

# Sår og sårheling hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i RAS med sjøvannstilsetning og i tradisjonelle sjømerder

av

Iselin Lillevik Møllerstuen

Masteroppgave i fiskehelse



Institutt for biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I BERGEN

16. november 2020

© Iselin Lillevik Møllerstuen

2020

Sår og sårheling hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i RAS med sjøvannstilsetning og i tradisjonelle sjømerder

Iselin Lillevik Møllerstuen

<http://bora.uib.no/>



## Sammendrag

Produksjon av postsmolt atlantisk laks (*Salmo salar*) i resirkulerende akvakultursystemer (RAS) med sjøvannstilsetning er tatt i bruk for å forkorte produksjonstiden i sjø. Dette er som følge av store utfordringer knyttet til sår og høyt smittepress fra ulike parasitter og patogene bakterier som ofte er til stede ved oppdrett i tradisjonelle åpne sjømerder. Produksjon i RAS har derimot også utfordringer knyttet til fiskens helse og velferd. Det er meldt fra om problemer knyttet til bruk av sjøvann i RAS og bakterieinfeksjoner som forårsaker hudinfeksjoner og sår (Sommerset et al., 2020). Huden er en del av fiskens barriere mot patogener og god hudhelse er dermed sentral for produksjonen av robust postsmolt. Det er gjennomført studier hvor sårhelingsprosessen av mekanisk induserte sår hos postsmolt laks (Sveen et. al.) har blitt kartlagt, men det er fortsatt nødvendig med mer kunnskap om hudhelse og sår i nye og tradisjonelle produksjonsstrategier for laks.

Hovedmålet med denne studien var derfor å undersøke sår og sårheling hos laks i to ulike oppdrettssystemer. Den ene gruppen var postsmolt fra RAS-anlegg med sjøvannstilsetning, der det var mistanke om mekaniske sår. Den andre gruppen var fra et tradisjonelt sjøanlegg med full sjøvannssalinitet, der det var detektert bakterier som assosieres med sår (*Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* sp.). Det ble benyttet ulike histokjemiske metoder, både veletablerte med polyklonale antistoff mot bakterier, men også monoklonale antistoffer mot celler eller celleresponser, som har krevd metodeutvikling og tilpasning for å kunne studere hud, sår og sårheling i prøvematerialet. For å systematisere og semi-kvantifisere funn ble det utarbeidet et scoringssystem. Det ble også utført amplikonanalyse på et utvalg prøver fra RAS-anlegget for å se på den relative forekomsten av ulike bakterier til stede i sår og på hud.

Resultatene viste at det var tydelige histopatologiske forskjeller med tanke på immunologiske celleresponser i de to gruppene. Sårene med mekanisk opprinnelse var mindre alvorlige og hadde en mildere cellereaksjon enn sårene hvor *Moritella viscosa* var til stede. I tillegg kom det frem at det hadde en betydning hvilke bakterier såret var infisert med. Dersom *Tenacibaculum* sp. var til stede i sårene var det lavere tilstedeværelse av immunceller. Resultatene kan tyde på at det vil være raskere sårheling hos fisk med mindre mekaniske sår hvor bakterier som assosieres med sår ikke er til stede. Gode rutiner for å hindre sår og kunnskap om sår og sårheling er viktig for produksjonsstrategier i oppdrett av laks.

## Forord

Denne masteroppgaven er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse ved institutt for biovitenskap på Universitet i Bergen (UiB). Arbeidet har blitt utført hos Fiskeimmunologigruppen (UiB), men hovedarbeidet på Veterinærinstituttet i Bergen (VI).

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere og de som har vært involvert i denne studien. Først og fremst en *enormt* stor takk til **Hanne Nilsen** (VI) for all den faglige og gode veiledningen, for å se løsninger og håp når jeg ikke har gjort det, og ikke minst for å ta deg tid til den ekstra jobben som veileder. En stor takk vil jeg også rette til min hovedveileder ved UiB, **Heidrun I. Wergeland**, din ekspertise på antistoffer, verdifulle og faglige råd under skriveprosessen, og ikke minst for å utfordre og ha troen på meg – tusen takk! Jeg vil også si tusen takk til **Karine Drønen** (UiB). Du har støttet opp med faglig engasjement, ideer og råd. Tusen takk for gode samtaler, latterfylte øyeblikk, all tiden du har brukt på retting og for å ha øye for detaljer.

Videre vil jeg takke **Anne Berit Olsen** (VI) for dine faglige vurderinger, konstruktive spørsmål og gode råd – det har vært en bratt, men fin læringskurve!

En stor takk også til **Irene Roalkvam** for hjelp med amplitkonanalyser og retting av oppgave. Takk til **Harald Lunde** (UiB) for grundig og god hjelp på lab med antistoffene, og takk til **Håkon Dahle** (UiB) for utføring av bioinformatikk. Takk til MONITOR-prosjektet og ERKO Settefisk AS sitt postsmolt RAS-anlegg for tilgang på fisk og nødvendig informasjon om driftsdata.

Til alle dere fantastiske mennesker på VI, *tusen takk* for at dere har gjort min tid som masterstudent så fin! Selv om jeg har vært alene om å være student hos dere, har jeg aldri følt meg alene. Hver dag har vært fylt med glede, latter og gode samtaler, med et ønske om å komme tilbake dagen etter. En ekstra takk til **Kari Sandnes** for din raushet og omsorg. Og spesielt en *stor* takk til **Torill Thoreby Jensen**. Din kompetanse, tålmodighet og raushet har gjort det mulig for meg å gjennomføre laboratoriarbeid hos dere.

Til slutt vil jeg takke min fine familie, mine nydelige venner og fantastiske kjæreste – TUSEN TAKK for at dere har støttet meg og holdt ut med meg gjennom studietiden. Uten dere hadde jeg ikke klart det. Helt til slutt; Anne, Kristense, Nina og Elisabeth, uten dere hadde ikke tiden på fiskehelse vært den samme.

Iselin Lillevik Møllerstuen

## Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	III
Forord .....	IV
Ordforklaringer.....	VIII
Forkortelser .....	IX
1 Introduksjon .....	1
1.1 Produksjon av laksefisk i Norge.....	1
1.2 Produksjon i resirkulerende akvakultursystem (RAS).....	2
1.3 Hud og hudhelse hos laks.....	4
1.4 Sår og sårheling .....	7
1.4.1 Overflatesår i hud hos laks .....	7
1.4.2 Sårbakteriene <i>Moritella viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> spp.....	8
1.4.3 Mekaniske hudskader og sår .....	9
1.4.4 Sårheling.....	10
1.5 Spesifikk bakgrunn for masteroppgaven.....	12
1.6 Målsetning .....	12
2 Materiale og metoder.....	14
2.1 Prøvemateriale fra RAS-anlegget.....	14
2.1.1 Om postsmolt RAS-anlegget.....	14
2.1.2 Prøvemateriale fra fisk i et kommersielt RAS-anlegg.....	15
2.2 Prøvemateriale med kjent infeksjonsårsak, fra laks i tradisjonelle sjømerder .....	20
2.3 Prøvemateriale brukt som test/kontroller til IHK.....	20
2.4 DNA-ekstraksjon fra vevsprøver.....	22
2.5 PCR, amplikonbibliotek og gelelektroforese .....	22
2.6 Sekvensering, bioinformatikk og databehandling.....	25
2.7 Histologi .....	26

2.8 HE-farging.....	26
2.9 Immunhistokjemi .....	27
2.9.1 Antistoff til bruk i immunhistokjemi .....	27
2.9.2 Isolering av antistoff ved hjelp av protein G-kolonne og affinitetskromatografi....	29
2.9.3 Kvantitering av antistoff.....	30
2.9.4 Protokoll for immunhistokjemi .....	31
2.9.5 Optimalisering av immunhistokjemisk metoder med monoklonale antistoffer .....	33
2.10 Mikroskopering .....	34
2.11 Utarbeidelse av et histopatologisk scoringssystem for sår hos laks.....	34
3 Resultater.....	38
3.1 Driftsdata og fysiokjemiske parametere fra RAS-anlegget.....	38
3.1.1 Dødelighet av fisk .....	43
3.2 Histologiske analyser .....	43
3.2.1 Histologi fra fisk i RAS-anlegget.....	44
3.2.2 Histologi fra fisk i sjømerder.....	47
3.3 Optimalisering av immunhistokjemiske metoder.....	50
3.3.1 Isolering av antistoff.....	50
3.3.2 Antistoff C7G7 .....	51
3.3.3 Antistoff C4B6 .....	51
3.3.4 Anti-PCNA.....	52
3.4 Immunhistokjemi med monoklonale antistoff på prøver fra RAS og sjømerder.....	53
3.4.1 Antistoff C4B6 .....	53
3.4.2 Anti-PCNA.....	54
3.5 Immunhistokjemi med polyklonale antistoff på prøver fra RAS- og sjømerder.....	54
3.5.1 <i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> sp. i prøver fra RAS-anlegget.....	54
3.5.2 <i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> sp. i prøver fra sjømerder.....	55
3.6 Amplikonanalyse.....	62
3.6.1 Resultat fra amplikonanalyse .....	62
3.6.2 Resultat fra tillaging av amplikonbibliotek.....	62
4 Diskusjon.....	65

4.1 Sammenstilling av driftsdata og vannkvalitetens påvirkning på hudhelse.....	65
4.2 Etablering av et scoringssystem for sår.....	67
4.3 Optimalisering av immunhistokjemiske metoder med monoklonale antistoff .....	69
4.4 Sammenstilling av histologieresultatene for sjø og RAS.....	70
5. Oppsummering og fremtidige perspektiver.....	76
Litteratur.....	78
Vedlegg .....	86
Vedlegg 1: Protokoll for immunhistokjemi.....	86
Vedlegg 2: Veiledende vannkvalitetsparametere .....	86
Vedlegg 3: PCR-produkter.....	87
Vedlegg 4: Sekvenseringsrapport.....	88
Vedlegg 5: Scoringsskjema.....	89

## Ordforklaringer

*Salmo salar* L., atlantisk laks og laks: Foruten om i oppgavens tittel, vil *Salmo salar* L. og Atlantisk laks fra nå av omtales «laks».

Relativ forekomst: Forekomsten av en spesifikk bakterie i én prøve.

16 rRNA gene: Liten ribosomal ribonukleinsyre enhet (den minste av de to store RNA komponentene i ribsomet). Brukes til taksonomisk karakterisering av mikroorganismer.

Semi-kvantitativ metode: Metode som kan gi kvantitativ informasjon, men uten den statistiske nøyaktigheten en kvantitativ metode vil ha, men et grundig innblikk i problemstillingen.

Modul 2: Én modul med fire fiskekar. Modulen har to separate resirkuleringssystem (RAS) med separate målinger av vannkvalitet. Når det henvises til vannkvalitetsparametere fra modul 2, vises det derfor til RAS1 eller RAS2 for å definere hvilket resirkuleringssystem det er snakk om. For dødelighetsdata og prøver fra fisk skilles det ikke mellom RAS1 og RAS2.

## **Forkortelser**

AOB: ammonium-oksiderende bakterier

AU: absorbanse enhet (absorbance unit)

Dpw: dager etter sårdannelse (days post wounding)

HE: hematoxylin og eosin

Ig: immunoglobulin

IHK: immunhistokjemi

ml: milliliter

n = antall

OD: optisk tetthet (optical density)

OTU: operational taxonomic unit (her gruppe av sekvenser med >97% likhet).

PCNA: proliferative cell nuclear antigen

PU: produksjonsuke

RAS: resirkulerende akvakultursystemer

SE: standardfeil (standard error)

TAN: total ammonium nitrogen

UiB: Universitet i Bergen

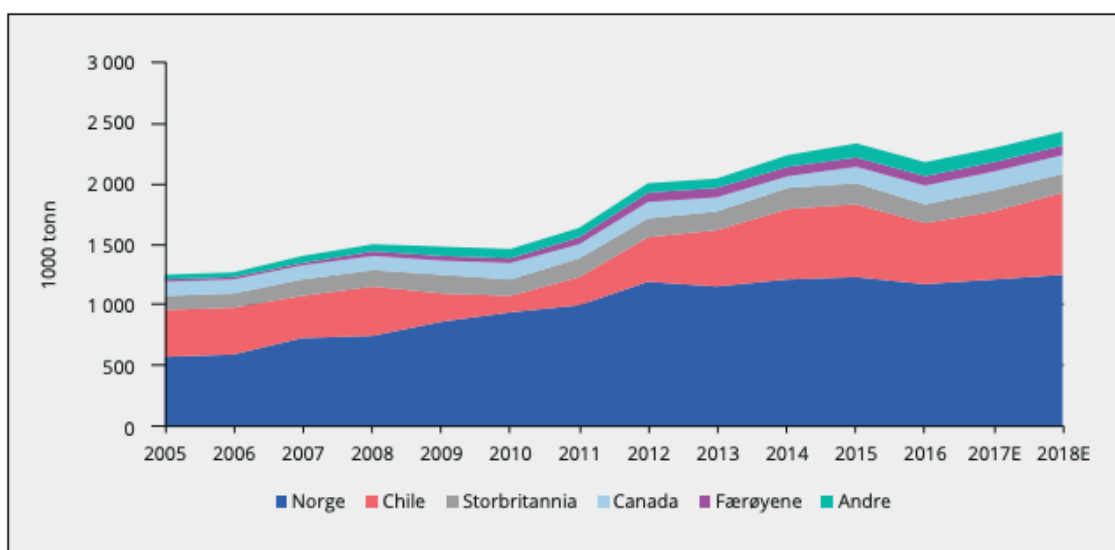
VI: Veterinærinstituttet i Bergen

µl: mikroliter

# 1 Introduksjon

## 1.1 Produksjon av laksefisk i Norge

I norsk akvakulturnæring ble det i 2018 produsert 1 354 939 tonn sjømat, hvorav 94,6 % av produksjonen var laks (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) og 5,0 % var regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Statistisk sentralbyrå, 2019). Dette gjør Norge til den ledende produsenten av laks på verdensbasis (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019) (figur 1). I 2019 hadde norsk sjømatnæring en eksportverdi på 107,3 milliarder kroner og var eksportnasjon nummer to etter Kina (Food and Agriculture Org. of the United Nations, 2018; Norges Sjømatråd, 2020; Nærings- og fiskeridepartementet, 2019). Produksjonen av laks utgjør en viktig del av norsk økonomi, og sammen med annen sjømat inngår det som en sentral del av FNs bærekraftsmål (FN, 2020; Nærings- og fiskeridepartementet, 2019). I sammenheng med dette har regjeringen som mål å øke produksjonen av laksefisk til nærmere 5 millioner tonn frem mot 2050 (Olafsen, Winther, Olsen & Skjermo, 2012; Takle et al., 2015).



**Figur 1:** Utviklingen av den globale produksjonen av laks (*Salmo salar* L.) i årene 2005-2018. Figuren viser landene som har høyest produksjon av laksefisk. Kilde: (NOU 2019: 18, 2019)

Produksjonsveksten skal bidra til verdiskaping og foregå innenfor bærekraftige rammer for å bevare havets ressurser (Nærings- og fiskeridepartementet, 2019; Veterinærinstituttet, 2018). Bærekraftige rammer innebærer en etisk forsvarlig produksjon der god dyrevelferd skal fremmes, uavhengig av nytteverdien (Dyrevelferdsloven, 2009) og miljøindikatorer benyttes for å regulere vekst (Produksjonsområdeforskriften, 2017). Som miljøindikator brukes lakselus (*Lepophtheirus salmonis*), en ektoparasitt som fester seg og beiter på huden hos



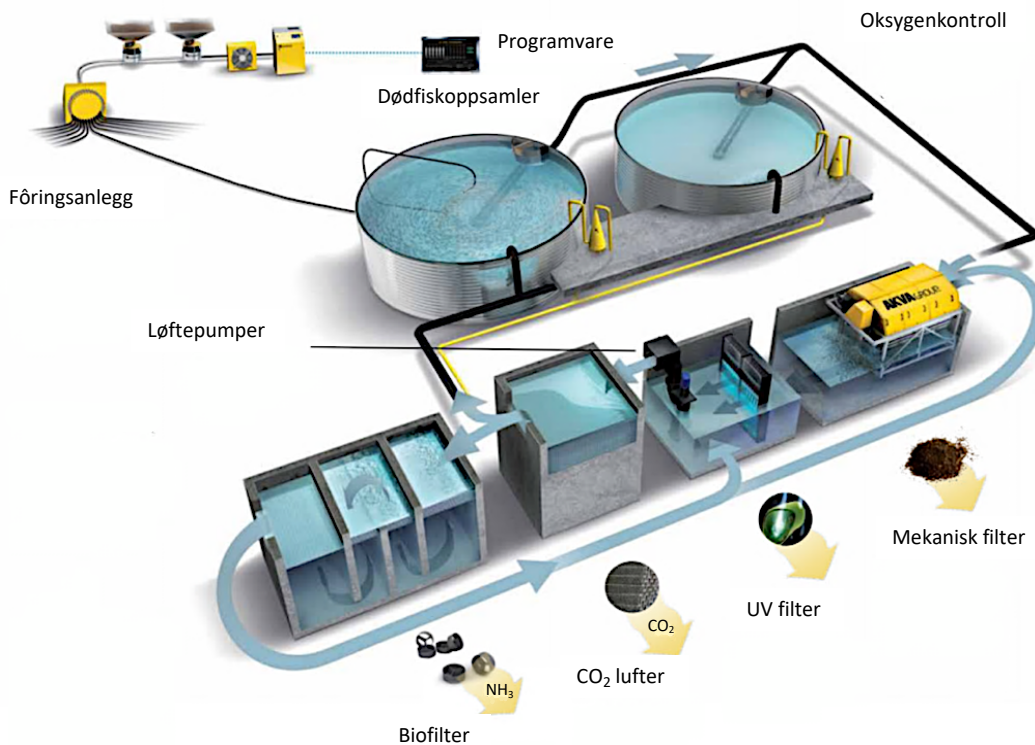
laksefisk og på den måten forårsaker sår og tap av hud (Overton et al., 2018; Takle et al., 2015). Brudd i hudbarrieren er en innfallsport for bakterieinfeksjoner som kan komme sekundært. Lakselusa er en av næringens største utfordringer, den medfører store helse- og velferdsmessige konsekvenser for laksen (Mordue & Birkett, 2009; Overton et al., 2018; Veterinærinstituttet, 2019), og koster i tillegg den norske oppdrettsnæringen rundt 5 milliarder kroner årlig (Iversen, Hermansen, Nystøyl & Hess, 2017; Overton et al., 2018). I praksis reguleres produksjonsveksten gjennom «trafikklyssystemet», et system som vurderer risikoen for dødelighet hos villaks som følge av smitte med lakselus i oppdrettsnæringen (Sommerset et al., 2020).

Det har blitt større fokus på å utvikle storsmoltproduksjon i lukkede anlegg med sjøvann for å forkorte produksjonstiden i sjø. Dette kan bedre fiskehelse og -velferd, ved at smittepresset fra bakterier, virus og parasitter hos både oppdrettslaks og villaks, reduseres (Klakegg, Abayneh, Fauske, Fulberth & Sorum, 2019; Sommerset et al., 2020). Tradisjonelt har laks blitt produsert i settefiskanlegg med gjennomstrømningssystemer i ferskvann, og videre i sjøanlegg med åpne merder frem til slakt (Hjeltnes, Bang-Jensen, Bornø, Haukaas & Walde, 2019; Sveen, 2018). RAS-anlegg kan redusere helsemessige konsekvenser og gi økt kontroll på produksjonen gjennom kontinuerlig overvåking og regulering av vannkvalitet, men også føre til nye utfordringer, særlig knyttet til høyere salinitet og toksiske nivåer av hydrogensulfid (H<sub>2</sub>S). Det vises til at flere fiskehelsetjenester i 2017 og 2018 meldte fra om bakterielle hudinfeksjoner og sår i RAS-anlegg knyttet til bruk av sjøvann (Hjeltnes et al., 2019). Det rapporteres også fra felt om gjentakende problemer med skjellødem som forårsaker skjelltap (Fremtidens smoltproduksjon, 2020). God vannkvalitet er avgjørende for god fiskehelse (Hjeltnes et al., 2019), og det trengs mer kunnskap om hvordan produksjonen i resirkuleringsystemer påvirker huden og helsen til laks i settefisk- og postsmoltfasen (Hjeltnes et al., 2019; Takle et al., 2015).

## **1.2 Produksjon i resirkulerende akvakultursystem (RAS)**

RAS er lukkede, landbaserte anlegg som brukes til produksjon av oppdrettsfisk (figur 2). For oppdrett av laks kan RAS-anlegg benyttes både på settefiskstadiet og for postsmolt. Postsmolt produseres i RAS med sjøvann og gjør det mulig å forlenge produksjonstiden på land og det kan produseres laksefisk opp til én kilo (Hjeltnes et al., 2019). RAS baserer seg på behandling av vann og resirkulering av opp til 100 % av vannet (Iversen, Andreassen, Hermansen, Larsen & Terjesen, 2013; Sveen et al., 2016). Slike oppdrettssystemer gjør det enklere å kontrollere

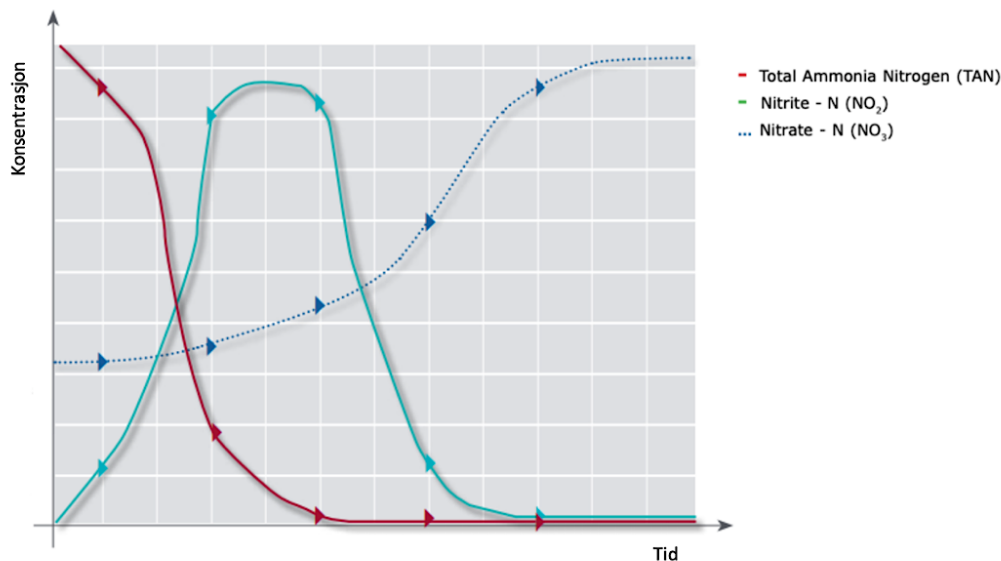
fysiokjemiske parametere som temperatur, oksygen ( $O_2$ ), karbondioksid ( $CO_2$ ), ammoniakk ( $NH_3$ ) og pH. Dette er faktorer som er svært sentrale for både fiskevelferd og vekst hos fisken (Bjerkestrand, Bolstad & Hansen, 2013; Bregnballe, 2015; Terjesen et al., 2013).



**Figur 2:** Resirkulerende akvakultursystemer (RAS). Figuren viser en generell oppbygging, den kan variere mellom leverandører og anlegg. Modifisert etter AKVA group (u.å.-b).

RAS er avanserte teknologiske systemer som krever kontinuerlig overvåking og oppfølging. Ved gjenbruk av vann må avløpsvannet behandles før det går tilbake til fisken. Første trinn er et mekanisk filter som fjerner organisk materiale (figur 2). Deretter kan vannet gå videre gjennom et UV-filter som inaktiverer eller dreper patogener. I tillegg til, eller i stedet for UV, brukes også ozon ( $O_3$ ) for desinfeksjon og forbedret vannkvalitet (Fjellheim, Hess-Erga, Attramadal & Vadstein, 2016; Gonçalves & Gagnon, 2011; Summerfelt, 2003). Organisk materiale som ikke fjernes i det mekaniske filteret, brytes videre ned i biofilteret av heterotrofe bakterier (Fjellheim et al., 2016). Nedbrytningen av organisk materiale frigir ammoniakk, som også er et viktig ekskresjonsprodukt fisken skiller ut over gjellene. Ammoniakk kan foreligge i to tilstandsformer, enten som uionisert form ( $NH_3$ ), som er giftig for fisken, eller som den ioniserte formen ammonium ( $NH_4^+$ ). Forholdet mellom disse styres av pH. Summen av de to tilstandsformene kalles total ammonium nitrogen (TAN) og benyttes til å måle om det er giftige nivåer av  $NH_3$  i vannet. Via en mikrobiell to-steps

nitrifikasjonsprosess (figur 3) i biofilteret omsettes ammonium til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). I det første steget omdanner ammonium-oksiderende bakterier (AOB) (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* og *Nitrospira*) ammonium til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ). Deretter omdanner nitritt-oksiderende bakterier (NOB) (*Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospina* og *Nitrospira*) nitritt til nitrat (Bjerknes & Liltved, 2007; Fjellheim et al., 2016; Schroeder et al., 2015). For å oppnå en optimal nitrifikasjonsprosess bør pH ligge på rundt 7,5 (Fjellheim et al., 2016). Produksjonsvannet inneholder et høyt nivå av  $\text{CO}_2$ , som i likhet med ammonium skilles ut fra fisken og gjør vannet surere. For å opprettholde en stabil pH degasses avløpsvannet gjennom lufting og det tilsettes natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Bjerknes & Liltved, 2007; Fjellheim et al., 2016). Vannet sendes gjennom  $\text{CO}_2$ -luftere for å øke kontaktflaten mellom vann og luft. Til slutt tilsettes oksygen til vannet, før det går tilbake til karet. Oppbygningen av RAS-anlegg og graden av resirkulering kan variere mellom anlegg, avhengig av behov og produsent (Bjerkestrand et al., 2013; Bregnballe, 2015).



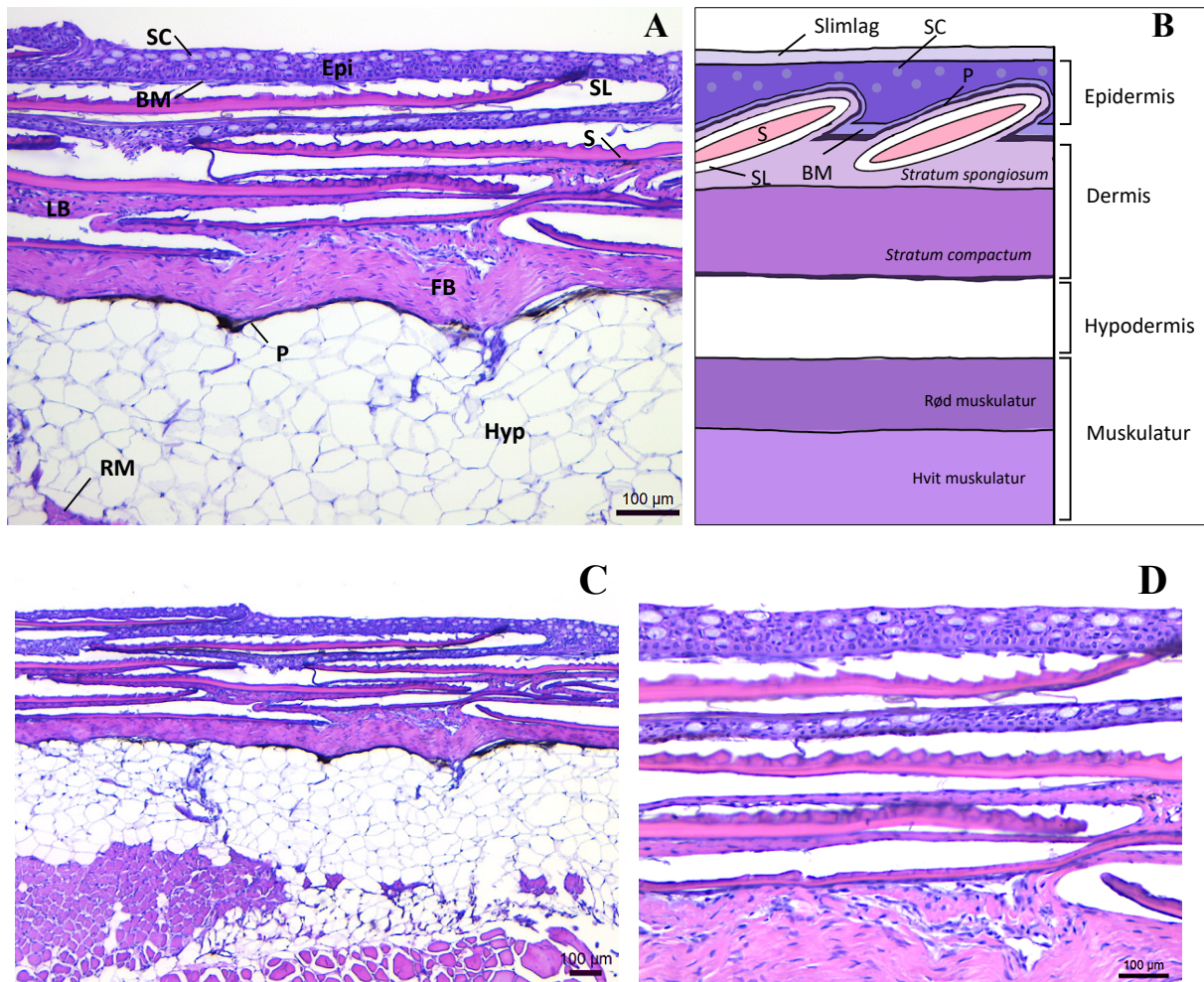
**Figur 3:** Illustrasjon av to-stegs nitrifikasjonsprosess. Omdannelsen av ammonium (TAN) til nitritt og nitrat skjer gradvis (AKVA group, u.å.-a).

### 1.3 Hud og hudhelse hos laks

Intakt hud er viktig for å opprettholde homeostase og gi beskyttelse mot patogener. Huden er en flerlaget fysisk barriere som skiller det indre miljøet i kroppen fra de ytre omgivelsene. Hudlaget er bygget opp av epidermis med et tynt slimlag utenpå, under epidermis ligger

dermis og deretter hypodermis med tilstøtende rød og hvit muskulatur (Esteban, 2012) (figur 4).

Slimcellene finnes i hele epidermis, men tettheten av slimceller er størst i dorsale og dorsolaterale regioner på fisken, altså på ryggen og ryggside, der behovet for slim er størst. Den anteriore regionen (hoderegionen) og den kaudale regionen (haleregionen) har lavest tetthet med slimceller (Kryvi & Poppe, 2016; Pickering, 1974; Pittman et al., 2013). Mengden slimceller påvirkes også av fiskens livsstadium, kjønn, ernæring og vannstrøm. Gjennom forsøk har det blitt sett at mengden slimceller avtar med inntil 50 % under smoltifisering (O'Byrne-Ring, Dowling, Cotter, Whelan & Macevilly, 2003). Slimcellene produserer og frigjør slim som fordeler seg utover hele hudens overflate og danner et slimlag. Slimlaget er sammen med hudens kommensale mikrobiota en viktig del av laksens førstelinjeforsvar mot patogener og andre mikroorganismer. Slimlaget er med på å fange opp, immobilisere og hindre patogener og andre mikroorganismer i å etablere seg på huden (Esteban, 2012). I tillegg er slimlaget med på å beskytte mot mekaniske skader og å bevare osmoregulatoriske funksjoner (Kryvi & Poppe, 2016). Slimcellene inneholder immunologiske komponenter som er en del av både det innate og det adaptive immunforsvaret hos laksen. Disse komponentene er humorale komponenter som glykoproteiner, lektiner, enzymer, antimikrobielle peptider og immunoglobuliner (Ig, antistoff) (Esteban, 2012; Magnadóttir, 2006). Antistoff produseres og skilles ut fra B-celler og hos teleoster er det identifisert tre isotyper; IgM, IgT og IgD (Mashoof & Criscitiello, 2016; Murphy & Weaver, 2017). IgM er det dominerende antistoffet hos fisk og bidrar både i det medfødte og ervervede immunforsvaret. Det finnes naturlig i serum og slim hvor fire monomerer danner en tetramer (hos pattedyr er det et pentamer). IgM finnes også som membranbundet monomer på overflaten av B-celler. IgT finnes i slim og serum og ser ut til å være knyttet til immunresponser i slim hos laks. IgD har blitt identifisert hos ørret, men ikke hos laks (Hordvik, 2015).



**Figur 4:** Oppbygging av hudlaget hos laks (*Salmo salar*). Hudlaget består av epidermis, dermis og hypodermis med tilstøtende skjelettmuskulatur (A-D). A) Epidermis (Epi) med slimceller (SC) og tilstøtende basalmembran (BM), løst bindevev (LB) og fast bindevev (FB) som sammen danner dermis. I dermis ligger også skjell (S) i skjellommer (SL). Under dermis ligger hypodermis (Hyp), ofte med et pigmentlag (P) imellom. Dypere ligger skjelettmuskulatur (RM, rød muskulatur) (x100). B) Skjematisk fremstilling av hudlagene. C) Hudlagene hos laks, inkludert rød og hvit skjelettmuskulatur (x50). Figur D) Øvre hudlag; epidermis med slimceller, dermis og skjellommer med skjell (x200). Foto og illustrasjon: Iselin Lillevik Møllerstuen.

Epidermis, et flerlaget plateepitel, er det ytterste hudlaget hos laks og de fleste andre teleoster.

Epidermis består av epidermisceller, pigmentceller og slimceller (figur 4 A-D).

Epidermisceller kalles noen steder i litteraturen for keratocytter. Epidermisceller hos laks inneholder ikke et ytre keratinisert lag av døde celler (Kryvi & Poppe, 2016) og for å unngå forvirring vil «epidermisceller» bli brukt i denne oppgaven. Epidermiscellene utgjør størsteparten av epidermis og er bundet sammen av desmosomer og tilhørende cytoskjelett.

Denne oppbygningen gir epidermis en sterk mekanisk styrke (Esteban, 2012; Kryvi & Poppe, 2016). Tykkelsen på epidermis varierer ut ifra lokasjon på kroppen og fiskens størrelse, og kan være fra noen få til mer enn 20 celledag tykt (Karlsen et al., 2018b; Kryvi & Poppe, 2016). Epidermis er tykkere i regioner på kroppen som ikke er dekket av skjell, eksempelvis

hoderegionen og finnene (Elliot, 2011). Epidermiscellene har strukturelle forskjeller ut ifra hvor i epidermis de er plassert (Elliot, 2011). Epidermis kan deles inn i tre lag fra ytterst til innerst; *stratum superficiale*, *stratum spinosum* og *stratum basale*. *Stratum superficiale*, det ytterste laget, består av slimceller og kubiske epidermisceller (Takle et al., 2015). I *stratum spinosum* har epidermiscellene en rundere form. Dette laget består i større grad av slimceller enn det ytre laget. *Stratum basale*, det innerste laget i epidermis har epidermisceller i mer kubisk fasong og grenser mot en basalmembran i dermis (Elliot, 2011).

Dermis ligger under epidermis og kalles underhuden. Dermis har et ytre lag og et dypere lag, henholdsvis *stratum spongiosum* og *stratum compactum* (figur 4D). Det øverste laget i *stratum spongiosum* er basalmembran som gir tydelig avgrensning mellom epidermis og dermis. Videre består *stratum spongiosum* av løst bindevev satt sammen av en stor variasjon med celler. Det løse bindevevet er satt sammen av kollagenfibre, fibroblaster, pigmentceller, fagocytiske celler, skjellproduserende celler (osteoblaster og osteoklaster) og skjell. *Stratum compactum* har en mer ordnet og kompakt struktur enn *stratum spongiosum*. Kollagenfibrene ligger lagvis i motsatt retning og danner fast bindevev som gir både styrke og fleksibilitet til fisken (Elliot, 2011; Kryvi & Poppe, 2016; Takle et al., 2015). Under dermis ligger hypodermis som en avgrensning til den underliggende skjelettmuskulaturen (Elliot, 2011) (figur 4A, B og D). Hypodermis består av løst bindevev og fettceller (Kryvi & Poppe, 2016).

Skjellene er med på å dekke og beskytte huden hos fisk. De består av benvev og et delvis mineralisert ytre lag. Skjellene er organisert slik at de overlapper hverandre og ligger på skrått i skjellommer i dermis. Hvor dypt skjellene ligger i dermis varierer, men de ligger slik at de dekkes av epidermis (Kryvi & Poppe, 2016; Sire & Akimenko, 2004; Sire, Allizard, Babiar, Bourguignon & Quilhac, 1997; Takle et al., 2015).

## **1.4 Sår og sårheling**

### **1.4.1 Overflatesår i hud hos laks**

Sår er en av de viktigste årsakene til tap av fisk i oppdrettsnæringen (Aunsmo et al., 2008; Takle et al., 2015). I følge en spørreundersøkelse gjort i regi av VI, meldes det om at håndtering, medikamentfrie avlusninger og sår er noen av de vanligste årsakene til nedsatt fiskevelferd og økt dødelighet i oppdrettsnæringen (Sommerset et al., 2020). Ulike faktorer innen håndteringsprosesser og oppdrettsforhold kan altså påvirke hverandre, og sår på huden



til fisken kan oppstå som følge av mekaniske skader og gi grobunn for en bakteriell infeksjon som kommer sekundært (Takle et al., 2015). Et utbredt problem assosiert med en bakteriell infeksjon, er klassisk og atypisk vintersår som ofte observeres i vintermånedene når vanntemperaturen er under 8°C (Lunder, Eversen, Holstad & Håstein, 1995; Olsen et al., 2011).

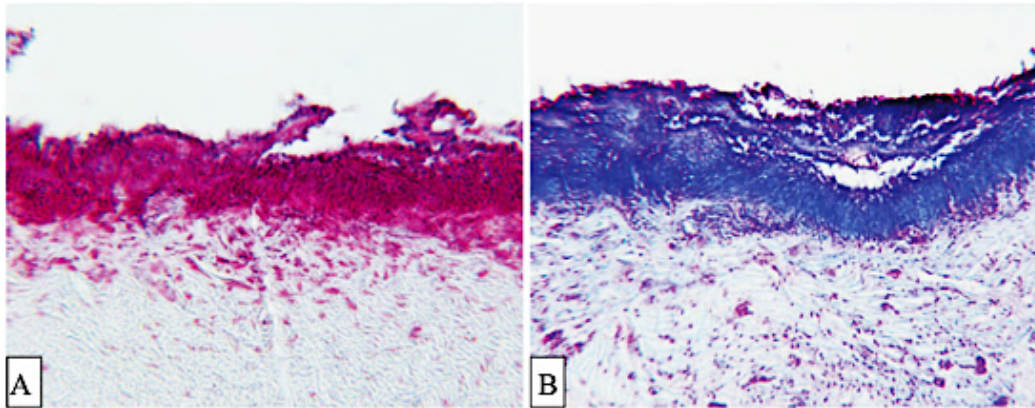
#### **1.4.2 Sårbakteriene *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* spp.**

Bakteriene *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. assosieres med sårutvikling og da henholdsvis til klassisk og atypisk vintersår. I oppdrettsnæringen utgjør begge et alvorlig fiskehelse- og velferdsproblem, men de kan også føre til store økonomiske tap gjennom redusert slaktekvalitet (Løvoll et al., 2009; Sommerset et al., 2020; Takle et al., 2015).

*M. viscosa* er en bevegelig Gram-negativ stavbakterie og er regnet som det etiologiske agenset til «klassisk» vintersår (figur 5-B). Sykdommen kjennetegnes av runde eller ovale sår langs siden på fisken og rammer laksefisk i oppdrett, hovedsakelig laks i kaldt sjøvann (Lunder et al., 1995; Roberts, 2012). Dødeligheten ligger på <10% under et utbrudd og ved temperaturer over 8°C går dødelighetsraten ytterligere ned (Bruno, Noguera & Poppe, 2013; Lunder et al., 1995; Løvoll et al., 2009).

*Tenacibaculum* sp. er lange slanke trådlignende Gram-negative stavbakterier som observeres alene eller sammen med *M. viscosa* i hudsnitt fra klassiske vintersår (Olsen et al., 2011; Roberts, 2012). Bakterier i denne gruppen er også assosiert med «tenacibaculose» eller «atypisk vintersår», som karakteriseres av dype hemoragiske sår i kjeve- og hoderegionen. Tenacibaculose kan medføre høy dødelighet hos smolt etter sjøsetting (Sommerset et al., 2020; Takle et al., 2015). Histopatologisk sees disse bakteriene som tykke lag i hudår og gjerne i de øvre delene av såret. Tettheten av bakterier i sårene kan være høy og de er gjerne orientert i samme retning som kollagenfibrene (figur 5-A). Noen bakterier kan også observeres i muskulaturen, men med lavere tetthet (Bruno et al., 2013; Olsen et al., 2011; Sommerset et al., 2020). Genetiske studier av disse bakteriene viser at det er flere arter med undergrupper som isoleres fra sår hos laksefisk. Vanlige forekommende er *Tenacibaculum finnmarkense* (Småge, 2018) med to nylig foreslåtte undergrupper *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* og *T. finnmarkense* genomovar *ulcerans* (Olsen et al., 2011; Olsen et al., 2020), samt en ny art med foreslått navn *T. piscium* sp. nov. (Olsen et al., 2020). I

tillegg er *Tenacibaculum dichentrarchi* rapportert fra et utbrudd med sår i et landbasert postsmoltanlegg (Klakegg et al., 2019).



**Figur 5:** A) Bildet viser positiv immunhistokjemisk farging med antiserum rettet mot *Tenacibaculum* sp. Bakteriene er farget rød. B) Bildet viser immunhistokjemisk farging med antiserum mot *M. viscosa* (også farget rødt). Begge bildene er fra samme sår hos laks. Bildet er hentet fra Olsen et al. (2011).

### 1.4.3 Mekaniske hudskader og sår

Mekaniske hudskader er forstyrrelser i hudens integritet, uten at det har en patologisk etiologi (Sveen, Karlsen & Ytteborg, 2020; Vågsholm & Djupvik, 1998). Hudlesjoner kan defineres som tap av skjell med eller uten misfarging av huden, blødninger i huden eller sår som omfatter hele eller deler av hudvev (epidermis, dermis og tilstøtende skjelettmuskulatur) (Vågsholm & Djupvik, 1998). Mekaniske hudskader hos oppdrettsfisk kan skyldes flere potensielle faktorer gjennom produksjonssyklusen. Risikofaktorene kan knyttes til ulike håndteringsprosesser i både settefisk- og i sjøfasen; vaksinerings, håving, pumping i forbindelse med sortering eller flytting av fisk, transport og ulike avlusningsregimer (Segner et al., 2011). Slike håndteringsprosesser fører ofte til trenging og panikkatferd, som igjen øker risikoen for fysiske traumer som slag, finne- og gjelleskader og sår på huden (Noble et al., 2012; Noble et al., 2018; Norwegian Veterinary Institute, 2012). Skader på fiskens ytre barrierer fører til osmoregulatorisk ubalanse, reduksjon av immunologiske funksjoner og en mindre robust fisk (Grimnes & Jakobsen, 1996). Håndteringsprosesser der fisk er utsatt for skader og stress fører til nedsatt fiskehelse og -velferd.

Produksjon i RAS-anlegg gir bedre kontroll på biosikkerhet og vannkvalitet, men det er også usikkerhet knyttet til hvordan produksjonen i RAS påvirker fiskens helse. Høye CO<sub>2</sub>-nivåer, for høy vannstrøm eller tetthet kan ha negativ effekt på huden og kan føre til et tynnere hud- og slimlag, som igjen gjør fisken mindre robust og mer utsatt for håndteringsskader og



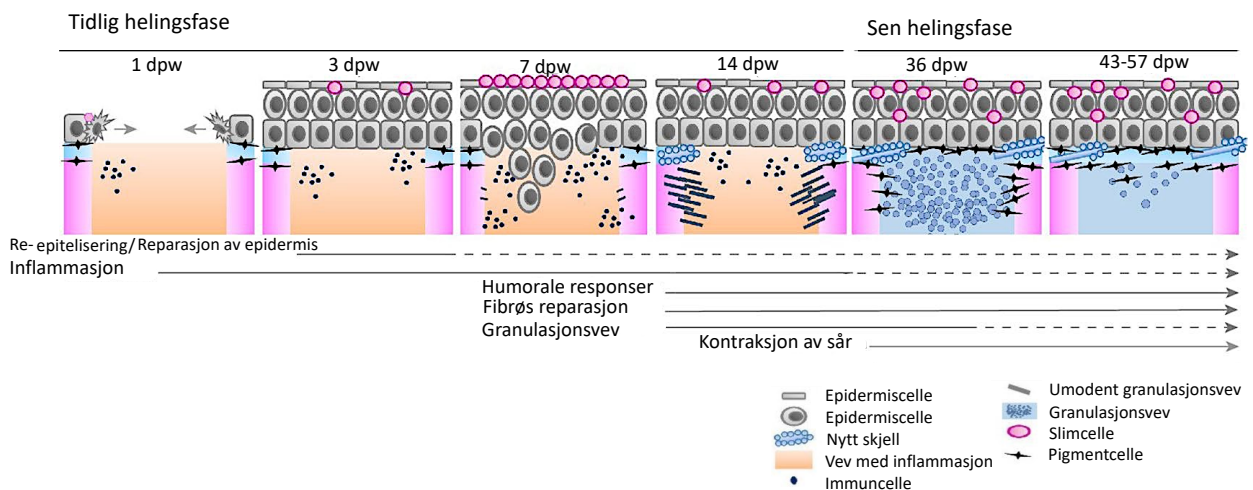
sykdom (Liu, Liu & Sun, 2017; Mota et al., 2019; Ytrestøyl et al., 2020). Suboptimale forhold over tid kan være en trigger til stress og forårsake kompromiss mellom energikrevende prosesser hos fisken som forstyrrelser i indre homeostase og immunologiske responser. Dette kan videre forårsake nedsatt funksjon i primære epitelbarrierer som hud, gjeller og tarm (Segner et al., 2011). Alt i alt fører dette til dårligere fiskevelferd, som medfører redusert vekst og økt risiko for sykdom og dødelighet (Noble et al., 2012; Vågsholm & Djupvik, 1998).

#### **1.4.4 Sårheling**

Prosessen for sårheling hos fisk varierer med faktorer som fiskeart, sårets størrelse og dybde, ernæringsstatus, stress og miljøfaktorer (f.eks. vanntemperatur, organisk materiale, pH) (Jensen et al., 2015). Fisk er ektoterme og påvirkes i større grad av temperaturen i omgivelsene enn pattedyr. I øvre ytterkant av artens temperaturområde får enkelte celletyper økt aktivitet ved sårheling (Bullock, Marks & Roberts, 1978; Ream, Theriot & Somero, 2003). Lave temperaturer har derimot vist seg å senke hastigheten på sårheling (Jensen et al., 2015). Sårets omfang er også en sentral del av sårhelingen, hvorav dype sår kan involvere tap av både epidermis, dermis og skjell. Et omfattende tap av hudvev kan føre til nedsatt og langsommere regenerering av vev (Richardson et al., 2013; Takle et al., 2015).

Sårhelingen kan deles inn i flere faser som kan overlappe hverandre noe. Den første fase er reepitelisering, deretter inflammasjon, dannelse av granulasjonsvev, sammentrekning av sår og omdannelse av granulasjonsvev (Richardson et al., 2013). Den tidlige fasen av sårhelingsprosessen starter med reepitelisering umiddelbart etter sårdannelse (figur 6). I denne fasen migrerer både epidermisceller, slimceller og pigmentceller til sårområdet fra omkringliggende hud. Migreringen av celler gjør at hudområdene rundt blir tynnere. I begynnelsen av den tidlige fasen starter også inflammasjonsprosessen med inflammatoriske celler (leukocytter). Nøytrofile granulocytter er de første leukocytene som blir rekruttert til et inflammatorisk område. De produseres i hodenyre og milt og migrerer gjennom blodet og til det inflammatoriske området (Havixbeck & Barreda, 2015). Makrofager, en annen type leukocytt, er modne monocytter som også raskt rekrutteres ved inflammasjon. Makrofagene er fagocytterende celler og er sammen med nøytrofile, viktige celler ved inflammasjon, reparasjon og infeksjon av patogener. Rekrutteringen av disse cellene er en del av det medfødte immunforsvaret hos fisken (Murphy, Janeway, Mowat & Weaver, 2012; Sveen et al., 2019). Dendritiske celler er også en del av det medfødte immunforsvaret. De fungerer

som antigenpresenterende celler som knytter det medfødte til det spesifikke immunforsvaret hvor B- og T-lymfocytterne (B- og T-celler) er involvert. Lymfocytterne er de vanligste typen leukocytter og de står for produksjonen av antistoffer (Bassity & Clark, 2012; Jensen et al., 2015; Kryvi & Poppe, 2016; Murphy & Weaver, 2017). Migreringen av celler stanser når hele såret er dekket av nye epidermisceller (Iger & Abraham, 1990). Senere i denne fasen kan det sees at slimceller dekker hele overflaten av de nye epitelcellene. Undervegs i den tidlige sårhelingsfasen er det overlapp fra inflammasjonsfasen til omdannelsen av vev. Det vil være tilstrømming av fibroblaster, dannelse av granulasjonsvev og skjelldannelse. Dannelsen av granulasjonsvev fortsetter i den sene fasen som også karakteriseres av sårkontraksjon. I løpet av den sene fasen aktiveres også det adaptive immunforsvaret til fisken. Dette er i likhet til det medfødte immunforsvaret, en viktig del av bekjempelsen mot patogener i en sårhelingsprosess (Magnadóttir, 2006; Sveen et al., 2019).



**Figur 6:** Sårhelingsprosessens hovedfaser i dype sår hos laks. Tidlig fase består i grove trekk av reepitelisering, inflammasjon, humorale responser og dannelse av granulasjonsvev. Denne fasen varer fra omtrent én dag etter sår dannelse (dpw) til 14 dpw. Den sene fasen innfatter sammentrekning av sår og omdannelse av granulasjonsvevet. Fasen varer fra omtrent 14 dpw til 57 dpw. Basert på sår hos postsmolt oppdrettet på ~10 °C. Figur etter Sveen et al. (2019).

## 1.5 Spesifikk bakgrunn for masteroppgaven

Denne studien inngår i et prosjekt finansiert av Norges forskningsråd: NFR prosjekt nr. 267545 «Adapting monitoring tools for bacterial load detection in closed marine fish farms: for improved fish health and reduced mortalities», MONITOR. Det er et 4-årig prosjekt og er et samarbeid mellom UiB, VI og oppdrettsanlegg som har lukkede produksjonssystemer. Prosjektet kartlegger tilstedeværelsen av bakterier som påvirker miljøet fisken lever i og hvilken betydning dette har for fiskehelse og -velferd. Gjennom prosjektet er det identifisert faktorer knyttet til kjemiske vannparametere, tekniske forhold og driftsmessige forhold i tillegg til forekomst av bakterier. I denne masteroppgaven benyttes prøvemateriale fra sår og tilgjengelig driftsdata fra ERKO Settefisk AS sine postsmolt RAS-anlegg, som i likhet med andre RAS-anlegg, har hatt problemer med sår på fisken. Ved oppstart av anlegget var det store sårutbrudd med >30% tap av fisk, men også ved oppstart av senere produksjonssykluser var det regelmessige tap av fisk i varierende grad. Det benyttes også prøvemateriale fra sår med kjent infeksjonsproblem fra FHF-prosjekt nr. 901434 som omhandler «*Tenacibaculum* spp. som årsak til atypisk vintersår på norsk oppdrettslaks». Hensikten med prøver med kjent infeksjonsproblem var at dette ville være et godt referansemateriale som også var velegnet for opptrening i histologivurderinger.

## 1.6 Målsetning

Målet med denne studien har vært å undersøke sår og sårheling hos laks, og å sammenligne mekaniske sår med sår med kjent infeksjonsproblem, ved bruk av histologiske metoder. Videre var målet å forsøke å utarbeide et scoringssystem for sår som kunne bidra til å semi-kvantifisering av histopatologiske funn og sårenes alvorlighetsgrad, basert på en rekke kriterier.

### Delmål

- Benytte histokjemiske metoder for å sammenligne mulig etiologi, morfologi og eventuelt andre funn i histologisnitt hentet fra de to ulike fiskegruppene.
- Utvikle og tilpasse immunhistokjemiske metoder med spesifikke antistoff rettet mot leukocytter og celleproliferasjon.

- Benytte immunhistokjemiske metoder for å detektere *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. i histologisnitt.
- Utarbeide et scoringssystem for morfologiske endringer i histologisnitt av sår, for å systematisere og semi-kvantifisere funn.
- Benytte amplikonanalyse som molekylærbiologisk metode for å se på relativ forekomst av bakterier.

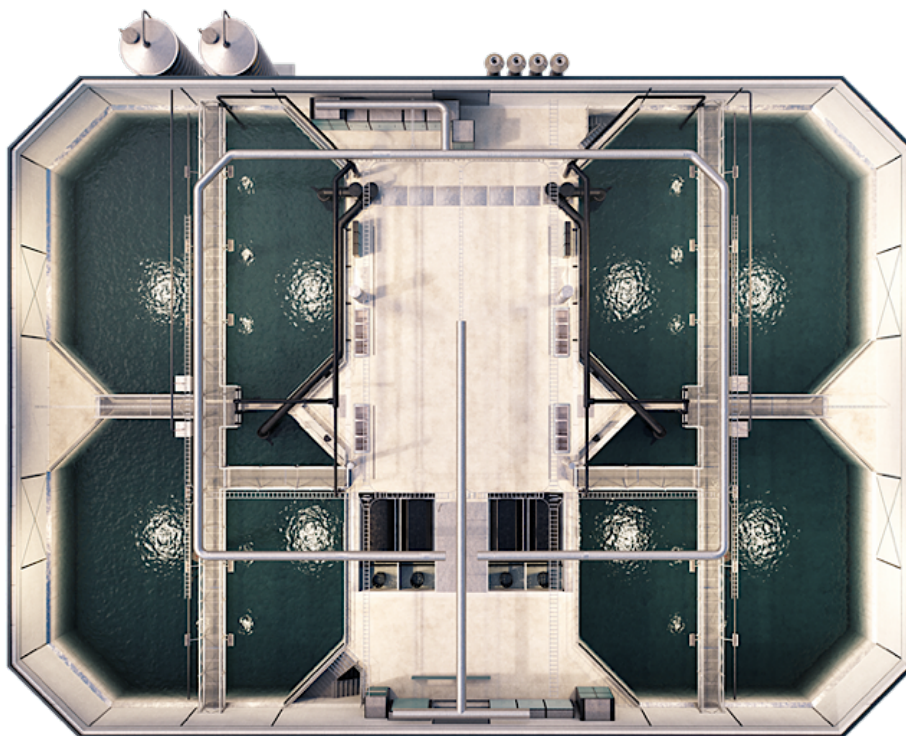
## 2 Materiale og metoder

Prøvematerialet omfatter prøver fra to ulike grupper. Den ene gruppen var prøver hentet fra postsmolt laks oppdrettet i RAS, der det var mistanke om mekaniske skader som årsak til sår. Den andre gruppen var fra laks med sår, oppdrettet i tradisjonelle åpne sjømerder, der kjent bakteriell infeksjon var antatt å være årsak til sår dannelse. Prøvematerialet og RAS-anlegget vil bli videre beskrevet i avsnittene under.

### 2.1 Prøvemateriale fra RAS-anlegget

#### 2.1.1 Om postsmolt RAS-anlegget

Prøvene fra fisk i RAS ble tatt fra et kommersielt RAS-anlegg for postsmolt, lokalisert i Vestland fylke. Postsmoltanlegget består av to moduler (modul 1 og modul 2), som hver har fire åttekantede produksjonskar på 1050 m<sup>3</sup> (driftsleder, personlig kommunikasjon, 30. september 2020) (figur 7). Det gjeldende RAS-anlegget for postsmolt hadde et par modifikasjoner i forhold til den generelle beskrivelsen av RAS-anlegg under kapittel «1.2 Produksjon i resirkulerende akvakultursystemet (RAS)». Det var kun spede vannet som gikk gjennom et UV-filter og ikke det resirkulerte vannet, og O<sub>3</sub> ble tilsatt i CO<sub>2</sub>-lufterne. Fisken ble overført fra anlegget sin egen avdeling for settefisk til postsmoltanlegget i løpet av den første uken i februar (produksjonsuke 1 (PU1)), og ble stående til slutten av april. I denne perioden hadde fisken en tilvekst på 100-500 gram, avhengig av modul og kar. Fisken var blitt vaksinert mot *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Listonella anguillarum* serotype O1 og 2a, *Vibrio salmonicida*, *M. viscosa*, infeksjøs pankreasnekrosevirus serotype Sp 0 (IPNV) og salmonid alfavirus subtype 3 (SAV3). Anlegget tar inn sjøvann (>30 ‰) fra 70 meters dyp og kan med tilsetning av ferskvann drifte både med brakkvann (<30 ‰) og sjøvann. Anlegget er designet slik at slam ikke skal hope seg opp og det er prosessstyringsanlegg og alarmfunksjoner som overvåker og gir kontroll over vannkvaliteten i anlegget (Nofitech AS, u.å.). Informasjon om vannkvaliteten for prøvetakingsperioden (PU3 og PU4) ble innhentet fra anlegget samtidig som prøveuttakene ble gjennomført. Vannkvalitetsparametere og antall døde fisk ble registrert daglig for begge modulene. Modul 2 består av to separate systemer og registreringen av vannkvalitetsparametere er derfor delt inn i RAS1 og RAS2. Henvisning til vannkvalitetsparametere for modulen blir herfra omtalt som modul 2 RAS1 eller RAS2. Dødelighetsdataene gjelder for hele modul 2. Modul 1 fikk tilført fisk 1. februar og modul 2 fikk fisk 7. februar.



**Figur 7:** Illustrasjon av et modul RAS-anlegg med fire kar. Illustrasjonen er i stor grad tilsvarende det anlegget det ble hentet prøvemateriale fra, men det anlegget består av to slike moduler. Illustrasjonen er hentet fra Nofitech AS (u.å.).

### 2.1.2 Prøvemateriale fra fisk i et kommersielt RAS-anlegg

Prøvematerialet ble hentet fra laks produsert for kommersiell bruk. Anlegget har hatt gjentakende utfordringer med sårutbrudd i starten av hver produksjonssyklus. I forbindelse med en av produksjonssyklusene ble det hentet ut prøvemateriale ved to tidspunkt i produksjonssyklusen (uttak 1: PU3, uttak 2: PU4). Ved hvert prøveuttak ble det tatt prøver fra fisk med sår og fisk som tilsynelatende var frisk og hadde intakt hud. Den friske fisken ble tatt med som kontroll for intakt og frisk hud. Hvilken fisk som hadde sår og hvilke som var frisk er oppgitt i tabell 1. Fra begge prøveuttakene ble det tatt prøver fra totalt 40 fisk ( $n=40$ ). Ved prøveuttak i PU3 ble det hentet ut fisk fra modul 1 ( $n=4$ ) og modul 2 ( $n=17$ ). På uttakstidspunktet var gjennomsnittsverken 102,8 g i modul 1 og 89,3 g i modul 2. Ved prøveuttak i PU4 ble det hentet ut fisk fra modul 1 ( $n=5$ ) og modul 2 ( $n=14$ ) (tabell 1). Modul 1 hadde da en gjennomsnittsvikt på 123,9g og 107,9g i modul 2. Fisken ble hentet ut ved bruk av håv. Fisken ble avlivet med slag i hodet i henhold til norsk regelverk (Forskrift om bruk av dyr i forsøk, 2017, s. § 16, Vedlegg C).

**Tabell 1:** Prøvematerialet fra RAS-anlegget. Prøvenummer er oversikt over alle (n=40) individene det ble tatt vevsprøver av. Et utvalg prøver (n=20) ble valgt ut til videre arbeid i studien og har fått nye navn (RAS-1 – RAS-20), disse står oppgitt i egen kolonne.

<i>Prøvenummer</i>	<i>Navn på prøver valgt til videre arbeid</i>	<i>Uttak</i>	<i>Modul</i>	<i>Makroskopiske observasjoner</i>
1		1	M1	Sår bak ryggfinne
2	RAS-1	1	M1	Sår midt på
3	RAS-2	1	M1	Sår under ryggfinne
4	RAS-3	1	M1	Sår ved gattet
5	RAS-4	1	M2	Sår på siden
6		1	M2	Byll
7	RAS-5	1	M2	Sår ved hale
8	RAS-6	1	M2	Sår midt på siden
9	RAS-7	1	M2	Sår på siden
10		1	M2	Byll
11		1	M2	Sår på siden
12		1	M2	Sår på siden
13	RAS-8	1	M2	Sår på siden
14		1	M2	Sår
15	RAS-9	1	M2	Sår
16	RAS-10	1	M2	Sår på siden
17	RAS-11	1	M2	Sår på siden
18		1	M2	Sår
19		1	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
20		1	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
21		1	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
1		2	M1	Tilsynelatende frisk, intakt hud
2		2	M1	Sår på siden
3	RAS-12	2	M1	Tilsynelatende frisk, intakt hud
4	RAS-13	2	M1	Tilsynelatende frisk, intakt hud
5	RAS-14	2	M1	Tilsynelatende frisk, intakt hud
6		2	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
7		2	M2	Sår på siden
8	RAS-15	2	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
9		2	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
10		2	M2	Tilsynelatende frisk, intakt hud
11	RAS-16	2	M2	Svimer
12		2	M2	Nylig død
13	RAS-17	2	M2	Nylig død
14	RAS-18	2	M2	Svimer
15		2	M2	Nylig død
16		2	M2	Små sår på siden
17	RAS-19	2	M2	Nylig død, sår på siden
18	RAS-20	2	M2	Sår på siden
19		2	M2	Små sår på siden

### 2.2.1 Prøver til histologi og amplikonanalyse

Ved hvert uttak ble det tatt ut prøver til histologi (n=40) og amplikonanalyse (n=40) fra hver fisk. Vevsbitene til histopatologi ble tatt av hele såret eller fra sårkant (n=29) avhengig av størrelsen på såret, og et utvalg (n=11) ble tatt fra intakt hud på tilsynelatende frisk fisk som kontroller. Vevsbitene ble tatt fra siden på fisken, men med noe variasjon med hensyn på hvor sårene var lokalisert. Sårene varierte i størrelse og alvorlighetsgrad, fra store åpne sår og byller til små blødninger som ble sett som røde prikker i huden (figur 8). Vevsbiter til histopatologi ble lagt i formalin 10% nøytral bufret og merket med individnummer. Videre ble det lagd histologisnitt og utført HE-farging på hver av prøvene (se eget avsnitt om histologi og HE-farging). Det ble lagd tre replikater av hver prøve og disse ble vurdert gjennom mikroskopering. Basert på resultater fra mikroskopering ble det valgt ut 20 snitt (n=20) som det ble arbeidet videre med i prosjektet og utført amplikonanalyse og immunhistokjemi (IHK) på. De utvalgte prøvene fikk nye navn (RAS-1 – RAS-20) og disse navnene er oppgitt i en egen kolonne i tabell 1. Hvilke metoder som har blitt utført på de ulike prøvene er vist i tabell 2.

Prøver til amplikonanalysen var ca 1mm tykk og tatt fra sårkant. Disse prøvene ble ikke tatt fra samme sår som histologiprøvene, men fra samme fisk. Prøvene ble lagt på RNAlater og merket med individnummer og lagt i frys på – 20°C frem til videre behandling. Basert på de 20 (n=20) utvalgte prøvene fra histologi ble det utført amplikonanalyse på 12 (n=12) prøver, hvor både sårfisk (n=8) og tilsynelatende frisk fisk (n=4) var representert.





**Figur 8:** Prøvematerialet fra RAS-anlegget. A) Fisk tatt ut til prøveuttak. Små sår observeres som røde prikker i huden (piler). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen. B-C) Vevsbiter som viser små sår. Foto: lupe x40 (Veho DX-1 200x USB 2MP), Karine Drønen.

**Tabell 2:** Oversikt over de utvalgte prøvene fra laks i sjøvanns-RAS og tradisjonelle sjømerder. Tabellen viser hvilke prøver det har blitt utført HE-farging, amplikonanalyse og IHK på.

Lokalitet og prøvenavn	HE	PCR	Immunhistokjemi			
			Tenacibaculum	M.vis	Anti-PCNA	C4B6
<b>Prøver RAS</b>						
RAS-1	x	x		x	x	x
RAS-2	x	x		x	x	x
RAS-3	x	x		x	x	x
RAS-4	x			x	x	x
RAS-5	x			x	x	x
RAS-6	x			x	x	x
RAS-7	x	x			x	x
RAS-8	x	x			x	x
RAS-9	x			x	x	x
RAS-10	x	x		x	x	x
RAS-11	x			x	x	x
RAS-12	x	x			x	x
RAS-13	x	x			x	x
RAS-14	x	x			x	x
RAS-15	x				x	x
RAS-16	x	x			x	x
RAS-17	x			x	x	x
RAS-18	x				x	x
RAS-19	x	x		x	x	x
RAS-20	x	x		x	x	x
<b>Prøver sjø</b>						
Sjømerd-1	x		x	x	x	x
Sjømerd-2	x		x	x	x	x
Sjømerd-3	x		x	x	x	x
Sjømerd-4	x		x	x	x	x
Sjømerd-5	x		x	x	x	x
Sjømerd-6	x		x	x	x	x
Sjømerd-7	x			x	x	x
Sjømerd-8	x		x	x	x	x
Sjømerd-9	x			x	x	x
Sjømerd-10	x			x	x	x
Sjømerd-11	x			x	x	x
Sjømerd-12	x			x	x	x
Sjømerd-13	x		x	x	x	x
Sjømerd-14	x			x	x	x
Sjømerd-15	x		x	x	x	x
Sjømerd-16	x		x	x	x	x
Sjømerd-17	x		x	x	x	x
Sjømerd-18	x		x	x	x	x
Sjømerd-19	x		x	x	x	x
Sjømerd-20	x			x	x	x

## **2.2 Prøvemateriale med kjent infeksjonsårsak, fra laks i tradisjonelle sjømerder**

Prøvematerialet med kjent infeksjonsårsak var vevsprøver fra laks i åpne merdanlegg i sjø med full sjøvannssalinitet (tabell 3). Prøvene (n=27) ble hentet ut på Vestlandet, i Trøndelag og i Nord-Norge i perioden 2018-2020, og i månedene januar-mai. Fisken det ble tatt prøver av var fra 400-5000g, noen var også kun registrert som «voksen». Vevsprøvene ble mottatt fra VI, som i forbindelse med FHF-prosjekt nr. 901434, hadde fiksert og støpt vevsprøvene i parafinvoks og lagd HE-snitt. Vevsprøvene besto av HE-preparater fra hud- og muskel hos fisk som i hovedsak hadde fått påvist *Tenacibaculum* sp. og/eller *M. viscosa*. Enkelte av prøvene hadde også fått påvist *Aliivibrio wodanis* og andre *Vibrio* sp. Diagnosene ble satt gjennom rutinediagnostiske verktøy som dyrking på marineagar for *Tenacibaculum* sp., blodagar tilsatt 1.5% NaCl for *M. viscosa*, histologi og IHK. I forbindelse med studien ble det utført arbeid knyttet til IHK og evaluering av funn i HE-snitt. Gjennom mikroskopering av histologisnitt ble det valgt ut et antall prøver (n=20) på lik linje med prøvene fra fisk i RAS. Disse har også fått nye navn (Sjømerd-1 – Sjømerd-20) (tabell 3). På de utvalgte prøvene (n=20) ble det utført IHK. Hvilke metoder som har blitt utført på de ulike prøvene er også vist i tabell 2.

## **2.3 Prøvemateriale brukt som test/kontroller til IHK**

I tilknytning til utførelse av IHK i studien var det behov for prøver som kunne brukes som test for tilpasning av metoder og som kontroller for å validere at metodene ved gjennomføring av endelig IHK på prøvematerialet viste riktig. Disse prøvene ble også mottatt fra VI, hvorav det ble lagd nye histologisnitt for hver utføring av IHK. Vevet som ble brukt var nyre, milt og tarm. Prøvene er fremstilt i tabell 3.

**Tabell 3:** Prøvematerialet fra laks med kjent infeksjonsårsak i sjømerder. Prøvenummer er alle (n=27) prøveindividene. Utvalgte prøver (n=20) ble arbeidet videre med i studien og har fått nye navn (Sjømerd1 – Sjømerd-20) som står oppgitt i egen kolonne. Der størrelsen er oppgitt som «voksen» er det ikke tilgjengelig vektdata. *M. viscosa* = *Moritella viscosa*, *A. wodanis* = *Aliivibrio wodanis*, *V. splendidus* = *Vibrio splendidus*.

Prøve-nummer	Navn på prøver valgt til videre arbeid	Infeksjon (påvist gjennom dyrking)	År	Måned	Lokasjon	Størrelse på fisken
1		<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Februar	Nord Norge	Voksen
2		<i>M. viscosa</i> fra sidesår og nyre	2018	Februar	Nord Norge	Voksen
3	Sjømerd-1	<i>M. viscosa</i> , <i>A. wodanis</i> fra sidesår og nyre	2018	Februar	Nord Norge	Voksen
4	Sjømerd-2	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Februar	Nord Norge	Voksen
5	Sjømerd-3	<i>A. wodanis</i> fra sidesår	2018	Februar	Nord Norge	Voksen
6	Sjømerd-4	<i>Tenacibaculum</i> fra sidesår	2018	Mars	Vestlandet	Voksen
7	Sjømerd-5	<i>Tenacibaculum</i> fra sidesår	2018	April	Trøndelag	Voksen
8		<i>Tenacibaculum</i> fra sår	2018	April	Vestlandet	Voksen
9		<i>M. viscosa</i> fra nyre og <i>Tenacibaculum</i> fra sår	2018	April	Nord Norge	400-600g
10	Sjømerd-6	<i>V. splendidus</i>	2018	Mai	Nord Norge	5000g
11	Sjømerd-7	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
12	Sjømerd-8	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
13	Sjømerd-9		2018	Mai	Nord Norge	Ikke oppgitt
14	Sjømerd-10	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
15	Sjømerd-11	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
16	Sjømerd-12	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
17	Sjømerd-13	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2018	Mai	Nord Norge	5000g
18	Sjømerd-14	<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2019	Februar	Nord Norge	4000 g
19	Sjømerd-15	<i>Tenacibaculum</i> fra sidesår	2019	Februar	Nord Norge	4000 g
20	Sjømerd-16	<i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> fra sår	2019	Februar	Nord Norge	4000 g
21	Sjømerd-17	<i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> fra sår	2019	Februar	Nord Norge	4000 g
22	Sjømerd-18	Uspesifikk blandingsflora fra sår	2019	Mars	Nord Norge	Voksen
23	Sjømerd-19	M.vis og Tenaci fra sår	2019	Mars	Nord Norge	3000g
24		ikke dyrket	2019	Mars	Nord Norge	3000g
25		<i>M. viscosa</i> fra sidesår	2019	Mars	Nord Norge	3000g
26		<i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> fra andre sår	2019	Mars	Nord Norge	3000g
27	Sjømerd-20	Ingen infeksjon påvist	2020	Januar	Vestlandet	4000g
Test		Nyre/mil til kontrollsnitt	*Benyttet til IHK-metodeutvikling			
Test		Tarm til kontrollsnitt	*Benyttet til IHK-metodeutvikling			

## **2.4 DNA-ekstraksjon fra vevsprøver**

For ekstraksjon av DNA ble det brukt vevsmateriale lagret på RNAlater. Det ble tatt ut vevsbiter på 25-50 mg fra 12 forskjellige prøver, der hver prøve representerte ett individ. Det må presiseres at dette ikke var samme vevsbiter som ble brukt til histologi, men de kan kobles til andre vevsbiter tatt fra samme individ. For ekstraksjon av DNA ble det brukt High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA, USA). Ekstraksjonen av DNA ble gjort i henhold til kitets protokoll «2.4 Isolering av nukleinsyrer fra pattedyrvev» og «2.6 Protokoll for vasking og eluering». Prosessen for DNA ekstraksjon kan deles inn i tre hoveddeler; lysis, ekstraksjon og isolering av DNA. Etter vevsbitene ble tatt ut, ble de hakket opp med skalpell for mekanisk nedbrytning. Dette for å starte lysisprosessen av cellemembraner (bioingeniør ved VI, personlig kommunikasjon, 2019). Videre ble det tilsatt lysis buffer og enzymet Proteinase K for kjemisk nedbrytning. I steg 1 ble DNA frigjort fra cellene. I steg 2 ble det tilsatt en bindingsbuffer for å binde ekstrahert DNA, og isopropanol for å frigjøre proteiner og andre cellulære bestanddeler. For å fjerne de frigjorte komponentene ble det gjennomført flere vaskesteg og ekstrahert DNA ble isolert (steg 3). I påvente av videre analysering ble prøvene oppbevart i frys på -20 °C. DNA ekstraksjon og oppbevaring av prøvene ble gjennomført på avdelingen for fiskeimmunologi, Institutt for Biovitenskap ved UiB.

## **2.5 PCR, amplikonbibliotek og gelelektroforese**

PCR står for polymerase kjedereaksjon og er en prosess som benyttes for å amplifisere utvalgte nukleotidsekvenser fra templatet i prøven. Amplifiseringen av 16S rRNA gener fra isolert DNA fra prøvene ble gjennomført i en to-steps PCR amplifikasjonsprosess (Roalkvam, Drønen, Dahle & Wergeland, 2019). Denne prosessen ble gjort i henhold til Jorgensen og Zhao (2016) sin protokoll, som er modifisert fra Berry, Mahfoudh, Wagner og Loy (2011). I det første steget ble 16s rRNA genene amplifisert gjennom 25-32 sykluser. I dette steget ble det brukt standard primere, med 519f (CAGCMGCCGCGGTAA) som forward primer og 806r (5`GACTACHVGGGTATCTAATCC) som reversprimer, og reaksjonsblandinger i henhold til tabell 4.

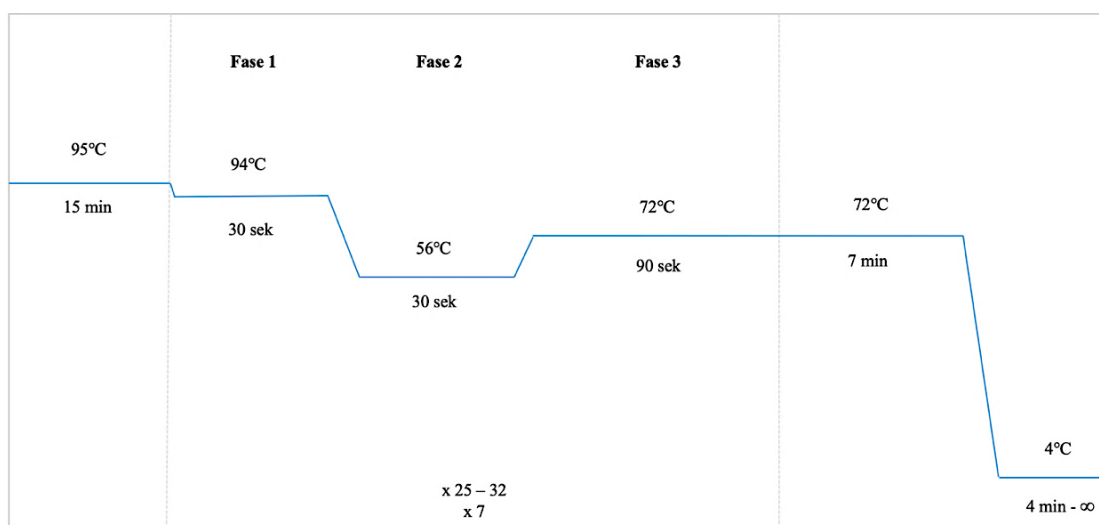
**Tabell 4:** Reaksjonsblandinger til bruk for steg 1 og 2 i to-steps PCR amplifikasjonsprosess.

Reagenser 1. PCR	Volum per prøve (µl)
2x HotStarTaq mastermix (Qiagen)	10
519f (Forward primer) (100 µM stock)	0,2
806r (Reverse primer) (100 µM stock)	0,2
Templat	2
H <sub>2</sub> O	7,6
Totalvolum	20

Reagenser 2. PCR	Volum per prøve (µl)
HotStarTaq mastermix (Qiagen)	12,5
519f MID primer (10 µM stock)	2
806r B-key primer (100 µM stock)	0,2
PCR produkt fra første PCR (~10 ng/µl)	10
H <sub>2</sub> O	0,3
Totalvolum	25

PCR-reaksjonen startet med en varmeaktivering av polymerase enzymet på 95°C i 15 minutter. PCR-amplifikasjonsprosessen deles inn i tre faser; denaturering, hybridisering og forlenging (figur 9). De tre fasene var lik for både første og andre PCR, med unntak av antall sykluser. Den første fasen, denatureringsfasen, holdt 94°C i 30 sekunder. Her ble dobbeltrådig DNA denaturert til enkelttrådig DNA. Under hybridisering ble temperaturen senket til 56°C i 30 sekunder slik at primerne kunne feste seg til den komplementære regionen på DNA-templatet. Etter hybridisering ble temperaturen økt til 72°C i 90 sekunder for at polymerasen kunne forlenge primerne og danne nye DNA-tråder som var nøyaktige kopier av templat-DNA. PCR-syklusen ble avsluttet med en videre forlengelse på 72°C i 7 minutter før produktene ble holdt stabilt på 4°C.

**Figur 9:** PCR-amplifikasjonsprosess. Prosessen starter med en oppvarmingsfase, før det går over til denaturering (fase 1), annealing (fase 2) og elongering (fase 3). Prosessen avsluttes med en forlengelse av elongering for ampliconene holdes stabilt på minimum 4°C.

PCR produktene ble visualisert ved hjelp av 1D gel elektroforese (PowerPac™ Basic Power Supply VWR, Bio RAD) med 1% agarose gel og GelGreen® Nucleic Acid Stain (Biotium). G:Box (Syngene) ble brukt for å verifisere positive produkter innenfor riktig baseparlengde (300 bp) og fotografering av resultat. Produkter med svake bånd ble kjørt gjennom en ny amplifikasjonsprosess, men da med 35 sykluser for å øke mengden positive produkter. Det ble så dannet triplikater av alle PCR-produktene gjennom en parallell PCR amplifikasjon. Triplikatene ble lagt i én pool for hver av prøvene og rensset med AMPure XP bead Purification kit (Agencourt). For hvert volum av DNA lagt i poolen ble det brukt 0.7 volum av AMPure XP reagenser. Rensingen av DNA ble gjort i henhold til kitets protokoll. Ved å bruke QuantiFluor® dsDNA System (Promega) med 197.5 µl 1xTE buffer, 0.5 µl farge og 2 µl prøve, ble rensset DNA kvantifisert med Quantus™ Fluorometer (Promega).

Reaksjonsblandningene som ble brukt i det andre PCR-steget er gjengitt i tabell 4. Forward primeren som ble brukt i steg 2 (519f Multiplex identifikator (MID)) skilte seg fra 519f primeren i første PCR ved at den hadde en adapter og en strekkode som ga en unik identifikasjon til hver prøve. Identifikasjonen var gitt av en bestemt sekvens på 10bp. Merkingen førte til at ampliconene kunne brukes direkte i sekvensering. 806r B-key primeren ble brukt som reversprimer og hadde en adapter festet til seg, men i motsetning til 519f MID var denne adapteren lik for alle prøvene. PCR2 ble kjørt med samme program som PCR1, men med 7 amplifikasjonssykluser.

Produktene fra steg 2 ble rensset ved hjelp av AMPure XP bead Purification kit og deretter visualisert ved 1% agarose gel electrophorese på samme måte som tidligere. Visualiseringen ble gjort for å kontrollere for gjenværende primere eller primer-dimere. Rensede produkter ble kvantifisert, også på samme måte som tidligere. Til slutt ble alle prøvene målt i ekvimolar konsentrasjon for å få samme 16s rRNA konsentrasjon fra hver prøve, samlet i én pool (ampliconbibliotek). Dette ble gjort ved at prøver med omtrent samme konsentrasjon ble fordelt mellom pool 1 og 2. Pool 2 måtte fortynnes med nukleasefritt vann (H<sub>2</sub>O) for å ha samme konsentrasjon som pool 1. Prøvene ble til slutt samlet i ett ampliconbibliotek med en endelig konsentrasjon på 40 pM i minimum 25 µl volum. Ampliconbiblioteket inneholdt totalt 96 prøver, hvorav 12 av prøvene tilhørte denne studien. PCR og gel elektroforese ble gjennomført ved Institutt for Biovitenskap, UiB.

## 2.6 Sekvensering, bioinformatikk og databehandling

Amplikon sekvenseringsprosessen ble gjennomført ved Institutt for Biovitenskap, UiB. Før selve sekvenseringen ble amplikonene tilsatt en tilpasset mengde kuler, slik at adapteren i 806r B-key primeren festet en sekvens per kule. Kuler med mer enn én sekvens (polyklonale) ble sortert ut. Videre ble det kjørt emulsjons PCR for å amplifisere sekvensen på hver kule og på den måten forsterke signalet under sekvenseringen. De amplifiserte sekvensene ble festet på ledige adaptere på samme kule. Ved sekvenseringen ble den amplifiserte løsningen med kulene flyttet over til en chip (316), og sekvensert ved hjelp av Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) technology. Sekvenseringen startet fra forward primer enden med at en primer festet seg på adapteren til 509f MID primerne. En løsning med én nukleotid om gangen, ble tilsatt i sykluser til sekvenseringen var ferdig. Sekvenser med en komplementær base til nukleotidet som ble tilsatt, frigjorde et H<sup>+</sup> ion (Merriman, Ion Torrent R&D Team & Rothberg, 2012). Frigjøringen av ionet ble registrert som nedgang i pH. Denne prosessen ble gjort med alle kulene på chipen samtidig. Signalene som ble registrert under sekvenseringen ble automatisk overført til en datamaskin og det ble registrert hvilket nukleotid som var til stede. Dette ble samlet i en sekvenseringsrapport som inneholdt informasjon om ~3 millioner DNA-sekvenser.

Etter sekvensering ble det gjennomført en analyse av sekvensene gjennom en bioinformatisk prosedyre i fem steg: filtrering av sekvenser, OTU klassifisering, Chimera fjerning, taksonomisk klassifisering og tillaging av OTU-tabell. Under filtrering ble alle sekvenser med samme prøvespesifikke strekkode samlet i separate filer, og sekvenser med færre enn 200 bp eller med lav kvalitet ble fjernet. Gjenværende sekvenser ble gruppert i operative taksonomiske enheter (OTU) ved hjelp av USEARCH og UPARSE, slik at hver OTU representerer en samling av sekvenser med 97-100% likhet (Roalkvam et al., 2019). Taksonomisk klassifisering ble utført i QIIME på en sekvens per OTU med SSU Ref Silva versjon 128 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-128/>). Det neste steget i bioinformatikken tok for seg fjerning av chimera sekvenser. Chimera sekvenser dannes på grunn av feil i PCR, og er kunstige sekvenser. For fjerning av chimera sekvenser ble databasen Gold brukt som referanse (Roalkvam et al., 2019). Videre ble det foretatt en taksonomisk klassifisering for identifisering av sekvensene. Det ble plukket ut én sekvens fra hver OTU som ble sammenlignet med kjente sekvenser i en database. Her ble SSU Ref Silva versjon 128 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-128/>) brukt som database. Det var i flere tilfeller (~39%) mulig å klassifisere sekvenser til slektsnivå. Antall sekvenser som



grupperte i hver OTU i hver prøve ble sammenfattet i en OTU tabell. Tabellen ble videre prosessert i Excel for å lage en tabell der distribusjonen av sekvenser i hver OTU ble beregnet som relativ forekomst.

## 2.7 Histologi

Prøver til histopatologi ble bearbeidet ved VI og fulgte VI sin protokoll for utførelse av histologi. Ved mottak av prøvene ble vevsbitene trimmet og lagt i ny formalin 10% nøytral bufret for fiksering. Deretter fulgte en dehydreringsprosess hvor vevsbitene ble lagt i en fremføringsmaskin (Excelsior AS, Thermo Scientific). Først ble det tilsatt formalin i to runder for ytterligere fiksering. Formalinen ble deretter fjernet og alkohol ble tilsatt i 6 runder (1x70%, 1x80%, 2x96%, 2x100%) for å fjerne alt vann fra de fikserte vevsbitene. Etter behandling med alkohol ble det tilsatt xylen i to runder som fjernet all alkohol i vevsbitene og gjorde vevet tilgjengelig for impregnering med parafinvoks, som bevarer celle- og vevsstrukturer. Flytende parafinvoks på 60°C ble tilsatt i tre runder. De impregnerte vevsbitene ble lagt i støpeformer og støpt inn med flytende parafinvoks, satt direkte på kuldeplate og deretter i frys. Etter nedkjøling var prøvene klare for snitting med mikrotomer. Det ble benyttet Thermo Scientific™ HM 355S Automatic Microtome (ThermoFisher Scientific) til å lage tynne snitt av vevsbitene. Overflødig voks ble fjernet og det ble skjært 2,5-3,0 µm tykke vevssnitt. Vevssnittene ble lagt i vannbad på omtrent 42°C før de ble satt på objektglass, Superfrost® Microscope Slides for HE-farging (hematoxylin og eosin) og Polysine® Adhesion Slides (Thermo Scientific, Menzel-Gläser) for IHK. Det ble laget tre replikater av hver prøve, til videre behandling med HE-farging og IHK.

## 2.8 HE-farging

Farging med hematoxylin og eosin (HE) ble gjennomført i henhold til VI sin protokoll. Farging med HE er en generell farging av vev som tillater histologiske observasjoner og evaluering av preparater i mikroskopi. Fargeprosessen og dekking av preparater med film ble gjort med Tissue-Tek Prisma® Plus og Tissue-Tek Film® (Sakura, Netherlands). For å varme opp voksen ble preparatene plassert i en varmeboks på 60°C før de ble satt i xylen i 2x4 minutter for å løse opp voksen. Xylen er ikke løselig med vann og måtte derfor fjernes gjennom alkohol. Alt arbeid med xylen og alkohol ble gjort med maskiner med avsug eller i avtrekksskap. Preparatene ble satt i alkoholrekke med 30 sekunder i hver beholder. Alkoholrekken startet med 2x absolutt alkohol (ABS) på 100%, og videre i 96%, 80% og

70%. For rehydrering av vevet ble preparatene satt i destillert vann i minimum ett minutt, før de ble farget med hematoxylin i ett minutt. Videre ble preparatene vasket i vann i to minutter og ett minutt før de ble farget med eosin i 2,5 minutter og vasket i 30 sekunder. Etter farging ble preparatene satt i en ny alkoholrekke for dehydrering, nå med lavest konsentrasjon først (70%, 80%, 96%, 2xABS). Det siste steget i fargeprosessen var 2x1 minutt i xylen. Deretter ble de dekket med dekkfilm som er løselig med xylen og feste seg til objektglasset. Preparatene sto til lufting og tørking i avtrekkskap i minimum 20 minutter før de ble mikroskopert.

## **2.9 Immunhistokjemi**

Immunhistokjemi (IHK) er en metode som brukes mye innen diagnostisk patologi. IHK utføres på vevssnitt og kan ved hjelp av spesifikke antistoff merke og identifisere distribusjonen og lokalisering av vev- og cellekomponenter (Munson, Arya & Shergill, 2007; Verma, Kumari, Mittal & Mittal, 2017). Med bakgrunn i resultater fra histologi ble det utført IHK på et utvalg representative prøver med god kvalitet på histologisnittene. Utvalget var fra RAS-anlegget og fra merder i sjøanlegg. Oversikt over hvilke prøver som ble tatt med sees i tabell 2. Det ble lagd et nytt snitt av de utvalgte preparatene for hvert antistoff de skulle testes mot. IHK ble gjennomført ved VI og med utgangspunkt i deres protokoll «Immunhistokjemi, generell TE01\_006».

### **2.9.1 Antistoff til bruk i immunhistokjemi**

I prosjektet ble det brukt både polyklonale og monoklonale antistoffer (tabell 5). De polyklonale antistoffene var lagd i kanin og var rettet mot *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. Det polyklonale antistoffet brukt mot *M. viscosa* var fra immunisering med *M. viscosa* NCIMB 13584 (Colquhoun, D., personlig kommunikasjon, 20. august 2020). Mot *Tenacibaculum* sp. ble antistoffet Tx (Gruppe 1) med immunisering mot isolat F140/96 brukt. Antistoffet mot *Tenacibaculum* sp. er tidligere beskrevet i Olsen et al. (2011). Begge disse polyklonale antistoffene fra VI ble benyttet med en serumfortynning på 1:1000.

Det ble brukt tre ulike monoklonale antistoffer til IHK. For leukocytter ble det brukt C7G7 spesifikt mot B-celler og C4B6 rettet mot leukocytter generelt. Begge disse antistoffene ble isolert ved UiB sine laboratorier. Disse antistoffene er tidligere beskrevet i Pettersen et al. (1995) og Pettersen, Bjercknes og Wergeland (2000). Det ble også brukt antistoff mot

cellekjerner under deling (anti proliferativ cell nuclear antigen, anti-PCNA (EMD Millipore Corp., USA)) for å detektere celleproliferasjon, som beskrevet av Sveen et al. (2019). For de monoklonale antistoffene måtte protokollen for IHK tilpasses, dette er beskrevet i «2.9.5 Optimalisering av immunhistokjemisk metoder med monoklonale antistoffer».

**Tabell 5:** Antistoffer brukt til immunfarging.

<b>Antistoff, antiserum og reagenser</b>	<b>Antistoffets spesifisitet</b>	<b>Konsentrasjon og fortynning i 2,5% BSA</b>	<b>Inkubasjonstid</b>
<b>Primærantistoff</b> <b>Monoklonale antistoff (mAb)</b> <i>C4B6</i>	Leukocytter	1798 µg/ml 1:1000	3 timer
<i>C7G7</i>	B-celler	697 µg/ml <i>Ulike fortynninger og inkubering ble utprøvd, uten resultat. Antistoff ble derfor ikke brukt videre i IHK.</i>	
<i>Anti-PCNA</i>	Prolifererende celler	0,2 mg/ml 1:200	3 timer
<b>Polyklonale antistoff (pAb)</b> <i>Moritella viscosa 478 (M.Visc)</i>	<i>M. viscosa</i> bakterier	1:1000	30 minutter
<i>Tenacibaculum x K234 (Tx)</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp. bakterier	1:1000	30 minutter
<b>Sekundærantistoff</b> <b>Konjugat til mAb</b> <i>Kanin anti-mus</i>	Anti-PCNA	1,0 g/l 1:300	30 minutter
	<i>C7G7</i>	1:500	30 minutter
	<i>C4B6</i>	1:500	30 minutter
<b>Konjugat til pAb</b> <i>Geit anti-kanin</i>	<i>M. viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> sp.	1,0 g/l 1:500	30 minutter
<b>Kompleks</b> <i>Streptavidin-AP</i>	Fester seg til sekundærantistoffet	1:1000	30 minutter
<b>Substrat</b> <i>Fast Red TR salt</i>	Fester seg til komplekset	0,01g Fast Red TR salt i 10 ml substrat	20 minutter
<b>Motfarge</b> <i>Hematoxylin</i>	Fester seg til vevet og fungerer som motfarging mot Fast Red-substrat	1:5 (1 ml springvann, 4 ml hematoxylin)	2 minutter
<b>Normalserum</b> <i>Kanin anti-mus</i>	Som kontroll for å se om sekundærantistoffet binder seg uspesifikt til primærantistoffet	1,0 g/l 1:300	Samme som primærantistoffet

## 2.9.2 Isolering av antistoff ved hjelp av protein G-kolonne og affinitetskromatografi

C7G7 og C4B6 er monoklonale antistoff (mab) produsert i mus og som henholdsvis reagerer med B-celler og leukocytter hos laks. Antistoffene ble tildelt fra fiskeimmunologigruppen ved UiB, hvor de tidligere var blitt lagd og lagret i hybridomsupernatant. Rensing av antistoffene C7G7 og C4B6 fra supernatant, hver på ~115 ml, ble gjort med en HiTrap™ Protein G HP 5 ml kolonne (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sverige). Rensingen ble gjort i henhold til protokoll for «HiTrap Protein G HP antibody purification columns», ved hjelp av affinitetskromatografi (Liquid Chromatography Controller LCC-501 Plus, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sverige). HiTrap™ Protein G HP kolonne inneholder biokompatibelt polypropylen, som er en type syntetisk polymer som ikke reagerer med biomolekyler (ScienceDirect (Elsevier), u.å) og kan derfor brukes til rensing av monoklonalt og polyklonalt antistoff (GE Healthcare Life Sciences, 2016).

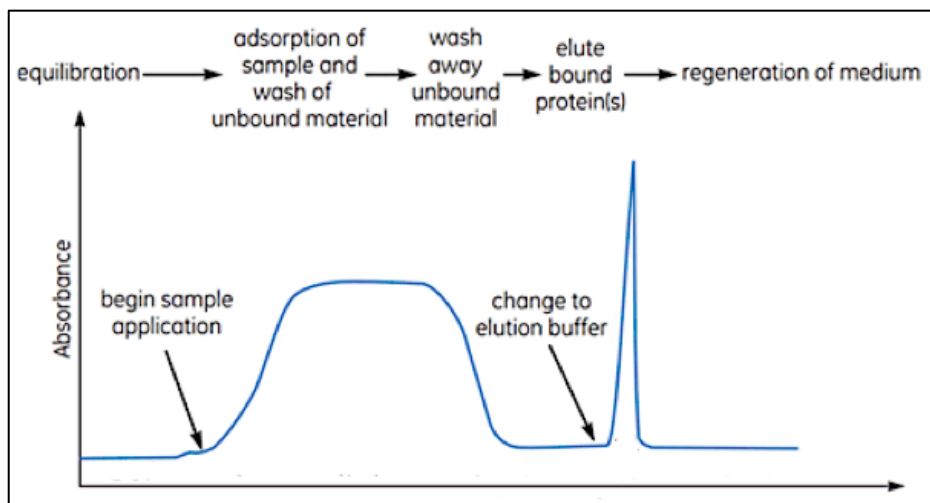
For rensing av antistoff ble det tilberedt bindingsbuffer, elueringsbuffer og en nøytraliserende buffer (tabell 6). Som bindingsbuffer ble det brukt 0,02M fosfatbuffer med pH 7,0, 0,1M Glycin-HCl med pH 2,7 som elueringsbuffer og 1M Tris-HCl pH 9,0 som nøytraliserende buffer. pH for samtlige buffere ble kontrollert ved hjelp av et pH-meter. Glycin-HCl og Tris-HCl ble justert til riktig pH med HCl. Etter kontroll av pH og umiddelbart før tilsetting i kolonnen ble fosfatbufferen og Glycin-HCl, filtrert gjennom et 2,2-filtrer.

**Tabell 6:** Informasjon om protein G kolonne og reagenser brukt til rensing av antistoffer i affinitetskromatografi.

Kolonne	<i>HiTrap Protein G HP 5 ml</i>
Prøve	115 ml C7G7, 115 ml C4B6 i celsesupernatant
Bindingsbuffer	0,02M Fosfatbuffer, pH 7,0
Elueringsbuffer	0,1M Glycin-HCl pH 2,7
Nøytraliserende buffer	1M Tris-HCl pH 9,0

Antistoffene i celsesupernatanten ble tint i romtemperatur på ristemaskin, og deretter sentrifugert på 170 x g i 10 minutter (Allegra® X-15R Centrifuge, Beckman Coulter). Etter sentrifugering ble supernatanten pipetert ut og filtrert for pellet rester med en 50-ml sprøyte med 0,22 filter. Kolonnen ble kalibrert med 10 kolonnevolum bindingsbuffer med 5 ml per minutt. Etter kalibrering ble supernatanten pumpet inn i kolonnen. Kolonnen med supernatant ble så vasket med 10 kolonnevolum bindingsbuffer med pH 7,0 for å binde IgG til protein G. Det er ved pH 7,0 affiniteten mellom protein G og IgG er sterkest. Deretter ble det tilsatt

elueringsbuffer med pH 2,7 for å bryte bindingene og frigjøre antistoffene. De eluerte antistoffene ble samlet i eppendorfrør med 200µl Tris-HCl. Tris-HCl ble tilsatt for at den endelig pH til prøven skulle være omtrent 7,0. Prosessen er illustrert i figur 10. Det totale volumet etter rensing var på ~4 ml. Elueringen av antistoffene ble fremstilt i kromatogram med måleenhet absorbans enhet (AU) mot ml. Begge antistoffene ble rensset med samme fremgangsmåte, og med samme kolonne. Mellom rensingene ble kolonnen vasket med bindingsbuffer og rensset med etanol (EtOH (20%)). Prøvene ble oppbevart i frys på -20°C frem til videre kvantitering av antistoffene.



**Figur 10:** Skjematisk fremstilling av prosessen for antistoffrensing med affinitetskromatografi. Hentet fra og redigert etter GE Healthcare Life Sciences (2016).

### 2.9.3 Kvantitering av antistoff

For kvantitering av de rensede antistoffene ble Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories AB NUF, Oslo, Norge) brukt til å lage standardkurve. IgG (Bio-Rad Protein Assay Standard I) ble brukt som standardprotein for standardkurven. Bio-Rad Protein Assay er et farge-assay der farge binder til proteiner og det skjer en fargeendring avhengig av proteinkonsentrasjonen. Fargereagens ble fortynnet med fire deler destillert H<sub>2</sub>O og filtrert gjennom et 40 µg/ml filter. Det ble lagd fire fortyngninger (200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml og 800 µg/ml) av IgG protein standard. Det ble pipettert 100 µl av hver standard over i et rør sammen med 5,0 ml av fortynnet fargereagens og blandes ved røring. Blandingen sto til inkubering i romtemperatur i minimum 5 minutter og maksimalt én time. Samme prosedyre ble gjort med antistoffene (C7G7 og C4B6). Absorbansen på prøvene ble deretter målt i optisk tetthet (O.D.) ved 595 nm i plateleser (TECAN SpectraFluor, XFluor 4, versjon 4.50).

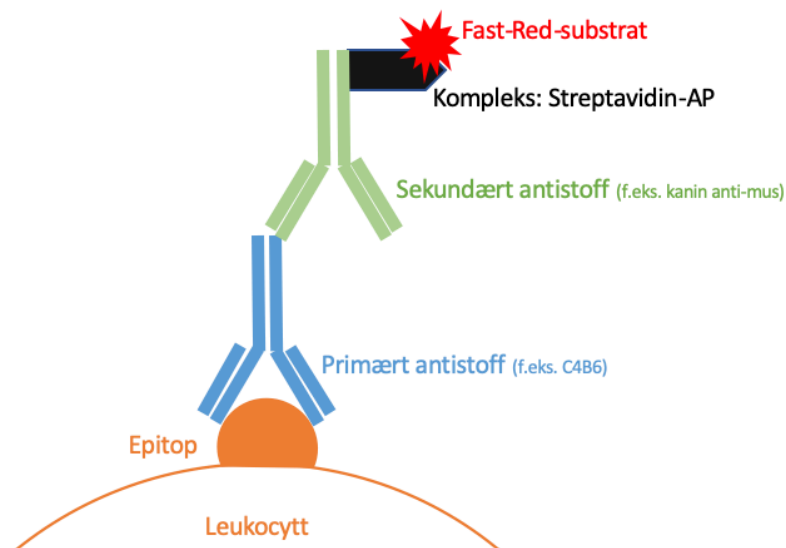
#### 2.9.4 Protokoll for immunhistokjemi

Etter snitting i Mikrotomer ble Polysine Slides med vev satt i varmeskap med en temperatur på 60°C. Polysine Slides binder vev- og cellepreparater elektrokjemisk og biokjemisk og tillater omfattende behandling og fargeprosesser (Huang, Gibson, Facer, Gu & Polak, 1983; Thermo Fisher Scientific, u.å.-b). Tiden i varmeskap var på 20 minutter for IHK-metoder uten forbehandling. For IHK med forbehandling ble tiden i varmeskapet tilpasset (se «2.10.5 Optimalisering av immunhistokjemisk metoder med monoklonale antistoffer»). I påvente av videre behandling ble preparatene oppbevart i romtemperatur.

For videre behandling og klargjøring til IHK ble snittene satt i xylen i 10 minutter for rehydrering. Deretter ble snittene satt i alkoholrekken ABS, ABS, 96%, 80% og 70% med oppholdstid på 5 minutter i hvert steg. Etter alkoholrekken ble preparatene satt i vanlig springvann i minimum ett minutt for å holde preparatene hydrert frem til de ble satt i vaskebuffer. Preparater som ikke trengte forbehandling etter denne prosessen, var klare for IHK. Ved bruk av anti-PCNA ble preparatene forbehandlet med citratbuffer i henhold til protokoll «9.6.1 Forbehandling i mikrobølgeovn» i «Immunhistokjemi, generell TE01\_006» fra VI. Ved citratforbehandling ble preparatene satt i citratbuffer (0,1 M sitronsyre, pH 6,0) i mikrobølgeovn på 650W i 6 minutter. Etterpå stod preparatene 5 minutter i den varme løsningen før de ble skylt raskt i vann og satt i ny citratbuffer. Preparatene ble satt i mikrobølgeovn på nytt og med 650W i nye 6 minutter, påfulgt av 15 minutter i den varme løsningen. Preparatene ble deretter vasket med Tris bruksløsning og satt i vaskebuffer frem til blokkering. Ved bruk av C7G7 og C4B6 var det ikke behov med forbehandling.

IHK med polyklonale antistoff ble utført i Dako Autostainer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US), IHK med monoklonale antistoff ble utført manuelt. Metoden for IHK var likevel den samme. En oppsummering av metoden kan sees i vedlegg 1. Det første steget var blokkering for å hindre uspesifikk binding av antistoff. Preparatene ble dekket med 5% bovine serum albumin (BSA) i Tris-bufret saltvann (TBS) i 20 minutter i romtemperatur. Blokkeringsløsningen ble dunket av preparatet og det ble tilsatt primærantistoff som binder seg til spesifikke målantigen. Hvilke antistoffer som ble brukt, fortynninger og inkubasjonstider er vist i tabell 5. Antistoffene ble fortynnet med 2,5% BSA i TBS. Snittene ble inkubert med primærantistoffet i fukt-kammer i romtemperatur i 30 minutter eller 3 timer. Etter inkubering med primærantistoff ble preparatene vasket i 3x5 minutter i vaskebuffer (Tris buffer 0,05M pH 7,6, 0,08% NaCl, Tween 20). Vaskingen fjernet antistoff som hadde bundet

seg uspesifikt og klargjorde for sekundærantistoff. Preparatene ble inkubert med sekundært antistoff i 30 minutter. Det ble brukt biotinyleret kanin anti-mus (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated DAKO E354) for anti-PCNA, C7G7 og C4B6, og biotinyleret geit anti-kanin (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated DAKO E432) for *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. (Dako Danmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Danmark). Etter tilsetning av sekundært antistoff ble preparatene på nytt vasket i 3x5 minutter med vaskebuffer. Etter vasking ble preparatene inkubert med streptavidin (Streptavidin Alkaline Phosphatase, Vector Laboratories, Inc., CA, 94010 USA) i 30 minutter i romtemperatur. Streptavidin er et biotinbindende protein som reduserer uspesifikke bindinger til endogent biotin eller endogen enzymaktivitet (Thermo Fisher Scientific, u.å.-a). Etter tilsetning av streptavidin ble preparatene vasket i 3x5 minutter med vaskebuffer. Preparatene ble inkubert med Fast Red TR Salt (SIGMA Chemical Company, USA) i 20 minutter i romtemperatur. Fast Red er et kromogen med farge som fester seg til og synliggjør antigen-antistoffkomplekset (figur 11). Fast Red ble skylt av i 3x5 minutter i springvann. Preparatene ble tilsatt hematoxylin (1:5 fortykning) i 2 minutter for farging av cellestrukturer. Etter 2 minutter ble hematoxylinen skylt av i springvann. Til slutt ble preparatene dekket med Aquatex Mounting Medium.



**Figur 11:** Skjematiske illustrasjon av antistoffkompleks. Primærantistoffet (mus IgG mot lakse IgM) bindes til epitop på en leukocyt. Sekundærantistoffet (kanin mot mus IgG) bindes til primærantistoffet, og har igjen et streptavidin-AP-kompleks med Fast-Red-substrat bundet til seg. (AP = alkaline phosphatase).

### 2.9.5 Optimalisering av immunhistokjemisk metoder med monoklonale antistoffer

VI sin protokoll for immunhistokjemi ble brukt som utgangspunkt for å utføre stegene for immunhistokjemi med antistoffene C4B6, C7G7 og anti-PCNA. Metoden ble tilpasset målet i studien gjennom flere forsøksoppsett hvor forbehandlinger, fortynninger og inkuberingstider ble optimalisert (tabell 5).

IHK med antistoffene C4B6 og C7G7 har tidligere blitt beskrevet i bruk ved flowcytometri og på frysesnitt av nyre og milt (Pettersen et al., 2000). Det var derfor behov for tilpasning for utføring på formalinfiksert materiale. Protokollen «Immunhistokjemi, generell TE01\_006» ble benyttet som utgangspunkt, men med ulike modifikasjoner for optimalisering av fortynningsforhold og inkuberingstider. Modifikasjonene ble først testet på preparater fra nyre og milt (testpreparater fra VI), hvor det var kjent at ulike leukocytter var til stede. Det ble gjort modifikasjoner med primærantistoffenes fortynningsforhold (1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000) og ulike inkuberingstider (1, 3 og 24 timer). Alle fortynningene ble utprøvd med alle inkuberingstidene og det ble lagd to ulike kontroller for uspesifikk merking. Den ene kontrollen for uspesifikk merking hadde 2.5% BSA i TBS, den andre negative kontrollen hadde primærantistoff Mab *A. salmonicida* med fortynning 1:1000.

IHK med anti-PCNA er tidligere beskrevet i Sveen et al. (2019), hvor det ble brukt DAB som gir en brunlig farge, til merking. Med ønske om å få tydeligere visualisering av prolifererende celler i vev hvor det er normalt med brune pigmenter, ble det i stedet brukt Fast-Red-substrat som gir en rødlig merking. Anti-PCNA med Fast-Red er tidligere beskrevet av Gjessing, Kvellestad, Ottesen og Falk (2009), men da ved bruk i hjernevev og retina og med andre reagenser enn de som var tilgjengelig for denne studien. Metoden trengte derfor noe tilpasning. Metoden ble først prøvd ut på tarmvevpreparater (testpreparater fra VI) som hadde fått påvist uttalte forandringer og celleproliferasjon, og hvor det var forventet merking av celler under proliferasjon. Samme preparat ble senere lagd nye snitt av, og brukt som kontrollsnitt. IHK med anti-PCNA ble utført etter VI sin protokoll for *Aeromonas salmonicida* (ASS.) med de generelle prosedyrene fra «Immunhistokjemi, generell TE01\_006». I stedet for *A. salmonicida* som primærantistoff, ble det benyttet anti-PCNA. Det ble utprøvd ulike fortynninger (1:100, 1:200, 1:400) og ulike inkuberingstider (30 minutter og 3 timer) i romtemperatur. IHK ble gjennomført med tre paralleller, der hver parallell enten hadde ingen forbehandling, forbehandling med trypsin eller forbehandling med citrat. Det var forbehandling med citrat, inkubering på 3 timer og antistoff fortynning 1:200 som ga det beste



resultatet. Metoden måtte likevel testes videre på grunn av at vevet kunne løsne fra polysineglasset etter citratbehandlingen. Inkuberingen i varmeskap før forbehandling ble derfor økt fra 20 minutter i 60°C, til over natt på 60°C. Dette på grunn av tidligere erfaringer gjort på VI når det gjelder muskelvev og forbehandling før IHK.

## **2.10 Mikroskopering**

Preparater fra histologi og immunhistokjemi ble mikroskopert med lysmikroskop på forstørrelsene x50, x100, x200 og x400 (Leica DM2500 LED). Bilde av preparatene ble tatt med Leica MC 190 HD.

## **2.11 Utarbeidelse av et histopatologisk scoringssystem for sår hos laks**

For å undersøke sår og sårhelingsprosessen var det behov for en metode som kunne systematisere og semi-kvantifisere sentrale faktorer. Dette inkluderte morfologi som er typisk ved bakterielle og mekaniske sår. Det har derfor vært et ønske at denne studien kunne være et første skritt på veien for å utarbeide et scoringssystem for sår hos laks. I arbeidet med å utarbeide scoringssystemet for sår har det blitt sett til litteratur, retningslinjer og metoder for utarbeidelse av histologisk scoring og gradering (Caswell et al., 2018a, 2018b; Gibson-Corley, Olivier & Meyerholz, 2013; Meyerholz & Beck, 2018; Meyerholz, Tintle & Beck, 2018; Schafer et al., 2018; Treuting & Boyd, 2019). Det er også sett til protokollen for histopatologisk gjellescore, som brukes til å undersøke gjellehelsen hos laks (Gjessing et al., 2019; Mitchell, Baxter, Holland & Rodger, 2012). Protokollen for histopatologisk gjellescore inkluderer kriterier som er vanlige patologiske endringer ved hvilken som helst gjelleskade, disse anses som indeksekriterier. Indeksekriteriene scores fra 0 til 3, hvor 0 er ingen eller veldig lite patologi, mens 3 er utbredt/alvorlige patologiske endringer. I gjellescoreprotokollen til Mitchell et al. (2012) brukes også tilleggs-kriterier, disse scores med tilstede (1) eller ikke tilstede (0) og er kriterier som inflammasjon, eosine granulære celler, sirkulasjonsforstyrrelser og bakterier (Mitchell et al., 2012). Denne typen scoring gir data som beskriver utbredelsen av kriteriene og på den måten kvantifiserer histologiske funn (Knoblauch & Himmel, 2018).

De faktorene som er inkludert i scoringssystemet for sår, er vanlige patologiske endringer som sees i forbindelse med bakterielle og ikke-bakterielle sår. En annen viktig del av scoringssystemet er de reaksjonene som sees i forbindelse med en sårhelingsprosess. Det ble i den forbindelse lagt vekt på kunnskap om sårheling fra en tidligere studie på mekaniske sår

og sårheling hos laks (Sveen, 2018; Sveen et al., 2020; Sveen et al., 2019; Sveen et al., 2016), samt kunnskap om sårheling hos zebrafisk (*Danio rerio*) (Richardson et al., 2013) i utarbeidelsen av scoringssystemet for sår (tabell 7, også lagt med som vedlegg 5). Sveen et al. (2019) deler sårhelingsprosessen inn i en tidlig og en sen fase, hvor det er en viss overlapp mellom ulike prosesser og reaksjoner (figur 6). Med utgangspunkt i de prosessene og reaksjonene involvert i en sårhelingsprosess, prøvemateriale i denne studien og kunnskap innhentet fra litteratur om scoringssystemer ble det besluttet å dele scoringssystemet inn i hovedkriterier og tilleggskriterier. Hovedkriteriene har fått score 0 til 3, hvor 0 er normal, og 3 er uttalte reaksjoner eller endringer. Scoren på hovedkriteriene ble gitt ut ifra hva som ble observert ved mikroskopering av prøvematerialet, der noen hadde «mer» eller «mindre» utbredelse av de ulike kriteriene i og rundt såret. De utvalgte hovedkriteriene er affisert hudvev, degenerasjon av hudvev, sirkulasjonsforstyrrelse, infiltrasjon av immunceller og celleproliferasjon. Disse er nærmere beskrevet under. For tilleggskriterer har det i likhet med protokollen for gjellescore blitt scoret for til stede (1) eller ikke til stede (0). Reepitelisering, hypertrofi/hyperplasi av slimceller, hyperpigmentering i sårkant, granulasjonsvev, amorft proteinrikt eksudat og bakterier har blitt satt som tilleggskriterier. For bakterier ble det, med bakgrunn fra observasjoner gjort i HE-preparater, gjort notasjoner om bakteriene som ble observert var lange eller korte stavbakterier.

### *Hovedkriterier*

Affisert hudvev: Kriteriet undersøker hvor dypt såret i huden er. Jo høyere score, jo dypere går såret.

Degenerasjon av hudvev: Kriteriet undersøker graden av degenerative lesjoner. En høy score betyr at vevet har få eller ingen strukturer igjen. Degenerasjon er reversible forandringer eller skader som endrer funksjoner i cellen. Kjennetegn er celleoppsvulming og vakuolisering, men ved vedvarende skadelig påvirkning blir skadene irreversible og nekrose og lysis er vanlige kjennetegn (Roberts, 2012).

Sirkulasjonsforstyrrelser: Dette kriteriet omfatter både blødning og stuvning i blodkar. Scoren gis basert på en semi-kvantitativ vurdering av hvor utbredt eller til stede blødningen og/eller stuvningen er i snittet.

Infiltrasjon av immunceller: Kriteriet sier noe om hvor utbredt tilstedeværelsen av immunceller er i snittet. Som immunceller regnes ulike leukocytter og makrofager. En høy score betyr at det er en høy tilstedeværelse av immunceller i vevet i snittet. For kontroll scores dette kriteriet både på HE-snitt og IHK C4B6-snitt.

Merking av leukocytter med C4B6 i et utvalgt område i IHK-snitt: Det er sett på merking av leukocytter med C4B6 i et område i snittet som ligger i nærheten av sårområdet og om omfatter minimum dermis, men kan også omfatte epidermis og hypodermis.

Celleproliferasjon: Kriteriet undersøker utbredelsen av celleproliferasjon for å se om det er cellevekst i vevet. Scoringen gjøres basert på IHK med anti-PCNA, og en høy score viser til en høy grad av merkede celler.

#### *Tilleggsriterier*

Reepitelisering: Oppkonsentrering av epidermisceller i sårområdet.

Hyperpigmentering i sårkant: Pigmenteringsreaksjon med melanocytter i eller rundt sårområdet, enten i form av en oppkonsentrering av mengde eller størrelse på melanocytene.

Granulasjonsvev: Dannelse av granulasjonsvev bestående av bindevev, fibroblaster, immunceller og små blodkar.

Amorft proteinrikt eksudat: Formløst substrat som fyller sårområdet.

Bakterier: Bakterier scores med 0 eller 1 ut ifra om det observeres bakterier eller ikke i snittet. Dette scores ut ifra HE-snitt.

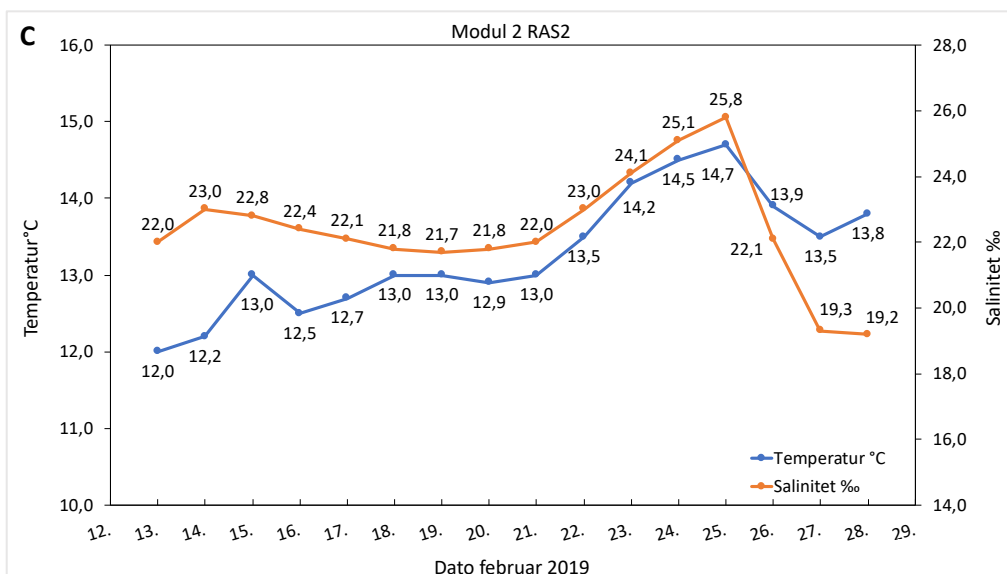
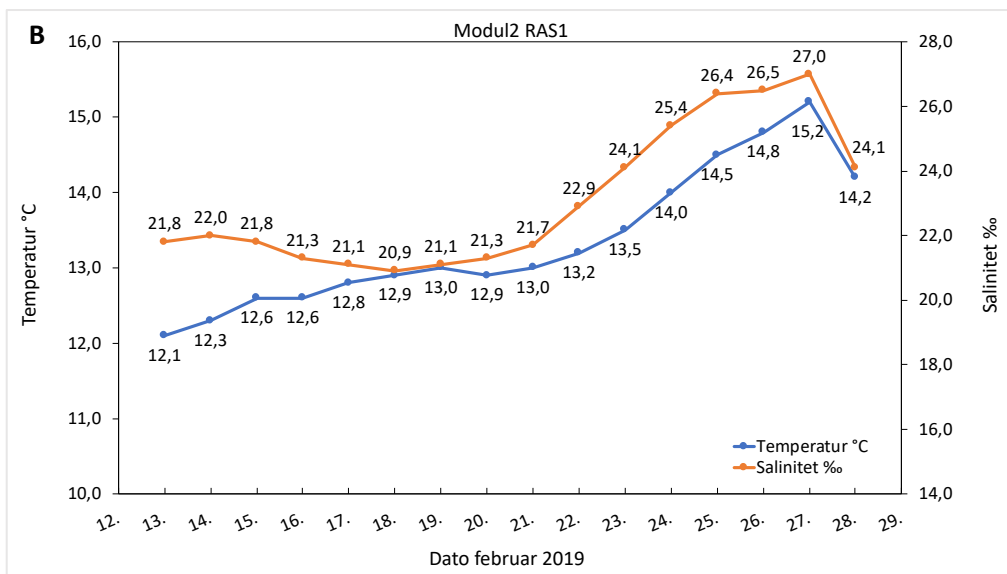
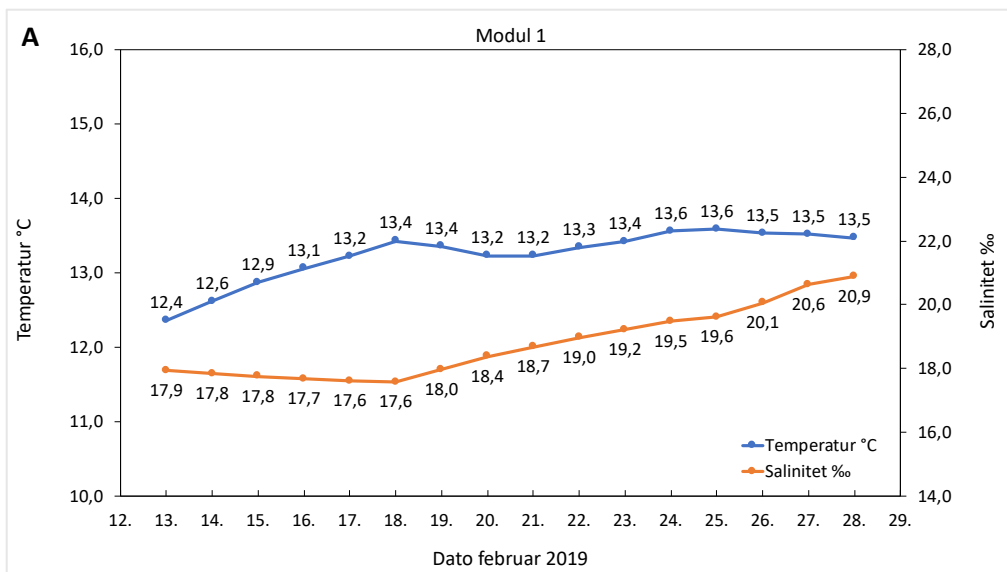
**Tabell 7:** Scoringsskjema for sår basert på histopatologiskemetoder (HE-farging og IHK). Patologiscore = grad av patologi (0-3). Hovedkriterier = kriterier/kategorier som har blitt gitt en subjektiv scoringsgrad 0-3. Tilleggskriterier = kriterier som har blitt registrert som ikke til stede (0) eller til stede (1).

Patologiscore	Ingen (0)	Sparsom (1)	Moderat (2)	Uttalt (3)
<b>Hovedkriterier</b> <i>Affisert hudvev (dybde på sår)</i>	Intakt og ansees som normal.	Erosjon. Fokalt tap av epidermis.	Ulcer. Fullstendig tap av epidermis, hele eller deler av dermis er affisert (spongiøse og kompakte del). Hypodermis kan også være affisert. Tilstøtende skjelettmuskulatur er intakt.	Ulcer. Fullstendig tap av epidermis, dermis og hypodermis. Tilstøtende skjelettmuskulatur er affisert.
<i>Degenerasjon av hudvev</i>	Intakt og ansees som normalt.	Hovedsakelig intakt, men noe nedbrutt vev- og cellestruktur.	Vev- og cellestruktur er til dels brutt ned.	Massiv nedbrytning av vev- og cellestruktur. Normalstruktur kan være erstattet av bakterier.
<i>Sirkulasjonsforstyrrelser (stuvning og/eller blødning)</i>	Ingen observasjoner av blødning eller stuvning i blodkar.	Fokale blødninger og stuvning i blodkar.	Multifokale blødninger og stuvning blodkar.	Blødninger diffust i vevet. De fleste blodkar har stuvning.
<i>Infiltrasjon av immunceller i HE-snitt</i>	Ingen infiltrasjon av leukocytter.	Fokal infiltrasjon av leukocytter.	Multifokal infiltrasjon av leukocytter.	Diffus infiltrasjon av leukocytter.
<i>Merking av leukocytter med C4B6 i et utvalgt område i IHK-snitt</i>	Ingen merking av leukocytter.	Spredt og få merkede leukocytter.	Få leukocytter merket fokalt eller multifokalt.	Diffus og massiv merking av leukocytter.
<i>Celleproliferasjon (anti-PCNA)</i>	Ingen merking av celler med anti-PCNA.	Få celler er merket med anti-PCNA.	Moderat merking av celler med anti-PCNA multifokalt.	Utbredt merking av celler med anti-PCNA diffust.
<p><b>Tilleggskriterier</b></p> <p><i>Reepitelisering:</i> epidermisceller som ser ut til å vandre til sårområdet.</p> <p><i>Hyperpigmentering i sårkant:</i> Pigmenteringsreaksjon med melanocytter i eller rundt sårområdet.</p> <p><i>Granulasjonsvev:</i> Dannelse av granulasjonsvev bestående av bindevev, fibroblaster, immunceller og små blodkar.</p> <p><i>Amorft proteinrikt eksudat:</i> Substrat som fyller sårområdet.</p> <p><i>Bakterier</i></p>				

## 3 Resultater

### 3.1 Driftsdata og fysiokjemiske parametere fra RAS-anlegget

Variasjonen i temperatur (°C) og salinitet (‰) i perioden 13.-28. februar er vist i figur 12A-C for de tre RAS-modulene. Temperaturen i modul 1 var forholdsvis jevn i hele perioden og lå mellom 12,4-13,6°C. Saliniteten lå også jevnt mellom 17,6-20,9‰. I samme periode hadde modul 2 derimot, en større variasjon og økning både i temperatur og salinitet for begge RAS-enhetene. For modul 2 RAS1 økte temperaturen jevnt fra 12,1°C til 15,2°C. Saliniteten fulgte samme utvikling med en jevn økning fra 21,8‰ til 27,0‰, men med et fall til 24,1‰ den 28. februar. Det samme mønsteret for temperatur og salinitet gjaldt også i modul 2 RAS2. Temperaturen økte jevnt fra PU3 til PU4, og lå mellom 12,0-14,7°C. Saliniteten økte fra 22,0‰ til 25,8‰ i samme periode, og sank til 19,2‰ mot slutten av PU4.

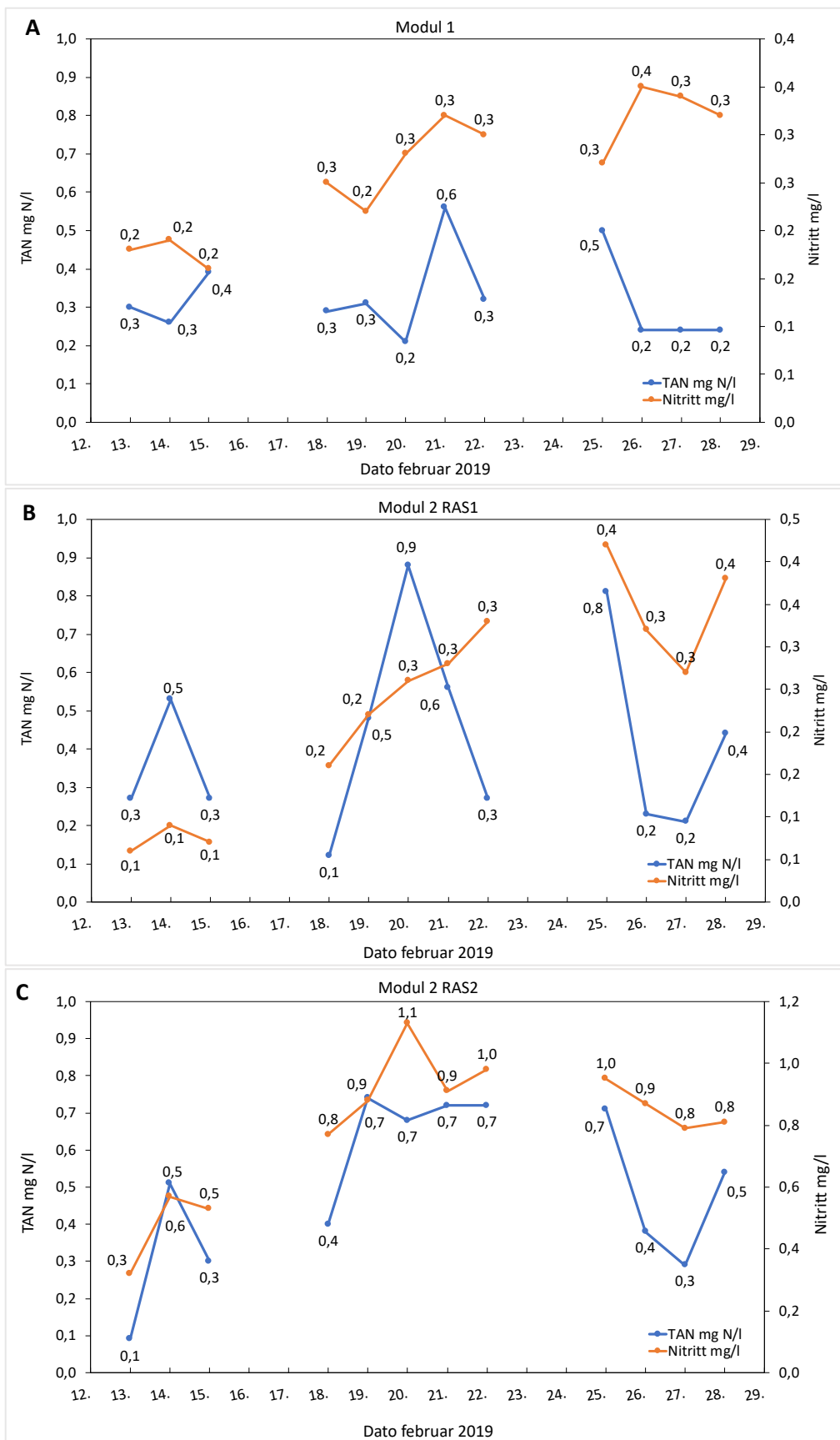


**Figur 12:** Temperatur (°C) og salinitet (‰) i RAS fra 13.-28. februar. A) Modul 1 RAS, B) Modul 2 RAS1, C) Modul 2 RAS2.

Det ble foretatt daglige målinger av TAN (mg N/l) og nitritt (mg/l), foruten om i helger, i hver av modulene (figur 13A-C). Verdiene i begge modulene varierte fra dag til dag, men lå alltid mellom 0,1-0,9 mg N/l for TAN og mellom 0,1-1,1 mg/l for nitritt. I gjennomsnitt lå TAN-verdiene på  $0,3 \pm 0,1$  mg N/l for modul 1,  $0,4 \pm 0,2$  mg N/l i modul 2 RAS1 og 0,5 mg N/l i modul 2 RAS2. Nitritt lå i gjennomsnitt på  $0,3 \pm 0,1$  mg/l i modul 1, 0,2 mg/l i modul 2 RAS1 og 0,8 mg/l i modul 2 RAS2.

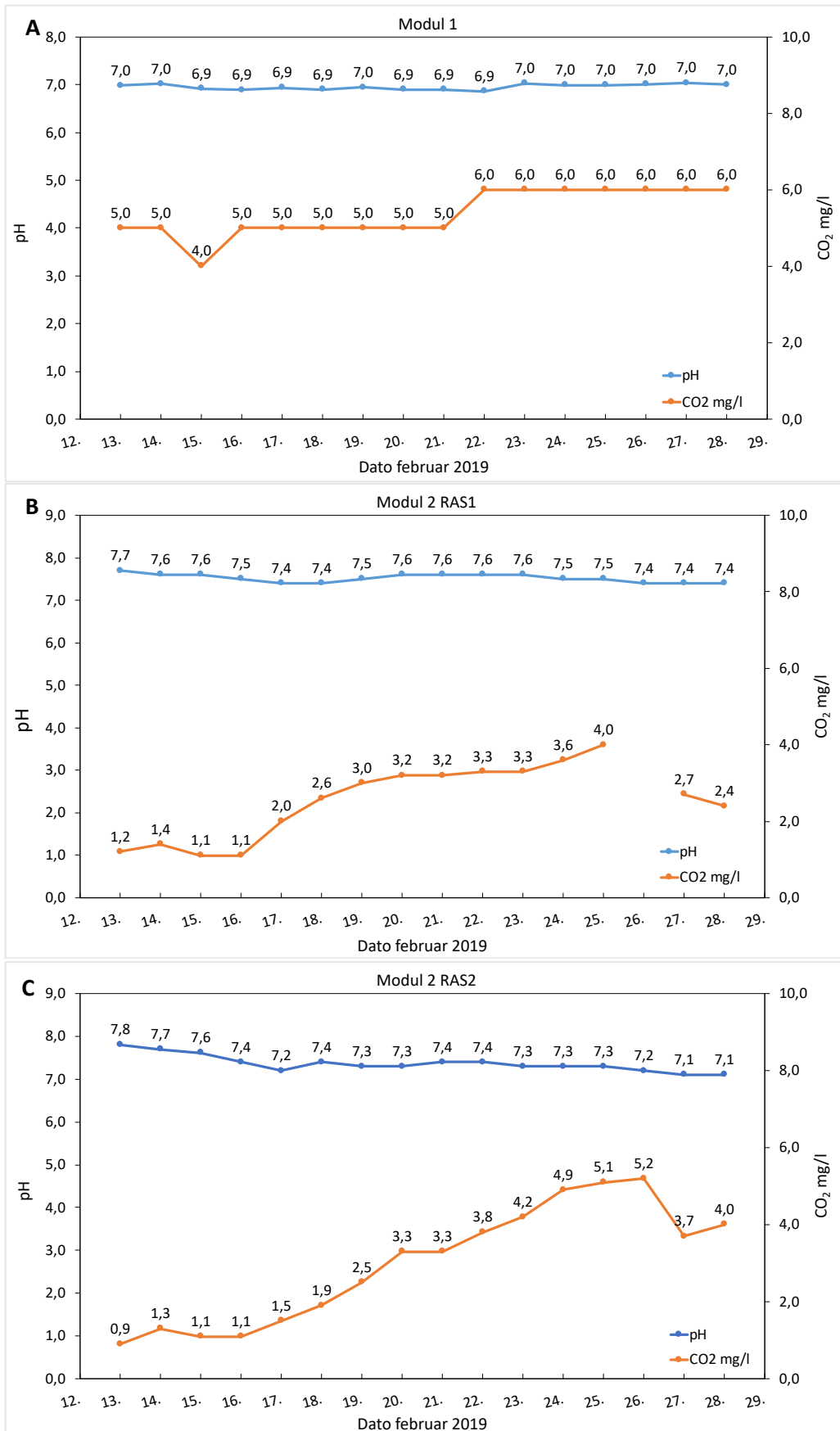
Målingene for pH og CO<sub>2</sub> er fremstilt i figur 14A-C. Gjennom hele perioden (13.-28. februar) lå pH i begge modulene mellom 6,9-7,8. Gjennomsnittlig pH var  $7,0 \pm 0,1$  i modul 1,  $7,3 \pm 0,7$  for modul 2 RAS1 og  $7,4 \pm 0,2$  for modul 2 RAS2. Verdiene av CO<sub>2</sub> lå jevnt mellom 4,0-6,0 mg/l i modul 1, med et gjennomsnitt på  $5,4 \pm 0,6$  mg/l. I modul 2 ble CO<sub>2</sub> verdiene målt til å ha økende verdi i samme periode. CO<sub>2</sub> i modul 2 RAS1 økte jevnt fra 1,2 til 4,0, før den gikk ned til 2,4 etter vasking av CO<sub>2</sub>-luftere den 26. februar. Gjennomsnittet lå på  $2,5 \pm 0,9$  mg/l. Nivåene i modul 2 RAS2 hadde også en jevn økning fra 0,9-5,2 mg/l, frem til 27.-28. februar hvor nivået sank til omtrent 4 mg/l. Gjennomsnittet var  $3,0 \pm 1,5$  mg/l i denne RAS-enheten.

Det ble også registrert verdier for O<sub>2</sub>-nivå for modul 1 og modul 2 (RAS1 og RAS2) i denne perioden. O<sub>2</sub>-nivået lå stabilt på 95% uten variasjon for begge modulene.



**Figur 13:** TAN (mg N/l) og nitritt i RAS fra 13.-28. februar. Det er ikke gjort målinger i periodene 9.-10., 16.-17. og 23.-24. februar, noe som forårsaker brudd i grafene. Dette skyldes helgeavvikling på anlegget. A) Modul 1 RAS, B) Modul 2 RAS1, C) Modul 2 RAS2.

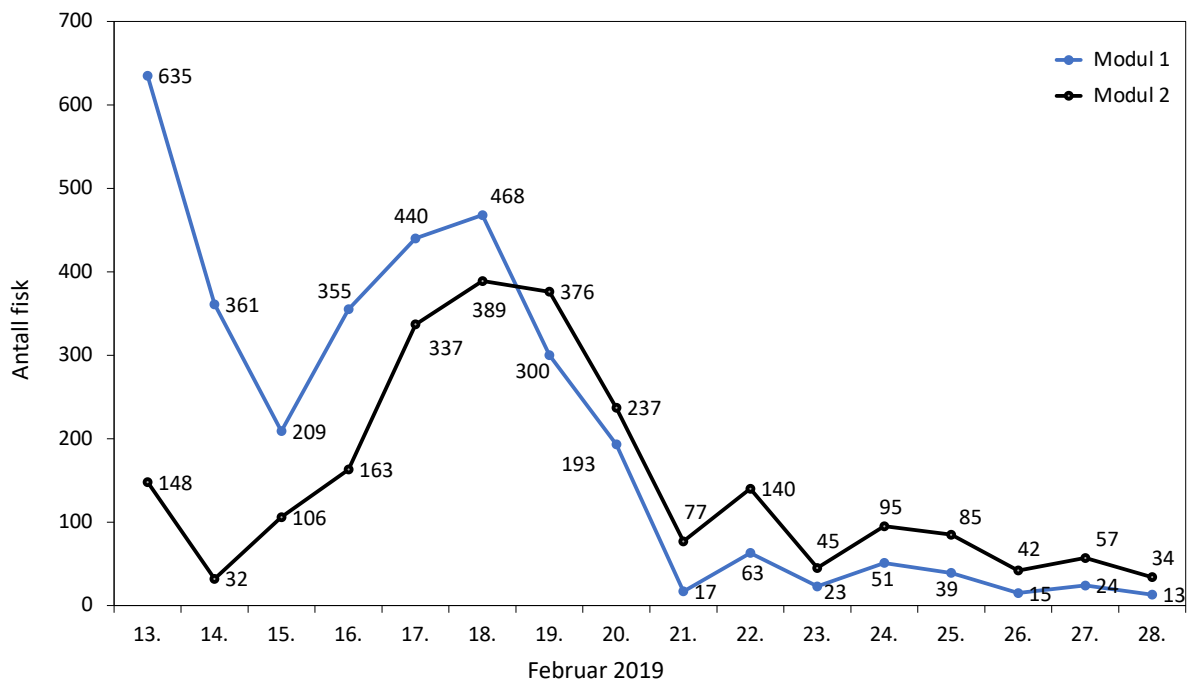




**Figur 14:** pH- og CO<sub>2</sub>-verdier i RAS for 13.-28. februar. A) Modul 1 RAS, B) Modul 2 RAS1. Den 26. februar ble CO<sub>2</sub>-luftere vasket og det ble ikke foretatt måling av CO<sub>2</sub> i karet. C) Modul 2 RAS2.

### 3.1.1 Dødelighet av fisk

Antall døde fisk ble registrert daglig av driftspersonalet på anlegget (figur 15). Dersom fisken hadde synlige sår, ble det registrert. I modul 1 var det totalt 3206 døde fisk i løpet av perioden 13.-28. februar, hvorav 105 (34%) var registrert med sår. Den første registreringen av døde fisk med sår i modul 1 var 22. februar. For modul 2 var det totale antallet døde fisk i perioden 13.-28. februar 2839, der 318 (11%) hadde sår og første registrerte tilfellet var 20. februar. Anlegget rapporterte at selv om de hadde gjentakende problemer knyttet til sår, var det i hovedsak i oppstarten av en ny produksjonssyklus og de så bedring etter noen uker (driftsleder, personlig kommunikasjon, 2019).



**Figur 15:** Døde fisk i RAS fra 13.-28. februar 2019. Daglig registrering av antall døde fisk fra både modul 1 og modul 2 i PU3 og PU4.

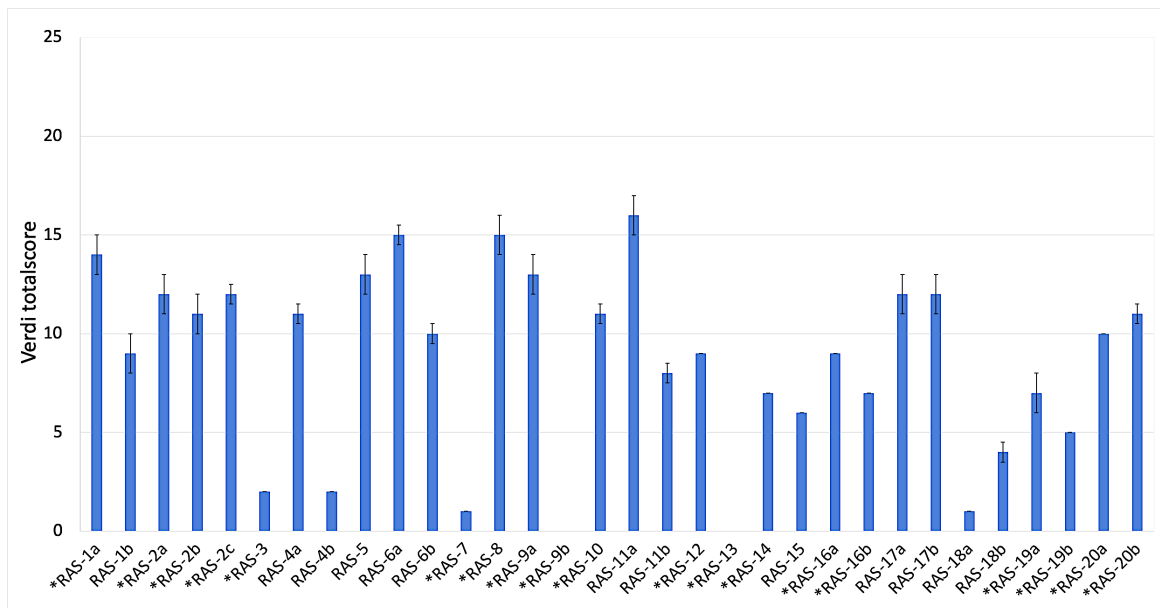
### 3.2 Histologiske analyser

Ved mikroskopering ble det foretatt histologiske vurderinger av histologipreparatene fremstilt fra de totalt 40 prøvene fra fisk i RAS-anlegget (sår n=29, frisk n=11), samt de 27 histologipreparatene med sårprøver fra FHF-prosjektet. Et utvalg på 20 prøver fra hver gruppe ble valgt ut for videre arbeid, basert på kvaliteten av materialet som viste representative morfologiske endringer observert i HE-preparater. De utvalgte HE-preparatene sammen med IHK-preparater ble vurdert etter indeks- og tilleggskriteriene i scoringssystemet utarbeidet i forbindelse med dette prosjektet (tabell 7). Resultatet fra scoringen er vist i tabell 8 og 9.

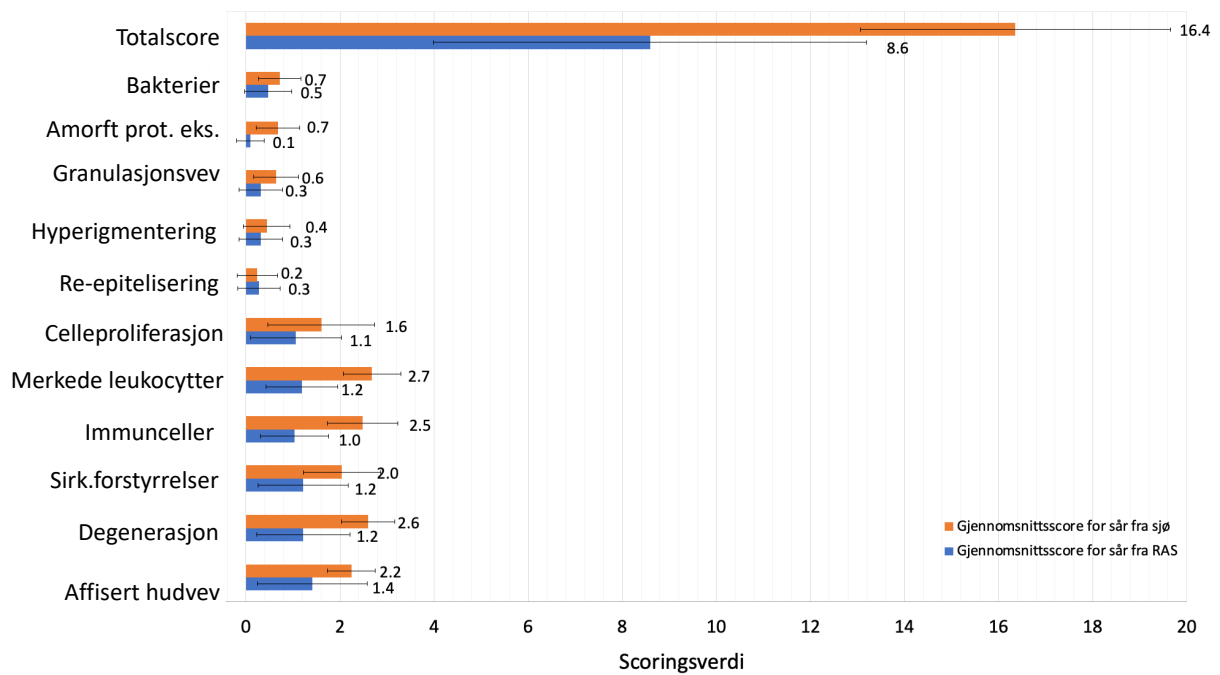
Noen av de 20 utvalgte prøvene hadde flere vevsbiter fra samme fisk på objektglasset, der dette var tilfellet ble prøvene merket med a, b eller c i tillegg til prøvenavn (dette kommer frem i tabell 8 og 9). For vurdering av prøvene har det derfor blitt henvist til scoring utført på et gitt histologisnitt.

### **3.2.1 Histologi fra fisk i RAS-anlegget**

For alle indeksekriteriene (affisert hudvev, degenerasjon av hudvev, sirkulasjonsforstyrrelser (blødning) og inflammasjon) ble det gitt en gjennomsnittsscore på 1,0-1,4, som tilsvarer sparsomme endringer (tabell 8). Det ble gitt alle scoringsverdier mellom 0-3, men score 2 som regnes som moderate endringer, hadde høyest frekvens på to av fire kriterier (degenerasjon av hudvev og sirkulasjonsforstyrrelser). Hudvevet var i hovedsak lite affisert og mer begrenset til erosjon, men med noen unntak som hadde ulcer av ulik grad (figur 27A-B). Når det gjelder degenerasjon av hudvev, sirkulasjonsforstyrrelser og infiltrering av immunceller ble dette i hovedsak observert i dermis og hypodermis i nærheten av sårområdet (figur 28A-B, 29A-B, 30A-B). Epidermis var i ulik grad synlig i snittene, men der epidermis var til stede kunne det i enkelte tilfeller observeres reepitelisering eller hypertrofi av epidermisceller (figur 33A-B). Reepitelisering fikk en gjennomsnittsscore på 0,3. For tilleggskriteriene ble det oftest gitt score 0, slik at i de fleste tilfeller var kriteriet «ikke til stede». Enkelte snitt/preparater hadde likevel noe registrering av «til stede». «Hyperpigmentering» ble observert i nærheten av sårkant (figur 34) og fikk en gjennomsnittsscore på 0,3 (figur 17). Granulasjonsvev fikk også en gjennomsnittsscore 0,3. Amorf proteinrikt eksudat ble observert i tre snitt, men med svært liten utbredelse (figur 17, tabell 8). For tilleggskriteriet «bakterier» ble det registrert 15 snitt (tilsvarer 11 individer) med bakterier til stede. De observerte bakteriene var tilsynelatende korte stavbakterier i ytre deler av huden i tilknytning til sår. Bakteriene lå som et tynt lag og i avgrensede områder (figur 37A). Det ble regnet ut en totalscore for hvert snitt (summen av scoren fra samtlige kriterier i scoringskjemaet, minimum 0 og maksimum 23). For snittene fra RAS-anlegget var den laveste registrerte totalscoren på 0 og den høyeste på 16 (figur 16, tabell 8). Dersom snittene fra uttak 1 og 2 blir sett på hver for seg, hadde 66,7% av snittene fra uttak 1, en totalscore mellom 10-16. For uttak 2 var dette 28,6%. Dersom det blir sett på det totale gjennomsnittet for totalscoren, lå det på 8,6 (figur 17, tabell 8).



**Figur 16:** Totalscore ( $\pm$ SE) for hvert histologisnitt fra laks i RAS. Totalscoren er summen av scoringene for indeks- og tilleggskriteriene.



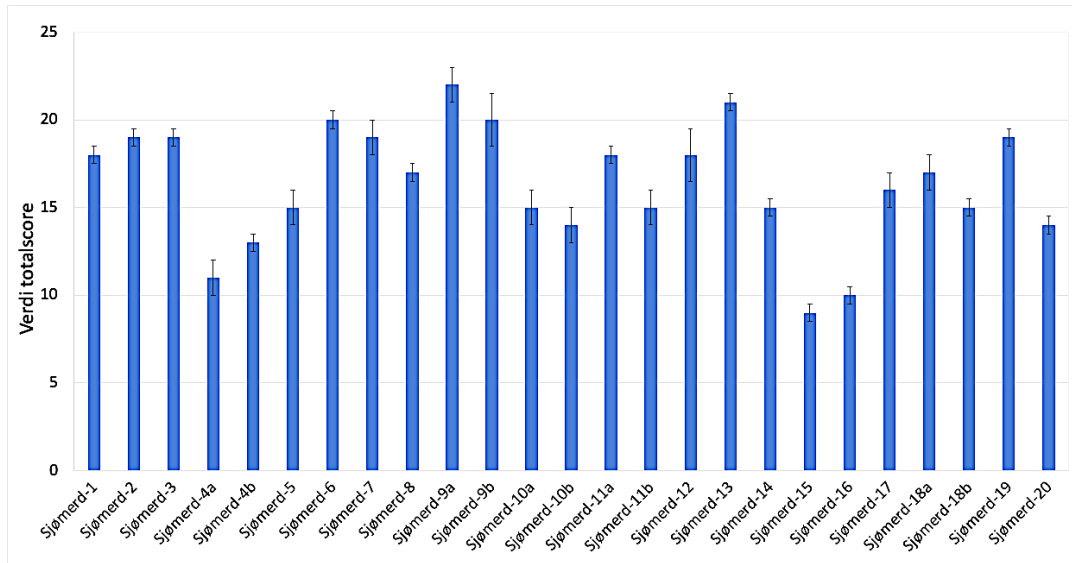
**Figur 17:** Gjennomsnittscore ( $\pm$ SE) for scoringskriteriene, inkludert totalscore.

**Tabell 8:** Oppsummering av histopatologiske undersøkelser på de utvalgte histologi- og IHK-snitt fra laks hentet fra RAS-anlegget. Prøvenummer merket \* er prøver hvor bakterieforekomst fra sår på samme fisk har blitt undersøkt ved hjelp av amplikonanalyse. Nederst vises gjennomsnittsverdien og standardfeilen for hvert kriterium.

Prøvenr.	Affisert hudvev	Degenerasjon	Sirkulasjonsforstyrrelse	Infiltrasjon av immunceller	IHK-merkede leukocytter	Celleproliferasjon (anti-PCNA)	Reepitelisering	Hyperpigmentering i sårkant	Granulasjonsvev	Amorft proteinrikt eksudat	Bakterier	Totalscore
RAS-1a*	3	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1	14
RAS-1b*	2	2	0	1	1	2	1	0	0	0	0	9
RAS-2a*	3	2	1	1	1	1	1	0	0	1	1	12
RAS-2b*	3	3	2	1	1	0	0	0	0	0	1	11
RAS-2c*	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	1	12
RAS-3*	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
RAS-4a	2	1	2	1	1	2	0	0	0	1	1	11
RAS-4b	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
RAS-5	3	3	2	1	2	0	0	1	0	0	1	13
RAS-6a	2	2	3	2	2	1	0	1	0	1	1	15
RAS-6b	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	1	10
RAS-7*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
RAS-8*	3	2	2	2	3	1	0	0	1	0	1	15
RAS-9a*	3	3	2	1	2	0	0	1	0	0	1	13
RAS-9b*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAS-10*	2	2	2	1	1	0	1	1	0	0	1	11
RAS-11a	3	2	3	2	3	1	0	0	1	0	1	16
RAS-11b	1	0	1	1	1	2	1	0	1	0	0	8
RAS-12*	0	1	1	1	1	3	1	0	1	0	0	9
RAS-13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAS-14*	0	1	0	0	2	2	0	0	1	0	0	6
RAS-15	0	0	1	1	1	2	0	0	1	0	0	6
RAS-16a*	0	0	2	1	1	3	1	0	1	0	0	9
RAS-16b*	0	0	1	1	1	2	1	0	1	0	0	7
RAS-17a	2	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0	12
RAS-17b	2	2	2	2	1	2	0	0	1	0	0	12
RAS-18a	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
RAS-18b	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	4
RAS-19a*	2	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	7
RAS-19b*	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	5
RAS-20a*	1	1	2	2	2	0	0	1	0	0	1	10
RAS-20b*	2	1	2	2	2	0	0	1	0	0	1	11
Gj.snitt	1,4	1,2	1,2	1,0	1,2	1,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,5	8,6
St.feil	1,2	1,0	1,0	0,7	0,8	1,0	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	4,6

### 3.2.2 Histologi fra fisk i sjømerder

Histologisnittene fra fisk i sjømerder hadde for alle de fire indekskriteriene en gjennomsnittscore på mellom 2,0-2,6 (tabell 9), hvorav score 2 tilsvarer moderate endringer. Det var gjennomgående større uttalte forandringer i histologisnittene fra sjø, hvorav affeksjon og degenerasjoner kunne observeres dypere i huden, sirkulasjonsforstyrrelsene var større og infiltrasjonen av immunceller (i HE-snittene) var høyere enn i histologisnittene fra RAS-anlegget (figur 27C, 28C, 29C, 30C). For histologisnittene fra sjø ble score 0 kun gitt én gang, dette var i prøve Sjømerd-4a i kategorien sirkulasjonsforstyrrelser. Score 1 var deretter den scoren med lavest frekvens i alle indekskriterier. Histologisnittene fra sjø hadde et høyere antall snitt med score 3 enn histologisnittene fra RAS-anlegget. Den laveste totalscoren var på 9 og den høyeste var 22 (figur 18, tabell 9), mens gjennomsnittet for totalscoren var 16,4 (figur 17, tabell 9). Det ble i større grad observert granulasjonsvev (figur 35) og amorft proteinrikt eksudat i sjø, sistnevnte med svært liten utbredelse i snittet (figur 36). Fra sjø ble det observert bakterier i 18 av 25 histologisnitt, tilsvarende 16 individer. Disse bakteriene var lange stavbakterier (LS) alene (figur 37C) eller i kombinasjon med korte stavbakterier (KS) (figur 37D). Det ble observert LS i omtrent halvparten (n=8) av histologisnittene, enda færre av histologisnittene hadde kun KS (n=4) (figur 37B) eller en kombinasjon av LS og KS (n=6). Bakteriene ble observert med høy tetthet i dermis i sårkanten hvor det var lite struktur igjen i vevet (figur 37B-D). Bakteriene kunne i noen tilfeller også observeres dypere i huden, men også da i tilknytning til sår. Også i histologisnittene fra sjø var epidermis fraværende i flere tilfeller, men det kunne i de tilfeller det var til stede observeres reepitelisering. Reepitelisering fikk i gjennomsnitt en score på 0.2 (figur 17, tabell 9).



**Figur 18:** Totalscore ( $\pm$ SE) for hvert histologisnitt fra laks i tradisjonelle sjømerder. Totalscoren er summen av scoringene for indeks- og tilleggskriteriene.

**Tabell 9:** Oppsummering av histopatologiske undersøkelser på de utvalgte histologi- og IHK-snitt fra laks hentet fra tradisjonelle sjømerder. Nederst vises gjennomsnittsverdien og standardfeilen for hvert kriterium.

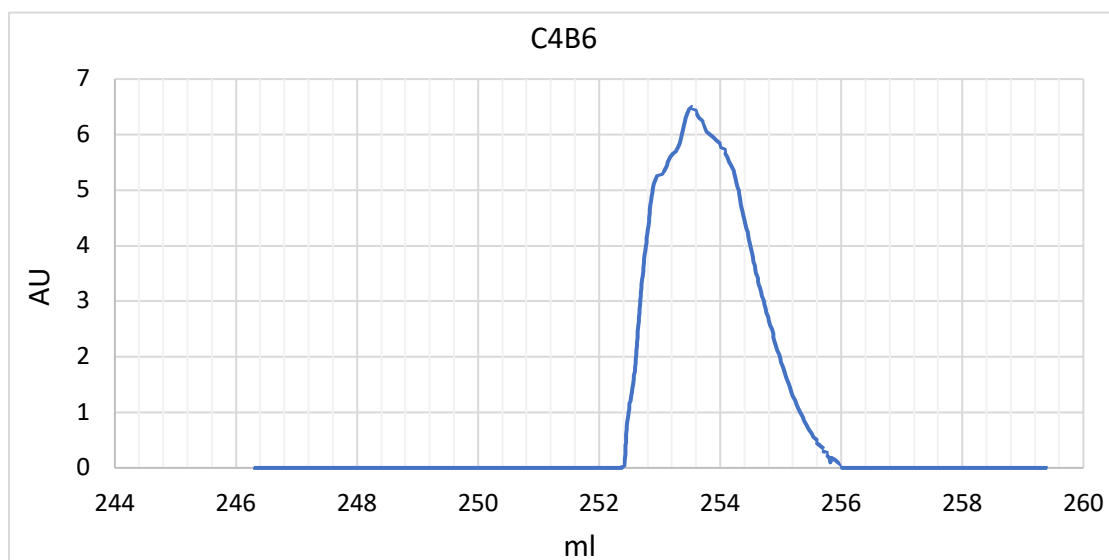
Provennr.	Affisert hudvev	Degenerasjon	Sirkulasjonsforstyrrelse	Infiltrasjon av immunceller	IHK-merkede leukocytter	Celleproliferasjon (anti-PCNA)	Reepitelisering	Hyperpigmentering i sårkant	Granulasjonsvev	Amorft proteinrikt eksudat	Bakterier	Totalscore
Sjømerd-1	2	3	2	3	3	2	0	0	1	1	1	18
Sjømerd-2	2	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1	19
Sjømerd-3	2	3	2	3	3	3	1	0	0	1	1	19
Sjømerd-4a	3	3	0	1	1	2	0	0	0	0	1	11
Sjømerd-4b	2	3	1	1	2	2	0	1	0	0	1	13
Sjømerd-5	3	3	2	2	3	0	0	1	0	0	1	15
Sjømerd-6	2	3	3	3	3	2	1	0	1	1	1	20
Sjømerd-7	2	2	3	3	3	3	0	1	1	1	0	19
Sjømerd-8	2	2	1	3	3	3	0	0	1	1	1	17
Sjømerd-9a	3	3	3	3	3	3	0	1	1	1	1	22
Sjømerd-9b	3	3	2	3	3	3	0	1	1	1	0	20
Sjømerd-10a	2	2	2	3	3	1	0	0	1	1	0	15
Sjømerd-10b	2	2	1	3	3	1	0	0	1	1	0	14
Sjømerd-11a	2	2	3	3	3	2	0	0	1	1	1	18
Sjømerd-11b	2	1	3	3	3	1	0	0	1	1	0	15
Sjømerd-12	3	2	3	3	3	2	0	0	1	1	0	18
Sjømerd-13	2	3	3	3	3	2	1	1	1	1	1	21
Sjømerd-14	2	3	2	2	3	0	0	1	0	1	1	15
Sjømerd-15	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	9
Sjømerd-16	2	3	1	1	2	0	0	0	0	0	1	10
Sjømerd-17	3	3	2	2	2	1	1	0	1	0	1	16
Sjømerd-18a	3	3	2	2	3	0	0	1	1	1	1	17
Sjømerd-18b	2	2	2	2	3	1	0	1	0	1	1	15
Sjømerd-19	2	3	2	3	3	3	0	1	1	0	1	19
Sjømerd-20	1	2	2	3	2	0	1	1	1	1	0	14
Gj.snitt	2,2	2,6	2,0	2,5	2,7	1,6	0,2	0,4	0,6	0,7	0,7	16,4
St.feil	0,5	0,6	0,8	0,8	0,6	1,1	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	3,3



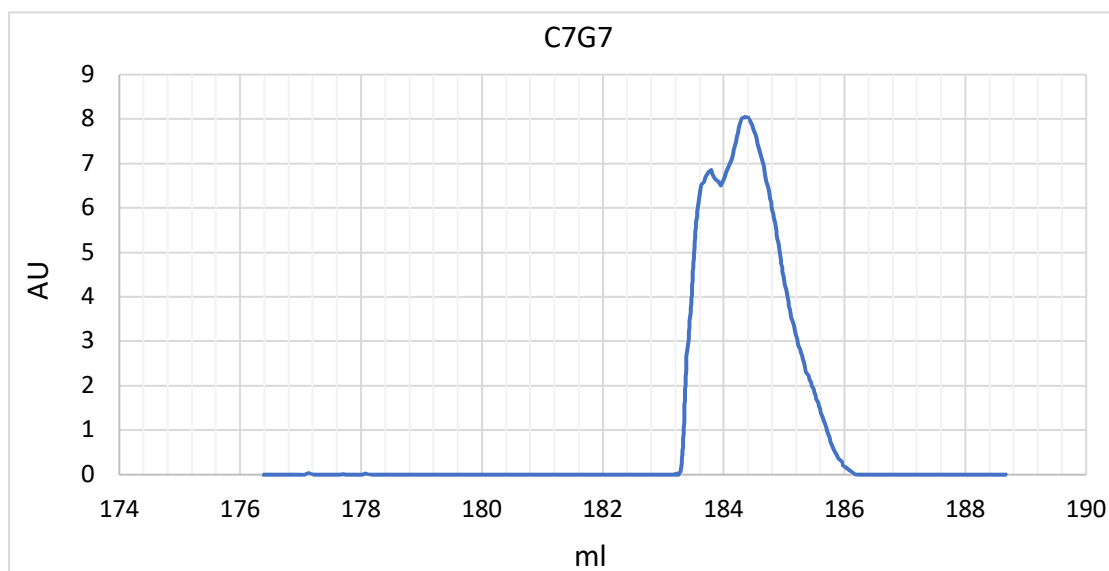
### 3.3 Optimalisering av immunhistokjemiske metoder

#### 3.3.1 Isolering av antistoff

Gjennom protein G kolonne og affinitetskromatografi ble det isolert ~4 ml C4B6 antistoff som ble eluert etter tilføring av 252 ml elueringsbuffer (figur 19). Det ble isolert ~3 ml av antistoffet C7G7 etter tilførsel av tilførsel av 183 ml elueringsbuffer (figur 20).



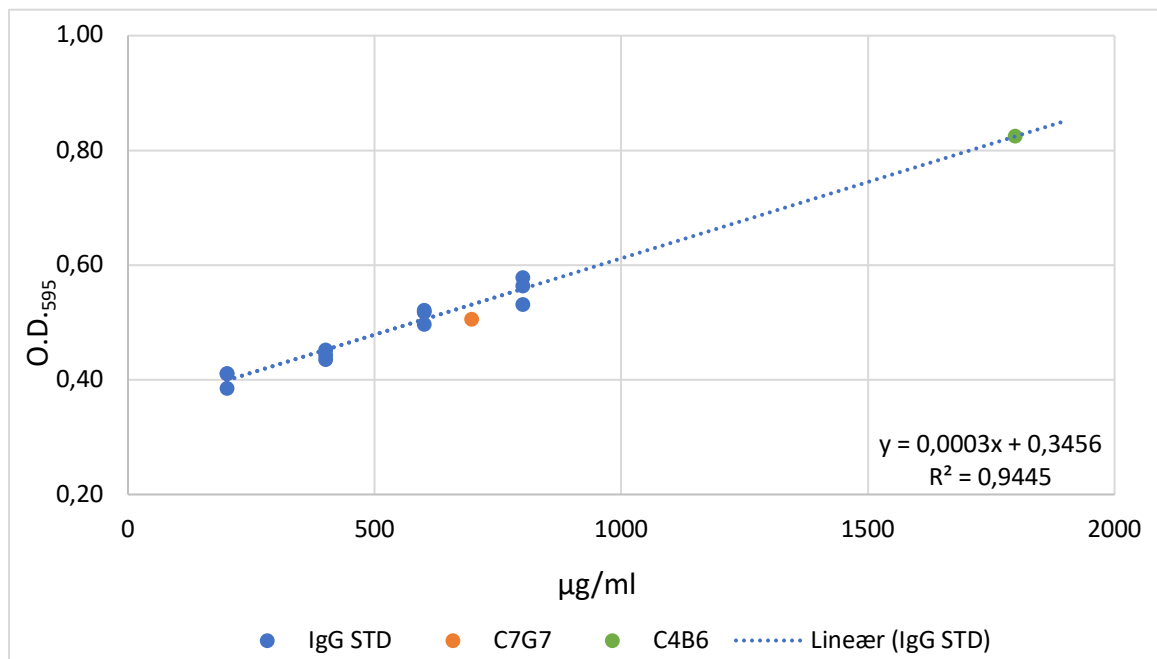
**Figur 19:** Antistoffkromatogram for C4B6. Eluert antistoff ~4ml. Målingen er gjort i absorbans per enhet (AU) mot ml.



**Figur 20:** Antistoffkromatogram for C7G7. Eluert antistoff ~3ml. Målingen ble gjort i absorbans per enhet (AU) mot ml

Gjennom Bio-Rad Protein Assay ble antistoffene C7G7 og C4B6 kvantitert. Konsentrasjonen til antistoffene C7G7 og C4B6 ble målt til henholdsvis 697  $\mu\text{g/ml}$  og 1798  $\mu\text{g/ml}$  (figur 21).

Trendlinjen viser gjennomsnittet av replikatene for proteinstandarden IgG. Ut ifra figur 21 ligger konsentrasjonen til begge antistoffene på eller veldig nært linjen til protein standarden.



**Figur 21:** Standardkurve for Bio-Rad Protein Assay med IgG som standardprotein og OD-verdi for antistoffene C7G7 og C4B6. Målt i optical density (OD).

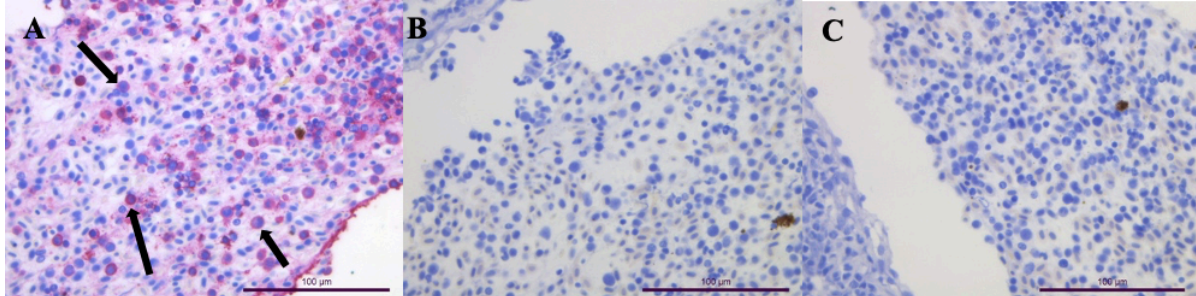
### 3.3.2 Antistoff C7G7

Antistoffet C7G7 ble benyttet for merking av B-celler. Antistoffet har ikke blitt brukt til IHK med parafinsnitt av hudvev tidligere, og det var derfor behov for å utvikle og tilpasse IHK-metoden. Under mikroskopering ble det ikke registrert uspesifikk merking i vev på noen av testsnittene med C7G7 som primærantistoff. Dette gjaldt for alle fortynningsforhold og inkuberingstider. For de negative kontrollene ble det heller ikke registrert uspesifikk merking. Etter inkubering med FastRed-substrat på IHK-snitt kan det ofte observeres makroskopisk, en rødlig farge på vevet. Dette var ikke tilfellet for IHK-snitt med antistoffet C7G7.

### 3.3.3 Antistoff C4B6

Antistoffet C4B6 ble benyttet for merking av leukocytter. På samme grunnlag som C7G7 trengte også C4B6 metodeutvikling og -tilpasning. Gjennom mikroskopering hadde alle testsnittene med C4B6 som primærantistoff merking av leukocytter, uavhengig av fortynningsforhold og inkuberingstid. Fortynningen 1:1000 og 3 timer inkubering ga tydeligst merking i testpreparatene og ble derfor brukt videre til IHK med prosjektets prøvemateriale

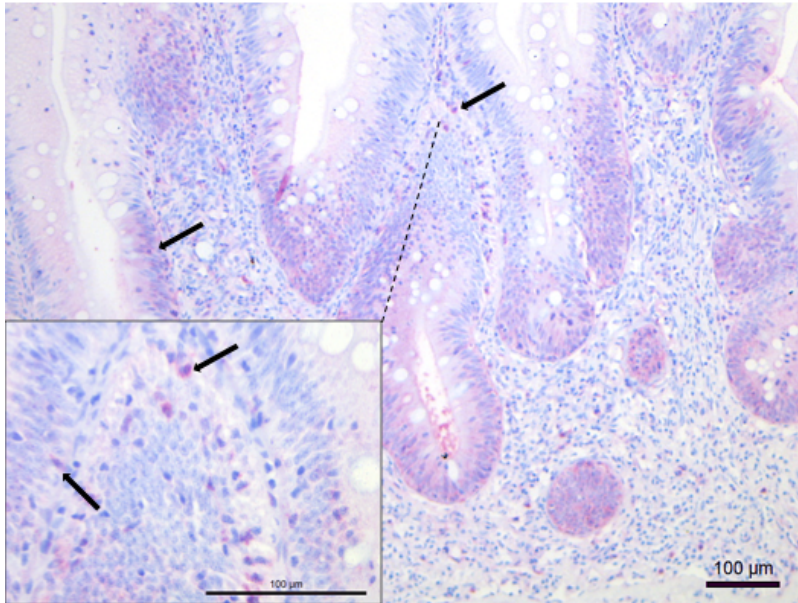
(figur 22A). Begge de negative kontrollene, den med primærantistoff Mab *A.salmonicida* (figur 22B) og den med 2.5% BSA i TBS (figur 22C) hadde ingen uspesifikk merking etter IHK var utført etter protokoll.



**Figur 22:** Kontrollsnitt for IHK merking med C4B6 antistoff. Snittene er fra nyre- og miltpreparater (40x). A) C4B6 merking av leukocytter. Tydelig merking av leukocytter (piler). B) Negativ kontroll med *A. salmonicida* som primærantistoff. C) Negativ kontroll med BSA i stedet for primærantistoff. Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

### 3.3.4 Anti-PCNA

Anti-PCNA antistoff ble benyttet til og vise celleproliferasjon. Metoden for IHK med anti-PCNA ble testet på tarmvev med ulike fortynninger, inkuberingstider og forbehandlingsmetoder for å se om reagensene som ble benyttet viste ønsket resultat. Snittene uten forbehandling ga ingen merking, og snittene med trypsinforbehandling ga ingen eller svært svak merking. Ved fortynning 1:200, inkubering 3 timer og med citratforbehandling var det tydelig reaksjon i testsnittene med tydelig merking på celler under deling i lamia propria og i tarmepitelet (figur 23). I epitelcellenes cytoplasma var det svak bakgrunnsfarging. Som negativ kontroll ble primærantistoffet Mab *A.salmonicida* fortynning 1:200 brukt. Det var ingen uspesifikk merking med museserumets isotype IgG. Negativ kontroll der primærantistoffet ble utelatt og preparatet inkubert med 2.5% BSA i TBS, hadde heller ingen uspesifikk merking.



**Figur 23:** Anti-PCNA for merking av celleproliferasjon. Tydelig merking av prolifererende cellekjerner (piler). Forstørrelse: x100, utsnitt x400. Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

### 3.4 Immunhistokjemi med monoklonale antistoff på prøver fra RAS og sjømerder

#### 3.4.1 Antistoff C4B6

##### *Resultat fra prøvene fra RAS-anlegget*

Resultatene fra IHK med C4B6 i prøvematerialet fra RAS-anlegget viste merking av ulike leukocytter i og rundt sårområdet (figur 31A-C). Merkingen var hovedsakelig lokalisert i dermis og hypodermis. Det ble gjort få observasjoner av merking av leukocytter i muskulaturen. Resultatene fra scoringssystemet viste at 18 av 32 snitt hadde score 1, syv snitt hadde score 2 og bare to snitt hadde score 3. Fem snitt hadde ingen merking og fikk score 0. I gjennomsnitt ble det gitt score  $1,2 \pm 0,8$  på merking av leukocytter med C4B6 (tabell 8).

##### *Resultat fra prøvene fra sjømerder*

Det ble utført samme IHK-prosedyre med antistoffet C4B6 på snittene fra fisk i sjømerder som på snittene fra RAS-anlegget. I disse snittene ble det under mikroskopering registrert merking av leukocytter i dermis, hypodermis og dypt ned i rød muskulatur (figur 31A-C). Score 3 hadde høyest forekomst med 19 snitt, fire snitt fikk score 2 og to snitt fikk score 1. Fra prøvene fra fisk i sjømerder var det ingen av de 25 snittene som fikk score 0. Snittene fikk en gjennomsnittscore på  $2,7 \pm 0,8$  (tabell 9).

### 3.4.2 Anti-PCNA

#### *Resultat fra prøvene fra RAS-anlegget*

Snittene fra RAS-anlegget ble scoret 0-3 basert på hvor uttalt merkingen av prolifererende celler med anti-PCNA var. Det ble i gjennomsnitt gitt en score  $1,1 \pm 1,0$ . Det ble gitt score 0 til 12 av 32 snitt, score 1 ble gitt på 8 snitt og score 2 på 10 snitt. Det var bare to snitt som fikk score 3 (tabell 8).

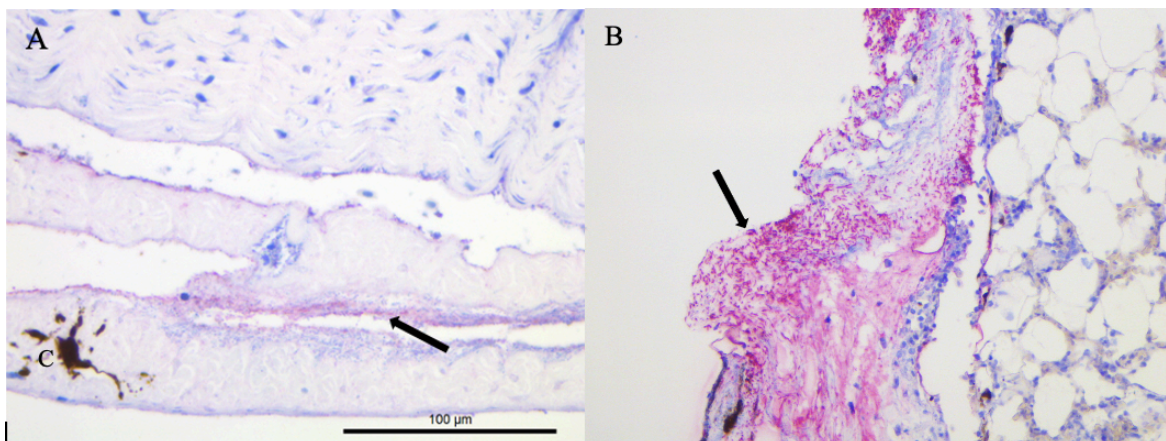
#### *Resultat fra prøvene fra sjømerder*

Snittene fra fisk i sjømerder ble scoret ut ifra samme kriterier som prøvene fra RAS-anlegget, hvorav gjennomsnittscoren for merking med anti-PCNA var  $1,6 \pm 1,1$ . Seks av snittene fikk score 0, fem fikk score 1, syv fikk score 2 og syv fikk score 3 (tabell 9). Det var merking både av prolifererende epidermisceller og fibroblaster (figur 32A-C).

## 3.5 Immunhistokjemi med polyklonale antistoff på prøver fra RAS- og sjømerder

### 3.5.1 *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. i prøver fra RAS-anlegget

Det ble utført IHK med antiserum mot *M. viscosa* på et utvalg histologisnitt (n=12), basert på observasjoner i HE-snitt (tabell 8). Én prøve (RAS-5) hadde spesifikk merking for *M. viscosa* (figur 24A), resterende hadde ingen merking. Det ble observert lange stavformede bakterier i snitt RAS-20a og dette ble bekreftet gjennom IHK med antiserum mot *Tenacibaculum* sp. (figur 24B). I resterende histologisnitt fra RAS-anlegget ble det ikke observert lange stavbakterier og det ble derfor ikke utført IHK mot *Tenacibaculum* sp. på disse.

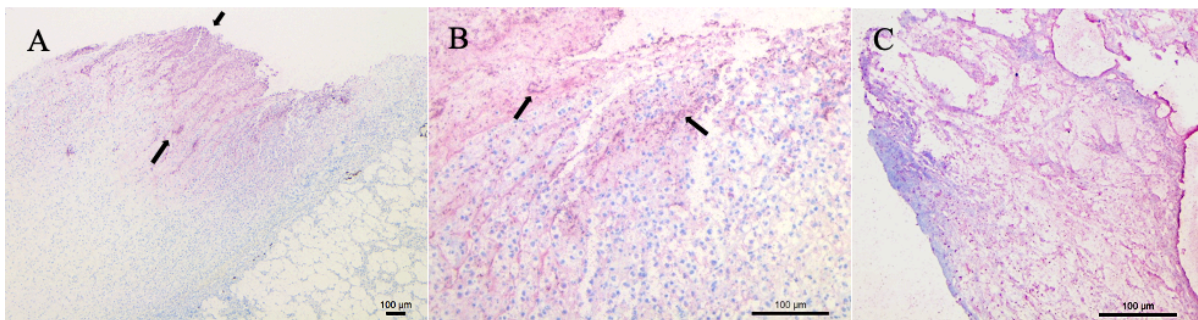


**Figur 24:** Påvisning av bakterier i sår med bakteriespesifikke antistoff. A) Spesifikk merking for *M. viscosa* i prøve RAS-5. Bakteriene ligger i dermis i tilknytning til skjellomme (pil). Forstørrelse x400. B) Spesifikk merking for *Tenacibaculum* sp. i prøve RAS-20a (pil). Bakteriene ligger i dermis. Forstørrelse x200. Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

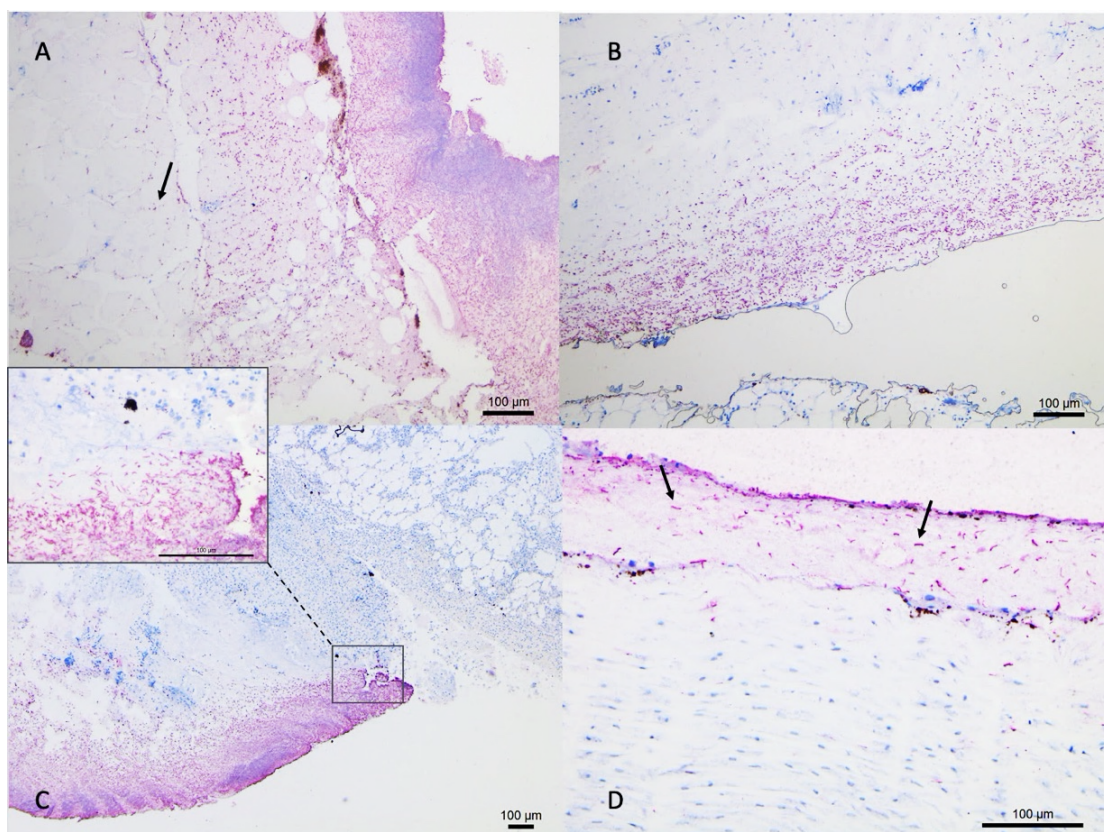


### 3.5.2 *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. i prøver fra sjømerder

På prøvene fra fisk i sjømerder ble det utført IHK med antiserum mot *M. viscosa* på samtlige snitt (n=25), basert på observasjoner i HE-snitt og påvisning av bakterier via dyrking gjort av VI (tabell 9). Resultatet viste at det var merking spesifikt for *M. viscosa* i 18 av prøvene, i de resterende 7 var det ingen merking (tabell 9). Merkingen av bakterier var i hovedsak i dermis, tilknyttet området rundt sårkant, noe merking ble også observert i hypodermis (figur 25A-C). Basert på histologiske funn ble det også utført IHK med antistoff mot *Tenacibaculum* sp. på et utvalg prøver (n=14). Antistoffet ga spesifikk merking i 13 av snittene. Bakterien var hovedsakelig lokalisert i dermis og i sårkant, men den ble også observert i hypodermis og mellom muskelfibre (figur 26A-D).



**Figur 25:** Påvisning av bakterier i sår med bakteriespesifikke antistoff mot *M. viscosa*. A-B) Spesifikk merking for *M. viscosa* i dermis i sårkant (piler), i prøve Sjømerd-12 (A: x50, B: x200). C) Spesifikk merking for *M. viscosa* i positiv kontroll (testsnitt fra VI) med kjent bakterieforekomst (x200). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen



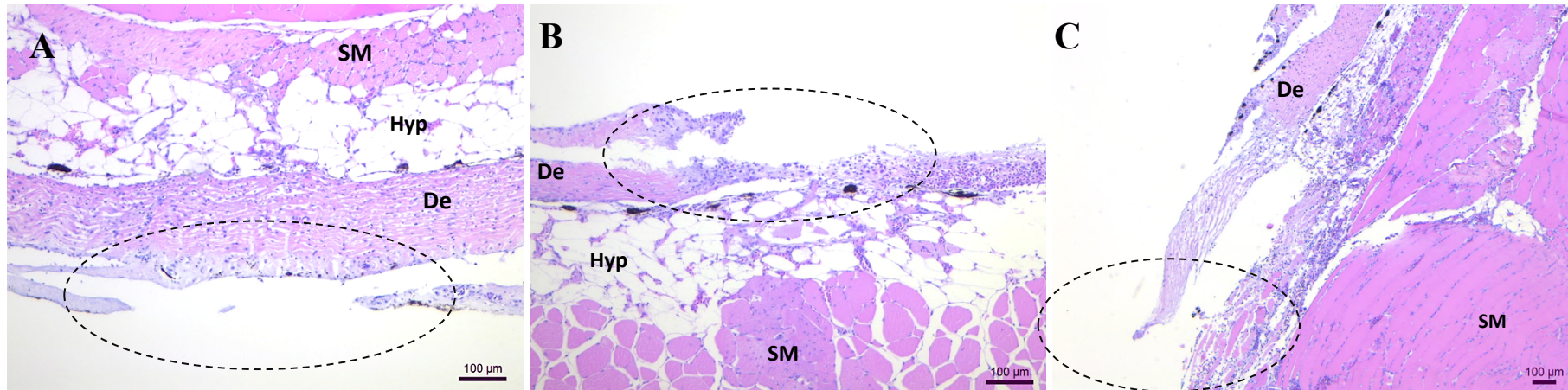
**Figur 26:** Påvisning av bakterier i sår med bakteriespesifikke antistoff mot *Tenacibaculum* sp. A) Spesifikk merking av bakterier i dermis, hypodermis og ned i skjelettmuskulaturen (pil) i prøve Sjømerd-4a (x100). B) Spesifikk merking for *Tenacibaculum* sp. i dermis. Bakteriene er orientert i samme retning som vevsstrukturene i dermis. Prøve: Sjømerd-17 (x100). C) Spesifikk merking for *Tenacibaculum* sp. i prøve Sjømerd-6. Bakteriene ligger som et tykt lag i dermis i sårkanten (x50). Fremhevet i utsnitt (x400) D) Positiv kontroll (testsnitt fra VI) med kjent bakterieførekost (x200). Bakteriene ligger i øvre lag av dermis (piler), orientert i samme regning som vevsstrukturene. Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

**Tabell 10:** Påvisning av bakteriene *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp. ved IHK i histologisnitt fra sjø.

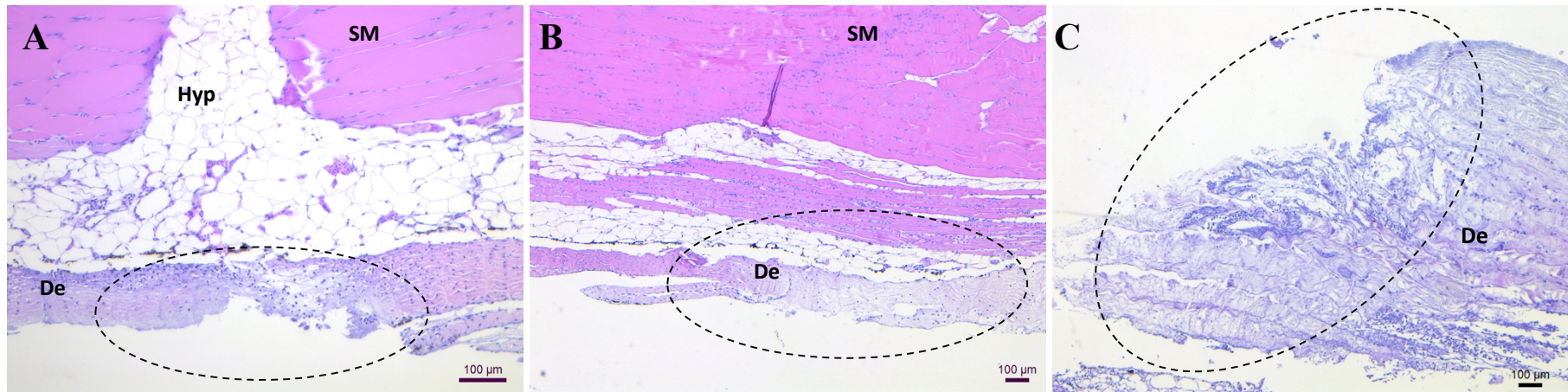
	Sjømerd-1	Sjømerd-2	Sjømerd-3	Sjømerd-4a	Sjømerd-4b	Sjømerd-5	Sjømerd-6	Sjømerd-7	Sjømerd-8	Sjømerd-9a	Sjømerd-9b	Sjømerd-10a	Sjømerd-10b	Sjømerd-11a	Sjømerd-11b	Sjømerd-12	Sjømerd-13	Sjømerd-14	Sjømerd-15	Sjømerd-16	Sjømerd-17	Sjømerd-18a	Sjømerd-18b	Sjømerd-19	Sjømerd-20
<i>M. viscosa</i>	1 *	1 *	1	0	0	1	1	0 *	1 *	1	1	1	1 *	1 *	1 *	1 *	1 *	1 *	0	0 *	0 *	1	1	1 *	0
<i>Tenacibaculum</i> sp.	1	1	1	1 *	1 *	1 *	1 *	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	x	1 *	1 *	1 *	1	1	1 *	x

\*bakterien også påvist gjennom dyrking utført ifbm FHF prosjektnr. 901434. x = ikke gjennomført IHK på gjeldende snitt. 0 = ikke til stede, 1 = til stede



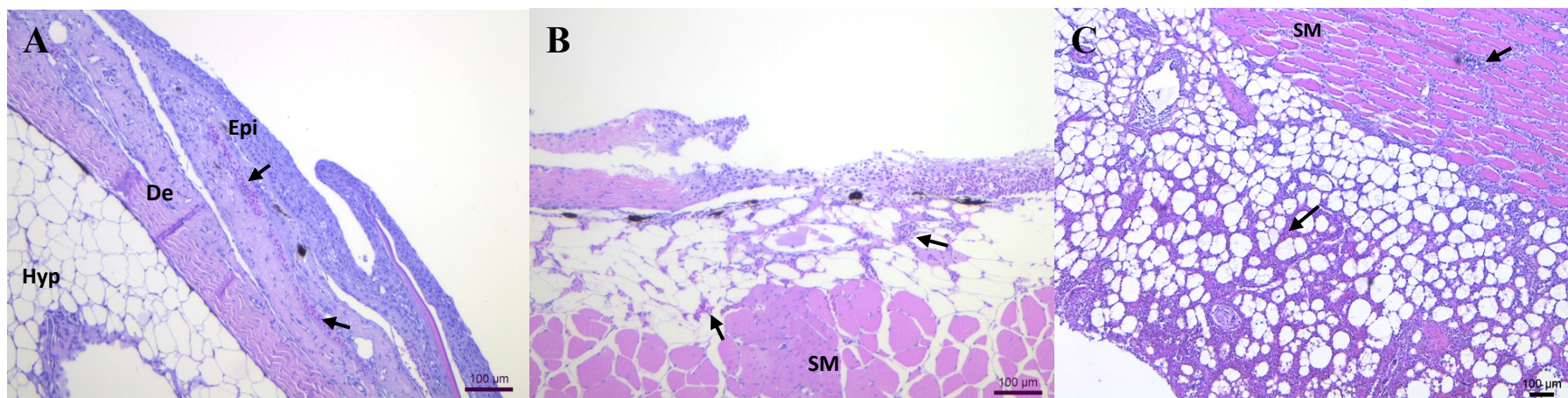


**Figur 27:** Hovedkriteriet: Affisert hudvev (HE-snitt). A) Score 1: Erosjon med fokalt tap av epidermis. RAS-20a, x100. B) Score 2: Tap av epidermis og deler av dermis, hypodermis er også noe affisert. RAS-4a, x100. C) Score 3: Fullstendig tap av epidermis, dermis og hypodermis i sårområdet. Hudvev affisert ned til skjelettmuskulatur. RAS-1a, x50. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

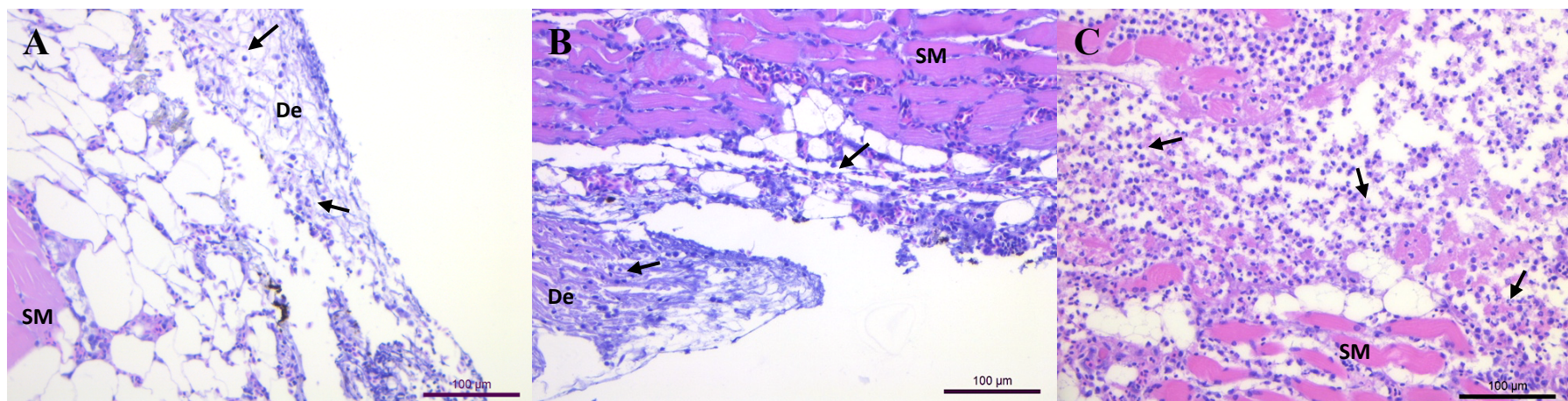


**Figur 28:** Hovedkriteriet: Degenerasjon av hudvev (HE-snitt). A) Score 1: Noe nedbrutt vev og cellestrukturer fokalt. RAS-20b, x100. B) Score 2: Vev- og cellestrukturer er til dels brutt ned i et større område. RAS-19a, x50. C) Score 3: Massiv nedbrytning av vev- og cellestrukturer i hele dermis. Sjømerd-14, x50. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen



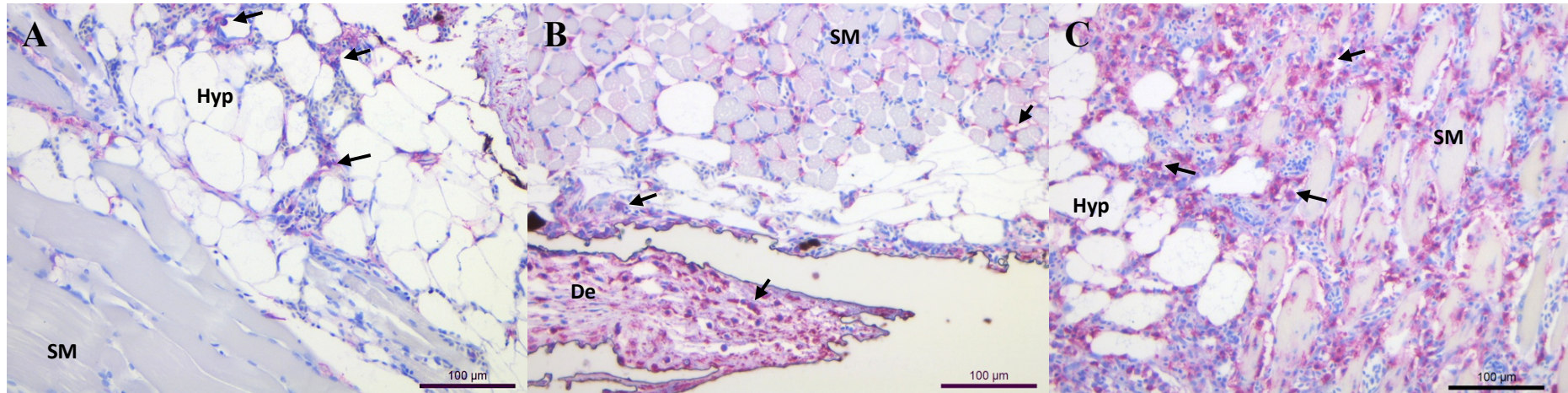


**Figur 29:** Hovedkriteriet: Sirkulasjonsforstyrrelser og blødning (HE-snitt). A) Score 1: Fokale blødninger (piler). RAS-12, x100. B) Score 2: Multifokale blødninger i sårområdet (piler). RAS-4a, x100 C) Score 3: Blødninger diffust i vevet, både i hypodermis og skjelettmuskulatur (piler). Sjømerd-13, x50. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

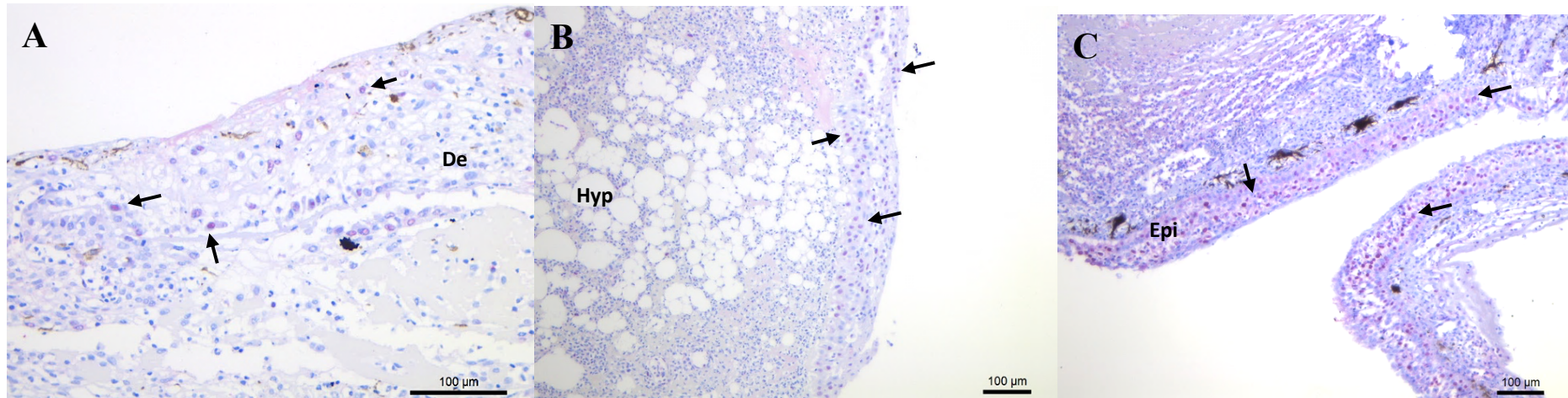


**Figur 30:** Hovedkriteriet: Infiltrasjon av immunceller (HE-snitt). A) Score 1: Fokal infiltrasjon med en begrenset mengde leukocytter (piler). RAS-1b, x200. B) Score 2: Multifokal infiltrasjon av leukocytter (piler) og større mengde. RAS-17b, x200. C) Score 3: Diffus infiltrasjon med store mengder leukocytter (piler). Sjømerd-9a, x200. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen



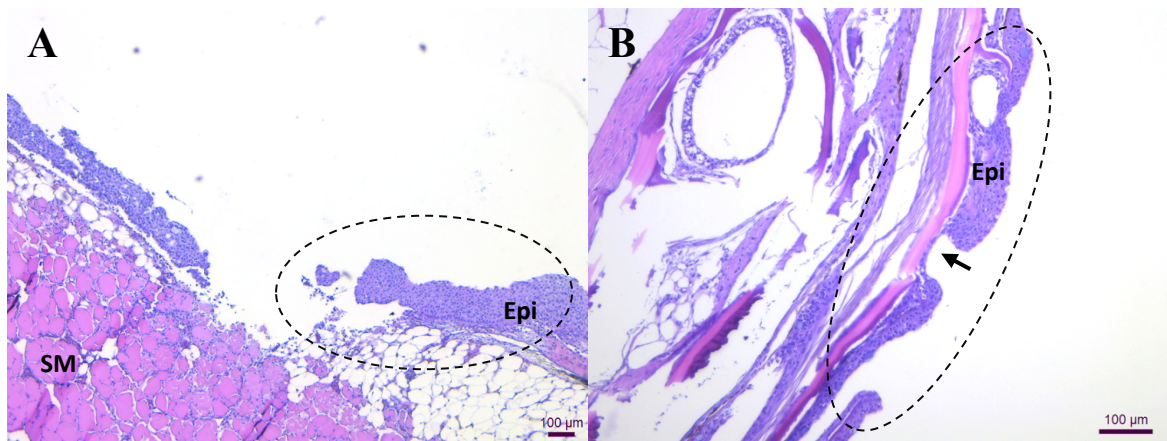


**Figur 31:** Hovedkriteriet: Merkede leukocytter med antistoffet C4B6 i IHC-snitt. A) Score 1: Spredt og få merkede leukocytter (piler). RAS-10, x200. B) Score 2: Multifokal merking av leukocytter (piler), men fortsatt en begrenset mengde. RAS-6a, x200. C) Score 3: Diffus og massiv merking av leukocytter (piler). Sjømerd-9a, x200. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

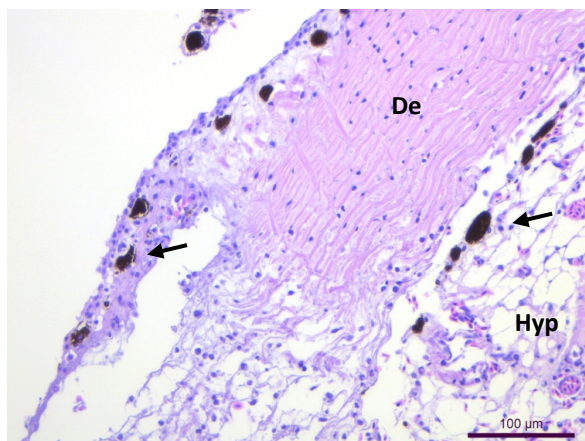


**Figur 32:** Hovedkriteriet: Celleproliferasjon merket med antistoffet anti-PCNA i IHC-snitt. A) Score 1: Få celler er merket i område med regenerasjon av hudvev (piler). Sjømerd-10a, x200. B) Score 2: Moderat merking av epidermisceller basalt i epidermis (piler). Sjømerd-13, x100, C) Score 3: Utbredt merking av epidermisceller diffust i epidermis (piler). Sjømerd-9a, x100. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

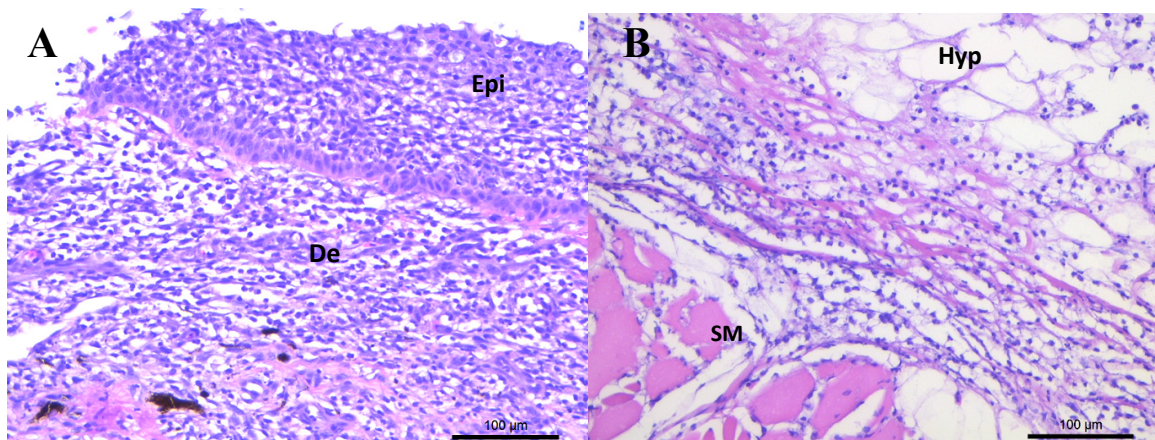




**Figur 33:** Tilleggskriteriet reepitelisering (HE-snitt). A) Fortykkelse av epidermis i sårområdet (sirkel). RAS-2a, x50. B) Fortykkelse av epidermis i området rundt såret (sirkel) som har fått et tynt lag med epidermisceller (pil). RAS-16b, x50. Epidermis (Epi), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

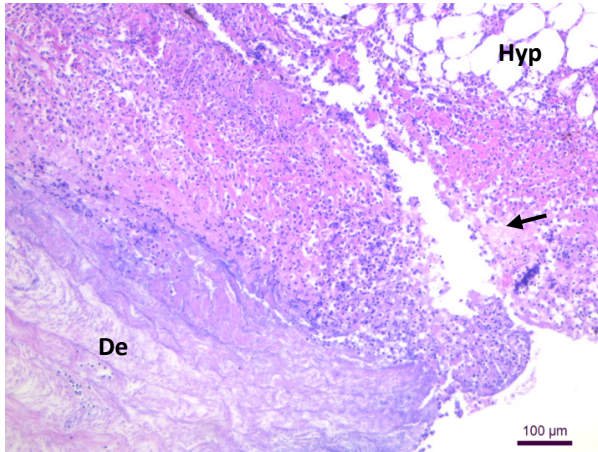


**Figur 34:** Tilleggskriteriet hyperpigmentering i sårkant. Kraftige og flere melanocytter til stede i sårområdet (piler). (HE-snitt). RAS-1a, x200. Dermis (De), hypodermis (Hyp). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

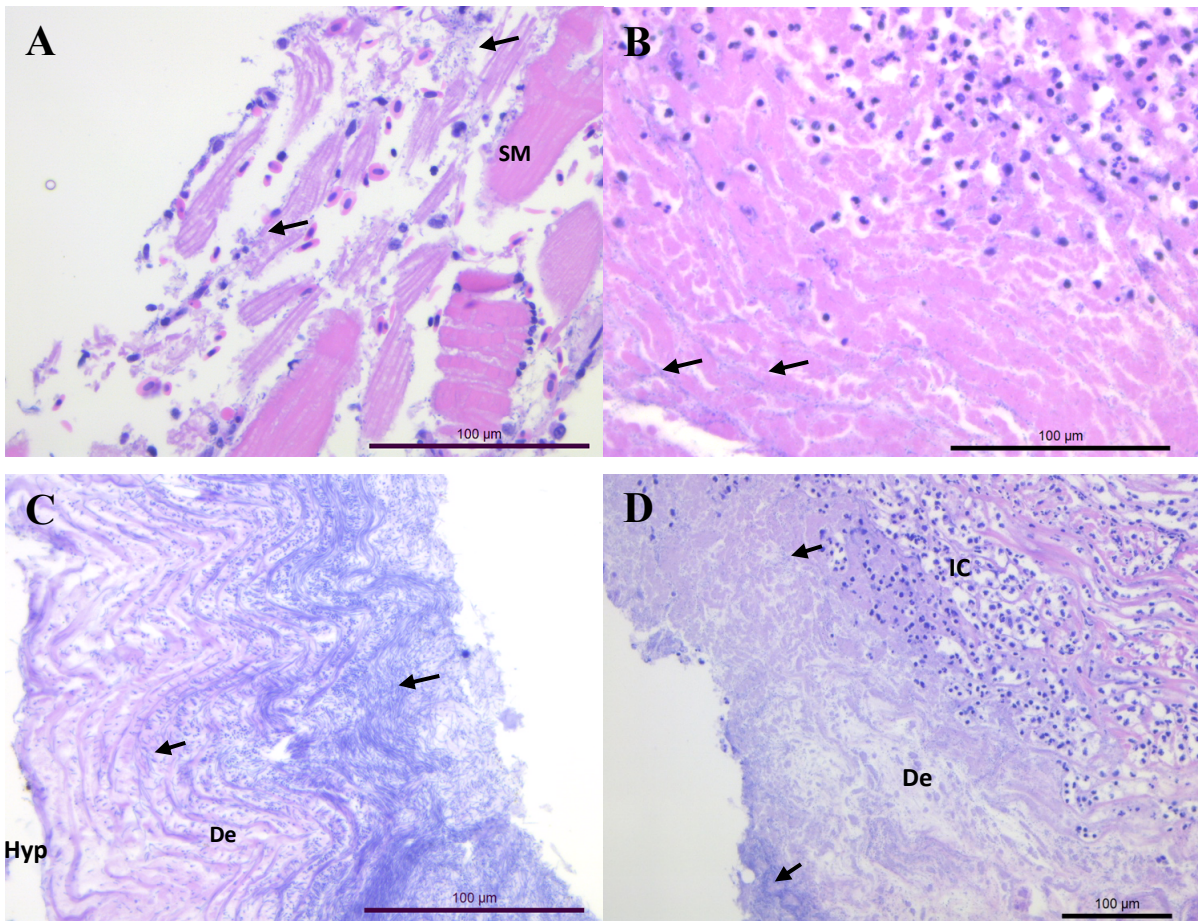


**Figur 35:** Tilleggskriteriet granulasjonsvev (HE-snitt). A) Granulasjonsvev utbredt både i epidermis (Epi) og dermis (De). Sjømerd-20, x200. B) Granulasjonsvev både i hypodermis (Hyp) og ned mot skjelettmuskulatur (SM). Sjømerd-19, x200. Foto: Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Iselin Lillevik Møllerstuen





**Figur 36:** Tilleggskriteriet amorph proteinrikt eksudat (HE-snitt). Amorph proteinrikt eksudat i sårområdet nært hypodermis (pil). Sjømerd-6, x100. Dermis (De), hypodermis (Hyp). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen



**Figur 37:** Tilleggskriteriet bakterier (HE-snitt). A) Korte stavbakterier i sårområde som er affisert ned til skjelettmuskulatur (piler). RAS-1a x400. B) Korte stavbakterier (piler) i dermis med kraftig degenrasjon. Sjømerd-13, x400. C) Lange *Tenacibaculum*-liknende stavbakterier (piler) som har erstattet normal vevsstruktur i dermis fullstendig. Ingen cellereaksjon i vevet. Sjømerd-4a, x400. D) Lange og korte stavbakterier (piler) med infiltrasjon av immunceller (IC). Sjømerd-8, x100. Epidermis (Epi), dermis (De), hypodermis (Hyp), skjelettmuskulatur (SM). Foto: Iselin Lillevik Møllerstuen

## 3.6 Amplikonanalyse

### 3.6.1 Resultat fra amplikonanalyse

Til amplikonanalyse ble det tatt prøver av hudvev fra 12 fisk fra modul 1 og modul 2 i RAS-anlegget. Resultatet fra amplikonanalysen er vist i en OTU-tabell (tabell 11) og i figur 38. Det er kun bakterier med relativ forekomst høyere enn 2% som er inkludert, som resulterte i 28 identifiserte taksa, hvorav omtrent 39% ble identifisert til høyest mulig taksonomiske nivå (slekt).

*Vibrio* med en relativ forekomst >2% var til stedet 75% av prøvene, men var den dominerende (47.3-97.8%) bakterieslekten i RAS-1, RAS-2, RAS-3, RAS-7, RAS-8, RAS-10, RAS-19 og RAS-20. I RAS-20 prøven ble også *Tenacibaculum* identifisert (44.1%) som dominerende bakterie. Det ble ikke identifisert *Tenacibaculum* med en relativ forekomst >2% i noen av de andre prøvene, men amplikonanalysen viste forekomster <2% i flere av de andre prøvene. Innenfor den gitte relative forekomsten ble bakterier i slekten *Aliivibrio* kun identifisert i én prøve, RAS-2 (3,89%). Prøvene RAS-12, RAS-13, RAS-14 og RAS-16 ble hentet fra tilsynelatende frisk fisk. Disse prøvene hadde høyere diversitet enn resterende prøver som var dominert av bakterier identifisert ned til orden *Flavobacteriales* og bakterier identifisert ned til familie *Flavobacteriaceae*. Prøvene for RAS-1, RAS-2, RAS-3, RAS-7, RAS-8 og RAS-10 ble hentet ut under førsteuttaket (20. februar), resterende prøver fra andreuttaket (28. februar).

### 3.6.2 Resultat fra tillaging av amplikonbibliotek

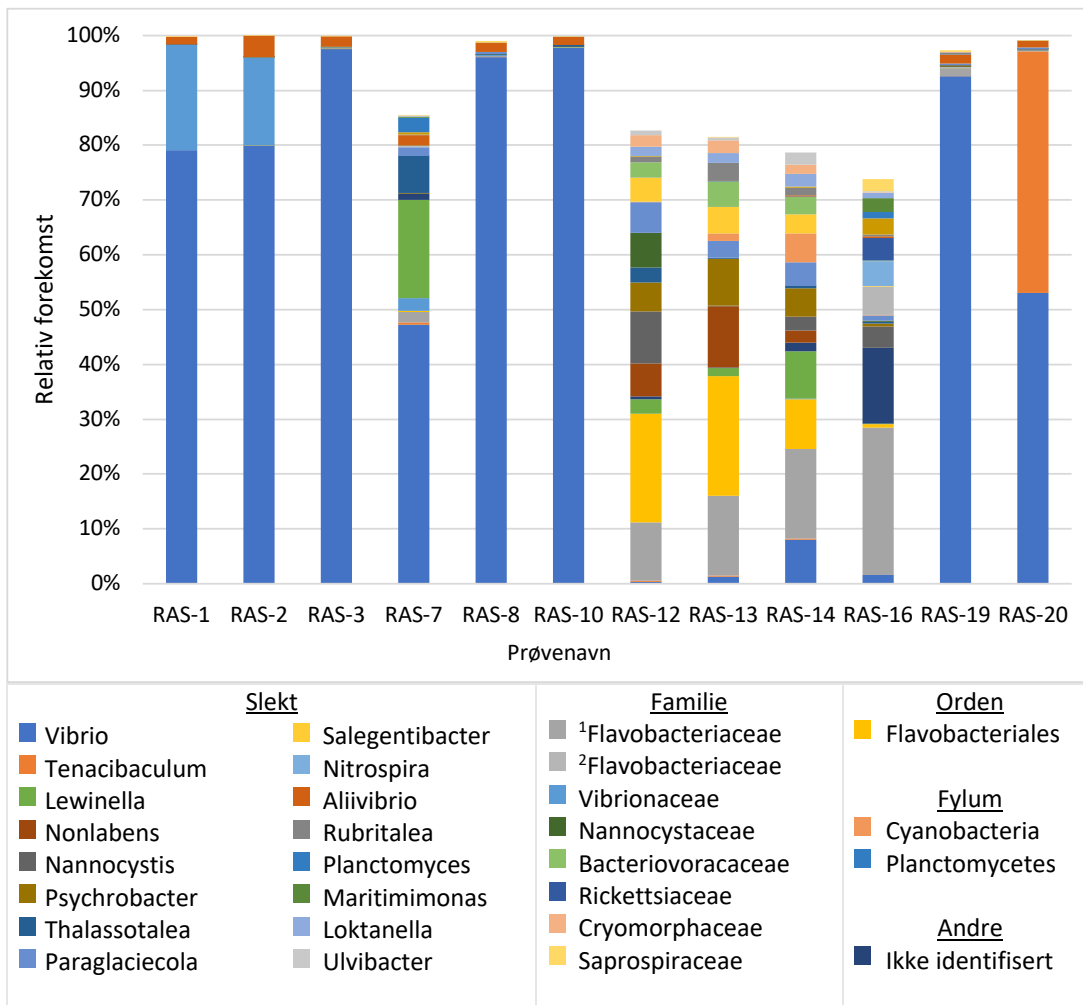
En to-steps PCR amplifikasjonsprosess ble gjennomført på 12 utvalgte prøver fra hud-og muskelvev hentet fra postsmolt i RAS-anlegget. Fra 1.PCR med 30 sykluser med miljøDNA som templat, var det sterke positive bånd på rundt 300bp for 7 av 12 prøver (vedlegg 3A). Resterende prøver fikk etter en ny amplifikasjonsprosess med 35 sykluser, sterke positive bånd på rundt 300bp. Fra 2.PCR ble det sterke positive bånd på rundt 300bp etter 7 sykluser på alle prøvene (vedlegg 3C).

Resultatene fra sekvenseringen ble samlet i en sekvenseringsrapport (vedlegg 4). I rapporten ble det registrert antall sekvenser, altså basepar, for hver prøve. Den gjennomsnittlige lengden på baseparene i hver prøve var 251bp. Sekvenseringsrapporten er nærmere forklart og beskrevet i vedlegg 4.

**Tabell 11:** Bakterier til stede i sår hos postsmolt laks, undersøkt ved hjelp av amplikonanalyse. Bakterier med en relativ forekomst >2,00% i en eller flere prøver er markert rødt i tabellen, og sier noe om forekomsten av bakterien i prøven.

Dato prøveuttak	20. februar 2019						28. februar 2019						Maksimal forekomst
	Modul 1			Modul 2			Modul 1			Modul 2			
	RAS-1	RAS-2	RAS-3	RAS-7	RAS-8	RAS-10	RAS-12	RAS-13	RAS-14	RAS-16	RAS-19	RAS-20	
<i>Vibrio</i> *	79,05	79,93	97,50	47,29	96,02	97,79	0,35	1,30	8,00	1,61	92,54	53,04	97,79
<i>Tenacibaculum</i> *	0,00	0,01	0,04	0,36	0,03	0,00	0,24	0,14	0,21	0,00	0,08	44,11	44,11
<sup>1</sup> <i>Flavobacteriaceae</i> **	0,00	0,02	0,03	1,95	0,18	0,05	10,65	14,63	16,40	26,82	1,49	0,11	26,82
<i>Flavobacteriales</i> †	0,00	0,02	0,04	0,22	0,07	0,01	19,73	21,80	9,09	0,73	0,07	0,01	21,80
<i>Vibrionaceae</i> **	19,35	16,05	0,24	2,27	0,14	0,03	0,00	0,00	0,01	0,02	0,09	0,11	19,35
<i>Lewinella</i> *	0,00	0,00	0,03	17,88	0,01	0,03	2,71	1,46	8,72	0,08	0,04	0,00	17,88
Ikke identifisert	0,00	0,00	0,00	1,19	0,01	0,01	0,46	0,07	1,54	13,74	0,09	0,09	13,74
<i>Nonlabens</i> *	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,05	11,24	2,28	0,00	0,03	0,00	11,24
<i>Nannocystis</i> *	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	9,43	0,06	2,44	3,92	0,00	0,03	9,43
<i>Psychrobacter</i> *	0,00	0,00	0,03	0,04	0,01	0,01	5,29	8,57	5,21	0,55	0,13	0,03	8,57
<i>Thalassotelea</i> *	0,00	0,01	0,00	6,81	0,09	0,30	2,78	0,20	0,40	0,33	0,01	0,05	6,81
<i>Nannocystaceae</i> **	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	6,32	0,00	0,01	0,18	0,05	0,01	6,32
<i>Paraglaciecola</i> *	0,00	0,00	0,03	1,49	0,46	0,04	5,61	3,06	4,33	0,95	0,31	0,27	5,61
<i>Cyanobacteria</i> †	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,08	1,42	5,31	0,17	0,00	0,01	5,31
<sup>2</sup> <i>Flavobacteriaceae</i> **	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,11	0,01	0,01	5,11
<i>Salegentibacter</i> *	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	4,42	4,77	3,49	0,12	0,00	0,00	4,77
<i>Nitrospira</i> *	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,01	0,06	0,00	4,58	0,00	0,00	4,58
<i>Bacteriovoracaceae</i> **	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	2,80	4,57	3,12	0,11	0,00	0,00	4,57
<i>Rickettsiaceae</i> **	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,14	4,07	0,00	0,00	4,07
<i>Aliivibrio</i> *	1,39	3,89	1,90	1,89	1,66	1,42	0,00	0,03	0,15	0,33	1,58	1,12	3,89
<i>Rubritalea</i> *	0,00	0,01	0,00	0,04	0,01	0,00	1,05	3,26	1,42	0,26	0,39	0,03	3,26
<i>Planctomyces</i> *	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,00	0,03	0,00	0,14	2,96	0,00	0,00	2,96
<i>Planctomycetes</i> †	0,00	0,00	0,00	2,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00	2,69
<i>Maritimimonas</i> *	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,46	0,00	0,00	2,46
<i>Loktanella</i> *	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03	1,75	1,73	2,41	0,94	0,01	0,00	2,41
<i>Cryomorphaceae</i> **	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	2,05	2,39	1,64	0,17	0,05	0,00	2,39
<i>Ulvibacter</i> *	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,89	0,51	2,17	0,24	0,00	0,00	2,17
<i>Saprospiraceae</i> **	0,01	0,01	0,01	0,17	0,23	0,05	0,00	0,09	0,00	2,13	0,29	0,12	2,13

Forklaring: slekt\*, familie\*\*, orden†, fylum‡, <sup>1,2</sup>*Flavobacteriaceae*: to ulike OTUer identifisert til samme familie



**Figur 38:** Bakterier til stede i sår hos postsmolt laks, undersøkt ved hjelp av amplikonanalyse. Kun bakterier med en relativ forekomst >2,00% i en eller flere prøver er inkludert. Identifisering av takson på slekt-, familie eller ordensnivå. RAS-12, 13, 14 og 16 ble registrert som "frisk fisk" under uttak. Prøvene RAS-1, RAS-2 og RAS-3 ble hentet fra modul 1 20. februar, RAS-7, RAS-8 og RAS-10 ble hentet fra modul 2 samme dato. RAS-12, RAS-13 og RAS-14 kommer fra modul 1 den 28. februar, og RAS-16, RAS-19 og RAS-20 kom fra modul 2 samme dato. <sup>1,2</sup>Flavobacteriaceae: to ulike OTUer identifisert til samme familie.

## 4 Diskusjon

Oppdrettsnæringen møter mange utfordringer knyttet til produksjon av laksefisk i tradisjonelle merder i sjø og sår er en av de største helse- og velferdsutfordringene. Sår på fisken har flere årsaker. Det kan være problemer som forårsakes av bakterie- og virussykdommer og parasitter som lakselus, men også av ulike behandlingsmetoder rettet mot infeksjonene. Problemer med lus og skader fra behandling mot lakselus har vært en pådriver for utviklingen av nye produksjonsstrategier (Sommerset et al., 2020) og som reduserer problemene, som for eksempel produksjon av postsmolt i lukkede anlegg, deriblant RAS. I slike anlegg er det mulighet for bedre kontroll over vannmiljøet. Det er mulig å rense inntaksvannet og det er flere muligheter til å justere vannparametere. Det er likevel viktig å være klar over at denne produksjonsstrategien også har sine utfordringer. Særlig har høy og akutt dødelighet som følge av toksiske nivåer med hydrogensulfid ( $H_2S$ ) vært et problem i postsmoltanlegg med sjøvannstilsetning (Sommerset et al., 2020). I tillegg har utfordringer med sår blitt rapportert inn fra fiskehelsetjenester, som et betydelig problem i postsmolt-RAS (Fremtidens smoltproduksjon, 2020; Sommerset et al., 2020). Målsetningen for denne studien har vært å undersøke sår og sårheling ved å sammenligne to grupper fra ulike driftsformer og sårproblemer.

### 4.1 Sammenstilling av driftsdata og vannkvalitetens påvirkning på hudhelse

Prøvematerialet ble hentet fra to ulike fiskefiskegrupper oppdrettet i ulike miljøforhold; RAS-anlegg med salinitet lavere enn 30‰ og tradisjonelle merder i sjø der salinitet vanligvis ligger over 30‰. Fra RAS-anlegget ble det innhentet nøyaktige målinger på pH,  $CO_2$ , temperatur, salinitet, TAN, nitritt og  $O_2$  for hele PU3 og PU4. Hensikten med å innhente data om vannparametere var å se om det var eventuelle avvik som lå utenfor hva som anses som normaldrift og som kunne påvirke fiskevelferden. I Fjellheim et al. (2016) presenteres Mattilsynet sine veiledende måleparametere for landbaserte settefisk for laks som gjelder både gjennomstrømming og RAS (vedlegg 2), dette er veiledning for ferskvann basert på §22 Akvakulturdriftsforskriften (2008). For postsmolt RAS-anlegg med sjøvannstilsetning er det manglende informasjon for hva som ansees å være god vannkvalitet (Ytrestøyl et al., 2020), men det har blitt sett på begrensede biologiske parametere i produksjon av postsmolt laks i lukkede akvakultursystemer (Thorarensen & Farrell, 2011). Vannparametere som inngår i denne studien er sammenlignet med de veiledende verdiene som foreligger i vedlegg 2, hentet fra Fjellheim et al. (2016) og Thorarensen og Farrell (2011). Det kom frem at pH,  $O_2$  og  $CO_2$  i



RAS-anlegget lå innenfor hva som ansees som veiledende maksimale grenseverdier for vannkvalitet for laks. Derimot lå de høyest målte verdiene for nitritt (1,1 mg/l) og TAN (0,9 mg N/l) i begge RAS-enhetene i modul 2, over hva som er anbefalt (Fjellheim et al., 2016; Thorarensen & Farrell, 2011). Fra anlegget ble det informert om at dette var tidlig i produksjonssyklusen og nivåene kunne dermed være litt ustabile (driftsleder, personlig kommunikasjon, 2019), men at de registrerte nitritt- og TAN-verdiene lå under hva som tidligere er registrert i anlegget i tidligere produksjonssykluser (DOI: 10.17632/zrmjktk992.1). Med en økt salinitet mot slutten av PU4 sees det også at både nitritt- og TAN-nivået gikk ned. Selv om det var avvik fra veiledende verdier, kan det basert på tidligere erfaringer fra anlegget, antas at verdiene på nitritt og TAN lå innenfor anleggets normaldrift. Likevel er det viktig at det forskes videre på konkrete grenseverdier angående miljøforhold for fisk i RAS med sjøvannstilsetning, for å sikre at velferden og helsen til fisken er god i nye produksjonsmetoder.

Det ble gjort registreringer på antall døde fisk i modul 1 og modul 2, disse dataene ble hentet ut fra PU3 og PU4. Det var en tydelig høy dødelighet i starten av PU3, men dødeligheten sank og ble betydelig lavere utover i PU4. Sammenlignes den prosentvise dødeligheten i de to modulene var det en betydelig høyere dødelighet i modul 1. Laks kan være ekstra utsatt for infeksjon og sykdom i løpet av den første perioden som postsmolt (Karlsen et al., 2018a) og det er tidligere vist sammenheng mellom håndtering, stress og økt dødelighet (Jensen et al., 2015). Fisken i anlegget ble usatt for håndtering og stress i forbindelse med flytting fra settefiskanlegget til postsmoltanlegget i starten av PU1. I tillegg var det mistanke om at fisken hadde fått påført mekaniske sår der flytting og håndtering var årsaken. Brudd i den primære epitelbarrieren gir økt risiko for infeksjon og dødelighet (Jensen et al., 2015; Noble et al., 2012; Segner et al., 2011; Vågsholm & Djupvik, 1998), og mekaniske sår kan være årsaken til den høye dødeligheten i PU3. Resultatene fra histologi tyder også på at alvorligheten av sår var større i PU3. Totalscoren som viser alvorlighetsgraden av sårene, var høyere i PU3 enn i PU4, og indikerer at sår var et større problem i samme periode som det var økt dødelighet. Nedgangen i totalscore i PU4 kan tyde på at sårene var under heling. Det kan være at en lav totalscore kan indikere en akutt tilstand hvor sårene nettopp har oppstått, men det er likevel mindre sannsynlig, siden det var en nedgang fra PU3 til PU4. Sårhelingen kan også sees opp mot den jevne økningen av temperaturen fra PU3 til PU4. Høyere vanntemperatur er vist å øke hastigheten på sårheling (Jensen et al., 2015). Produksjon av postsmolt i brakkvann kan

også ha en positiv effekt på hudens robusthet (Ytrestøyl et al., 2020). Dette kan underbygge at det var mekaniske skader som var hovedårsaken til sår i anlegget i denne perioden.

Prøvematerialet som ble hentet fra tradisjonelle sjømerder langs norskekysten var fra voksen laks i sjø, i perioden januar – mai. I slike anlegg ligger saliniteten stort sett på over 30‰ og vannkvaliteten styres for det meste av naturlige forhold. Sjøanlegg har ikke samme overvåkning av vannkvalitet som i RAS-anlegg, men det er viktig at merdene er plassert med gode strømforhold som sørger for vannutskifting (Sommerset et al., 2020). Med bakgrunn i forholdene i sjø er problemer med sår ofte knyttet opp mot håndteringsskader i forbindelse med ulike behandlinger, lakselus som bryter hudbarrieren og bakterielle infeksjoner som kommer sekundært inn i sår eller som assosieres med sår ved kalde temperaturer (Lunder et al., 1995; Olsen et al., 2011; Sommerset et al., 2020; Takle et al., 2015).

#### **4.2 Etablering av et scoringssystem for sår**

Hovedformålet med denne studien har vært å undersøke sår og sårheling hos laks, men spesiell vekt på immunceller. Et av delmålene var å utarbeide et scoringssystem som et verktøy for å semi-kvantifisere morfologiske endringer i sår, uavhengig av etiologi. Det har tidligere vært få histopatologiske scoringssystemer publisert fra laks, og utviklingen av scoringsskjemaet har derfor basert seg på retningslinjer og metoder for etablering av histologisk scoring og gradering for å sikre validering (Caswell et al., 2018a, 2018b; Gibson-Corley et al., 2013; Meyerholz & Beck, 2018; Meyerholz et al., 2018; Schafer et al., 2018; Treuting & Boyd, 2019). Det har også blitt sett på et tidligere studier der det har vært behov for evaluering av histopatologiske endringer for å vurdere gjellehelse hos laks (Gjessing et al., 2019; Mitchell et al., 2012).

Det scoringssystemet vi kom frem til for sår i hudvev hos laks tyder på at det er mulig å tallfeste histologiske forandringer. Tilsvarende systemer har også blitt vurdert som egnet for å belyse gjelleproblemer histologisk (Gjessing et al., 2019; Mitchell et al., 2012). Alle scoringskriteriene som ble valgt var parametere som er vanlige å se histologisk i hud, som reaksjon på sår eller infeksjon. Sveen (2018) har gjennom sitt arbeid kartlagt sentrale prosesser i en sårhelingsfase og dette ble derfor lagt til grunn for utarbeidelsen av scoringssystemet og hvilke kriterier som ble inkludert. For å sikre at de mest relevante kriteriene ble inkludert ble det også sett til andre studier på hud, sår og sårheling hos laks og andre teleoster (Richardson et al., 2013; Takle et al., 2015), under fasene beskrevet for

sårheling (Sveen, 2018; Sveen et al., 2019). Sårheling kan deles inn i en tidlig og sen fase deles (Sveen et al., 2019). I den tidlige fasen aktiveres reepitelisering, inflammasjon, humorale responser og dannelse av granulasjonsvev. I den sene fasen vil såret begynne å trekke seg sammen og det skjer en omdanning av granulasjonsvevet. Det ble også gjennomført grundige histologiske undersøkelser av studiens prøvemateriell for å sette relevante definisjoner rundt scoringskriteriene og for å se om det var mulig å identifisere de ulike prosessene nevnt av Sveen et al. (2019). Gjennomgangen av materialet ble gjort før selve scoringen av snittene, og la grunnlaget for hvordan scoringen av dette materialet ble gjort av observatøren. Fordi scoringene skulle gjøres subjektivt, og ikke basere seg på antall celler i ett område, eller hvor stor prosentandel av et område som var påvirket av forandringer, ble det for høy grad av usikkerhet å dele en scoringsskala inn i vurderinger som var mer konkrete enn; ingen (0), sparsom (1), moderat (2) og uttalt (3). I noen tilfeller var det også vanskelig å vurdere graden av utbredelse, og det ble i disse tilfeller mer hensiktsmessig å score som «til stede» eller «ikke til stede», for å minimere usikkerheten rundt resultatet. Dette gjaldt for reepitelisering, hyperpigmentering i sårkant, granulasjonsvev, amorf proteinrikt eksudat og bakterier. På samme måte som Mitchell et al. (2012) ble det derfor delt inn i hovedkriterier (score 0-3) og tilleggskriterier (score 0 eller 1). Hvorav score 0-3 var subjektive scoringer basert på graden av endring. Hovedkriteriene ble kategorisert til affisert hudvev, degenerasjon av hudvev, sirkulasjonsforstyrrelser, infiltrasjon av immunceller (i HE- og IHK-snitt) og celleproliferasjon. Infiltrasjon av immunceller ble scoret både i HE-snitt som en subjektiv observasjon av mengden immunceller til stede og i IHK-snitt der graden av merkede leukocytter var lettere å semi-kvantifisere og vurdere. Dette ble gjort for å se om vurderingen kunne korrelere med hverandre, noe det i stor grad viste seg å gjøre. De fleste kriteriene har vært hensiktsmessige å ha med i scoringssystemet, men amorf proteinrikt eksudat har senere blitt vurdert gjennom diskusjon med patologer til å ikke være et kriterium som nødvendigvis er relevant for sår.

Scoringssystemet som er utarbeidet i forbindelse med denne studien er ikke nødvendigvis fullstendig eller et endelig produkt. For å sikre en standardisering av et slikt system trengs mer forskning og et større samarbeid mellom erfarne patologer, erfaringer fra felt, og bruk av passende statistiske metoder. Selv om scoringssystemet trenger videre bearbeiding før det er standardisert har det hele veien vært søkelys på å minimere en rekke bias. For å sørge for en mest mulig reproducerbar semi-kvantitativ scoring av et høyt antall histologisnitt ble en rekke «beste praksis»-prinsipper etterfulgt. Evalueringene ble foretatt slik at det ble tatt hensyn til

diagnostisk drift, altså ble det unngått å gjøre scoringene over en lengre tidsperiode, som anbefalt i Meyerholz og Beck (2018). Rekkefølgen på snittene under gjentatte avlesninger varierte, dette for å sikre at snittene fikk en mest mulig lik vurdering. For videre validering av metoden ble det som beskrevet i Caswell et al. (2018b) gjort en ny evaluering av alle snittene etter en «wash-out» periode. Dette for å redusere feilvurderinger når scoringen blir gjort av én person. Som anbefalt av Meyerholz og Beck (2018) ble det også gjennomført kvalitetskontroll av snitt, utført av erfarne patologer ved VI. De to gruppene som benevnes «RAS» og «Sjømerd» ble vurdert hver for seg og det var kjent ved undersøkelsestidspunktet hvilken gruppe som ble evaluert. Det kan være at en blindscoring av snittene hadde gitt de sikreste resultatene, men det ble vurdert viktigere at observatøren hadde tilstrekkelig informasjon om gruppene og eventuelle gruppespesifikke lesjoner (Meyerholz & Beck, 2018).

### **4.3 Optimalisering av immunhistokjemiske metoder med monoklonale antistoff**

En sentral del av denne studien har vært å utvikle og tilpasse IHK-metoder med antistoffer for merking av leukocytter og celleproliferasjon i hudvev hos laks. For merking av leukocytter ble antistoffene C7G7 mot B-celler og C4B6 mot flere ulike typer leukocytter benyttet. Disse antistoffene ble produsert som et verktøy for studier av lakseleukocytter (Pettersen et al., 1995), og har tidligere blitt brukt i immunfluorescens på cytopinpreparater med isolerte leukocytter (Haugland, Jordal & Wergeland, 2012; Pettersen et al., 2000). Disse antistoffene har ikke tidligere blitt brukt i IHK rettet mot hudvev på histologisnitt med parafinvoкс. Ut ifra resultatene fra frysensnitt av vev beskrevet i studier av Pettersen et al. (2000) og Haugland et al. (2012), kunne en forvente merking av B-celler og ulike leukocytter i hudvev med infiltrasjon av immunceller. Metoden ble først utprøvd på nyre og milt preparater som er hematopoietiske vev der både B-celler og andre leukocytter produseres og modnes (Kryvi & Poppe, 2016). C7G7 positive celler, altså B-celler, er tidligere funnet i både hodenyre og milt (Pettersen et al., 2000), det var derfor noe uventet at antistoffet spesifikt for B-celler ikke ga merking. Det ble utført nøyaktig samme prosedyre for begge antistoffene og de var blitt lagret på samme måte i frys på -20°C. Både C7G7 og C4B6 har vist seg å binde til karbohyratepitoper (Pettersen et al., 1995), men de er tidligere ikke brukt i IHK på parafinsnitt eller på hudvev. Fikseringen av preparatene er kjent for å ha betydning for proteinkonfigurasjonen og den kan derfor ha endret eller skadet epitopene slik at det ikke var mulig for antistoffene å binde seg. Utenom dette var den eneste forskjellen konsentrasjonen til antistoffene, den var lavere for C7G7 enn C4B6. Immunhistokjemi utført med antistoffet

C4B6 ga derimot forventet resultat med tydelig merking av leukocytter både under metodeutviklingen og i bruk på hudvev fra fisk med sår. C4B6 som bindes til de ulike leukocyttypene har vist seg å være et nyttig verktøy i denne studien, hvor hensikten med å bruke antistoffet var å undersøke mengden immunceller til stede i hudsår hos laks. Merking av leukocytter kan brukes som egnet verktøy for å vurdere betennelsesreaksjoner i sår med hensyn på tilstedeværelse av immunceller.

Anti-PCNA ble brukt som antistoff for å detektere celleproliferasjon i hudvev hos laks. Antistoffet er tidligere benyttet av Sveen et al. (2019) for å se tilstedeværelsen av celleproliferasjon knyttet til sårheling. Antistoffet er rettet mot et protein (Proliferative cell nuclear antigen) som aktivt produseres i cellekjerner under mitose (Keshav & Narayanappa, 2015). For testing av metoden ble det brukt tarmvev med uttalte forandringer, dette ble bekreftet gjennom tidligere histologiske undersøkelser utført av patologer ved VI. Testing av IHK-metoden viste tydelig merking for prolifererende celler i tarmvev hos laks, og de visuelle resultatene samsvarte med merking av prolifererende celler hos laks fra tidligere studier (Haugarvoll, Bjerkås, Nowak, Hordvik & Koppang, 2008). Når sår skal hele settes en rekke prosesser i gang for å fornye vevet og lukke såret, deriblant reepitelisering og dannelsen av granulasjonsvev. Ved en slik prosess er proliferasjon av celler som epidermisceller og fibroblaster med i regenerering av hudvev (Sveen et al., 2020). Det å bruke anti-PCNA ble funnet å fungere godt og ble dermed vurdert å være et nyttig verktøy for å undersøke tilstedeværelsen av celleproliferasjon basert på resultatene i denne studien.

#### **4.4 Sammenstilling av histologieresultatene for sjø og RAS**

Denne studien har sammenlignet sårmaterialer fra to fiskegrupper. Den ene gruppen var fra postsmolt i RAS med sjøvannstilsetning der såretiologi var mistenkt å være mekanisk skade. Den andre gruppen var fra voksen laks i tradisjonelle sjømerder med infeksjonsproblemer knyttet til funn av *Tenacibaculum* sp. og *M. viscosa* i sår. Målet var å undersøke sår og prosessene som aktiveres ved sårheling og se om det er forskjell mellom mekaniske og infeksjøs sår. Det er tidligere gjort forsøk der det har blitt sett på sår av mekanisk årsak og infeksjøs årsak hver for seg, men det er gjort få studier hvor disse to gruppene har blitt sammenlignet. For å undersøke og sammenligne sårene ble scoringssystemet utarbeidet i denne studien benyttet. Scoringsskjemaet inkluderte sentrale sårhelingsprosesser som blant annet er beskrevet av Sveen (2018); Sveen et al. (2019).

Basert på scoringsresultatene for både hovedkriteriene og tilleggskriteriene ble det satt en totalscore for hvert individuelle histologisnitt. Totalscoren sier noe om hvor uttalt reaksjonene i såret er og gir en indikasjon på histopatologisk alvorlighetsgrad. Totalscoren kunne gå fra 0 og opp til maksimalnivå som var 23. Snittene fra sjø hadde i gjennomsnitt totalscore 16,4( $\pm$ 3,3), sammenlignet med 8,6( $\pm$ 4,6) i snittene fra RAS. Det viser at snittene med kjent infeksjonsproblem hadde en langt høyere alvorlighetsgrad og reaksjonene i forbindelse med sårheling var mer uttalt. Dette samsvarer også med omfanget av sårene som kan gis av kriteriene «affisert hudvev» og «degenerasjon av hudvev». Snittene fra sjø gikk i større grad dypere ned i huden og vevet ble observert som mer degenerert enn snittene fra RAS. Patologien var altså mer diffus, og omfanget kan beskrives som moderat til uttalt i snittene med kjent infeksjonsproblem fra sjø. Bakterieinfeksjonene ble i flere tilfeller bekreftet av dyrkningsresultater gjort av VI. Infeksjon med *Tenacibaculum* sp. og *M. viscosa* karakteriseres blant annet med dype og åpne sår (Løvoll et al., 2009; Takle et al., 2015). Det kan være totalt tap av epidermis og *Tenacibaculum*-liknende bakterier kan delvis eller totalt erstatte *stratum spongiosum* og *stratum compactum* og ved alvorlige tilfeller kan også bakterier observeres i hypodermis og muskelvev (Småge, 2018). Ved mikroskopering av snittene fra sjø med *Tenacibaculum* sp. var dette gjennomgående funn også i denne studien. Det ble også observert at degenerasjonen av hudvev var uttalt i umiddelbar nærhet av sårområdet, men avtok mer distalt. Dette ligner funn tidligere beskrevet av Småge (2018) og Olsen et al. (2011). Til sammenligning hadde snittene med antatt mekaniske sår for det meste sparsomme degenerasjoner i sårområdet med fokalt nedbrutt vev- og cellestrukturer, og de var mindre affisert med tanke på dybde på sår. I ett av snittene fra RAS ble det observert *Tenacibaculum*-liknende bakterier, noe som ble bekreftet via IHK med spesifikke antistoffer for *Tenacibaculum* sp. Via mikroskoperingen av HE- og IHK-snitt ble det observert typisk histopatologi for *Tenacibaculum* sp., men i langt mildere grad enn hva som ble observert i snittene fra sjø. Årsaken til dette kan være salinitetsforskjellen på  $>32\%$  i sjø mot  $\sim 21\%$  som var i modul 2 ved PU3, men også temperaturforskjellen som antakelig var  $<10^\circ$  i sjø (med tanke på årstid), mot  $12.9^\circ\text{C}$  i modul 2 i RAS-anlegget. *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* og *ulcerans*, som ofte assosieres med tenacibaculose i norske sjøanlegg sees gjerne ved full sjøvannssalinitet (34‰) og lavere temperaturer (Lunder et al., 1995; Olsen et al., 2011; Olsen et al., 2020; Småge, 2018). Forholdene i RAS-anlegget skilte seg altså fra de forholdene som vanligvis foreligger ved tilstedeværelse av *T. finnmarkense*. Salinitetsoptimumet til *Tenacibaculum* sp. ligger mellom 20-100‰ sjøvann (Olsen et al., 2020), tilsvarende rundt 27-34‰. Det ble utført amplikonanalyse på et annet sår, men fra

samme fisk, der det ble identifisert *Tenacibaculum* via HE og IHK. Amplikonanalysen detekterte tilstedeværelsen av bakterier i slekten *Tenacibaculum* (44,11%). Tidligere har det blitt identifisert *Tenacibaculum dicentrarchi* i samme RAS-anlegg (Nilsen, H. K., personlig kommunikasjon, 5.november 2020). *T. dicentrarchi* har også blitt knyttet opp til et utbrudd med akutt sykdom og dødelighet i et annet postsmoltanlegg (Klakegg et al., 2019), og assosiert med sår i sjøanlegg i Norge (Olsen et al., 2017). Med bakgrunn i tidligere funn og det man vet om vekstvilkårene til *T. dicentrarchi* og fra smitteforsøk (Klakegg et al., 2019), støtter dette at en kunne finne bakterien i materialet.

I et flertall av IHK-snittene fra sjø ble det detektert *M. viscosa* i sår, flere av disse hadde også fått påvist bakterien gjennom dyrkning gjort av VI. Sårene fremsto som alvorlige med uttalt degenerasjon og stor tilstedeværelse av bakterier. Mikroskopering av HE-snitt fra fisk fra RAS-anlegget resulterte også i funn av korte stavbakterier i flere snitt, hvorav ett av snittene fikk bekreftet *M. viscosa* gjennom IHK med spesifikke antistoff. Sammenlignet med sårene fra sjø med *M. viscosa*, hadde også snittet fra RAS uttalt degenerasjon. I de andre snittene hvor det ble observert korte stavbakterier ble det ikke detektert *M. viscosa*, hverken gjennom IHK-snitt eller amplikonanalyse. Fra scoringen viste snittene fra RAS at gjennomsnittet for grad av degenerasjon lå langt lavere enn i sjø. Det kan tyde på at sår med *M. viscosa* har en tendens til å være mer uttalte og gjøre større skade på hudvevet. De amplikonanalyserte prøvene med sår var i stor grad dominert av bakterier i slekten *Vibrio*, som inneholder både patogene og ikke-patogene arter. *Vibrio*-bakteriene er også korte stavbakterier (Silvester, Alexander, Antony & Hatha, 2017), og tilstedeværelse av ikke-patogene eller mindre patogene arter kan være årsaken til en lavere degenerasjon. Fra tidligere analyser av sår fra fisk fra det samme anlegget, ble det påvist en dominans av bakterier i slektene *Aliivibrio* og *Moritella*, men samme studie viste også en mikrobiota med høy diversitet både på huden hos fisk, i vannet og i biofilteret (Drønen, 2019). Fra tidligere studier er det vist at både *Moritella*, *Vibrio* og *Tenacibaculum* er vanlig å finne som en del av det mikrobielle miljøet både på fisken og i vannet i lukkede oppdrettsanlegg uten sykdom, medlemmer av *Flavobacteraceae* er også vanlig (Roalkvam et al., 2019). Amplikonanalysene fra hudvevet til de fire friske fiskene i denne studien viste en høyere diversitet av bakterier enn fiskene med sår. RAS-anlegg består av et komplekst mikrobielt miljø med både patogene og ikke-patogene bakterier. Selv om inntaksvannet behandles med UV kan likevel være tilstedeværelse av patogene bakteriestammer, men det kan tenkes at forekomsten av disse begrenses av ikke-patogene bakterier under gode driftsforhold (Klakegg et al., 2019; Roalkvam et al., 2019).

I en helingsprosess beskriver Sveen (2018) at den tidlige fasen kjennetegnes av reepitelisering, inflammasjon, humorale responser og dannelse av granulasjonsvev. Gjennom scoringssystemet ble alle disse prosessene sett på. Reepitelisering er den første prosessen som settes i gang, omkringliggende epidermisceller migrerer til sårområdet for å danne en beskyttende hinne (Richardson et al., 2013; Sveen, 2018). I snittene fra RAS varierte det i stor grad om epidermis var til stede eller ikke og det var derfor utfordrende å gi dette en gradert score. Vevsbiten som ble tatt ut til histologi inkluderte både sårområdet og intakt hud. Det er derfor usikkert hvorfor epidermis manglet i flere av snittene, men det kan ha sammenheng med fiksering. Epidermis var i større grad til stede i snittene fra fisk i sjø, og det var lettere å vurdere om det var en reepitelisering til stede. Likevel er dette det eneste kriteriet hvor snittene fra RAS har en høyere score enn snittene fra fisk i sjø. Forskjellen er minimal, men dersom dette stemmer kan det tyde på at reepitelisering i høyere grad er aktivert dersom det ikke er infeksiose bakterier til stede i sår. For tilfellene fra sår i sjø hadde disse også i større grad fullstendig tap av epidermis, dermis og hypodermis, i noen tilfeller også affisert skjelettmuskulatur. Dype sår i huden hos fisk kan også forsinke reepitelisering (Richardson et al., 2016).

I begge gruppene (RAS og Sjømerd) ble det i sårene observert infiltrasjoner av immunceller i varierende grad og av varierende art. Dette stemmer overens med inflammasjon og humorale responser som en del av kaskaden som igangsettes for sårheling (Richardson et al., 2013). Både vaskulære og cellulære reaksjoner er konsekvenser av skade eller irritasjon trigget av parasitter, bakterier, virus, kjemiske, fysiske eller mekaniske årsaker (Havixbeck & Barreda, 2015). Først skjer en dilatasjon av kapillærer som fører med seg en økt mengde erythrocytter og produksjon av amorft proteinrikt eksudat (plasmaproteiner). Den økte permeabiliteten i kapillærene fører til lekkasje av eksudat ut i vevet, et kjennetegn ved akutt inflammasjon (Roberts, 2012; Young, Stevens, Lowe, Wheater & Burkitt, 2002). Dette viste seg å være vanskelig å observere i snittene, noe som kan komme av prepareringsprosessen. Det bør derfor vurderes om denne tilleggsscoren bør utelukkes fra scoringsskjemaet, eller finne bedre metoder for preparering. Lettere å observere og vurdere var hyperemi og blødning i selve såret. Dette ble observert hos begge gruppene, men mest fremtredende var dette i snittene fra fisk fra sjø. I snitt hvor det var hyperemi og blødninger kunne det også observeres noen leukocytter både i kapillærer og årer. Dette stemmer overens med en tidlig cellulær respons, som tiltrekker seg leukocytter, særlig nøytrofile granulocytter og makrofager for å fjerne



årsaken til skade, skadet vev eller reparere vevet. I noen snitt ble det ikke observert hyperemi og i disse var det i større grad leukocytter til stede. I snittene farget med HE ble det registrert multifokale og til dels diffuse infiltrasjoner i snittene fra fisk i sjø. I snittene fra fisk i RAS var det derimot kun fokal infiltrasjon av leukocytter, altså en mer begrenset tilstrømming av immunceller i sårområdet. Infiltrasjonen med leukocytter ble tydeliggjort gjennom IHK med antistoffet C4B6, et antistoff som merker de ulike leukocytterne (Pettersen et al., 2000; Pettersen et al., 1995). Scoringene for merkede leukocytter i IHK og leukocytter i HE viste seg å stemme godt overens, men med noe høyere score i IHK snittene. En observasjon som viste seg å være gjennomgående, var at i snittene fra fisk i sjø var IHK-merkede leukocytter til stede dypt i vevet, mellom skjelettmuskulaturen. Dette var ikke tilfeller for snittene fra fisk i RAS, hvor infiltrasjonen tilsynelatende var mer sentrert i dermis i sårområdet eller øvre deler av skjelettmuskulatur dersom såret var dypt. Ved innbyrdes sammenligning av snittene fra fisk i sjømerder ble det gjort en interessant registrering. De snittene som hadde spesifikk merking av *M. viscosa*, uten eller i kombinasjon med *Tenacibaculum* sp. hadde hovedsakelig score 3 for kriteriene infiltrasjon av immunceller og merking av leukocytter. De snittene som kun hadde spesifikk merking for *Tenacibaculum* sp., hadde i alle tilfeller score 1 eller 2 på de samme kriteriene. Dersom disse notasjonene stemmer, indikerer det en større immunrespons i sår med *M. viscosa* til stede enn i sår hvor kun *Tenacibaculum* er til stede. Ved tilstedeværelse av *M. viscosa*, har også erfarne patologer fått inntrykk av at sårene er av større alvorlighet og det er sterkere immunreaksjoner (Nilsen, H. K., personlig kommunikasjon, 2020; Olsen et al., 2011). Totalscoren tyder altså på at sårene var mer alvorlige i snittene fra sjø enn fra RAS. Basert på observasjonene gjort av leukocytter i sårområdene på snittene kan det tyde på at etablering av immunologiske responser er lavere i mekaniske sår enn i infeksiose sår, dersom det ellers er gode driftsforhold i anlegget og sårene er av sparsom til moderat alvorlighet. Innbyrdes for sårene fra sjø var det generelt lavere immunreaksjon når *Tenacibaculum* sp. var til stede, enn når *M. viscosa* var forekommende. Et interessant videre arbeid med scoringssystemet hadde vært å benytte det i materiale fra smitteforsøk for å videre verifisere funnene og eventuelt knytte disse opp mot ulike bakteriestammer og virulensforskjeller.

Høy tilstedeværelse av melanocytter ble registrert under mikroskopering av snittene fra begge grupper. Forskjellen mellom gruppene var liten, med  $0,3(\pm 0,4)$  i RAS mot  $0,4(\pm 0,5)$  i sjø. Det ble likevel gjort interessante funn innad i gruppen fra fisk i RAS. De fire snittene som var hentet fra kontrollfisken med intakt hud (RAS-12, RAS-13, RAS-14 og RAS-16a og b) hadde ingen observasjon av økt mengde melanocytter. Denne observasjonen var forbeholdt snittene

fra fisk med sår. Dette funnet støttes opp av tidligere studier på sårheling hos postsmolt laks (Sveen et al., 2019), der hyperpigmentering ikke ble observert i intakt hud. Det ble derimot observert i sårområdet gjennom hele sårhelingsprosessen i prøver fra sår. Det samme har blitt observert umiddelbart etter påføring av sår og gjennom hele sårhelingsprosessen hos karpe (*Cyprinus carpio*) (Iger & Abraham, 1990). Det kan indikere at melanocytter har en hemmende effekt for etablering og spredning av bakterier, og at hyperpigmentering i sår er en beskyttelsesmekanisme mot sekundære infeksjoner hos laks (Iger & Abraham, 1990; Mackintosh, 2001).

Dannelsen av granulasjonsvev og celleproliferasjon er et resultat av en kronisk betennelsesreaksjon, og inntreffer derfor mot slutten av den tidlige sårhelingsfasen og over i den sene fasen. Dette er en kompleks fase som består av dannelsen av nye kapillærer, fibroblaster, makrofager, nøytrofile og ny ekstracellulær matriks. Det er omdiskutert når denne prosessen starter, men for laksefisk er det foreslått 7-14 dager etter såret oppsto (Sveen, 2018). En gradering av hvor mye granulasjonsvev som var til stede i snittene opplevdes utfordrende og sammensatt, og det krevdes god erfaring med avlesning av histopatologiske snitt. I stedet for en graderingsscore ble granulasjonsvev satt som en tilleggsscore. Som supplement ble det brukt antistoffer spesifikke for prolifererende celler (anti-PCNA), noe som lettere kunne verifisere proliferasjon. Celleproliferasjon er svært sentral for at sårhelingen skal være vellykket. I denne studien viste scoringen for celleproliferasjon, at proliferasjonen var sparsom i snittene hos begge gruppene. Tidligere er det vist at prolifererende aktivitet er høyest 36 dager etter påføring av sår, men avtar etter 42 og 57 dager (Sveen, 2018). Dersom mistanken om at de mekaniske sårene på fisken fra RAS-anlegget ble påført under flytting fra settefiskanlegget til postsmoltanlegget, stemmer ikke det overens med tidligere funn (Sveen, 2018). Prøveuttaket av sår fra fisk i RAS ble gjort i PU3 og PU4, altså 3-4 uker etter flytting fra settefiskanlegget. Det er viktig å påpeke at sårheling er en sammensatt immunologisk prosess som kan påvirkes av ulike faktorer. Først og fremst var sårene i denne studien av varierende dybde, men også temperaturen i RAS-anlegget var høyere enn i tidligere forsøk (Sveen et al., 2019), noe som kan indikere en raskere sårheling (Anderson & Roberts, 1975). Andre faktorer som kan påvirke sårhelingen er salinitet, ernæring og håndteringsforholdene (Jensen et al., 2015). Det er derfor vanskelig å gjøre en direkte sammenligning. Likevel skal det understrekes at selv om det var en lav grad av merking i snittene, viste metoden med anti-PCNA seg å være vellykket. Der det var merking, var det tydelig både i epidermisceller og i fibroblaster dypere i vevet.

## 5. Oppsummering og fremtidige perspektiver

I studien er det blitt undersøkt sår og sårheling hos laks, og sammenlignet mekaniske sår med sår med kjent infeksjonsproblem, ved bruk av histokjemiske metoder. Resultatene fra denne studien viste at det var tydelige histopatologiske forskjeller mellom de to gruppene. Sårene fra fisken i RAS hadde mekanisk opprinnelse og i gjennomsnitt en lavere totalscore enn sårene fra fisk i sjømerder som hadde *M. viscosa* og/eller *Tenacibaculum* sp. som infeksjonsårsak. De hadde en mildere cellereaksjon og ga et visuelt inntrykk av å være mindre alvorlig enn sårene vi undersøkte fra fisk fra sjømerder.

De histokjemiske metodene som ble brukt i denne studien har vært svært nyttige for å studere sår og se på responsene som aktiveres ved sårheling hos laks. Det har blitt benyttet veletablerte metoder som HE-farging og IHK med polyklonale antistoffer spesifikke mot bakterier, men det har også blitt tatt i bruk monoklonale antistoffer mot leukocytter og celleproliferasjon som har krevd metodeutvikling og tilpasning. Antistoffene mot leukocytter har ikke blitt brukt på histologisnitt med parafinvoks og på hudvev tidligere, og antistoffene mot celleproliferasjon ble tilpasset for å tydeliggjøre resultatene i denne studien. Begge de monoklonale antistoffene var viktige verktøy som ga informasjon om sårheling i prøvematerialet. Fremtidig arbeid kan sette søkelys på kvantifisering av antall merkede leukocytter og prolifererende celler i hudvev med sår, nettopp ved bruk av antistoffene C4B6 og anti-PCNA. Utarbeidelsen av scoringssystemet for sår var et nyttig verktøy for semi-kvantifisering gjennom tallfesting av histopatologiske endringer, immunreaksjoner og celleresponser i hudvev, tilknyttet både sår og sårheling. Resultatene viser tydelige forskjeller mellom de to gruppene og det kan tenkes at scoringssystemet, i tillegg til å være et semi-kvantitativt verktøy, kan brukes og videreutvikles til å si noe om histopatologiske tilstander ved tilstedeværelse av ulike patogener. Det hadde vært interessant å teste scoringssystemet for sår, på fisk fra smitteforsøk og for vurdering av etiologi hos fisk med sår fra ulike typer kommersielle oppdrettssystemer. Erfaringer fra denne studien viser at det er viktig med standardiserte prøveuttak som også inkluderer flere analysemetoder for å få et bedre bilde og mer informasjon om infeksjonssituasjonen.

Oppsummert viste resultatene i denne studien at sårene vi undersøkte med mekanisk opprinnelse var mindre alvorlige og hadde en mildere cellereaksjon enn sårene fra fisk i sjø med kjent infeksjonsproblem. Heling av de mekaniske sårene syntest å være raskere enn for

sår med uttalt bakterieinfeksjon, som de prøvene fra fisk i sjømerder undersøkt i denne studien, som var infisert med *M. viscosa* og *Tenacibaculum* sp.

En frisk og sterk fisk med god hudhelse vil ha et godt utgangspunkt for sårheling, men det vil alltid være en utfordring for fiskens forsvars- og reparasjonssystem med hensyn til alvorlighetsgrad og omfang av sår forårsaket av både mekaniske skader, miljøskader og infeksjoner, og ofte en kombinasjon av disse.

## Litteratur

- AKVA group. (u.å.-a). *Land Based Aquaculture*.
- AKVA group. (u.å.-b). Produkter. Hentet 20.08.2019 fra <https://www.akvagroup.com/landbasert-oppdrett/produkter>
- Akvakulturdriftsforskriften. (2008). Forskrift om drift av akvakulturanlegg (FOR-2008-06-17-822). Hentet fra [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822#KAPITTEL\\_3](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822#KAPITTEL_3)
- Anderson, C. D. & Roberts, R. J. (1975). A comparison of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. *Journal of Fish Biology*, 7(2), 173-182. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04588.x>
- Aunsmo, A., Bruheim, T., Sandberg, M., Skjerve, E., Romstad, S. & Larssen, R. B. (2008). Methods for investigating patterns of mortality and quantifying cause-specific mortality in sea-farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 81(2), 99-107. <https://doi.org/10.3354/dao01954>
- Bassity, E. & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS ONE*, 7(3), e33196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033196>
- Berry, D., Mahfoudh, K. B., Wagner, M. & Loy, A. (2011). Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7846. <https://doi.org/10.1128/AEM.05220-11>
- Bjerkestrand, B., Bolstad, T. & Hansen, S.-J. (2013). *Akvakultur : havbruk i Norge* (2. utg. utg.). Drammen: Vett & viten.
- Bjerknes, V. & Liltved, H. (2007). *Vannkvalitet og smoltproduksjon*. Rykkinn: Juul forl.
- Bregnballe, J. (2015). *A Guide to Recirculation Aquaculture* FAO.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A. & Poppe, T. T. (2013). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (2nd ed. 2013. utg.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Bullock, A. M., Marks, R. & Roberts, R. J. (1978). The cell kinetics of teleost fish epidermis: Epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Zoology*, 185(2), 197-204. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1978.tb03321.x>
- Caswell, J. L., Bassel, L. L., Rothenburger, J. L., Gröne, A., Sargeant, J. M., Beck, A. P., ... Yamate, J. (2018a). Observational Study Design in Veterinary Pathology, Part 1: Study Design. *Vet Pathol*, 55(5), 607-621. <https://doi.org/10.1177/0300985818785705>
- Caswell, J. L., Bassel, L. L., Rothenburger, J. L., Gröne, A., Sargeant, J. M., Beck, A. P., ... Yamate, J. (2018b). Observational Study Design in Veterinary Pathology, Part 2: Methodology. *Vet Pathol*, 55(6), 774-785. <https://doi.org/10.1177/0300985818798121>
- Drønen, K. (2019). *Microbial colonization and community shifts in a marine post-smolt RAS, monitored the first year of operation by deep sequencing analysis*. University of Bergen, Bergen.
- Dyrevelferdsloven. (2009). Lov om dyrevelferd (LOV-2009-06-19-97). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-97>

- Elliot, D. (2011). Functional morphology of the integumentary system in fishes. I A. P. Farrell (Red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (bd. 1, s. 476-488). San Diego: Academic Press.
- Esteban, M. A. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Fjellheim, A. J., Hess-Erga, O.-K., Attramadal, K. & Vadstein, O. (2016). *Resirkulering av vann i settefiskproduksjon. Bakgrunnshefte til kurs i resirkuleringsteknologi for settefiskproduksjon.* .
- FN. (2020, 28. januar 2020). FNs bærekraftsmål. Hentet fra <https://www.fn.no/Om-FN/FNs-baerekraftsmaal>
- Food and Agriculture Org. of the United Nations. (2018). *The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals*. Rome, Italy: FAO.
- Forskrift om bruk av dyr i forsøk. (2017). Forskrift om bruk av dyr i forsøk (FOR-2017-04-05-451). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-06-18-761>
- Fremtidens smoltproduksjon. (2020, 21. oktober). *Fremtidens smoltproduksjon*. Innlegg presentert ved Fremtidens smoltproduksjon, Sunndalsøra.
- GE Healthcare Life Sciences. (2016). *Affinity Chromatography. Vol. 2: Tagged Proteins*.
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K. & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Vet Pathol*, 50(6), 1007-1015. <https://doi.org/10.1177/0300985813485099>
- Gjessing, M. C., Kvellestad, A., Ottesen, K. & Falk, K. (2009). Nodavirus provokes subclinical encephalitis and retinochoroiditis in adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J Fish Dis*, 32(5), 421-431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01033.x>
- Gjessing, M. C., Steinum, T., Olsen, A. B., Lie, K. I., Tavoranpanich, S., Colquhoun, D. J. & Gjevre, A.-G. (2019). Histopathological investigation of complex gill disease in sea farmed Atlantic salmon.(Research Article). *PLoS ONE*, 14(10), e0222926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222926>
- Gonçalves, A. A. & Gagnon, G. A. (2011). Ozone Application in Recirculating Aquaculture System: An Overview. *Ozone: Science & Engineering*, 33(5), 345-367. <https://doi.org/10.1080/01919512.2011.604595>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01813.x>
- Haugarvoll, E., Bjerkås, I., Nowak, B. F., Hordvik, I. & Koppang, E. O. (2008). Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat*, 213(2), 202-209. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00943.x>
- Haugland, G. T., Jordal, A.-E. O. & Wergeland, H. I. (2012). Characterization of Small, Mononuclear Blood Cells from Salmon Having High Phagocytic Capacity and Ability to Differentiate into Dendritic like Cells. *PLoS ONE*, 7(11), e49260-e49260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049260>
- Havixbeck, J. & Barreda, D. (2015). Neutrophil Development, Migration, and Function in Teleost Fish. *Biology (Basel)*, 4(4), 715-734. <https://doi.org/10.3390/biology4040715>

- Hjeltnes, B., Bang-Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A. & Walde, C. S. (2019). *Fiskehelserapporten 2018* (6a/2019). Veterinærinstituttet. Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/fiskehelserapporten-2018>
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177. <https://doi.org/10.3390/biom5010166>
- Huang, W. M., Gibson, S. J., Facer, P., Gu, J. & Polak, J. M. (1983). Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry*, 77(2), 275-279. <https://doi.org/10.1007/BF00506570>
- Iger, Y. & Abraham, M. (1990). The process of skin healing in experimentally wounded carp. *Journal of Fish Biology*, 36(3), 421-437. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05622.x>
- Iversen, A., Andreassen, O., Hermansen, Ø., Larsen, T. A. & Terjesen, B. (2013). *Oppdrettsteknologi og konkurranseposisjon. Aquaculture technology and competitiveness (In Norw, English abstract)*.
- Iversen, A., Hermansen, Ø., Nystøyl, R. & Hess, E. J. (2017). *Kostnadsutvikling i lakseoppdrett – med fokus på før- og lusekostnader*. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF).
- Jensen, L. B., Wahli, T., McGurk, C., Eriksen, T. B., Obach, A., Waagbø, R., ... Tafalla, C. (2015). Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(6), 1527-1543. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0105-2>
- Jorgensen, S. L. & Zhao, R. (2016). Microbial Inventory of Deeply Buried Oceanic Crust from a Young Ridge Flank. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00820>
- Karlsen, C., Ytteborg, E., Timmerhaus, G., Høst, V., Handeland, S., Jørgensen, S. M. & Krasnov, A. (2018a). Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer. *Sci Rep*, 8(1), 9510-9512. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27818-y>
- Karlsen, C., Ytteborg, E., Timmerhaus, G., Høst, V., Handeland, S. & Krasnov, A. (2018b). Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27818-y>
- Keshav, R. & Narayanappa, U. (2015). Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Oral Submucous Fibrosis: An Immunohistochemical Study. *J Clin Diagn Res*, 9(5), ZC20-ZC23. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13046.5885>
- Klakegg, O., Abayneh, T., Fauske, A. K., Fulberth, M. & Sorum, H. (2019). An outbreak of acute disease and mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in Norway caused by *Tenacibaculum dicentrarchi*. *J Fish Dis*, 42(6), 789-807. <https://doi.org/10.1111/jfd.12982>
- Knoblauch, S. E. & Himmel, L. E. (2018). Keeping Score: Semiquantitative and Quantitative Scoring Approaches to Genetically Engineered and Xenograft Mouse Models of Cancer. *Vet Pathol*, 56(1), 24-32. <https://doi.org/10.1177/0300985818808526>

- Kryvi, H. & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Bergen: Fagbokforlaget.
- Liu, B., Liu, Y. & Sun, G. (2017). Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 48(5), 2133-2144. <https://doi.org/10.1111/are.13050>
- Lunder, T., Eversen, Ø., Holstad, G. & Håstein, T. (1995). 'Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of aquatic organisms*, 23(1), 39-49. <https://doi.org/10.3354/dao023039>
- Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C. R., Tunsjø, H. S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H. & Grove, S. (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* – Pathogen invasion and host response. *Fish Shellfish Immunol*, 26(6), 877-884. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.019>
- Mackintosh, J. A. (2001). The Antimicrobial Properties of Melanocytes, Melanosomes and Melanin and the Evolution of Black Skin. *J Theor Biol*, 211(2), 101-113. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2331>
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2), 137.
- Mashoof, S. & Criscitiello, M. F. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology (Basel)*, 5(4), 45. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>
- Merriman, B., Ion Torrent R&D Team & Rothberg, J. M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 33(23), 3397-3417. <https://doi.org/10.1002/elps.201200424>
- Meyerholz, D. K. & Beck, A. P. (2018). Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Lab Invest*, 98(7), 844-855. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0057-0>
- Meyerholz, D. K., Tintle, N. L. & Beck, A. P. (2018). Common Pitfalls in Analysis of Tissue Scores. *Vet Pathol*, 56(1), 39-42. <https://doi.org/10.1177/0300985818794250>
- Mitchell, S., Baxter, E., Holland, C. & Rodger, H. (2012). Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the European Aquaculture Society*, 20(5), 813-825. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9504-x>
- Mota, V. C., Nilsen, T. O., Gerwins, J., Gallo, M., Ytteborg, E., Baeverfjord, G., ... Terjesen, B. F. (2019). The effects of carbon dioxide on growth performance, welfare, and health of Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 498, 578-586. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.075>
- Munson, P., Arya, M. & Shergill, I. S. (2007). *Immunohistochemistry*. London: London: Springer London.
- Murphy, K., Janeway, C. A., Mowat, A. & Weaver, C. T. (2012). *Janeway's immunobiology* (8th ed. utg.). New York: Garland Science.
- Murphy, K. & Weaver, C. T. (2017). *Janeway's immunobiology* (9th edition. utg.). New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.



- Noble, C., Cañon Jones, H. A., Damsgård, B., Flood, M. J., Midling, K. Ø., Roque, A., ... Cottee, S. Y. (2012). Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol Biochem*, 38(1), 61-83. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9557-1>
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M., Kolarević, J. & Gismervik, K. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks : hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd* (Rev. utg. utg.). Tromsø: Nofima.
- Nofitech AS. (u.å.). Hentet 21.juni 2020 fra <https://nofitech.com/>
- Norges Sjømatråd. (2020, 7. januar 2020). Sjømateksport for 107,3 milliarder kroner i 2019. Hentet 2. april 2020 fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-1073-milliarder-kroner-i-2019/>
- Norwegian Veterinary Institute. (2012). *Fish Health Report 2011*.
- NOU 2019: 18. (2019). *Skattlegging av havbruksvirksomhet*. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/nou-2019-18/id2676239/>
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2019). *Blå muligheter: Regjeringens oppdaterte havstrategi*. Hentet fra [https://www.regjeringen.no/globalassets/departementene/nfd/dokumenter/strategier/nfd\\_havstrategi\\_2019\\_norsk\\_uu.pdf](https://www.regjeringen.no/globalassets/departementene/nfd/dokumenter/strategier/nfd_havstrategi_2019_norsk_uu.pdf)
- O' Byrne-Ring, N., Dowling, K., Cotter, D., Whelan, K. & Macevilly, U. (2003). Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. *Journal of Fish Biology*, 63(6), 1625-1630. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2003.00273.x>
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y. & Skjermo, J. (2012). *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050*.
- Olsen, A. B., Gulla, S., Steinum, T., Colquhoun, D. J., Nilsen, H. K. & Duchaud, E. (2017). Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Vet Microbiol*, 205, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.028>
- Olsen, A. B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sørum, H. & Colquhoun, D. J. (2011). *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 94(3), 189-199. <https://doi.org/10.3354/dao02324>
- Olsen, A. B., Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Lagesen, K., Gulla, S., Avendaño-Herrera, R., ... Colquhoun, D. J. (2020). *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004501>
- Overton, K., Samsing, F., Oppedal, F., Dalvin, S., Stien, L. H. & Dempster, T. (2018). The use and effects of hydrogen peroxide on salmon lice and post-smolt Atlantic salmon. *Aquaculture*, 486, 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.041>
- Pettersen, E. F., Bjercknes, R. & Wergeland, H. I. (2000). Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol*, 10(8), 695-710. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0284>

- Pettersen, E. F., Fyllingen, I., Kavlie, A., Maaseide, N. P., Glette, J., Endresen, C. & Wergeland, H. I. (1995). Monoclonal antibodies reactive with serum IgM and leukocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & shellfish immunology*, 5(4), 275-287. <https://doi.org/10.1006/fsim.1995.0027>
- Pickering, A. D. (1974). The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 6(2), 111-118. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04531.x>
- Pittman, K., Pittman, A., Karlson, S., Cieplinska, T., Sourd, P., Redmond, K., ... Sweetman, E. (2013). Body site matters: an evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 36(2), 115-127. <https://doi.org/10.1111/jfd.12002>
- Produksjonsområdeforskriften. (2017). *Forskrift om produksjonsområder for akvakultur av matfisk i sjø av laks, ørret og regnbueørret* (FOR-2020-02-04-106). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2017-01-16-61>
- Ream, R. A., Theriot, J. A. & Somero, G. N. (2003). Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4539-4551. <https://doi.org/10.1242/jeb.00706>
- Richardson, R., Metzger, M., Knyphausen, P., Ramezani, T., Slanchev, K., Kraus, C., ... Hammerschmidt, M. (2016). Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development*, 143(12), 2077-2088. <https://doi.org/10.1242/dev.130492>
- Richardson, R., Slanchev, K., Kraus, C., Knyphausen, P., Eming, S. & Hammerschmidt, M. (2013). Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *J Invest Dermatol*, 133(6), 1655-1665. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.16>
- Roalkvam, I., Drønen, K., Dahle, H. & Wergeland, H. I. (2019). Microbial Communities in a Flow-Through Fish Farm for Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) During Healthy Rearing Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10(1594). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01594>
- Roberts, R. J. (2012). *Fish pathology* (4th ed. utg.). Chichester: Wiley-Blackwell.
- Schafer, K. A., Eighmy, J., Fikes, J. D., Halpern, W. G., Hukkanen, R. R., Long, G. G., ... Francke, S. (2018). Use of Severity Grades to Characterize Histopathologic Changes. *Toxicol Pathol*, 46(3), 256-265. <https://doi.org/10.1177/0192623318761348>
- Schroeder, J. P., Klatt, S., Schlachter, M., Zablotski, Y., Keuter, S., Spieck, E. & Schulz, C. (2015). Impact of ozonation and residual ozone-produced oxidants on the nitrification performance of moving-bed biofilters from marine recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.*, 65, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.008>
- ScienceDirect (Elsevier). (u.å). Polypropylene. Hentet 11. mai 2020 fra <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/polypropylene>
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., ... Vaughan, L. (2011). Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol Biochem*, 38(1), 85-105. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9517-9>

- Silvester, R., Alexander, D., Antony, A. C. & Hatha, M. (2017). GroEL PCR- RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. *Microb Pathog*, 105, 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.029>
- Sire, J. Y. & Akimenko, M. A. (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol*, 48(2-3), 233-247. <https://doi.org/10.1387/ijdb.031767js>
- Sire, J. Y., Allizard, F., Babiar, O., Bourguignon, J. & Quilhac, A. (1997). Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Anat*, 190 ( Pt 4), 545-561. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19040545.x>
- Småge, S. B. (2018). Tenacibaculosis in Norwegian farmed Atlantic salmon. I: The University of Bergen.
- Sommerset, I., Walde, C. S., Bang-Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (2020). *Fiskehelsesrapporten 2019 (5a/2020)*. Veterinærinstituttet. Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/fiskehelsesrapporten-2019>
- Statistisk sentralbyrå. (2019, 24. oktober). Akvakultur. Hentet 1. april 2020 fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar>
- Summerfelt, S. T. (2003). Ozonation and UV irradiation—an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering*, 28(1-2), 21-36. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00069-9)
- Sveen, L. R. (2018). *Aquaculture relevant stressors and their impacts on skin and wound healing in post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar L.)* (Doktoravhandling). Universitetet i Bergen. Hentet fra <https://bora.uib.no/handle/1956/19024>
- Sveen, L. R., Karlsen, C. & Ytteborg, E. (2020). Mechanical induced wounds in fish – a review on models and healing mechanisms. *Reviews in aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12443>
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Handeland, S. & Ytteborg, E. (2019). Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Scientific reports*, 9(1), 3565. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39080-x>
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Torgersen, J. S., Ytteborg, E., Jørgensen, S. M., Handeland, S., ... Takle, H. (2016). Impact of fish density and specific water flow on skin properties in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) post-smolts. *Aquaculture*, 464, 629-637. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.012>
- Takle, H. R., Ytteborg, E., Nielsen, K. V., Karlsen, C. R., Nilsen, H. K., Sveen, L., ... Nilsen, A. (2015). Sårproblematikk og hudhelse i laks-og regnbueørrettoppdrett.
- Terjesen, B. F., Summerfelt, S. T., Nerland, S., Ulgenes, Y., Fjæra, S. O., Megård Reiten, B. K., ... Åsgård, T. (2013). Design, dimensioning, and performance of a research facility for studies on the requirements of fish in RAS environments. *Aquacultural Engineering*, 54, 49-63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.002>
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-a). Overview of Immunohistochemistry (IHC). Hentet 07. mai 2020 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home.html>
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-b). Polysine Adhesion Slides. Hentet fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home.html>

- Thorarensen, H. & Farrell, A. P. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture*, 312(1-4), 1-14.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.043>
- Treuting, P. M. & Boyd, K. L. (2019). Histopathological Scoring. *Vet Pathol*, 56(1), 17-18.  
<https://doi.org/10.1177/0300985818785699>
- Verma, N., Kumari, U., Mittal, S. & Mittal, A. K. (2017). Effect of asiaticoside on the healing of skin wounds in the carp *Cirrhinus mrigala*: An immunohistochemical investigation. *Tissue and Cell*, 49(6), 734-745. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.10.005>
- Veterinærinstituttet. (2018). Infeksiøs hematopoetisk nekrose (IHN). Hentet 28.09.2018 fra <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/infeksi%C3%B8s-hematopoetisk-nekrose-ihn>
- Vågsholm, I. & Djupvik, H. O. (1998). Risk factors for skin lesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L: Risk factors in salmon. *Journal of Fish Diseases*, 21(6), 449-454.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00123.x>
- Young, B., Stevens, A., Lowe, J. S., Wheeler, P. R. & Burkitt, H. G. (2002). *Wheeler's basic histopathology : a colour atlas and text* (4th ed. utg.). New York: Churchill Livingstone.
- Ytrestøyl, T., Takle, H., Kolarevic, J., Calabrese, S., Timmerhaus, G., Rosseland, B. O., ... Terjesen, B. F. (2020). Performance and welfare of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. post-smolts in recirculating aquaculture systems: Importance of salinity and water velocity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 373-392.  
<https://doi.org/10.1111/jwas.12682>

## Vedlegg

### Vedlegg 1: Protokoll for immunhistokjemi

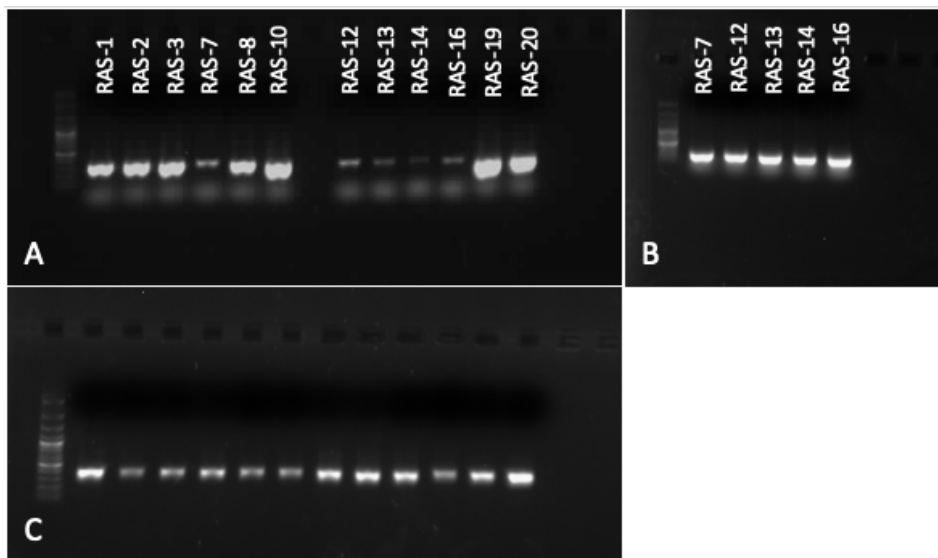
1. 5% BSA i TBS (blokkeringsløsning): 20 minutter. Dunk av.
2. Inkubering med primærantistoff: 30 minutter / 3 timer. Romtemperatur, fuktammer.
3. Vaskebuffer 3x5 min (TBS bruksløsning + Tween)
4. Inkubering med sekundærantistoff: Biotinylert kanin anti-mus 1:300, 30 minutter
5. Vaskebuffer 3x5 min
6. Kompleks: Streptavidin AP 1:1000, 30 min
7. Vaskebuffer 3x5 min
8. Substrat: Fast Red TR salt, 20 min
9. Skyll i vann 3x5 min
10. Hematoxylin 1:4 2 min
11. Skyll i vann 3 x5 min
12. Dekk med Aquatex Mounting Medium

### Vedlegg 2: Veiledende vannkvalitetsparametere

**Tabell A:** Veiledende verdier på vannkvalitetsparametere i lukkede anlegg for postsmolt (Thorarensen & Farrell, 2011) og i settefiskanlegg med gjennomstrømning eller RAS (Fjellheim et al., 2016).

Parameter	Verdier		Verdier i anlegget knyttet til studien
	Postsmolt	Settefisk	
pH	Ikke oppgitt	6,2 – 7,8	6,9 – 7,8
O <sub>2</sub> (%)	80-100	80-100	95
CO <sub>2</sub> (mg/l)	≤10	<15	4,0 – 6,0
Nitritt (mg/l)	<0,1	<0,5 (sjøvann)	0,1 – 1,1
TAN (mg/l)	-	<2,0	0,1 – 0,9 mg/l

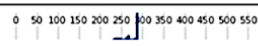
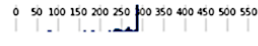
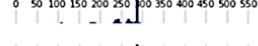
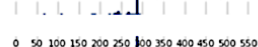
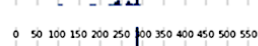
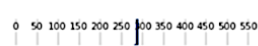
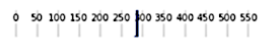
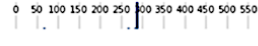
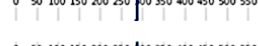

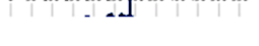

### Vedlegg 3: PCR-produkter



**Figur:** PCR-produkter fra første og andre PCR. Alle produktene har en baseparlengde ~300. A) Båndene fra første PCR med 30 sykluser. B) Båndene fra de fem svake prøvene ble kjørt på nytt med 35 sykluser. C) Bånd etter 2.PCR med 7 sykluser. Under båndene A og B sees en svak sky, som er primere som har en høyere baseparlengde.

## Vedlegg 4: Sekvenseringsrapport

**Tabell B:** I tabellen under vises sekvenseringsrapporten fra sekvenseringen utført ved Institutt for Biovitenskap, UiB. «Sample» representerer viser hver av de 12 prøvene. Nøyaktigheten på hvilke nukleotider som ble identifisert under sekvensering ble fremstilt som en Q-score. Q20 sier noe om at sannsynligheten for at en feil base er 1 av 100, det vil si at hvert 100 basepar sannsynligvis vil inneholde én feil. Dette tilsvarer en nøyaktighet på 99% på sekvenseringen. I tabellen viser Q20 hvor mange av basene som har en nøyaktighet på over 99%. Reads viser antall sekvenser, altså antall basepar. Gjennomsnittslengden på baseparene var 251 bp i gjennomsnitt for alle 12 prøvene.

Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram
RAS-1	9,667,023	8,644,137	37,392	258 bp	
RAS-2	10,797,889	9,490,696	43,742	246 bp	
RAS-3	10,669,857	9,269,187	42,891	248 bp	
RAS-7	9,542,904	8,401,962	39,216	243 bp	
RAS-8	10,504,753	9,094,354	42,642	246 bp	
RAS-10	9,983,369	8,677,346	40,310	247 bp	
RAS-12	11,260,647	10,377,226	43,891	256 bp	
RAS-13	10,524,569	9,691,042	40,637	258 bp	
RAS-14	11,760,297	10,782,064	46,218	254 bp	
RAS-16	11,755,759	10,764,469	45,100	260 bp	
RAS-19	10,391,609	9,060,610	41,906	247 bp	
RAS-20	11,490,070	10,060,442	45,647	251 bp	

## Vedlegg 5: Scoringsskjema

Patologiscore	<i>Ingen (0)</i>	<i>Sparsom (1)</i>	<i>Moderat (2)</i>	<i>Uttalt (3)</i>
<b>Hovedkriterier</b> <i>Affisert hudvev (dybde på sår)</i>	Intakt og ansees som normal.	Erosjon. Fokalt tap av epidermis.	Ulcer. Fullstendig tap av epidermis, hele eller deler av dermis er affisert (spongiøse og kompakte del). Hypodermis kan også være affisert. Tilstøtende skjelettmuskulatur er intakt.	Ulcer. Fullstendig tap av epidermis, dermis og hypodermis. Tilstøtende skjelettmuskulatur er affisert.
<i>Degenerasjon av hudvev</i>	Intakt og ansees som normalt.	Hovedsakelig intakt, men noe nedbrutt vev- og cellestruktur.	Vev- og cellestruktur er til dels brutt ned.	Massiv nedbrytning av vev- og cellestruktur. Normalstruktur kan være erstattet av bakterier.
<i>Sirkulasjonsforstyrrelser (stuvning og/eller blødning)</i>	Ingen observasjoner av blødning eller stuvning i blodkar.	Fokale blødninger og stuvning i blodkar.	Multifokale blødninger og stuvning blodkar.	Blødninger diffust i vevet. De fleste blodkar har stuvning.
<i>Infiltrasjon av immunceller i HE-snitt</i>	Ingen infiltrasjon av leukocytter.	Fokal infiltrasjon av leukocytter.	Multifokal infiltrasjon av leukocytter.	Diffus infiltrasjon av leukocytter.
<i>Merking av leukocytter med C4B6 i et utvalgt område i IHK-snitt</i>	Ingen merking av leukocytter.	Spredd og få merkede leukocytter.	Få leukocytter merket fokalt eller multifokalt.	Diffus og massiv merking av leukocytter.
<i>Celleproliferasjon (anti-PCNA)</i>	Ingen merking av celler med anti-PCNA.	Få celler er merket med anti-PCNA.	Moderat merking av celler med anti-PCNA multifokalt.	Utbredt merking av celler med anti-PCNA diffust.
<p><b>Tilleggs-kriterier</b></p> <p><i>Reepitelisering:</i> epidermisceller som ser ut til å vandre til sårområdet.</p> <p><i>Hyperpigmentering i sårkant:</i> Pigmenteringsreaksjon med melanocytter i eller rundt sårområdet.</p> <p><i>Granulasjonsvev:</i> Dannelse av granulasjonsvev bestående av bindevev, fibroblaster, immunceller og små blodkar.</p> <p><i>Amorft proteinrikt eksudat:</i> Substrat som fyller sårområdet.</p> <p><i>Bakterier</i></p>				