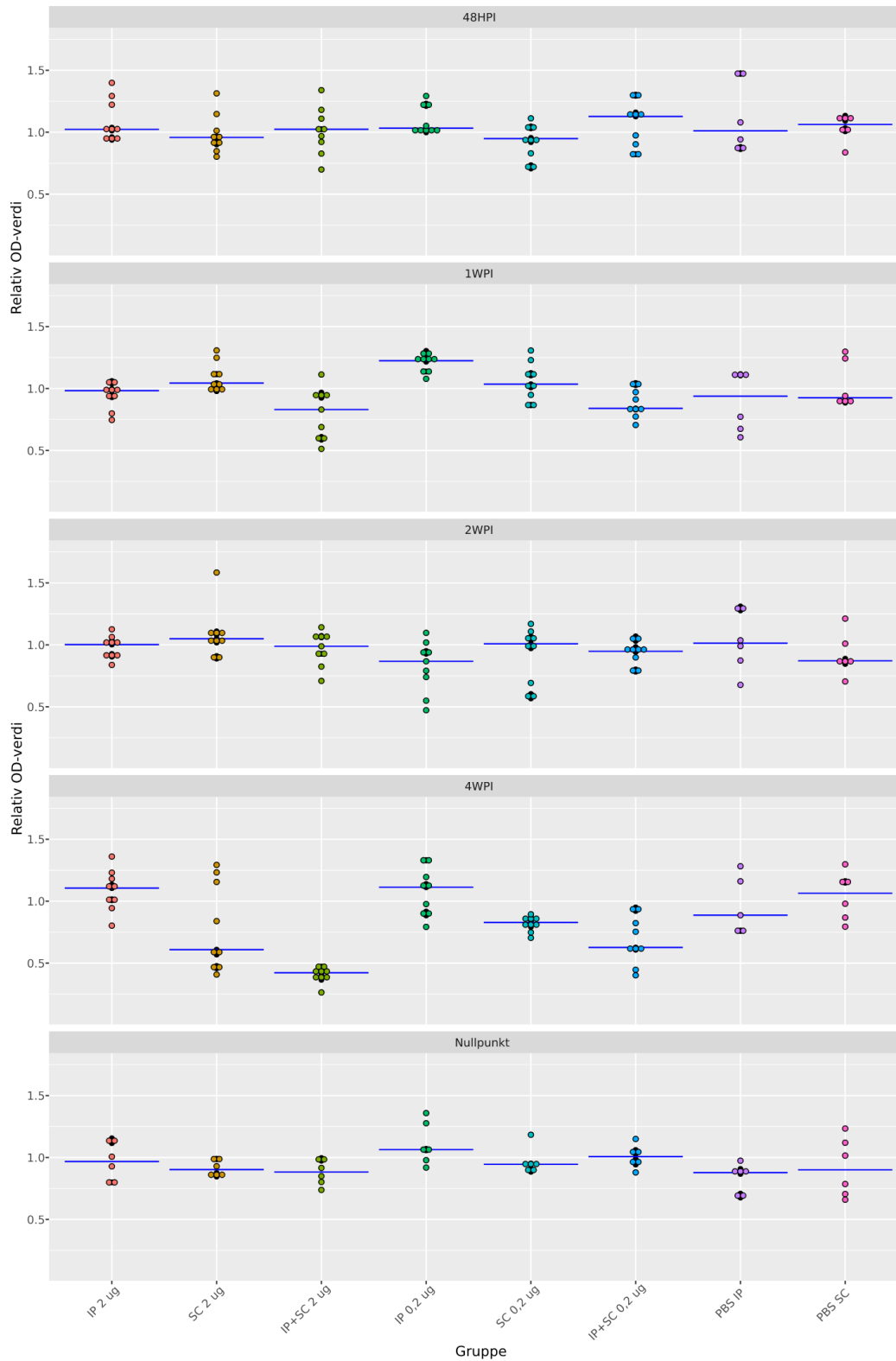
Ved 4WPI registrerer vi signifikante forskjeller mellom vaksinegruppene og kontrollgruppen. Testresultatene utført med Post-Hoc Dunn's test med en Bonferroni korrigeret alfa på 0,0018 viser signifikant forskjell mellom SC 2 µg og SC-kontrollgruppe (p-verdi < 0,001) samt mellom IP&SC 2 µg og begge kontrollgrupper (p-verdier < 0,001). Kontrollgruppene hadde signifikant høyere antistoffnivå, sammenlignet med SC 2 µg og IP&SC 2 µg. Det ble i tillegg registrert positive signifikante forskjeller mellom vaksinegruppe IP&SC 0,2 µg målt opp mot gruppene SC 2 µg og IP&SC 2 µg (p-verdier < 0,001).

Nivå av totale antistoffer

Registreringen av de totale antistoffnivåene er presentert nedenfor i boxplot (figur 15) og ved column scatter plot (figur 16). Sammenlignet med tilsvarende grafer for lusespesifikt antistoffnivå kan vi se at det ikke er like stor variasjon innad i gruppene, samt mellom gruppene. Ved 4 WPI registreres de største forskjellene mellom gruppene.

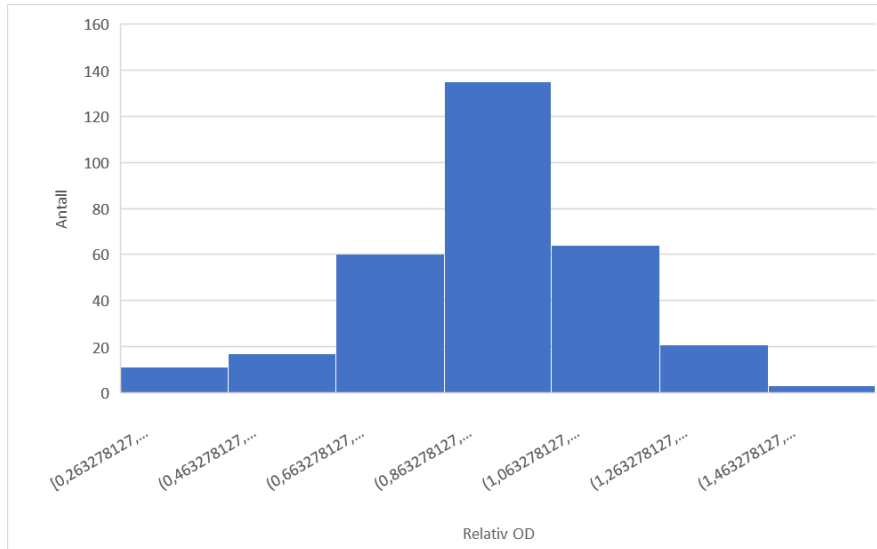


Figur 15: Viser relativ OD-verdi for totalt antistoffnivå målt ved sandwich ELISA. Y-aksen viser relativ OD-verdi, mens x-aksen viser de ulike vaksinasjonsgruppene. Tidspunkt for blodprøvetaking etter smitteeksponering er illustrert med ulike bokser i forskjellige farger.



Figur 16: Viser relative OD-verdier for totalt antistoffnivå. Hvert tidspunkt for blodprøvetaking er vist ved et eget diagram. Y-aksen viser relativ OD-verdi, mens x-aksen viser de ulike vaksinasjonsgruppene. Hvert individ er representert ved en prikk, og medianen er illustrert med blå strek.

Histogrammet i figur 17 viser en normalfordelt distribusjon av totale antistoffnivåer.

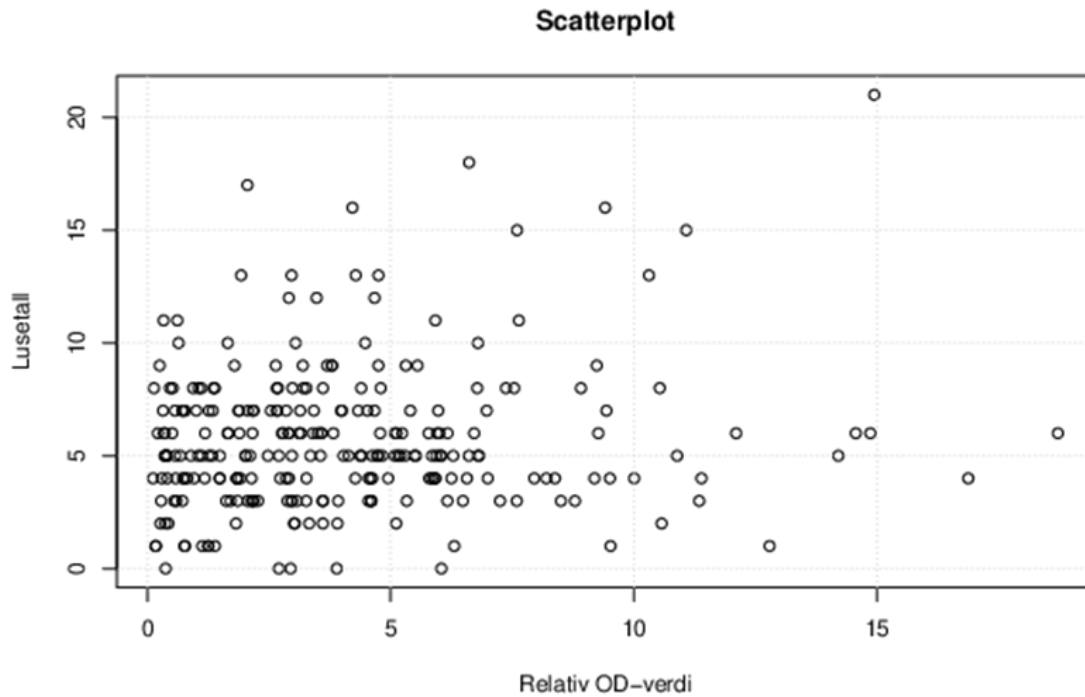


Figur 17: Viser fordelingen av relativ OD-verdi for totale antistoffer. X-aksen viser relativ OD, mens y-aksen viser antall prøver innen hvert intervall på x-aksen.

Sammenheng mellom antistoffnivå og lusetall

For å undersøke sammenhengen mellom lusetall og relativ OD-verdi for lusespesifikt antistoff, benyttet vi scatterplot og kendall rank correlation. Utregningene ble utført ved hjelp av statistikk-nettsiden wessa.net (Wessa, 2017).

Ved sammenligning av alt datamateriale, uten å ta hensyn til vaksinasjonsgruppe og måletidspunkt, får vi en kendall tau verdi på 0,05, og en tosidig p-verdi på 0,25. Det er dermed ikke mulig å påvise en sammenheng ved denne metoden. Dersom vi ser på figur 18, kan man heller ikke se noen tydelig korrelasjon mellom lusetall og relativ OD-verdi.



KENDALL TAU	0,050273
2-SIDED P-VALUE	0,249162

Figur 18: Illustrerer sammenheng mellom nivå av luse-spesifikt antistoffnivå og lusetall. Hver prikk er ett individ. Y-aksen viser lusetall, mens x-aksen viser relativ OD-verdi for luse-spesifikt antistoff. Her er det ikke tatt hensyn til gruppeinndeling og tidspunkt.

Vi har også sett på om det foreligger noen korrelasjon mellom lusetall og relativ OD-verdi innad i de ulike vaksinasjonsgruppene. Ved bruk av kendall rank correlation var det heller ikke her noen påvisbar sammenheng (tabell 6). Ingen av gruppene har en p-verdi $<0,05$, og kendall tau verdiene er nær 0.

	IP 2 μ g	SC 2 μ g	IP&SC 2 μ g	IP 0,2 μ g	SC 0,2 μ g	IP&SC 0,2 μ g	PBS-IP	PBS-SC
Kendall tau	0,03	0,21	0,01	-0,06	-0,20	0,13	0,02	0,13
2-sidig p-verdi	0,81	0,10	0,97	0,62	0,11	0,31	0,94	0,41

Tabell 6: Illustrerer hvorvidt det foreligger en sammenheng mellom lusetall og relativ OD-verdi innad i vaksinasjonsgruppene.

Vi har ikke sett på sammenhengen mellom lusetall og relativ OD-verdi for de ulike vaksinasjonsgruppene samtidig som det er medregnet tiden (t) som en forklaringsvariabel (avhengig variabel). Dersom tiden skulle medberegnes ville utvalgsstørrelsen innad i gruppene blitt lav, og dette kunne bidratt til en statistisk lavere validitet.

Diskusjon

Tolkning av resultater

I denne studien er det vist at vaksinerte grupper har signifikant redusert lusepåslag sammenlignet med kontrollgruppene, med unntak av gruppen vaksinert IP&SC med 0,2 µg som antigendose. Det er størst forskjell i lusetall mellom gruppene 4 uker etter smitteeksponering (figur 9 og 10).

I tillegg er det signifikante forskjeller mellom vaksinasjonsgruppene som kun fikk intraperitoneal eller subkutan injeksjon i ulike doser, og gruppene gitt høyest dose har lavest lusetall. Derimot ble det ikke registrert noen signifikant forskjell mellom vaksinasjonsgruppene som mottok både intraperitoneal og subkutan vaksine uavhengig av dose. Videre ser vi heller ikke en forventet dose-respons-sammenheng når vi sammenligner vaksinegruppen IP&SC 2 µg, med vaksinegruppene som fikk henholdsvis IP 0,2 µg og SC 0,2 µg. Det er et interessant funn at gruppene som mottok både intraperitoneal og subkutan injeksjon av vaksinen ikke har den forventede effekten på lusetall, til tross for at de har fått dobbelt mengde antigen (både IP og SC). Det er et kjent fenomen at administrasjonsmåte kan påvirke effekten av en vaksine (Rosenbaum et al., 2021). Ved et vaksinasjonsforsøk rettet mot kukoppevirus ble det vist at subkutan administrert vaksine utløste en ervervet immunrespons som tydelig skilte seg fra den sett ved intradermal eller intramuskulær injeksjon. Subkutan injeksjon gav høyere antistoffrespons mens intradermal eller intramuskulær injeksjon gav større grad av CD8+ cytotoxisk T-cellerespons. Det er derved tydelig at administrasjonsmåte også vil kunne ha betydning for immunresponsens karakter og må tas i betraktning for at vaksinen best kan tilpasses det aktuelle agens. Utfra dette er det ikke overraskende at intraperitoneal og subkutan injeksjon vil kunne gi litt ulik immunrespons, men akkurat

hvorfor kombinasjonen medfører et høyere lusetall (og derved mindre god beskyttende effekt av vaksinen) er uklart.

Det er mindre variasjon i antall lus innad i gruppene ved telling før 4 uker etter smitteeksponering, mens det ved 4WPI er en større variasjon innad i gruppene, og da spesielt i IP&SC 0,2 µg og kontrollgruppene. Dette er også gruppene med høyest median. En årsak til at man ikke ser økningen i lusetall før 4 uker etter smitteeksponering, kan skyldes at det er vanskelig å registrere de tidligste lusestadiene. Fastsittende stadier, særlig på gjeller, er vanskelig å oppdage og man er avhengig av å bruke en lupe. I tillegg vil blødning i gjellene ved avlivning / uttak av prøver også gjøre undersøkelsen vanskelig. Når lusa har kommet lenger i utviklingen, beveger de seg til mer synlige områder på fisken, i tillegg til at de har en større kroppsmasse.

Når det kommer til antistoffnivå spesifikt mot luseantigen, er det vanskelig å se en tydelig trend i resultatene. Ved signifikanstesting, er det ingen av vaksinasjonsgruppene som skiller seg signifikant fra kontrollgruppene når en ikke tar hensyn til tid. Om en derimot kun ser på resultater ved 4 uker etter smitteeksponering, er det mulig å påvise signifikant lavere verdier for SC 2 µg og IP&SC 2 µg, sammenlignet med kontrollgruppene. Disse to vaksinegruppene skiller seg også signifikant fra IP&SC 0,2 µg gruppen.

At antistoffnivåene er økt for kontrollgruppene sammenlignet med vaksinasjonsgruppene, er motsatt av hva som er forventet. Dersom vaksinen hadde en helt klar effekt på antistoffrespons skulle en kunne forvente at de vaksinerte gruppene hadde høyere antistoffrespons enn de uvaksinerte, samt at de som fikk høyere vaksinedose hadde høyere antistoffverdier enn de med lavere vaksinedose. Dette kan komme av at feilkilder har gitt oss kunstig økt nivå av lusespesifikke antistoffnivåer. Vi har også spekulert i om vaksinen kan gi

en økt lokal beskyttelse, slik at fisken får færre lus og videre en redusert systemisk respons. Dette samsvarer også med at de tre gruppene med høyest lusespesifikt antistoffnivå, også har de høyeste lusetallene.

Årsaken til reduksjon i lusespesifikke antistoffer fra nullpunkt til 4 uker i forsøket er ikke kjent. Nullpunkt er 6 uker etter vaksineringsstidspunktet, og om man hadde hatt en antistoffrespons relatert til vaksineringen kunne det tenke seg at fisken allerede hadde nådd et platå for antistoffnivå i blodet og at den videre reduksjonen har sammenheng med avtagende humoral aktivitet. Det at kontrollgruppene har de samme antistoffnivåene som vaksinasjonsgruppene ved nullpunkt, motsier at reduksjonen i antistoffnivå skyldes en avtagende vaksinerespons. Ved sekundær eksponering for antigen, enten via infeksjon eller en booster-vaksine, vil det normalt være en ny og større økning av antistoffnivå. Dette observeres ikke i vårt forsøk. En annen mulig årsak til reduksjon av spesifikke antistoffer over tid er at det er et forbruk av antistoffer under en infeksjon, som da binder seg til og nøytraliserer antigener. Hvor gjeldende dette er for vårt forsøk er usikkert, ettersom lakselus er en ektoparasitt og ikke har en systemisk distribusjon i verten slik vi eksempelvis ser ved bakterie- og virusinfeksjoner.

Etttersom vaksinen gir en effekt på redusert lusepåslag, men ingen effekt på nivået av lusespesifikke antistoffer, er det heller ikke overraskende at korrelasjonsanalysene konkluderer med at det ikke er en sammenheng.

Vi valgte å dele kontrollgruppen i to, ettersom kontrollvaksinene er administrert ved to ulike metoder. Gruppe 7 har fått PBS injisert intraperitonealt, mens gruppe 8 fikk PBS injisert subkutant. Ved å gjøre dette blir det mindre data i kontrollgruppene, sammenlignet om man hadde slått dem sammen, og individuell variasjon kan dermed påvirke resultatene i større

grad. Samtidig kan man argumentere for at PBS, uansett leveringsmåte, ikke skal gi en økning i nivået av luse-spesifikke antistoffer. Ved en visuell vurdering av resultatene våre, kan vi se at det ikke er veldig stor forskjell mellom kontrollgruppene og valget om å dele gruppene har sannsynligvis ikke påvirket konklusjonen vår.

Ved statistiske utregninger der det er tatt høyde for både vaksinegruppe og måletidspunkt, kan det være et forholdsvis lavt antall individer i hver gruppe (5-9 individer). Dette kan ha betydning for noen av de statistiske modellene som er benyttet, og bør tas hensyn til ved tolkning av resultatene. Dersom det hadde vært et høyere antall individer per gruppe ville dette potensielt styrket påliteligheten av resultatene. På den andre siden vil det i ethvert dyreforsøk, av dyrevelferdsmessige årsaker, være et mål om å bruke så få individer som mulig, så lenge dette ikke svekker validiteten i betydelig grad.

Feilkilder

Vi har gjennomført labarbeidet etter best mulig evne og nøyaktighet, men vi er ikke erfarne labteknikere og dette utgjør åpenbart en mulig feilkilde i denne studien. En av disse kan være eventuelle feil ved pipettering, og store forskjeller i parprøver kan muligens indikere dette. Det har også vært tidvis trøbbel med ELISA-vaskemaskinen, og muligheten for at denne ikke har vasket jevnt og riktig gjennom hele prosessen og derved gitt opphav til feilkilder er absolutt til stede. Vi observerte ved flere anledninger at ikke alle brønnene inneholdt lik mengde vaskebuffer. Vi har også spekulert i om den gjentatte opptiningen og nedfrysningen av serum kan ha degradert antistoffenes struktur til en viss grad og derved bidratt til lavere registrerte antistoffverdier.

Sammenligning av paralleller har vist at det foreligger ganske stor variasjon for enkelte av prøvene. Dette var også tilfellet da de samme prøvene ble analysert av en rutinert forsker ved NMBU. Det kan tenkes at dette muligens skyldes suboptimal pipettebruk eller at pipettene i seg selv ikke er helt pålitelige.

Det er også viktig å påpeke at det ble observert variasjon i resultat for positiv og negativ verdi, fra en plate til en annen. Ideelt sett skal disse være identiske, ettersom vi alltid brukte samme konsentrasjon fra samme plasmaprøver. I praksis blir de nok aldri helt like, men forskjellene vi har sett mellom enkelte plater var såpass stor at vi måtte analysere de på nytt.

Øvrige refleksjoner

Resultatene viser at vaksinen gir redusert lusepåslag, uten at man ser tydelige forøkede nivåer av antistoffer. En kan spekulere i om fraværet av betydelig antistoffrespons kan skyldes at vaksinen muligens har stimulert lokale, medfødte immunresponser i større grad enn det ervervede immunsystemet, og at dette er årsaken til at antistoffresponsen var såpass svak. PCR-tester ville muligens kunne kartlagt en slik eventuell årsakssammenheng. Grunnet mangel på tid ble ikke dette gjort, men planen var å undersøke genekspressjonen lokalt i huden ved hjelp av PCR.

Videre ser man at den spesifikke antistoffresponsen ikke er normalfordelt. Dette er fordi man alltid vil ha noen individer som er høy-respondere og noen som er lav-respondere. Dette er ikke unikt for de antigenene som er benyttet her og den samme type responsen ser man ved vaksinasjon mot flere ulike agens (Sotomayor-Gerding et al., 2020; Romstad et al., 2012). En årsak til dette er ulik genetisk bakgrunn hos individene. Utavlede stammer av atlantisk laks vil kunne gi flere uteliggere av antistoffverdier. Ved større genetisk homogenitet hos vaksinerte grupper vil man få et mer enhetlig svar, med mindre variasjon i antistoffresponsen. I tillegg

har man en del non-respondere, som skyldes at fisken generelt har en langsom ervervet immunrespons. En lengre induksjonsperiode for etablering av immunitet ville trolig gi en bedre normalfordeling i antistoffresponsen. For de totale antistoffene ser vi en normalfordelt distribusjon. Dette er også forventet, ettersom den totale poolen av antistoffer ikke lar seg påvirke av enkelte ekstremverdier, på samme måte som en kan se hos den spesifikke antistoffdistribusjonen.

Som nevnt ser man en reduksjon i lusetall uten tydelig økning i antistoffverdier. En kan derfor stille spørsmål ved hvor godt mål IgM er for å måle effekt av vaksinen mot lusepåslag. Dersom man tar utgangspunkt i at vaksinen kan ha en effekt på lokale immunresponser, kunne det vært hensiktsmessig å måle lokale antistoffer. IgT er avgjørende for slimhinneimmunitet og det kunne vært aktuelt å undersøke for en mulig økning av IgT i fiskens slim ved infestasjon.

Vi har undersøkt grad av lusepåslag samt antistoffnivå i plasma. Noe som kunne vært interessant å studere er hvorvidt vaksinen har innvirkning på reproduksjonsevne og senere generasjoner av lus. Det kan tenkes at en eventuell effekt av vaksinen først melder seg etter den adulte hunnlusen har inntatt blod, og at man dermed kan observere effekter på reproduksjonen og smittepresset ved neste generasjon. Lusetallene er ikke kategorisert, slik at vi ikke kan si noe om eksempelvis visse stadier affiseres mer enn andre. I en studie som omhandlet en laboratorietest av en vaksine mot lakselus, ble det konkludert med at vaksinen først og fremst påvirket antall hunnlus og deres reproduksjonsevne. Forsinket klekkemønster og redusert antall copepoditter i andre generasjon medførte en eksponentiell reduksjon i omfanget av reinfeksjon (Swain et al., 2018). Videre testet Greyson et al. i 1995 en vaksine

basert på adulte lus. Forsøket viste ingen forskjell i lusetall, men immunisert fisk hadde færre antall gravide hunnlus med færre egg.

Det er foretatt flere studier på mygg, som i likhet med lakselus legger egg. Det er for eksempel vist at dersom mygg rammes av en tarminfeksjon vil den nedprioritere eventuell eggproduksjon til fordel for bekjempelse av infeksjonen (Rono et al., 2010). Muligens kan dette ha overføringsverdi til lakselus hvor antistoffer produsert av laksen kan gi lokal reaksjon i tarmen hos lusa og derved påvirke eggproduksjonen.

I et annet studie ønsket man å undersøke overlevelsesgrad hos mygg som inntok blod fra mus immunisert med ulike vaksiner basert på antigener fra myggens tarmkanal. Resultatene ga delvis tilsvarende funn som de registrert i vår studie. Det ble observert høyere dødelighet hos mygg som sugde blod fra mus med lave spesifikke antistoffnivåer. Studiet sammenlignet også mortaliteten til en gruppe mygg som inntok blod direkte fra musene med en gruppe mygg som fikk i seg immunisert serum indirekte via en kunstig løsning. Det ble kun observert forhøyet dødelighet hos den første gruppen. Dette indikerer at det er andre faktorer enn serumkomponenter alene, som var avgjørende for dødelighet hos myggen (Foy et al., 2003).

Generaliserbarhet

Dette er en forholdsvis liten og eksperimentell studie, og styrken ligger i en dose respons-effekt uavhengig av leveringsmåte når kun en modalitet benyttes, men samtidig er det vanskelig å forutsi hvilken effekt og grad av beskyttelse vaksinen vil kunne ha i felt. Vi har kun undersøkt effekter frem til 4 uker etter smitteeksponering og smitte lengre tid etter vaksinasjon vil være nødvendig å undersøke.

I forsøket ble laksen holdt i kar med en temperatur på 10 (+/- 1) grader. I sjøen vil temperaturen variere, både geografisk og ved ulike årstider. Man vet at temperatur er

avgjørende for fiskens immunforsvar og lusens utvikling, og det kan tenkes at dette kan ha en innvirkning på vaksinens effekt i felt. Samtidig konkluderes det i boken “Fish Vaccination” med at beskyttelsesgrad av vaksiner til fisk ikke affiseres nevneverdig av temperatur, såfremt temperaturen er innen normalområdet for arten (Lillehaug, 2014). I sjøen vil fisken være utsatt for gjentatte infestasjoner, i motsetning til under forsøket hvor laksen kun ble eksponert for copepoditter én gang. Det er ikke utenkelig at gjentatt smitte og varighet av infestasjon trolig også vil kunne påvirke hvor god beskyttelse man kan oppnå.

Konklusjon

Vaksinen gir redusert lusepåslag i denne studien, påvist som signifikante forskjeller mellom flere av vaksinasjonsgruppene og kontrollgruppene. Vi kan konkludere med at nivået av lusespesifikke antistoffer ikke er økt ved vaksinerings mot lakselus, og at det ikke er en sammenheng mellom antall lus på fisken og nivået av luse-spesifikke antistoffer i vårt forsøk. Det er mulig at vaksinen har induisert medfødte lokale immunresponser, som kan forklare reduksjonen i lusepåslag og fraværet av antistoffrespons. Dette vil i så fall være et moment for videre forskning.

Takk til bidragsyttere

Vi vil gjerne takke våre veiledere, Øystein Evensen og Koestan Gadan, for god hjelp og oppfølging under arbeid med denne oppgaven. Takk for gjennomganger, veiledninger og mailutvekslinger. Takk til Amr Ahmed Abdelrahim Gamil for tålmodig veiledning på lab og fine triks når vaskemaskinen slo seg vrang. En særskilt takk til Elisabeth Gislefoss som lærte oss alle trinnene i en ELISA-analyse og som svarte på alle de dumme spørsmålene våre.

Takk til Sandra Radunovic for gjennomgang av labsikkerhet og –rutiner. En takk til Norges miljø- og biovitenskapelig universitet og det veterinærmedisinske fakultet som har gitt oss tilgang til laboratoriet og materialer/utstyr. Kaffemaskinen utenfor laben har også vært et gledelig lyspunkt ved lange arbeidsdager.

En stor takk til Erlend Risvik for hjelp til fremstilling av column scatter plots benyttet i oppgaven.

En siste takk til venner og familie som har gitt oss støtte i en krevende periode med studering, labarbeid og oppgaveskriving.

Summary

Title: Effects of vaccination against sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation – antibody response and severity of lice infestation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

Authors: Elise Fure, Erik Andreas Lie, Jenny Ottesen Stone og Marie Amundsen Wold

Supervisor: Professor Øystein Evensen and scientist Koestan Gadan,
Department of paraclinical sciences.

In this thesis we have studied the effects of a prototype vaccine against sea lice. This vaccine consists of a homogenous mixture of different life cycle stages of the parasite formulated as a water-in-oil adjuvant-based vaccine. The vaccine was administered intraperitoneally, subcutaneously or by a combination of these two methods. Furthermore, the groups of fish were given different dosages. Blood samples were analyzed using ELISA to measure levels of specific antibodies against the parasite. Levels of total immunoglobulins (non-specific) were also measured. Lice counts following exposure to infective copepodites were also registered. Blood samples and lice counts were taken and registered at different intervals, ranging from 2-28 days post-exposure.

Our results showed a considerable reduction in lice counts amongst several of the vaccinated groups compared to control groups. The immunized fish did not produce higher levels of lice-specific antibodies post vaccination compared to control groups. The highest levels of lice-specific antibodies at 4 weeks post exposure were observed within the control groups as well as one of the vaccinated groups. There was no measurable correlation between the number of lice and the relative optical density (OD) for lice-specific antibodies.

During our lab work we have produced somewhat variable results with regard to the replicate samples. This may indicate sub-optimal pipetting and/or less precise equipment, which may affect the validity of our study and results.

Thus we may conclude that the vaccine might hold some protective properties against sea lice, though this does not appear to be attributable to an increase in specific antibodies against the parasite. There is a possibility of the vaccine triggering more localized, innate immune responses, which could be an important topic for further research.

Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2015). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 5. utg. St. Louis: Elsevier
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology*. 9. utg. Philadelphia: Elsevier
- Abcam. (u.å.) *ELISA principles and types*. Tilgjengelig fra: <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle> (lest 24.04.23)
- Abós, B., Bailey, C. & Tafalla, C. (2022). Adaptive immunity. I: Buchmann, K & Secombes, C. J. (red) *Principles of fish immunology: from cells and molecules to host protection*. Cham: Springer
- Alhaji, M. & Farhana, A. (2023). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls* [internett]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/> (lest 23.03.23)
- Artsdatabanken. (u.å.). *Caligus elongatus von Nordmann, 1832*. Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/Taxon/Caligus%20elongatus/16062> (lest 24.03.2023)
- Artsdatabanken. (u.å.). *Lakselus Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837)*. Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/taxon/ /16071> (lest 24.03.2023)
- Bakke, A. F. (2021). *Immune responses in Atlantic salmon (Salmo salar) following vaccination and Salmonid alphavirus challenge*. Doktoravhandling. Ås/Adamstuen: Norwegian University of Life Sciences. Tilgjengelig fra: https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/3055260/111468_NMBU_Bakke_finished.pdf?sequence=1 (lest 29.03.2023).
- Barrett, L. T., Oppedal, F., Robinson, N. & Dempster, T. (2020a). Prevention not cure: a review of methods to avoid sea lice infestations in salmon aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12 (4): 2527-2543. doi: <https://doi.org/10.1111/raq.124556>
- Barrett, L. T., Overton, K., Stien, L. H., Oppedal, F. & Dempster, T. (2020b). Effect of cleaner fish on sea lice in Norwegian salmon aquaculture: a national scale data analysis. *International Journal for Parasitology*, 50 (10-11): 787-796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.12.005>
- Berg, A., Bergh, Ø., Fjellidal, P.O., Hansen, T., Juell, J.O., Nerland, A. (2006) *Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger*. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/hi_dyrevelferdsmessige_konsekvenser_vaksinasjon_av_fisk_effekter_og_bivirkninger_2006.5907/binary/HI:%20Dyrevelferdsmessige%20konsekvenser%20vaksinasjon%20av%20fisk%20effekter%20og%20bivirkninger%20\(2006\)](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/hi_dyrevelferdsmessige_konsekvenser_vaksinasjon_av_fisk_effekter_og_bivirkninger_2006.5907/binary/HI:%20Dyrevelferdsmessige%20konsekvenser%20vaksinasjon%20av%20fisk%20effekter%20og%20bivirkninger%20(2006)) (lest 28.04.2023)
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*, 321: 424. doi: 10.1136/bmj.321.7258.424
- Bio-rad. (u.å.). *ELISA: Types of ELISA*. Tilgang fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> (lest 24.04.23)

- Caballero-Solares, A., Umasuthan, N., Xue, X., Katan, T., Kumar, S., Westcott, J., Chen, Z., Fast, M., Skugor, S., Taylor, R. & Rise, M. (2022). Interacting Effects of Sea Louse (*Lepeophtheirus salmonis*) Infection and Formalin-Killed *Aeromonas salmonicida* on Atlantic Salmon Skin Transcriptome. *Frontiers in immunology*, 13: 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2022.804987
- Carpio, Y., Basabe, L., Acosta, J., Rodriguez, A., Mendoza, A., Lisperger, A., Zamorono, E., Gonzalez, M., Rivas, M., Conteras, S., Haussmann, D., Figueroa, J., Osorio, V., Ancio, G., Mancilla, J., Ritchie, G., Borotto, C. & Estrada, M. (2011). Novel Gene isolated from *Caligus rogercresseyi*; a promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine.*, 29 (15): 2810-2820. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.109
- Coates, A., Philips, B. L., Bui, S., Oppedal, F., Robinson, N. A. & Dempster, T. (2021). Evolution of salmon lice in response to management strategies: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13 (3): 1397-1422. doi: <https://doi.org/10.1111/raq.12528>
- Dalvin, S., Karlsen, Ø. & Samuelson, O. (2018). *Tema: lakselus*. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus> (lest 24.03.2023)
- Dalvin, S. (2018). *Skottelus og torskelus*. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/skottelus> (lest 24.03.2023)
- Eichner, C (2022) *Vaksine mot lakselus: Fremstilling og test av nye vaksinekandidater i småskala forsøk*. Tilgjengelig fra https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901510/?fileurl=https://fhfno.sharepoint.com/sites/pdb/Publisertedokumenter/312899faglig-sluttrapportering_FHF901510.pdf.PDF&filename=Sluttrapport:%20Vaksine%20mot%20lakselus:%20Fremstilling%20og%20test%20av%20nye%20vaksinekandidater%20i%20sm%C3%A5skala%20fors%C3%B8k (lest 03.04.2023)
- Evensen, Ø. (2014). Future Fish Vaccinology. I: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (red). *Fish Vaccination*, 167. Chichester: John Wiley & Son, Ltd
- Evensen, Ø. (2009). Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. *Options Mediterraneennes*, 86: 177-186
- Evensen, Ø. (2023). *A review of immune prevention against sea lice infection in salmonids – a need for rethinking approaches?* (e-post til Jenny Ottesen Stone 19.03.2023)
- Evensen, Ø med bidrag fra Nafstad, A., Steffenak, H., Brudeseth, B., Holm, H., Thoen, E. & Poppe T. (2021). *Kompendium- akvamedisin og fiskesykdommer*, upublisert
- Evensen, Ø., Reed, A.K. & Amlie, T. (u.å.). *A review of immune prevention against sea lice (Lepeophtheirus salmonis) infection in salmonids – a need for rethinking approaches?* Upublisert artikkel
- Fagerbakke, C. (2020). *Dette er trafikklyssystemet*. Tilgjengelig fra: <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/februar/trafikklys> (lest 24.03.2023)
- FHF. (u.å.). *Utnytte artsuavhengig variasjon i resistens mot lakselus/Harnessing cross species variation in sea lice resistance (CrispResist)*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901631/> (lest 29.03.23)
- Fiskeridirektoratet. (2022). *Cleanerfish (Lumpfish and Wrasse)*. Tilgjengelig fra: <https://www.fiskeridir.no/English/Aquaculture/Statistics/Cleanerfish-Lumpfish-and-Wrasse> (lest 29.03.23)
- Forskrift om lakselusbekjempelse. (2012). *Forskrift om bekjempelse av lakselus i*

- akvakulturanlegg av 05. Desember 2012 nr. 1140. Tilgjengelig fra:
<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140> (lest 23.03.23)
- Foy, B. D., Magalhaes, T., Injera, W. E., Sutherland, I., Devenport, M., Thanawastien, A., Ripley, D., Cárdenas-Freytag, L. & Beier, J. C. (2003). Induction of Mosquitocidal Activity in Mice Immunized with *Anopheles gambiae* Midgut cDNA. *ASM Journals*, 71 (4). doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2032-2040.2003>
- Gjerde, B. (2011). *Parasittiske arthropodar i veterinærmedisinen*. 11. Utgave. Oslo. s. 96. Tilgjengelig fra:
<http://bk.gjerde.name/index.php/component/phocadownload/category/14-kompendium>
- Greyson, T. H., John, R. J., Wadsworth, S., Greaves, K., Cox, D., Roper, J., Wrathmell, B., Gilpin, M. L. & Harris, J. E. (1995). Immunization of Atlantic salmon against the salmon louse: identification of antigens and effects on louse fecundity. *Journal of Fish Biology*, 47 (sA): 85-94. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.tb06046>
- Grimnes, A. & Jakobsen, P. J. (1996). The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 48 (6): 1179-1194. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01813.x>
- Grøntvedt, R. N., Nerbøvik, I. K. G., Viljigrein, H., Lillehaug, A., Nilsen, H., Gjevre, A. G. (2015). *Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt*. Veterinærinstituttets rapportserie 13-2015. Oslo: Veterinærinstituttet (lest 03.03.2023)
- Hamre, L. A., Bui, S., Oppedal, F., Skern-Mauritzen, R. & Dalvin, S. (2019). Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C. *Aquacult Environ Interact*, 11: 429-443. doi: <https://doi.org/10.3354/aei00320>
- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M. A., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., Boxshall, G., Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLoS ONE*, 8 (9): e73539. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Helgesen, K. O., Horsberg, T. E., Stige, L. C., Tarpai, A (2022). *The surveillance programme for resistance in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2021*. Report 8/2022 (lest 15.03.2023)
- Holan, A. B., Roth, B., Breiland, M. S. W., Kolarevic, J., Hansen, Ø. J., Iversen, A., Hermansen, Ø., Gjerde, B., Hatlen, B., Mortensen, A., Lein, I., Johansen, L. H., Noble, C., Gismervik, K., Espmark, Å. M. (2017). *Beste praksis for medikamentfrie metoder for lakseluskontroll (MEDFRI)*. Rapport 10/2017. Tilgjengelig ved: <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/handle/11250/2443555> (lest 15.03.2023)
- Holm, H. J. (2016). *Immunological response profiles to salmon lice infections in Atlantic salmon: modulation by nutrition and selective breeding*. Doktoravhandling. Ås: Norwegian University of Life Sciences. Tilgjengelig fra: <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2447806> (lest 29.03.2023)
- Hytterød, S., Andersen, L., Hansen, H., Blindheim, S. H., Poppe, T. T., Kristoffersen, A. B., Mo, T. A. (2017). *AGD Behandlingsstrategier - Dose respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann*. Rapport 10-2017. Tilgjengelig fra:

- <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/agd-behandlingsstrategier-dose-respons-studier-med-hydrogenperoksid-og-ferskvann> (lest 31. 03. 2023)
- Kania, P. W. & Buchmann, K. (2022). Complement activation in fish with emphasis on MBL/MASP. I: Buchmann, K. & Secombes, C. J. (red) *Principles of fish immunology: from cells and molecules to host protection*. Cham: Springer
- Koppang, E.O., Larsen, H.S., Satoh, M (2012). *Bivirkninger som følge av vaksinerings av laks*. Tilgjengelig ved https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/900631/?fileurl=https://fhfno.sharepoint.com/sites/pdb/Dokumenter/900631/Rapport_Bivirkninger%20som%20følge%20av%20vaksinerings%20av%20laks-23102012.pdf&filename=Sluttrapport:%20Bivirkninger%20som%20følge%20av%20vaksinerings%20av%20laks (lest 28.04.2023)
- Krogdahl, Å., Kortner, T. & Løkka, G. (2023). Nutrition and the immune system in fish and shellfish. I: Kumar, V. (red) *Nutrition and Metabolism in Fish and Shellfish / Nutritional Physiology of Fish and Shellfish*, upublisert
- Lequin, R.M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51 (12): 2415-2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Lillehaug, A. (2014). Vaccination Strategies and Procedures. I: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (red) *Fish Vaccination*, s. 142. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lin, A.V. (2015). Direct ELISA. I: Hnasko, R. (red). *ELISA. Methods in Molecular Biology*, s. 61-67. New York; Humana Press. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_6
- Makesh, M. & Rajendran, K.V. (2022). *Fish immune system and vaccines*. Singapore: Springer. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1007/978-981-19-1268-9>
- Mashoof, S. & Criscitiello, M. (2016). Fish immunology. *Biology*, 5 (4): 45. doi:[10.3390/biology5040045](https://doi.org/10.3390/biology5040045)
- Mattilsynet. (2016). *Fakta om lakselus og lakselusbekjempelse*. Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/fakta_om_lakselus_og_lakselusbekjempelse.23766 (lest 23.03.23)
- Mattilsynet (2019). *Nasjonal tilsynskampanje 2018/2019 Velferd hos rensefisk*. Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/akvakultur/rensefisk/mattilsynet_sluttrapport_renseskampanje_2018_2019.37769/binary/Mattilsynet%20sluttrapport%20rensefiskkampanje%202018%20-%202019 (lest 31.03.2023)
- Munang'andu, H. M. & Evensen, Ø. (2015). A Review of Intra- and Extracellular Antigen Delivery Systems for Virus Vaccines of Finfish. *Journal of Immunology research*. doi: 10.1155/2015/960859.
- Nærings og fiskeridepartamentet. (2017). *Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus*. Tilgjengelig fra: https://www.regjeringen.no/contentassets/bac8a85fb17145939d38ce038130ce0e/w-0016_handlingsplan-mot-resistens-mot-legemidler-mot-lakselus.pdf (lest 15.03.2023)
- Overton, K., Barrett, L. T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Dempster, T. (2020). Sea lice

- removal by cleaner fish in salmon aquaculture: a review of the evidence base. *Aquacult Environ Interact*, 12: 31-44. doi: <https://doi.org/10.3354/aei00345>
- Paulsen, N. (2018). *Skottelus (Caligus elongatus) En litteraturgjennomgang*. Masteroppgave. Bergen: universitetet i Bergen. Tilgjengelig fra: https://slrc.w.uib.no/files/2018/11/MSc-Caligus-elongatus_Nina-Paulsen-2018.pdf (lest 24.03.2023)
- Pike, A. W & Wadsworth, S. L. (1999). Sealice on salmonids: their biology and control. *Adv. Parasitol*, 44: 233-337. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60233-x
- Raynard, R. S., Bricknell, I. R., Billingsley, P. F., Nisbet, A. J., Vigneau, A. & Sommerville, C (2002). Development of vaccines against sea lice. *Pest Manag Sci.*, 58 (6): 569-75. doi: 10.1002/ps.474
- Romstad, A. B., Reitan, L. J., Midtlyng, P., Gravningen, K. & Evensen, Ø. (2012). Antibody responses correlate with antigen dose and *in vivo* protection for oil-adjuvanted, experimental furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and can be used for batch potency testing of vaccines. *Vaccine*, 31 (5): 791-796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.069>
- Rono, M. K., Whitten, M., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E. A. & Marois, E. (2010). The Major Yolk Protein Vitellogenin Interferes with the Anti-Plasmodium Response in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLOS Biology*, 8 (7): e1000434. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000434>
- Rosenbaum, P., Tchitchek, N., Joly, C., Pozo, A., Stimmer, L., Langlois, S., Hocini, H., Gosse, L., Pejowski, D., Cosma, A., Beignon, A.S., Bosquet, N.D., Lery, Y., LeGrand, R. & Martinon, F. (2021). Vaccine Inoculation Route Modulates Early Immunity and Consequently Antigen-Specific Immune Response. *Frontiers*, 12: 1664-3224. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645210>
- Samsing, F., Oppedal, F., Dalvin, S., Johnsen, I., Vågseth, T. & Dempster, T. (2016). Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) development times, body size, and reproductive outputs follow universal models of temperature dependence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73 (12): 1841-1851. doi: <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0050>
- Sea Lice Research Centre. (u.å.). *The atlantic salmon louse*. Tilgjengelig fra: <https://slrc.w.uib.no/about-sea-lice/the-atlantic-salmon-louse/> (lest 23.03.23)
- Seppic. (u.å.). *MONTANIDE™ ISA-W/O*. Tilgjengelig fra: <https://www.seppic.com/en/montanide-isa-w-o> (lest 23.03.23)
- Sigma-Aldrich (u.å.). *Tween 20*. Tilgang fra: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sial/p1379> (lest 23.03.23)
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Oliveira, V. H. S.d, Moldal, T., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (2023). *Fiskehelserapporten 2022*. Veterinærinstituttets rapportserie nr. 5a/2023. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelserapporten-2022> (lest 29.03.23)
- Sotomayor-Gerding, D., Troncoso, J.M., Pino, A., Almendras, F. & Diaz, M.R. (2020). Assessing the Immune Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) after the Oral Intake of Alginate-Encapsulated *Piscirickettsia salmonis* Antigens. *Vaccines*, 8 (3): 450. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030450>

- Statistics kingdom (u.å.). *Kruskal Wallis Test Calculator*. Tilgjengelig fra: <https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>
- Stormoen, M. (2023). *Generell lusekunnskap – lusebiologi og lusetelling*. Ås: universitetet for miljø- og biovitenskap (forelesning 06.03.2023).
- Swain, J. K., Johansen, L-H. & González, Y. C. (2018). *Validating a salmon lice vaccine candidate as a preventive measure against salmon lice at the lab-scale*. Rapport 32/2018. Tilgjengelig fra: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901461/> (lest 26.04.23)
- ThermoFisher. (u.å.). *Overview of ELISA*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html> (lest 23.03.23)
- Tucker, C. S., Sommerville, C. & Wootten, R. (2000). An Investigation into the Larval Energetics and Settlement of the Sea Louse, *Lepeophtheirus salmonis*, an Ectoparasitic Copepod of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Pathology*, 35(3): 137-146. doi: <https://doi.org/10.3147/jsfp.35.137>
- Veterinærinstituttet. (u.å.). *Lakselus*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/lakselus> (lest 24.03.2023)
- Wessa, (2017), *Kendall tau Rank Correlation (v1.0.13) in Free Statistics Software (v1.2.1)*, Office for Research Development and Education, Tilgjengelig fra: https://www.wessa.net/rwasp_kendall.wasp/
- Willadsen, P., Kemp, D. H., Bobon, G. S. & Wright, I. G. (1992). Successful vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* using recombinant antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 (3): 289-94. doi: 10.1590/s0074-02761992000700049

Vedlegg

Vedlegg 1: gj. og SD for spesifikk Ig

Tabell som viser gjennomsnitt og standardavvik for relativ OD-verdi for lusespesifikke antistoffer, inndelt i vaksinasjons- og kontrollgrupper.

	Relativ OD-verdi – spesifikk ELISA									
	Nullpunkt		48HPI		1WPI		2WPI		4WPI	
	Gj.	SD	Gj.	SD	Gj.	SD	Gj.	SD	Gj.	SD
IP 2 µg	7,33	5,49	2,58	1,36	2,10	1,09	6,33	3,19	3,28	2,97
SC 2 µg	5,18	1,39	4,41	2,89	6,40	1,68	6,34	5,08	0,81	0,94
IP&SC 2 µg	6,07	1,59	8,53	4,10	2,27	2,00	4,80	3,28	0,43	0,22
IP 0,2 µg	6,76	4,05	3,20	3,05	5,86	1,52	2,08	2,22	2,39	0,72
SC 0,2 µg	9,67	2,23	2,62	3,46	7,68	3,88	2,35	1,74	1,99	0,77
IP&SC 0,2 µg	7,72	2,13	4,84	1,00	2,90	1,41	2,76	1,04	8,33	4,82
PBS-IP	4,75	2,70	6,00	2,66	2,23	1,84	4,81	4,78	4,66	1,19
PBS-SC	6,14	2,86	4,90	2,54	3,09	1,18	3,16	2,43	6,09	2,96

Vedlegg 2: Spesifikk ELISA protokoll

SPECIFIC Ig

ELISA Protocol for detection of antibodies against salmon lice antigens in salmon serum. 3 days

Specific Ig: 1:1000 Atg, 1:200 serum, mouse-anti salmonid HRP: 1:1000

A: Reagents:

Coating buffer (500 ml): Bicarbonate buffers (0,795 g Na₂CO₃ + 1,465 g NaHCO₃+ distilled water).
Water is added up to total volume 500 ml. PH adjustment is not necessary. The buffer is stable for at least two weeks when stored at 4 °C.

10 X Phosphate buffered saline (PBS):

1,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
9,8 g $\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
81 g NaCl
Distilled water is added up to total volume of 1 L.

Washing buffer (PBS/T) 100 ml 10X PBS/T
900 ml water
0.5 ml Tween 20 (0.05%)

Blocking buffer 5% fat free dry milk in PBS/T.
2,5 g fat free dry milk
PBS/T is added up to a total volume of 50 ml

Diluent buffer: 1% fat free dry milk in PBS/T
0,5 g fat free dry milk
PBS/T is added up to a total volume of 50 ml.

Substrate solution: **TMB**

Stop solution: 1 M HCl

B: Procedure:

1. **Coating:** Always have the buffers ready before you start. A dilution of **1/1000** of the antigen is used. In the 96 well 100 μl /well. Coat plates by adding 100 μl per well of sea lice antigen and incubate the plates **overnight at 4°C**.
2. Wash the plates three times using 250 μl washing buffer per well.
3. Blocking: Add 250 μl of blocking buffer to each well and incubate at room temperature for 2 hours.
4. **Serum:** Wash the plates three times and add 100 μl of diluted serum 1:200. Incubate the plate **overnight at 4°C**
5. Wash the plates three times and add 100 μl /well 1:1000 mouse anti-salmonid HRP (immunoprecipitate) in 1% dry milk in diluent buffer PBS/T for 1 hour at RT.
6. **Detection:** Wash as above and to each well add 75 μl /well of the TMB substrate solution. Incubate for 20 min in the dark at room temperature.
7. Do not wash, but add 50 μl of the stop solution to each well.
8. Read using a spectrophotometer ELISA reader machine at an absorbance of 450 nm.

Vedlegg 3: Total ELISA protokoll

TOTAL Ig

ELISA Protocol for detection of antibodies against salmon lice antigens in salmon serum. 3 days

Total Ig: 1:200 4C10, 1:200 serum, 1:2000 rabbit anti salmonid Ig, 1:2000 anti-rabbit HRP

A: Reagents:

Coating buffer (500 ml): Bicarbonate buffers (0,795 g Na_2CO_3 + 1,465 g NaHCO_3 + distilled water).
Water is added up to total volume 500 ml. PH adjustment is not necessary. The buffer is stable for at least two weeks when stored at 4 °C.

10 X Phosphate buffered saline (PBS):

1,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
9,8 g $\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
81 g NaCl
Distilled water is added up to total volume of 1 L.

Washing buffer (PBS/T) 100 ml 10X PBS/T
900 ml water
0.5 ml Tween 20 (0.05%)

Blocking buffer 5% fat free dry milk in PBS/T.
2,5 g fat free dry milk
PBS/T is added up to a total volume of 50 ml

Diluent buffer: 1% fat free dry milk in PBS/T
0,5 g fat free dry milk
PBS/T is added up to a total volume of 50 ml.

Substrate solution: TMB

Stop solution: 1 M HCl

B: Procedure:

1. **Coating:** Always have the buffers ready before you start. A dilution of **1:200 4C10**. Coat plates by adding 100µl per well and incubate the plates **overnight at 4°C**.
2. Wash the plates three times using 250µl washing buffer per well.
3. **Blocking:** Add 250µl of blocking buffer to each well and incubate at room temperature for 2 hours.
4. **Serum:** Wash the plates three times and add 100 µl of diluted serum 1:200. Incubate the plate **overnight at 4°C**
5. Wash the plates three times and add 100 µl/well of **1:2000 rabbit anti-salmonid Ig** in 1% dry milk in diluent buffer PBS/T for 1 hour at RT.
6. Wash the plates three times and add 100 µl/well **1:2000 anti-rabbit HRP** in 1% dry milk in diluent buffer PBS/T for 1 hour at RT
7. **Detection:** Wash as above and to each well add 75 µl/well of the TMB substrate solution. Incubate for 10 min in the dark at room temperature.
8. Do not wash, but add 50 µl of the stop solution to each well.
9. Read using a spectrophotometer ELISA reader machine at an absorbance of 450 nm.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no