

Immunrespons hos atlantisk laks (*Salmo salar*) ved
infestasjon av lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)

Endringer i genuttrykk og histologiske forandringer i hud

Sebastian Samsonsen



Masteroppgave i fiskehelse

Universitetet i Bergen

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

1. Juni 2021

Forord

Forsøksfisken og prøvedataen i denne masteroppgaven er en del av prosjektet «Infest» (Effekter av infestasjonsparametere på interaksjonen mellom laks og lakselus) som er del av et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet (HI) og Universitetet i Bergen (UIB). Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF).

Ønsker i den anledning å takke alle som har bidratt og hjulpet til prosjektet, og alle på forskningsstasjonen til HI på Matre for deres hjelp under sampling og som holder fisken og lusen i live. Videre ønsker jeg å gi en spesiell stor takk til mine veiledere som jeg ikke hadde klart meg uten fra smittespredning og sykdomsgruppen på Havforskningsinstituttet; Sussie Dalvin (forsker) og Mathias Stølen Ugelvik (postdoktor) for all deres hjelp og veiledning gjennom hele masteren. Ønsker også å takke intern veileder gjennom Universitetet i Bergen; Aina Cathrine Øvergård (Førsteamanuensis) for hennes hjelp og veiledning.

Ønsker å takke de som har hjulpet meg med ulike metoder på lab og labforsøk. Takk til Stig Mæhle (overingenør, HI) for hjelp til utførelse og databehandling av qPCR. Takk til Dawit Berhe Ghebretsaie (overingenør, HI) for hjelp til snitting og preparering av snitt til histologi. Takk til Dhamotharan Kannimuthu (postdoktor, HI) for hjelp til farging av snitt og immunhistokjemisk metode, og alt det innebar.

Takk til Kristoffer H. Tysseland for å ha vært min faste lab- og studiepartner opp gjennom alle årene på studiet.

Til slutt ønsker jeg å takke familie, venner og studiekamerater som har betydd utrolig mye for meg.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	6
1. Introduksjon	7
Tabell 1 – Estimert dødelighet for postsmolt grunnet lakselus fra oppdrettsanlegg 2012-2020 sammenlignet med trafikklysstatus 2020	9
1.1 Om prosjektet.....	10
1.2 Laks (Salmo Salar).....	10
1.3 Immunsystemet.....	11
1.3.1 Det medfødte immunsystemet	11
1.3.2 Det adaptivet immunsystemet.....	12
1.3.3 Immunoglobuliner	12
1.3.4 Cytokiner	13
1.3.5 Miljøforårsakende effekter på immunresponsen	13
1.4 Lakselus (Lepeophtheirus salmonis).....	14
1.5 Bakgrunn for forsøket	15
Tabell 2 - Immungener som ble analysert.....	16
1.6 Mål for prosjektet.....	17
2. Metode	18
2.1 Prøvetaking og RNA isolering	18
2.2 Spektrometri.....	18
2.3 cDNA syntese.....	18
2.4 Fortynning av cDNA.....	19
2.5 q-RT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR)	19
Tabell 3 – Oppsett 96-Brønnplate med mix	19
Tabell 4 – Oppsett qPCR.....	20
Tabell 5– Innstillinger for qPCR maskin	20
Tabell 6 - Sekvenser for primere brukt under qPCR	20
2.6 Behandling av lus og fisk	21
Tabell 6 – Lusekonsentrasjoner.....	21
Tabell 7 – Oppsett for doseforsøket.....	22
2.7 Histologi.....	24
2.7.1 Snitting.....	25
2.7.2 Farging.....	25
2.8 Blodprøver.....	26
2.9 Databehandling og statistiske analyser	27
3. Resultater	28

3.1 Uttrykking av immungener.....	28
3.1.1 Pro-inflammatoriske gen.....	29
Tabell 8 – P-verdier for IL-1 β	29
Tabell 9 – P-verdier for IL-8.....	31
Tabell 10 – P-verdier for TNF- α	33
3.1.2 Anti-inflammatoriske gen.....	35
Tabell 11 – P-verdier for IL4-13A.....	35
3.1.3 Immunoglobulin.....	37
Tabell 12 – P-verdier for IgM.....	37
Tabell 13 – P-verdier for IgT.....	39
3.1.4 Cath2.....	41
Tabell 14 – P-verdier for Cath2.....	41
3.1.6 INOS.....	43
Tabell 15 – P-verdier for INOS.....	43
3.1.7 MMP9.....	45
Tabell 16 – P-verdier for MMP9.....	45
3.2 Histologi.....	47
3.2.1 Eksempelbilder av snitt positive for TNF- α	47
3.2.2 – Snitt av hud farget immunhistokjemisk teknikk for TNF- α	49
3.2.3 Snitt av hud farget med HES.....	54
3.3 Kortisolnivå – Stress.....	57
3.4 Dødelighet.....	58
4. Diskusjon.....	59
4.1 metodiske feilkilder.....	59
4.1.1 eksperimentelt oppsett.....	59
4.1.2 Infeksjon.....	60
4.2 Dødelighet.....	61
4.3 Plasmakortisol - stress.....	61
4.4 Resultater genuttrykk av immungener og immunhistokjemi TNF- α	63
4.4.1 Pro-inflammatoriske gen.....	63
IL-1 β genuttrykk.....	63
IL-8 genuttrykk.....	64
TNF- α	64
4.4.2 Anti-inflammatoriske gen.....	66
IL-4/13A genuttrykk.....	66
4.4.3 Immunoglobulin.....	66

IgM.....	66
IgT.....	67
4.4.4 Cathelicidin-derived antimicrobial peptide 2 (CATH2).....	68
4.4.5 Inducible nitric oxide synthase (Inos).....	69
4.4.6 Matrix metalloproteinase (MMP9)	69
4.5 Histologi.....	70
4.6 Oppsummering.....	71
4.7 Konklusjoner.....	71
4.8 Videre forskning	72
Appendix A – Resultater av t-test for qPCR.....	76
Mean Fold Change og standardfeil (SE) for kontroll	76
Resultat t-test infisert mot kontroll.....	76
Appendix B – CT verdier qPCR.....	77
CT-verdier referansegen.....	77
CT-verdier Pro-inflammatoriske gen	78
CT-verdier Anti-inflammatoriske gen	79
CT-verdier immunoglobuliner	80
CT-verdier gen uten felles kategori.....	81
Appendix C - Syntax brukt i R studios.....	82
Syntax for å lage figurer i R studio.....	82
Syntax for t-test.....	82
Appendix D - Rådata av lusetall, vekt og plasmakortisol for 75 fisk fra sampling 24.02.2020.....	83

Sammendrag

Lakselus blir ansett som den største utfordringen knyttet til oppdrett i dag. Disse utfordringene kommer i form av redusert fiskehelse, økte produksjonskostnader samt tiltak og lovverk som begrenser vekst for næringen ved høye lusetall. I tillegg er lakselus en stor trussel for overlevelsen til villaksen og dermed et miljøproblem. Det er derfor et høyt fokus på forskning som ser nærmere på interaksjonen mellom laks og lakselus i håp om å finne nye og mer effektive tiltak mot problemet. Oppgaven er skrevet i forbindelse med et slikt prosjekt (Infest), som ser på denne interaksjonen ved ulike parametere.

Forsøket ble utført ved å infisere nysmoltifisert laks med ulike doser lakselus (*L. salmonis*) og sammenligne genuttrykket i disse og i uinfisert kontrollfisk. Forsøksfisken som ble benyttet var liten første generasjon villaks, som hadde en snittvekt på 47 gram ved sampling da lusen befant seg i Chalimus II. Oppgaven har et fokus på Chalimus II stadiet for å begrense omfanget. Endringen i genuttrykket i huden ble observert ved hjelp av qPCR, hvor 9 immungener med ulik relevans i forbindelse med immunresponsen ble studert. Plasmakortisol nivå ved sampling og dødelighet i løpet av forsøket ble også sett på. Det ble i tillegg tatt hudprøver av fisk fra et annet forsøk for å se på histologiske forandringer i forbindelse med infeksjon av lakselus ved å farge og studere disse hudsnittene. Snittene ble farget med både HES farging og en spesiell immunhistokjemisk teknikk for å påvise proteinet for immungenet TNF- α .

Immungenene som ble sett nærmere på i denne oppgaven ble valgt på bakgrunn av deres relevans i immunsystemet i tillegg til tidligere forskning som ser på immunrespons hos laks i forbindelse med infeksjon av lakselus. Immungenene som ble valgt var IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-4/13A, IgM, IgT, MMP9, Cath 2 og INOS. EF1 α og RLP1 ble benyttet som referansegen. Alle prøvene stammer fra hud, og på fisk infisert med lus ble prøvene tatt like over sidelinjen, og et tilsvarende sted hos kontrollfisken. Det ble ikke tatt negative kontroller av infisert fisk pga. størrelsen.

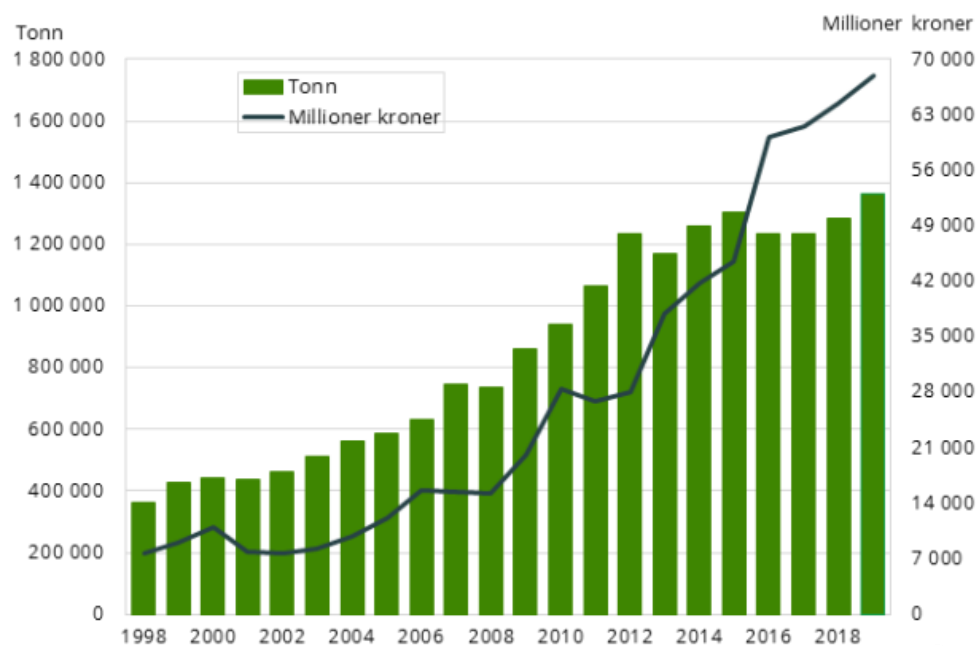
Uttrykket ble så beregnet ut ifra all fisk infisert med lus sammenlignet mot kontroll. Det ble bestemt en grense på over 2,0 Mean Fold Change for oppregulering, og under 0,5 for nedregulering samt $P < 0,05$ for statistisk signifikans. 7 immungener var oppregulert (men $P > 0,05$), hvor Cath2 var eneste av de oppregulerte genene som ga resultater av statistisk signifikans, Inos var signifikant nedregulert. Det var ingen korrelasjon for noen av immungenene for intensitet av infeksjonen og uttrykket av genet. Betydning av infeksjonsintensitet for dødelighet og stress på fisken ble diskutert. For histologi var ingen av snittene positive for tilstedeværelsen av proteinet for TNF- α , og for de HES fargede snittene var det ikke mulig å observere tydelige forandringer i vevet som følge av infeksjon med lakselus.

1. Introduksjon

Produksjonen av fisk i verda er estimert til 179 millioner tonn i 2018, med en førstehåndsverdi på 402 milliarder USD. Hvorav 82 millioner tonn, eller 250 milliarder USD kom fra akvakultur (FAO, 2020).

Totalt ble 156 millioner tonn brukt til menneskelig konsum noe som tilsvarer over 20 kg per innbygger, mens de resterende ble brukt til å produsere fiskemel og fiskeolje. Oppdrettsnæringen er også en svært viktig næring for Norge, og næringen eksporterte 1,45 millioner tonn fisk og skalldyr til en verdi av 71,7 milliarder kroner i 2019 (SSB, 2019). Laks alene stod for 1,36 millioner tonn og 68,0 milliarder kroner (SSB, 2020). Dette utgjorde en økning i lakseproduksjonen fra fjoråret på 6,4% prosent, som viser at laksenæringen fortsatt er i vekst. Likevel er det ikke gitt at denne veksten vil fortsette dersom produksjonskostnadene fortsetter å øke. Tall fra fiskeridirektoratet viser at produksjonskostnadene pr. kg økte med 14.8%, fra 30,09 til 34,54 kr på ett år (FD, lønnsomhetsundersøkelse, 2020). Med en slik høy økning i kostnader sammenlignet med en tilnærmet flat kurve i antall tonn solgt siden 2012 (se figur 1.1) vil en svakere laksepris enn dagens nivå kunne få store konsekvenser for næringen.

Solgt mengde og førstehåndsverdi av laks



Kilde: Fiskeridirektoratet.

Figur 1.1: Antall tonn solgt økte kraftig fra 1998 frem til 2012 hvor veksten i antall tonn solgt har nærmest uteblitt fra 2012 frem til de siste årene. Slik at lakseprisen alene står for økningen av førstehåndsverdien.

Mye av årsaken til den stagnerte veksten i produserte tonn skyldes sykdom, miljøutfordringer, strengere krav og en utfordrende lusesituasjon. Det er vanskelig å beregne nøyaktig hvor mye lakselus koster næringen, men det er liten tvil om at det er den desidert største utfordringen for bransjen. Problemet med lakselusen er at den påvirker både oppdrettslaksen og vill laksefisk. Oppdrettslaksen er mye større enn villaksen under første møte med lakselus og ofte i en mindre sårbar fase slik at det oftere går mer ut over velferden til villfisken, men samtidig befinner oppdrettsfisken seg i en veldig tett merd med svært høy biomasse slik at lusen sprer seg lett. Dersom et anlegg har 0.5 voksne hunnlus eller mer per laks må fisken gjennom avlusning som er en veldig kostbar prosess i tillegg til at det går på bekostning av velferden til fisken. Etter det ble enighet om at lakselus fra oppdrett utgjør den største trusselen mot villfiskbestandene har det blitt innført en rekke tiltak. Disse inkluderer trafikkløssystem, overvåkning av miljø, luseforskrift og et strengere lovverk som omfatter akvakultur og alt det medfører.

Alle disse tiltakene skal bidra til at oppdrettsnæringen blir mer bærekraftig med tanke på dyrevelferd, miljøet og naturen, men de medfører potensielt store kostnader. Dette har ført til en økning på forskning og på samspillet mellom laks og lakselus, i håp om å finne bedre og mer effektive metoder og tiltak som reduserer den negative påvirkningen av lakselus. Dette vil igjen ha positive konsekvenser knyttet til bærekraft og økonomi for oppdrett, men også for bestanden og overlevelsen til villaksen.

Havforskningsinstituttet utfører mye av denne forskningen på oppdrag av Mattilsynet og Nærings- og Fiskeridepartementet (NFD). Risikorapporten publisert av HI 03.02.2021 er et eksempel på dette, og her har de utført forsøk for å estimere dødelighet for utvandrende postsmolt av laks 2012-2020. De laget da modeller som viste dødeligheten for postsmolt grunnet lakselus sluppet fra oppdrettsanlegg i de 13 ulike produksjonsområdene i Norge. Disse modellene viser om dødeligheten i enkelte elver er <10%, mellom 10 og 20% eller over 30%. Resultatene fra dette arbeidet er forsøkt oppsummert i tabell 1 og satt i sammenheng med trafikkløsystemet.

Tabell 1 – Estimert dødelighet for postsmolt grunnet lakselus fra oppdrettsanlegg 2012-2020 sammenlignet med trafikklysstatus 2020

Produksjonsområde	Trafikklysstatus 2020	Generell dødelighet på postsmolt som følge av lakselus 2012-2014	Generell dødelighet på postsmolt som følge av lakselus 2015-2020
1. Svenskegrensen til Jæren	Grønn	Liten	Liten
2. Ryfylke	Grønn	Liten til Moderat	Liten til høy
3. Karmøy til Sotra	Gult	Moderat til høy	Moderat til høy
4. Nordhordaland til Stadt	Rødt	Liten til moderat	Moderat og høy
5. Stadt til Hustadvika	Rødt	Liten til høy	Liten til høy
6. Nordmøre til Sør-Trøndelag	Grønn	Liten til høy	Liten til høy
7. Nord-Trøndelag med Bindal	Grønn	Liten til moderat	Liten til moderat
8. Helgeland til Bodø	Grønn	Liten*	Liten til moderat
9. Vestfjorden og Vesterålen	Grønn	Liten	Liten**
10. Andøya til Senja	Gult	Liten til høy	Liten til høy
11. Kvaløya til Loppa	Grønn	Liten	Liten*
12. Vest-Finnmark	Grønn	Liten	Liten*
13. Øst-Finnmark	Grønn	Liten	Liten

Tabelltekst: Det er generell sammenheng mellom trafikklysstatus og estimert dødelighet forårsaket av lakselus fra oppdrett, men med noen avvik i produksjonsområde 2-8. Dette skyldes at det er mange flere faktorer som tas i betraktning når status skal bestemmes. Trafikklysstatus baseres på rapporter fra styringsgruppen i NFD som har fått en vurdering fra ekspertgruppen som tar for seg blant annet ulike modeller og overvåkningsdata inkludert dødelighet (som vist her). Områder med grønt lys får øke produksjonskapasiteten med inntil 6%, områder med gult lys forblir uendret, mens områder med rødt lys må redusere produksjonskapasiteten med inntil 6%. mange av produksjonsområdene i nord har en generelt liten dødelighet, men flere av disse har enkelte elver som skiller seg ut med moderat eller høy dødelighet, disse er markert med *(moderat) og **(høy).

Kilde: Rapport fra HI «Estimert dødelighet for utvandrende postsmolt av laks 2012-2020»

til Mattilsynet OK-program 56827 – Lakselusovervåking. Trafikklysstatus fra Nærings- og fiskeridepartementet.

1.1 Om prosjektet

Forsøksfisken og prøvedataen i denne masteroppgaven er en del av prosjektet «Infest» (Effekter av infestasjonsparametere på interaksjonen mellom laks og lakselus) som er del av et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet (HI) og Universitetet i Bergen (UIB). Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF) og har som mål å innhente mer forståelse for hvordan lakselusen og fisken interagerer for å finne vitenbaserte løsninger på luseproblematikken.

Denne oppgaven vil se nærmere på samspillet mellom laks og lakselus, og det skal gjøres ved blant annet å studere endring i genuttrykk av 9 ulike immungener i hudprøver fra fisk utsatt for ulike mengder lakselus på fisken. Immungenene er valgt ut enten fordi de har en rolle knyttet til infeksjon i huden eller utspiller en sentral rolle i fiskens immunrespons. Det ble også gjort histologiske undersøkelser, dette for å se hvilke effekter lakselus har på huden til fisken. I tillegg ble snittene farget med en immunhistokjemisk teknikk for å undersøke tilstedeværelsen av proteinet for TNF- α .

1.2 Laks (*Salmo Salar*)

Atlantisk laks (*Salmo salar*) er en anadrom fisk, som gyter i ferskvannet om høsten, eggene klekkes nedgravd i grus langs elveleie under vinteren og klekkes som lakseyngel på våren. I ferskvannet vokser de i en 2-4 års periode til parr, før de gjennomgår smoltifiseringsprosessen hvor de blir rustet for et liv i sjøen som saltvanns-migrerte smolt. Derifra går de under betegnelsen post-smolt til de modnes til voksen laks. Når laksen blir kjønnsmoden returnerer den til den samme elven for selv å gyte (Quinn, 1993).

Under smoltifiseringen går fisken gjennom omfattende fysiologiske endringer, som blant annet fører til at fisken klarer å opprettholde saltbalansen. Grunnet disse store fysiologiske endringer utgjør smoltifiseringen en krevende periode for laksen og dette sammen med liten størrelse gjør dem dermed sårbare for lakselus, dødeligheten i havet er svært høy og kan i noen tilfeller være 90-99% (Klemetsen et al. 2003 fra salmon ecology).

1.3 Immunsystemet

1.3.1 Det medfødte immunsystemet

Hos fisk er det medfødte immunsystemet en svært viktig komponent i bekjempelsen av patogen, grunnet begrensningene til det adaptive immunsystemet, grunnet varierende kroppstemperatur, lav variasjon i antistoffer og en sakte celledeling, modning og hukommelse av lymfocytter (Whyte, 2007 beskrevet av C. Uribe et.al., 2011). Det medfødte immunsystemet kan deles inn i tre deler: epiteliale/mucosale barrierer, humorale parametere og cellulære komponenter.

Hud

Fiskens slimlag i epidermis inneholder komponenter fra det medfødte immunsystemet, som blir produsert av slimceller (goblet) som er et førstelinjeforsvar mot ulike patogen, og fungerer som en barriere mellom fisken og miljøet. Slimet inneholder proteiner, enzymer som proteaser, antimikrobielle peptider (AMP), lectiner, lysozym, immunglobulin og komplement proteiner (Dash, Das, Samal, & Thatoi, 2018). Epidermis responderer også til ulike angrep ved hjelp av hypertrofi (cellefortykkelse) og cellulær hyperplasi (øker antall celler). Det er svært viktig at dette laget ikke skades slik at den osmotiske balansen opprettholdes og fremmede partikler ikke slipper inn (Beskrevet av C. Uribe et.al., 2011).

Komplementsystemet

Komplementsystemet er en gruppe proteiner som tilhører det medfødte immunforsvaret, og hjelper til mot infeksjoner ved å sette i gang betennelse og ta seg av smittestoffer. Komplementsystemet hos teleoster kan bli aktivert på tre måter: Den klassiske aktiveringsveien som aktiveres av antistoffer som bindes til celleoverflater, den alternative aktiveringsveien som blir direkte aktivert av fremmede mikroorganismer og lektin aktiveringsveien som aktiveres av et protein kompleks bestående av mannose/mannan-bindende lektin i bakterielle celler (Beskrevet av C. Uribe et.al., 2011).

1.3.2 Det adaptive immunsystemet

Det adaptive immunsystemet er mer spesifikt enn det medfødte immunsystemet ved at det er mer målrettet mot bestemte antigen i motsetning til det medfødte som er mer et generelt forsvar (*immunobiology, murphy and weaver, 9th edition*). Det spesifikke immunsystemet blir aktivert ved kontakt med et antigen (immunogen), og man skiller mellom humoral og cellulær respons. Den humorale responsen står for produksjon av antistoffer (immunoglobuliner) og den cellulære innebærer produksjon av cytotoksiske T-celler. Antistoff kan ha ulike funksjoner som agglutinasjon, opsonisering av antigen og som aktiveringsvei for komplementsystemet. Hos teleoster finner man antistoff i hud, gjelle, slim, tarm, galle og systemisk i plasma (Beskrevet av C. Uribe et.al., 2011). Immunresponsen i gjeller og huden er viktig ettersom disse organene er i direkte kontakt med miljøet. Fisk er også i stand til å frembringe spesifikke antistoff i huden, uten en systemisk respons.

Immunsystemet består videre av lymfocytter, som er de eneste cellene i kroppen som er i stand til å identifisere og huske spesifikke antigen. (*immunobiology, murphy and weaver, 9th edition*). Hos fisk skiller man mellom B- og T- lymfocytter. B- lymfocytter har et særtrekk hvor de ved stimulering differensierer seg til effektorceller: Plasma celler som skiller ut antistoff og B-minne-celler som forblir inaktive i kroppen frem til en ny infeksjon med samme antigen. Da vil minnecellene føre til raskere og kraftigere immunrespons mot dette patogenet. T-lymfocytter kan deles inn i T-celle reseptorer (TCR) som bidrar til aktiveringen av T-celler under presentasjon av antigen, CD4+ T hjelpelymfocytter som sender signaler og aktiverer andre T lymfocytter og cytotoksiske T-lymfocytter (CD8+) som dreper fremmede partikler.

1.3.3 Immunoglobuliner

T celler er sentrale komponenter i det cellulære immunsystemet, mens B celler produserer antistoff i form av immunoglobuliner som er nøkkelelementer i den humorale immunresponsen (Mashoof & Criscitiello, 2016). Immunoglobuliner er glykoproteiner og har en grunnleggende struktur bestående av to identiske tunge (H) kjeder og to identiske lette (L) kjeder (Janeway, Immunobiology, 2001). Både tung og lett kjedene inneholder et N-terminal variabelt domene (V_H eller V_L) og en eller flere C-terminal konstante domener (C_H eller C_L). De variable domenene bidrar til gjenkjenning av spesifikke antigen, mens de konstante domenene setter i gang ulike funksjoner knyttet til antistoffene. Eksempler på humoral immunrespons knyttet til immunoglobuliner er opsonisering (markere patogen for fagocytose), nøytralisering av giftstoffer og virus samt aktivering av komplementsystemet (Janeway, Immunobiology, 2001).

Det viktigste antistoffet hos fisk er IgM, mens IgT er hos laksefisk spesialisert rundt immunresponsen i slim (Beskrevet av Hordvik, 2015). Hos teleoster blir IgM ansett som en tetramer, mens hos andre vertebrater forekommer IgM som en pentamer. IgT isotypen i regnbueørret har vist seg å forekomme som en monomer i blodet og en tetramer i mucus. På proteinnivå har det blitt målt IgM konsentrasjoner som er 100-1000 ganger høyere enn IgT konsentrasjoner hos regnbueørret.

1.3.4 Cytokiner

Cytokiner regulerer vertens respons til infeksjoner, immunrespons, inflammasjon og stress. Disse molekylene sender signaler til det adaptive immunsystemet når det medfødte svikter i så slå tilbake en infeksjon. Noen cytokiner er betennelse fremmende (pro-inflammatoriske), mens andre hjelper til ved å redusere betennelsen (anti-inflammatoriske) (Dinarello, 2000). Eksempler på proinflammatoriske cytokiner relevant i immunresponsen hos laks i forbindelse med parasittinfeksjon er IL-8, IL1 β , TNF- α og IL-6. Eksempler på relevante anti-inflammatoriske er IL4/13A, IL-10 og TGF- β .

1.3.5 Miljøforårsakende effekter på immunresponsen

Fiskens immunforsvar blir påvirket av ulike miljøfaktorer som temperatur, lys, vannkvalitet, salinitet og andre stress utløsende faktorer. De fleste fisker er vekselvarme (poikiloterme) dermed vil endringer i temperatur påvirke de fysiologiske prosessene (Beskrevet av C. Uribe et.al., 2011). Videre har det vist seg at en økning av lysperiodene kan gi økt lysozym aktivitet og en økning av sirkulering av IgM. Oksygennivå påvirker aktiviteten til makrofager samt nivået av hvor mye antistoff som sirkulerer i kroppen. Også mengden frie partikler i vannet kan påvirke immunsystemet ved å øke hematokrit andelen i blodet for å kompensere for redusert evne til oksygenopptak i gjellene. Dette gir også økt lyzosom aktivitet samt økt IgM sirkulering i blodet. Økt salinitet gir økt aktivitet for lytiske enzymer, makrofager samt IgM nivåer, hvorfor salinitet påvirker immunresponsen på akkurat denne måten er det ikke helt enighet om. Forandringer i pH verdier har gitt motstridende resultater når det kommer til lyzosom aktivitet og IgM nivå i blodsysteet. Til slutt er stress som resultat av for høy populasjonstetthet og håndtering spesielt knyttet til oppdrett noe som gir økte kortisol nivåer som igjen gir en reduksjon i fiskens spesifikke og uspesifikke immunitet, noe som kan gjøre fisken mer mottakelig for opportunistiske patogen (Beskrevet av C. Uribe et.al., 2011).

1.4 Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er et naturlig forekommende ektoparasittisk krepsdyr som lever av hud, slim og blod hos laksefisker (laks, ørret og røye) (Finstad, 1993). Noe som fører til skader på vertens hud. Den store økningen i biomasse av atlantisk laks etter introduksjonen av lakseoppdrett, har imidlertid ført til økt forekomst av denne parasitten. Lakselus utgjør derfor nå en fare for villfisken i flere oppdrettsintensive områder (HI risikorapport). Livssyklusen til lakselus består av 8 stadier, separert av et skallskifte (Hamre et al., 2013). Livssyklusen starter med to planktoniske naupli stadier, som senere utvikler seg til frittstående kopepoditter som kan infisere egnete verter. Deretter følger 5 parasittiske stadier, derav to fastsittende chalimus stadier, to preadult stadier, før lusen utvikler seg til kjønnsmoden voksen lus (Johnson & Albright, 1991)(Hamre et al., 2013).

Studier har vist at interaksjonen mellom vert og parasitt varierer med utviklingsstadiet til lusen, og at negative effekter av infestasjonen ofte ikke er synlig før lusen når det preadulte stadiet (Braden, Monaghan, & Fast, 2020a). Immunmodulering kan også variere med stadiene til lusen, ved at f.eks. lakselusen i stadiene før preadult demper immunresponsen i større grad da den er mer sårbar overfor immunsystemet (diskutert av A. C. Øvergård, 2018).

Omfang av skade på verten kan også avhenge av stadiet til parasitten. Lakselus har en rekke ulike stadier før den er ferdigutviklet, og denne oppgaven ser på immunresponsen forårsaket av lus i chalimus stadiet. Forskjellen på chalimus og adult stadiet er at lus i chalimus stadiet kun vil parasittere fra området den har festet seg til, og bruke næringen til å utvikle seg før skallskifte (Eichner, Hamre, & Nilsen, 2015). På denne måten vil skadene på huden være svært begrenset i størrelse, men også i skade ettersom chalimus parasitterer hovedsakelig på mucus og epitel fra hud, og man finner sjeldnere tilstedeværelse av blod i magen fra lus i dette stadiet. For lus i pre-adult og adult stadiet derimot er skadebildet mer tydelig ettersom disse er mobile, og parasitterer i mye høyere grad på blodet til fisken (Beskrevet av Braden, Monaghan, & Fast, 2020b). Dette stadiet er derfor oftere assosiert med betydelig mekanisk skade på huden i tillegg til høy grad av betennelse. Høye nivåer av pre-adult/adulte lus kan også føre til skader på de underliggende lagene i huden, som også fører til blødende sår. Videre kan det gi fysiologiske forandringer hos laksen som økt mengde plasmakortisol, plasmaklorid, hematokrit og elektrolytter, samt redusert osmoregulatorisk kapasitet (Beskrevet av Braden, Monaghan, & Fast, 2020b).

Parasitter tar ressurser fra en vert for å kunne overleve og for å reprodusere, verten vil derfor forsøke å bekjempe parasitten ved hjelp av blant annet immunsystemet. Mange parasitter har tilpasset seg å leve med verten sitt immunsystem, mens andre parasitter kan endre verten sitt immunsystem eller hindre at det blir aktivert (immunomodulering) (Wikel, 1999).

Fysiologiske endringer grunnet lakselus er kjent, men man vet imidlertid mindre om vertens immunrespons mot lakselus. Det mangler fortsatt kunnskap rundt lakselusens evne til å påvirke fiskens immunrespons, og å vite i hvilken grad dette forekommer ville vært svært gunstig med tanke på forebyggende tiltak mot lakselus og fremtidig forskning. I forsøk på reguleringen av immunresponsen er det ofte vanskelig å avgjøre om det er skadene fra parasitten som har forårsaket endringen eller om immunmodulering har vært en faktor. Det er gjort flere studier på immunmodulering, og man mistenker at lakselus benytter eksokrine kjertler til å skille ut stoffer som kan påvirke vertens immunrespons.

Lakselus har fire typer eksokrine kjertler, tre typer tegumentale kjertler (teg 1-3) og spyttkjertler (A.-C. Øvergård et al., 2016). Teg 1 og 2 er de første kjertlene som dukker opp under utviklingen, og har ikke en helt kjent rolle, men teg 1 ser ut til å sekreere slim som hindrer vevet å vokse tilbake og teg 2 virker å ha utførselskanaler i områder med høy slitasje. Spyttkjertler har hovedsakelig en funksjon i å sekreere og lagre kjertelproduktet. Den siste kjerteltypen, teg 3, er ikke observert før i preadult 1 stadiet som er det stadiet hvor lusen gjør mer skade. Teg 3 blir derfor spekulert i å ha evnen til å utskille stoffer med betydning for interaksjonen med verten (f.eks. virulens og immunmodulering). *L. salmonis* teg 3 og spyttkjertel er derfor sannsynlig en viktig del av parasitt-vert interaksjonen.

Videre har eksperimentell karakterisering av sekretede proteiner hos lakselus utført av Braden et al., 2020a, funnet flere potensielle virulensfaktorer hos Lakselus som har likhetstrekk med de man finner hos andre ektoparasitter. Disse kan deles inn i fem kategorier: koaguleringsinhibitorer, haemoglobinolytiske enzymer, anti immunitet, antimikrobiell, og anti-sårheling, i tillegg til flere proteiner som ikke går under noen av kategoriene og har dermed ukjent funksjon (Braden et al., 2020a).

1.5 Bakgrunn for forsøket

Immungenene som ble analysert i dette forsøket ble valgt på bakgrunn av deres relevans i immunsystemet i tillegg til tidligere forskning som ser på immunrespons hos laks i forbindelse med

infeksjon av lakselus. Undersøkte gener er oppsummert i tabell 2 under, sammen med hvilken type molekyl de er.

Tabell 2 - Immungener som ble analysert

Navn	Forkortelse	Type
Interleukin-8	IL-8	Chemokine
Interleukin-1 β	IL-1 β	Cytokin
Tumor Necrosis Factor Alpha	TNF- α	Cytokin
Interleukin-4/13A	IL-4/13A	Cytokin
Immunoglobulin M	IgM	Immunoglobulin
Immunoglobulin T	IgT	Immunoglobulin
Matrix Metalloproteinase 9	MMP9	Endopeptidase/enzym
Cathelicidin-derived antimicrobial peptide 2	Cath 2	Anti-mikrobielt peptid
Inducible nitric oxide synthase	Inos	Enzym

Uttrykking av IL-1 β , IL-6, IL-8 og TNF- α er tydelig assosiert med infeksjon av lakselus hos Atlantisk laks (Braden et al., 2012). Stabil og høy økning av uttrykt matrix metalloproteinaser (MMP) forekom i alle vev med unntak av lever hos Atlantisk laks infisert med *L. salmonis*, disse endringene sett i sammenheng med oppregulering av andre gen indikerer en kombinasjon av kronisk stress, begrenset sårheling og immunomodulering (Skugor, Glover, Nilsen, & Krasnov, 2008). Hos teleoster har man funnet to cytokiner med felles evolusjonært opphav i både IL-4 og IL-13, disse har derfor blitt kalt IL4/13A og IL4/13B (Wang et al., 2016a). Immunresponsen hos Atlantisk laks mot *L. salmonis* innebærer en økning av blant annet IL-1 β , IL-8 og IL4/13A i fiskens hud ved festepunktet for parasitten (A. C. Øvergård, Hamre, Grotmol, & Nilsen, 2018). I tillegg er en økning av IgM og IgT uttrykking i hud hos Atlantisk Laks infisert med *L. salmonis* indikert tilstedeværelsen av en rekke adaptive humorale immunresponser (Tadiso et al., 2011). Inducible nitric oxide synthase (Inos) viste tydelig og signifikant nedregulering ($P < 0,05$) sammenlignet mot kontroll i hud hos Atlantisk laks ved infeksjon av *L. salmonis* (Holm et al., 2017). Det har blitt spekulert i at Cath2 kan ha en funksjon som signalmolekyl som trigger *L. salmonis* til å finne en egnet vert (Núñez-Acuña et al., 2018). En signifikant og rask økning av uttrykket til Cath2 som observert hos *O. mykiss* ved infestasjon av *L. salmonis*, kan tyde på at molekylet har en betydning for parasittens evne til å feste seg og opprettholde infestasjonen (Dalvin et al., 2020).

1.6 Mål for prosjektet

Målet for prosjektet er å se hvilken effekt ulike lusemengder har på immunresponsen i huden til Atlantisk laks, samt betydning for stress og dødelighet. Forsøket ble utført ved å infisere smolt med ulike doser lakselus og sammenligne relativt genuttrykk i disse mot uinfisert kontrollfisk. Endringen i genuttrykket i huden ble observert ved hjelp av qPCR, hvor 9 immungener med ulik relevans i forbindelse med immunresponsen ble studert. Det ble også tatt hudprøver av fisken for å se på histologiske forandringer ved å farge og studere disse hudsnittene. Snittene ble farget med både HES farging og en spesiell immunhistokjemisk teknikk for å påvise immungenet TNF- α .

Det finnes lite forskning på interaksjonen mellom laks og lakselus med de samme betingelsene hvor det brukes så liten fisk og samtidig ser på lus i chalimus stadiet. Dette er forhold som er svært relevante i naturen, da luseinfestasjoner på smolt er en av de største utfordringene når det kommer til overlevelse hos villaks. Det er derfor forskning med disse faktorene kan vise seg nyttig for å finne ut mer om overlevelsen til villfisken, og hvilken effekt ulike mengder lus har på sårbar liten smolt. Dette kan bidra til bedre tilrettelegging i oppdrett sammenheng, i tillegg til å finne mer effektive og målrettede tiltak i å forhindre oppdrett å negativt påvirke populasjonen av villfisk.

Oppgaven vil undersøke følgende hypoteser:

Hypotese 1: Det relative genuttrykket for hvert immungen som er undersøkt, vil variere avhengig om fisken er infisert eller ikke.

Hypotese 2: Intensiteten av infeksjonen vil ha betydning for det relative genuttrykket, immunrespons og stress for fisken.

Hypotese 3: Atlantisk laks infisert med *L. salmonis* vil vise tegn til histologiske forandringer i huden hvor lusen har festet seg, og man vil kunne påvise proteinet for TNF- α immunhistokjemisk i områder med høy betennelse.

2. Metode

2.1 Prøvetaking og RNA isolering

Hudprøver ble tatt av nysmoltifisert laks infisert med ulike mengder lakselus, prøvene ble ikke tatt like under lusene, men på det tilsvarende samme stedet for hver fisk. Hudprøvene ble snittet med skalpell slik at hudbitene utgjorde ca. 0,5*0,5*0,5cm. Prøvene ble plassert i FastPrep rør (FastPrep®-24 benchtop homogeniserer) og umiddelbart fryst og lagret på -80°C for å bevare RNA-et før senere ekstraksjon. RNA ble ekstrahert ved å tilsette 500 µl Trizol til hver prøve. Prøvene ble deretter ristet i 120 sekund på en FastPrep-96™ maskin (1400 rpm) og hvilte i 5 minutter i romtemperatur. Så ble det tilsatt 100 µl og kloroform, før prøvene ble ristet (60 sekund på 1400 rpm) og deretter sentrifugert (15 minutter på 4°C ved 16000 RCF). 200 µl av supernatanten ble tatt ut tuben. Resten av ekstraksjonen fulgte protokollen som fulgte med RNeasy® Micro Kit (QIAGEN). RNAet ble til slutt eludert ved å tilsette 14µl RNase-fritt vann direkte i senter av spin column membranen.

2.2 Spektrometri

Kvalitet og kvantitet av RNA i hver prøve ble analysert ved hjelp av NanoDrop1000 spektrometer (Thermo Scientific) og Bioanalyzer.

2.3 cDNA syntese

cDNA syntese ble utført ved bruk av SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit, og fulgte produsentens anbefalinger, delte oppgitte konsentrasjoner på to for å få et totalvolum på 10µL for en enkelt reaksjon. Med 48 prøver totalt ble det laget cDNA reaksjon og RT reaksjon nok til 50 prøver.

Prosessen for cDNA syntese samt qPCR ble utført to ganger på grunn av dårlige resultater i første omgang, slik at cDNA ble fortynnet i andre omgang, dette blir beskrevet i avsnitt 2.4. I første runde ble det for cDNA reaksjonen benyttet 2µL 5X VILO™ Reaction Mix, 1µL 10X SuperScript® Enzyme Mix, 4µL DEPC-behandlet vann og 3µL RNA som ga 10µL per prøve. For RT reaksjonene ble det benyttet 2µL 5X VILO™ Reaction Mix, ingen enzym, 5µL DEPC-behandlet vann og 3µL RNA som også ga 10µL per prøve.

På runde to med fortynnet cDNA ble det benyttet 2µL 5X VILO™ Reaction Mix, 1µL 10X SuperScript® Enzyme Mix, 0 µL DEPC-behandlet vann og 7µL RNA som ga 10µL per prøve. For RT reaksjonene ble det benyttet 2µL 5X VILO™ Reaction Mix, ingen enzym, 1µL DEPC-behandlet vann og 7µL RNA som også ga 10µL per prøve. Deretter ble prøvene satt i en PCR maskin hvor innholdet ble blandet og

inkubert ved 25°C i 10 minutter. Deretter 42°C i 60 minutter, og til slutt på 85°C i 5 minutter for å terminere reaksjonen. Prøvene ble så lagret på -20°C i påvente av qPCR.

2.4 Fortynning av cDNA

Første runde med qPCR ga dårlige resultater for mange av prøvene, derfor ble kvaliteten av RNA-et undersøkt med BioAnalyzer for å undersøke om problemet kunne ligge her. Analysen viste at kvaliteten av RNA var god, som indikerte at problemet var knyttet cDNAet. Det ble derfor laget nytt cDNA, og denne gang med fortynnet 1:20. Vi fortynnet cDNAet til 1:20, ved å tilsette 95 µl DPEC behandlet vann i hver brønn og deretter tilsette 5 µl cDNA, som gav total mengde på 100 µl.

2.5 q-RT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR)

Genene som ble undersøkt er oppsummert i tabell 2. Referansegene som ble benyttet var Elongation factor 1 alpha (EF1α) og Receptor like protein 1 (RLP1).

qPCR ble utført ved å følge produsentens protokoll (Fast SYBR™ Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific). Det ble først blandet 998 µl DPEC behandlet vann med 2 µl fargestoff i et 1.5ml eppendorf rør for å fortynne fargeløsningen 1:500, for å få en homogen løsning ble løsningen sentrifugert. Et eppendorf rør ble klargjort for hvert gen, og hver av disse ble først tilsatt 63 µl vann og deretter 7,5 µl fargeløsning. I tillegg ble det tilsatt 263 µl 2X buffer, og til slutt tilsatt 21 µl forward primer og 21 µl reverse primer. Blandingene ble så ristet og sentrifugert før den ble satt til kjøling i en kjøleblokk. Deretter ble miksen fordelt på 8 brønner på en 96 brønnsplate (mix-plate,) (Tabell 3) .

Tabell 3 – Oppsett 96-Brønnplate med mix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
B	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
C	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
D	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
E	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
F	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
G	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1
H	IL-1β	IL-8	IgT	IgM	TNF-α	MMP9	IL4/13A	Cath2	Inos	EF1A	RLP1

Mixplaten og 96-brønnsplaten med det fortynnete cDNA platen ble sentrifugert. Deretter ble det benyttet pipetteringsrobot til å tilsette korrekt mengde cDNA og mix i hver brønn på en 384-brønnplate (PCR Plate, 384-well, standard, Thermo Fisher). Dette ble utført i to omganger ettersom det var behov for mer enn 384 brønner. Etter roboten var ferdig å pipettere ble det tatt på en optisk adhesiv plast over PCR-platen. PCR-platen ble så satt i en QuantStudio 5 qPCR maskin og analysert.

Tabell 4 – Oppsett qPCR

Tilsetning	Mengde µl for hver enkelt reaksjon	Mengde µl totalt for alle reaksjoner
x2 Buffer (SYBR Green QPCR master mix?)	3,50	262,50
Forward Primer 10uM	0,28	21,00
Reverse Primer	0,28	21,00
Ref. dye 1:500	0,10	7,50
cDNA	2,00	150,00
H2O	0,84	63,00
Total mengde	7,00	525,00

Tabell 5– Innstillinger for qPCR maskin

ABI Q5 Fast		
Sykluser	Varighet på sykluser	Temperatur
1	3 min	95
40	5 sek	95
	20 sek	60

Tabell 6 - Sekvenser for primere brukt under qPCR

Gen	Forward primer	Reverse primer
Cath2	AAAGATTCCAAGGGGGGT	CAAAGGGTGTGTTGTGCTGT
Igm	CTTGCTTGTGACGATGAG	GGCTAGTGGTGTGAATTGG
Igt	AGCACCAGGGTGAAACCA	GCGGTGGGTTTCAGAGTCA
IL-1β	ACATTGCCAACCTCATCATCG	TTGAGCAGGTCCTTGTCTTG
IL-4/13A	ATCCTTCTCCTCTCTGTTGC	GAGTGTGTGTGATTGTCCTG
IL-8	AGAATGTCAGCCAGCCTTGT	TCTCAGACTCATCCCCTCAGT
Inos	ACCAGAAGGAGGGTCACTT	TGGGTGAGGGTGATGCCAA
TNF-α	GGGGACAACTGTGGACTGA	GAAGTTCTTGCCCTGCTCTG
mmp9	ACTCTACGGTAGCAGCAATGAAGGC	CGTCAAAGGTCTGGTAGGAGCGTAT

Sekvenser til gen 1-8 fra: (Dalvin et al., 2020)

Sekvens for mmp9 fra (Braden, Koop, & Jones, 2015)

2.6 Behandling av lus og fisk

Voksne hann- og hunnlus ble samlet fra oppdrettsanlegg i Austevoll og Matre og deretter overført på vertslaks på Matre forskningsstasjon. Egg ble samlet fra tidligst andre runde med eggstrenger, slik at eggene var bedre tilpasset de nye vannforholdene til Matre og ikke anlegget på Austevoll.

Eggstrengene ble samlet 5 dager før infeksjon for hver gruppe og klekket på 12°C i egne lusetanker med filter som tillater konstant vanngjennomstrømming. For å unngå mulige feilkilder ble all lus som ble brukt i forsøket, hentet fra samme kohort.

Konsentrasjonen av lus ble beregnet ved å samle alle kopepoditter i et stort litermål, for å så røre rundt i vannet for å jevnt fordele kopepodittene. Deretter ble det pipettert ut en milliliter vann som ble lagt i et tellekammer og antall levende kopepoditter ble telt. Denne prosedyren ble gjentatt x10, for å finne gjennomsnittlig antall kopepoditter per ml., og basert på antall kopepoditter per ml estimerte vi totalmengden lus i vannet. Ut fra dette kunne vi videre beregne hvor mange ml. vann med kopepoditter som var nødvendig for å oppnå ønsket dose. Endelige konsentrasjoner brukt under forsøket er ført inn i tabell 6 under.

Tabell 6 – Lusekonsentrasjoner

Kategori	Konsentrasjon (lus g ⁻¹)
Kontroll	0
Lav	0,06
Medium	0,24
Høy	0,48
Veldig høy	0,75

Fisken benyttet i dette forsøket er førstegenerasjon villaks, som betyr at eggene denne fisken er klekket fra er hentet fra elven, i dette tilfellet fra Etneelven. Videre er de klekket på forskningsanlegget på Matre, hvor de siden første foring har blitt holdt i tanker på 2x2x1m med ferskvann på rundt 4°C under et 12:12 lysregime. For å kunne følge vekst og vektutviklingen til fisken ble de i desember 2019 bedøvet og PIT-tagger satt inn i bukhulen. Hver fisk som på dette stadiet var parr, ble målt lengde og vekt på før de ble overført til eksperimentelle tanker (1x1x0.42m). Lys, temperatur, salinitet og håndteringsforhold i de eksperimentelle tankene er oppsummert i tabell 7. Tabellen viser hva de ulike gruppene gikk gjennom og når, alle gruppene fulgte en identisk plan, men med 7 dagers mellomrom det vil si oppstart den 20. desember, 27. desember, 3. januar, 10. januar og 17. januar.

Tabell 7 – Oppsett for doseforsøket

Dato					Dager etter start forsøk	Håndtering	Behandling
Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E			
16 des.	16 des.	16 des.	16 des.	16 des.	0	Overført til eks. kar	6°C (12:12)
20 des.	27 des.	3 jan.	10 jan.	17 jan.	4,11,18,25,32	Øker temp.	9°C (12:12)
23 des.	30 des.	6 jan.	13 jan.	20 jan.	+3	Øker temp.	12°C (12:12)
25 des.	1 jan.	8 jan.	15 jan.	22 jan.	+2	Regulerer lysforhold	12°C (24:0)
24 jan.	31 jan.	7 feb.	14 feb.	21 feb.	+30	Øker salinitet	12°C (24:0) 28 ‰
31 jan.	7 feb.	14 feb.	21 feb.	28 feb.	+7	Øker salinitet	12°C (24:0) 32 ‰
4 feb.	11 feb.	18 feb.	25 feb.	3 mar.	+4	Blodprøver	
7 feb.	14 feb.	21 feb.	28 feb.	6 mar.	+3	Infeksjon	
10 feb.	17 feb.	24 feb.	2 mar.	9 mar.	3 dpi	Til svømmetunnel	
11 feb.	18 feb.	25 feb.	3 mar.	10 mar.	4 dpi	Start svømmeforsøk	
13 feb.	20 feb.	27 feb.	5 mar.	12 mar.	6 dpi	Slutt svømmeforsøk	
18 feb.	25 feb.	3 mar.	10 mar.	17 mar.	11 dpi	Prøvetakning CH2.	
6 mar.	13 mar.	20 mar.	27 mar.	3 apr.	28 dpi	Prøvetakning Adult	

Forsøket bestod av 600 parr fordelt likt på 15 tanker (40 fisk i hver tank). Tankene var inndelt i grupper på tre tanker, som mottok vann fra samme vanntank. Dette ga 5 grupper, hvor hver gruppe ble behandlet og tatt prøve av til ulik tid (7 dager mellom gruppene). Slik at det alle gruppene har til felles er at prøvetaking av chalimusstadiet fant sted 60 dager etter start av smoltifisering (11dpi).

Første infeksjon fant sted 7. februar 2020. Det ble bestemt 5 ulike konsentrasjoner med lus, disse var fra 0-2.5 lus g⁻¹ (kontroll, lav, medium, høy og veldig høy dose). Fisken ble infisert med ulike doser, slik at man kunne estimere en grense for dødelighet. Konsentrasjonene tok høyde for at ikke alle kopepodittene fester seg til fisken. En annen faktor er at tilveksten til fisken vil variere, slik at det er umulig å få nøyaktig lus g⁻¹. Dosene ble også tilfeldig fordelt på de fem gruppene med fisk, for å motvirke de eventuelle forskjellene i vekst som skulle finne sted de følgende 5 uker.

Konsentrasjonene ble utregnet med hensyn til en suksessfull rate på antall lus som fester seg og overlever på fisken er rundt 30%. For veldig høy dose ble dermed regnestykket $2,5 * 0,30 = 0,75$. Høyeste dose på $0,75 \text{ lus g}^{-1}$ ble bestemt for å ta hensyn til den øvre grensen på 2.5 lus g^{-1} , som det ikke er tillatt å overstige. Hvis 100% av lusen i veldig høy dose skulle feste seg vil det gi 2.5 lus g^{-1} .

Oppsummert fikk hver tank kopepoditter basert på formelen: $\text{Tiltenkt intensitet} * (\text{antall fisk} * \text{gjennomsnittsvekt i tanken}) / 0,30$.

Slik at en tank med tiltenkt høy dose ($0,48 \text{ g}^{-1}$) med 30 fisk og en gjennomsnittsvekt på 40 gram blir regnet ut slik $(0,48 * (30 * 40)) / 0,30$ og får 1920 kopepoditter.

Før infeksjon ble vannivået i hver tank senket til rundt 50% og vanninnstrømmingen til rundt 6 L i minuttet. For å øke sjansene for at lusen kommer i kontakt med fisken. I tillegg ble det rørt rundt i vannet periodisk for å få fisken i bevegelse som igjen øker sjansene for at lusen oppdager fisken. Etter 45 minutter var vannivået tilbake til normalt i tankene og innstrømmingen satt tilbake til normalt.

For å simulere forhold fra smolt i det fri ble det også benyttet svømmetunnel i forsøket. På grunn av begrenset plass i svømmetunnelen var det kun 3 tanker som kunne kjøres samtidig Dette var også en av grunnene til at kun 2/3 av fisken i hver tank som gjennomførte migrasjonsforsøket. Det at ikke all fisken deltok i svømmeforsøket muliggjorde at disse fungerte som en kontrollfisk, som gjør at data fra fisk som ikke har svømt kan sammenlignes med data fra fisk som har svømt.

Migrasjonsforsøket startet tre dager etter infeksjon når lusen befant seg i kopepodittstadiet. Fisken ble utsatt for et svakt sedativt stoff dagen før, for deretter bli flyttet for hånd til en ventetank hvor de ble utsatt for en full sedativ dose ($0.01 \text{g}/1\text{L}$ metomidate hydrochloride) for sampling. Hvert individ ble identifisert ved PIT, for deretter å bli målt og antall kopepoditter. Fisken ble overført til svømmetunnel rett etter den var samlet. De ble deretter holdt 20 timer i svømmetunnelen med en motstrøm på 6 cm per sekund for å venne seg til de nye forholdene. Deretter startet migrasjonsforsøket som varte i 48 timer ved at hastigheten på motstrømmen ble økt til 15 cm per sekund, og deretter gradvise økninger hvert 5 minutt på 10-15 cm per sekund til tunnelen nådde ønsket hastighet på 50 cm i sekundet.

Etter perioden på 48 timer var over, ble utskiftningen av vann skrudd av og vannstrømmen ble redusert. Fisken i svømmetunnelen ble så gitt en svak sedativ dose før de ble direkte overført tilbake til sin originale eksperimenttank. For at fisken som ikke ble brukt i svømmetunnel ikke skulle ha ulik mengde håndtering, ble de også bedøvet og overført til en midlertidig tank før de ble tatt tilbake til

eksperimenttanken igjen. Denne håndteringen fant sted rett før fisken i svømmetunnel ble overført tilbake.

Ettersom man ønsket at fisken skulle gjennomgå perioden i svømmetunnel på samme tid ble fisk med ulike dosegrupper plassert i samme tunnel. Sannsynligheten for at lusen skulle bytte vert i løpet av migrasjonsforsøket ble ansett som liten, fordi lusen befant seg i de ikke mobile stadiene som kopepoditter/tidlig chalimus. I tillegg samstemte ikke lusetallene med hvilken tank fisken kom fra uansett da det hadde oppstått ulik suksessrate på de ulike infeksjonsdagene.

2.7 Histologi

Lus i chalimus stadiet var tiltenkt å være hovedfokuset i denne oppgaven, ettersom planen var å sammenligne resultater fra PCR av hud utsatt for chalimus med histologi snitt fra fiskens hud utsatt for chalimus. Prøvene som skulle brukes i histologi fra chalimus stadiet ble ikke lagret på riktig måte og det ble derfor benyttet histologiprøver fra et annet forsøksoppsett med lus i adult stadiet. Muligheten for å diskutere disse resultatene (histologi og genuttrykk) opp mot hverandre er derfor begrenset, på grunn av de store forskjellene på forsøksfisken, ulike stadier av parasitten og parametere i forsøkene.

Prosjektet disse prøvene stammer fra så på interaksjonen mellom laks og lakselus ved ulike temperaturparametere. Forskjellen på forsøksfisken brukt til histologiprøvene er at den er en del større, nærmere 500 gram i snitt i motsetning til fisken i doseforsøket som er i snitt 47 gram. All prøvetaking i de to forsøkene ble utført på tilsvarende måte og forsøksoppsettet var likt. Infeksjonsprosedyren var tilnærmet likt med unntak av bruken av svømmetunnel uteble fra forsøket med større fisk. I temperaturforsøket ble det både tatt positive og negative hudprøver fra infisert fisk, i tillegg til prøver fra kontrollfisk. Negative prøver betyr at hud er tatt fra et sted uten lus, mens positive prøver betyr her at hud er samplet direkte under festepunktet til lusen. For histologiprøvene benyttet i denne oppgaven er det kun benyttet positive prøver og uinfisert kontroll.

Ettersom det er behov for tilstedeværelsen av betennelse for å påvise genene knyttet til immunresponsen histologisk ble det kun valgt positive prøver med de høyeste lusetallene tilgjengelig. Likevel var det ikke veldig høye lusetall benyttet i temperaturforsøket (prosjekt 1) sammenlignet med doseforsøket (prosjekt 2), slik at prøvene ikke var optimale til dette formålet. Det ble derfor valgt ut 3 uinfiserte prøver og 6 prøver fra fisk infisert med 1-15 lus, og disse prøvene ble tatt like under lusens festepunkt.

2.7.1 Snitting

Hudprøver fra fisken ble preparert på parafin, og dermed ble det laget snitt ved bruk av en «Thermo Scientific Cool-Cut and Section Transfer System HM 355S» hvor produsentens protokoll for hvordan man operer maskinen ble fulgt. Det ble laget 9 snitt for HES farging, og to sett med 9 snitt for farging med TNF α . Hvor det andre settet var tiltenkt å ha i reserve i tilfelle man skulle få positive utslag for TNF α hvor det vil være nyttig å ha et ekstra sett så man kan gjenta forsøket med identiske snitt for å bevise at det ikke er falske positive. Snittene ble kuttet så de var 0,2 μ m i tykkelse, og deretter overført på objektglass og lagt til tørking i 30-60 minutter.

2.7.2 Farging

HES farging

Etter at snittene på objektglassene med snittene var tørket, ble objektglassene puttet i en beholder og plassert i varmeskap på 58°C i 30 minutter. Denne prodesyren ble fulgt slik at vevssnittene skulle feste seg til objektglasset og ikke falle av under fargingsprosessen. Første steg i fargingen var å bade snittene i xylen i 10 minutter, dette ble gjort for å vaske bort siste rest med parafin i snittene.

Deretter gjennomgikk snittene 5 bad med etanol med hensikt å vaske bort xylen brukt i første steg. Så ble snittene vasket i springvann før de gjennomgikk fargeprosessen som innebærer haematoxylin, erythrosin og alkoholisk saffron. Til slutt ble snittene dehydrert gjennom bad med etanol, og vann ble erstattet med xylen. Snittene ble satt til tørking/lufting over natten, før snittene ble observert i lysmikroskop og gjennom opplasting på datamaskin.

Der av kunne man se at haematoxylin har farget blant annet de basofile delene av cellene (kjernene) blå. Erythrosin farget de acidofile (eosinofile) delene av cellene (cytoplasma) rødlig. I tillegg har erythrosin en affinitet til muskelfibre som gjør at erythrocyttene (røde blodceller) fikk en klar rød farge, og bindevev farges gult av Saffron. (HI, manual for fremgangsmetoder, Fremstilling av parafininnleirete preparater til lysmikroskopi).

TNF α farging

Fremgangsmåten for prepareringen av snitt som skulle brukes til TNF α fargingen var den samme, men det ble benyttet en annen type objektglass til denne fargemetoden kalt «Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhesion slides». Disse objektglassene minimerer vevstapet under fargeprosessen, og fordi den fargemetoden som benyttes er langt mer belastende på snittene sammenlignet med standard HES farging. Etter snittene var tørket ferdig på objektglassene ble de satt i varmeskap på 60°C i 60 minutter, og deretter i romtemperatur 15-30 minutter. Første steg var i likhet med HES fargingen å bade snittene i xylen 2 ganger i 5 minutt. Deretter fulgte samme rekken med etanol bad for å fjerne xylen, etterfulgt av 4 skift i destillert vann. Snittene på SuperFrost Plus™

objektglassene ble så overført i en «2100-Antigen Retriever» hvor de gjennomgår antigen retrieval i citrat buffer i 20 minutter på 120 grader, dette ble utført i henhold til protokollen av produsenten.

Etter at snittene er ferdig i kokeren, blir de vasket to ganger i destillert vann, og deretter tørket på 60°C i 10 minutter. Objektglassene med snitt blir så lagt horisontalt i avtrekkskap hvor det brukes en PAP penn til å tegne en sirkel av et hydrofobisk lag rundt vevsdelen på snittet. Inni disse sirklene blir det så pipetert en dråpe «dual endogent enzym blokker» og lar snittene bli liggende med denne løsningen på seg i 10 minutter for å blokkere endogen peroxidase aktivitet. Snittene ble så vasket med vaskebuffer 2 ganger 2 minutt for å vaske bort løsningen. Snittene ble så tilsatt en dråpe 5% BSA og inkubert i 20 minutter, dette for å blokkere ikke-spesifikk binding av antistoff. Siste steg for dag 1 ble det ristet av overflødig 5% BSA løsning for deretter å tilsette primært antistoff til objektglassene. Dette antistoffet består av mus monoklonalt anti TNF α G4 fortynnet 1:200 antistoff, for negativ kontroll ble det benyttet antistoff diluent. Snittene ble så oppbevart med denne løsningen i kjøleskap på 4°C for inkubering over natten.

Dag 2 startet med å vaske snittene med vaskebuffer 2 ganger 5 minutt. «Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse» ble benyttet som sekundært antistoff, dette ble lagt til og snittene ble så inkubert i 30 minutter på romtemperatur. Vasker igjen med vaskebuffer 2 ganger 5 minutt. Tilsetter preparert DAKO DAB pluss substrat/AEC+ for farging og inkuberer snittene i 7-12 minutt. Vasker med destillert vann og skifter det ut 5 ganger. Farger med 50% gjelle haematoxylin i 2 minutter. Vasker snittene med springvann til alt fargestoff er borte. Bader snittene i ammoniakvann 4 ganger. Vasker med springvann før de i siste steg får tilsatt Aquatex® medium på seg og ferdiggjøres med å plassere et dekkglass over vevssnittet.

2.8 Blodprøver

Det ble tatt blodprøver av all fisk som ble samlet ved 11dpi (chalimus II stadiet), 5 fisk fra alle 15 tanker, som ga totalt 75 blodprøver. Disse prøvene ble tatt ved at fisken ble bedøvet, deretter avlivet like etter de ble bevisstløse. Blodet ble ekstrahert fra fiskens kaudale åre og midlertidig oppbevart på is før videre prosessering. Blod ble så sentrifugert og plasmaet ble fryst på -80°C for senere analyse. Plasma kortisol konsentrasjoner ble deretter bestemt ved bruk av et ELISA assay kit (IBL international GmbH) med en «Sunrise microplate reader» (Teccan). Resultatene for plasmakortisol er oppsummert i figur 3.30.

2.9 Databehandling og statistiske analyser

Utrekningene for Relativt genuttrykk ble først utført i Excel ved å regne ut gjennomsnittet av Ct verdiene for referansegen. ΔCT ble utregnet ved å ta Ct verdiene for hvert gen minus gjennomsnittet av referansegen, slik at $\Delta CT = CT - (\text{Gjennomsnitt referansegen})$. $\Delta\Delta CT = \Delta CT - (\text{gjennomsnitt kontroll}\Delta CT)$, og til slutt Mean Fold Change = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Mean Fold Change for hvert gen ble så brukt til å lage figurer som viser relativt genuttrykk. Det ble bestemt at gjennomsnitt av relativt genuttrykk må være over 2,0 for det bestemte genet for å kunne si at det er oppregulert, samtidig ble grensen for å anse genet som nedregulert satt til under 0,5. Gjennomsnitt relativt genuttrykk av alle kontrollprøver ble satt til 1, da det er dette som er utgangspunktet for reguleringen av genuttrykk med denne metoden. Samme grenseverdier og metode er brukt av Dalvin et al., 2020 i forsøket på forandringer i genuttrykket i hud hos regnbueørret ved infestasjon av lakselus.

T-test ble utført for å undersøke om det var signifikante forskjeller i genuttrykket på infisert og kontroll fisk. Figurene som viser relativt genuttrykk for infisert mot kontroll er laget i R studio (4.0.3) ved bruk av datapakken ggplot2. Det ble også brukt R studio i utregningene av gjennomsnitt av Mean Fold Change, SE og SD for alle gen. Kontrollverdiene ble manuelt satt til 1,0 for alle gen. Lineær regresjonsfigurene er laget i Excel. Fremgangsmåte sammen med all syntax benyttet i R studio er oppført i Appendix C.

3. Resultater

Resultatdelen i denne oppgaven er delt inn i tre delkapitler, hvor første del, kapittel 3.1 viser resultatene fra qPCR for det relative genuttrykket testet for de 9 ulike immungenene. Kapittel 3.2 viser resultatet fra histologiforsøket, og kapittel 3.3 viser resultater for nivå plasmakortisol og dødelighet. Alle prøvene brukt i denne oppgaven stammer fra to ulike prosjekter gjennom Infest, hvor prøvene brukt til histologi stammer fra prosjekt 1 som ser på interaksjonen mellom laks og lakselus når fisken utsettes for ulike temperaturer (publisert).

Prøver brukt til qPCR og stress/kortisol stammer fra prosjekt 2 hvor de ser på interaksjonen mellom laks og lakselus ved infestasjon av ulike doser lakselus (upublisert). Resultatene for stress og dødelighet er kun «lånt» ut til denne oppgaven, og inneholder derfor ikke fullstendig data og blir bare kort omtalt da det fortsatt venter publisering.

3.1 Uttrykking av immungener

Forsøksoppsettet for prøver for qPCR var originalt 5 smittegrupper (kontroll, lav, medium, høy og veldig høy), men ettersom den faktiske distribusjonen av lus ikke representerte disse dosene ved samplingsdatoene, ble de inndelt i nye grupper under databehandlingen. Dose er bestemt ut ifra mengde lus fisken hadde ved sampling, og i de ulike figurene er dose derfor presentert som intensitet (lus/gram) eller delt inn i gruppene «infisert» eller «uinfisert kontroll». Dataene for totalt 8 fisk ble fjernet da disse hadde amplifisering av «non-target fragmenter» basert på smeltekurven for qPCR resultatene.

For å studere immunresponsen til atlantisk laks under infestasjon med lakselus ble det analysert genuttrykket til ni immungener. Disse var IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-4/13A, IgM, IgT, MMP9, Cath 2 og INOS. EF1 α og RLP1 ble benyttet som referansegen. Alle prøvene stammer fra hud, og på fisk infisert med lus ble prøvene tatt direkte under lusens festepunkt, og et tilsvarende sted hos kontrollfisk. Det ble ikke tatt negative kontroller av infisert fisk i dette forsøket, dette på grunn av fiskens størrelse, som gjør det vanskelig å avgjøre et sted på fisken upåvirket av lokal immunrespons. Uttrykket ble så beregnet ut ifra all fisk infisert med lus sammenlignet mot kontroll.

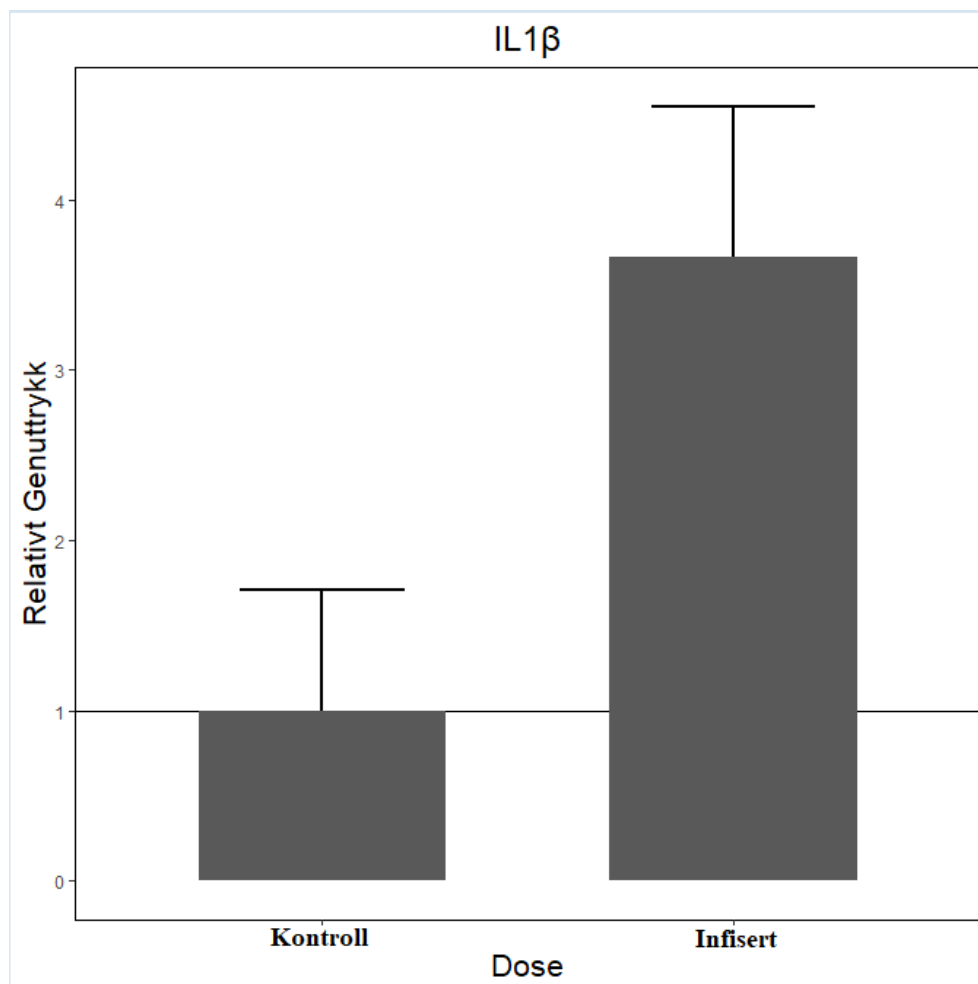
3.1.1 Pro-inflammatoriske gen

IL-1 β genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 3,66, som vist i figur 3.1.

Tabell 8 – P-verdier for IL-1 β

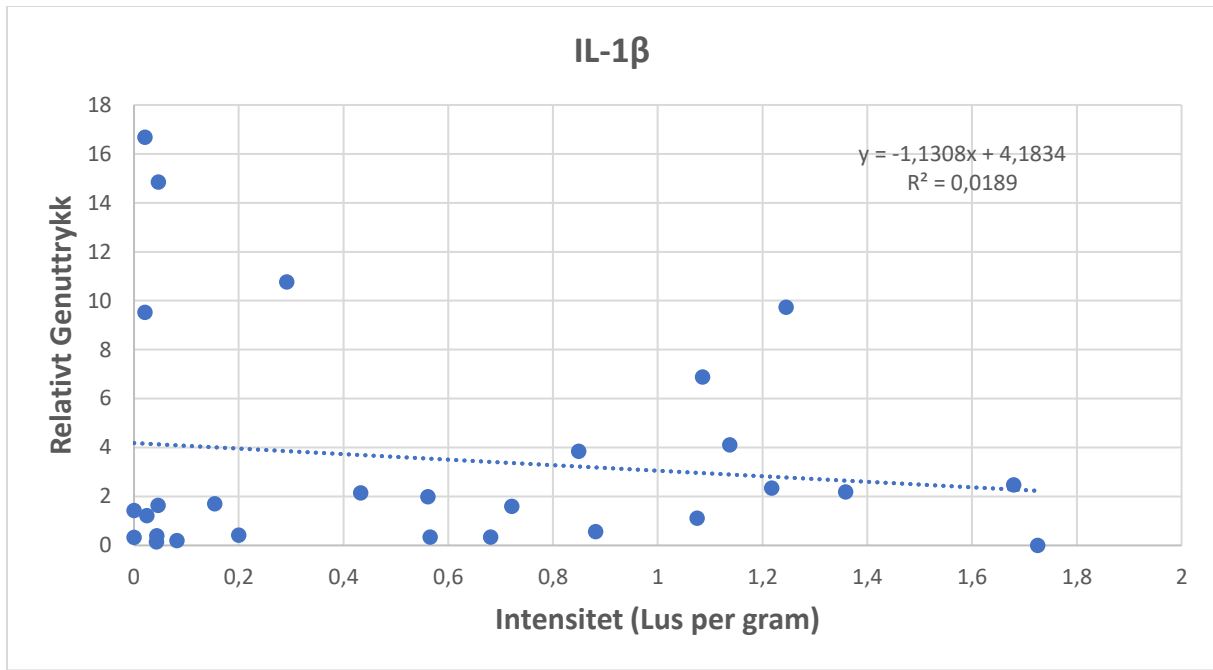
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.1502



Figur 3.1 – Relativt genuttrykk (Y-aksen fra hudprøver for infisert og kontroll (X-aksen) beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for IL-1 β . Antall prøver analysert for IL-1 β med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=27, og antall prøver analysert for IL-1 β uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Errorbars viser standardfeil.* Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0189, dette tilsvarer 1,89 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen for IL-1 β .



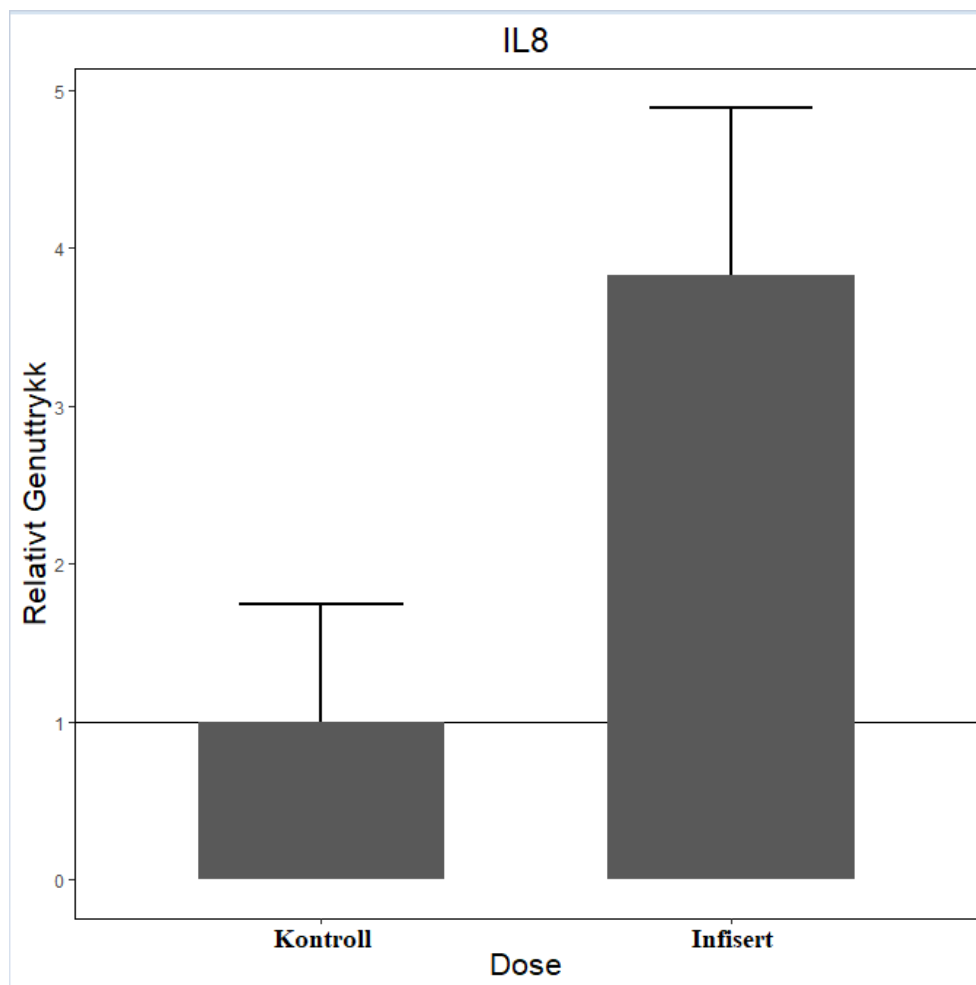
Figur 3.2 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for IL-1 β på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollfisk er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

IL-8 genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 3,83, som vist i figur 3.3.

Tabell 9 – P-verdier for IL-8

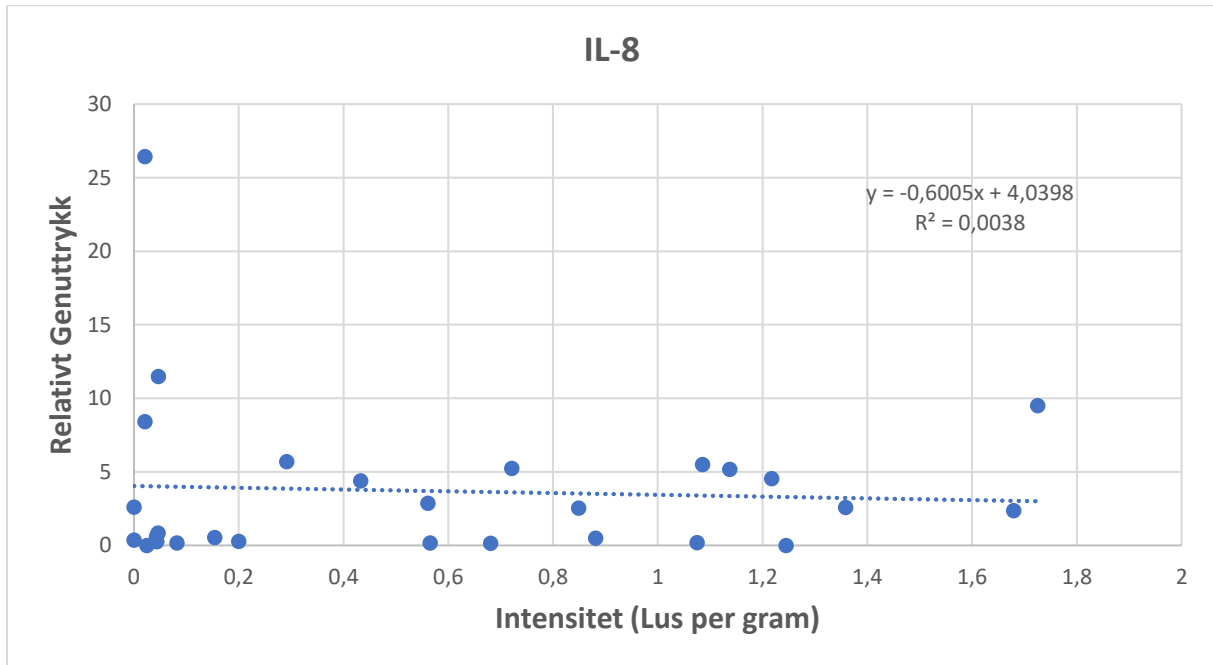
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.4829



Figur 3.3 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for IL-8. Antall prøver analysert for IL-8 med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=27, og antall prøver analysert for IL-8 uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0038, dette tilsvarer 0,38 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen for IL-8.



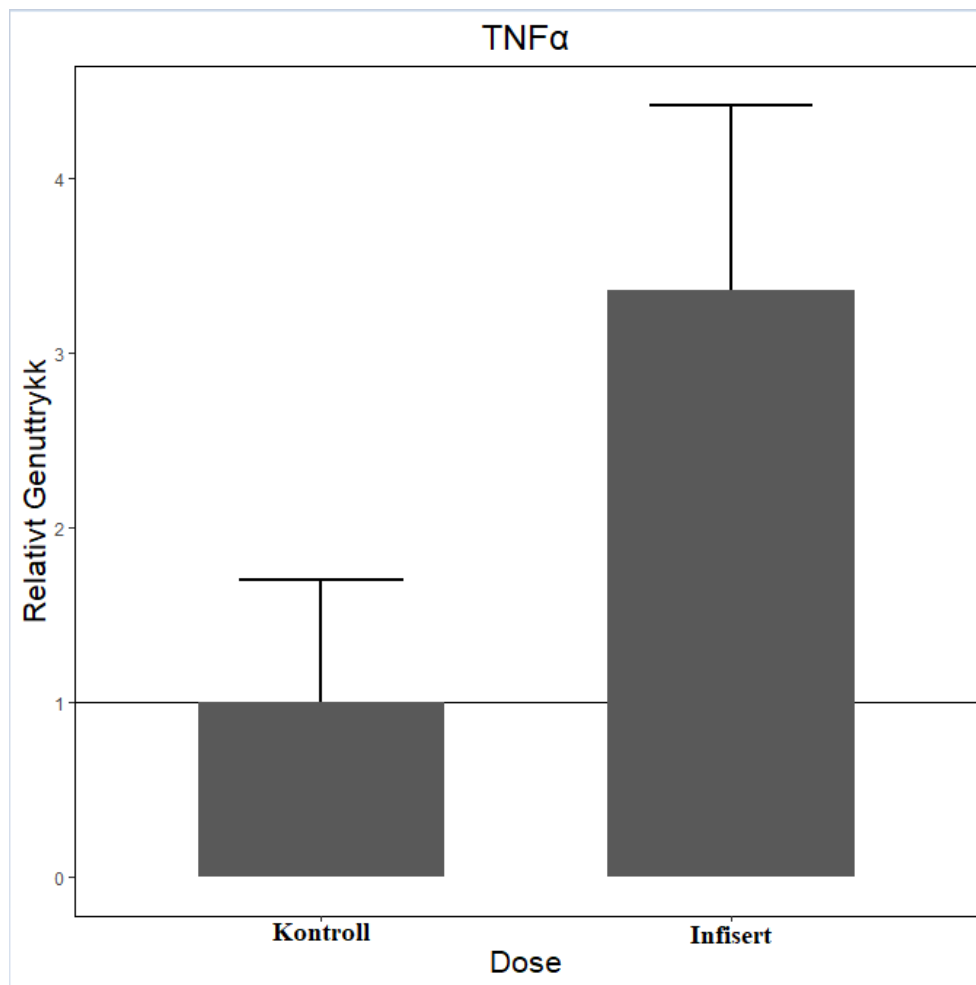
Figur 3.4 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for IL-8 på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

TNF- α genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 3,35, som vist i figur 3.5.

Tabell 10 – P-verdier for TNF- α

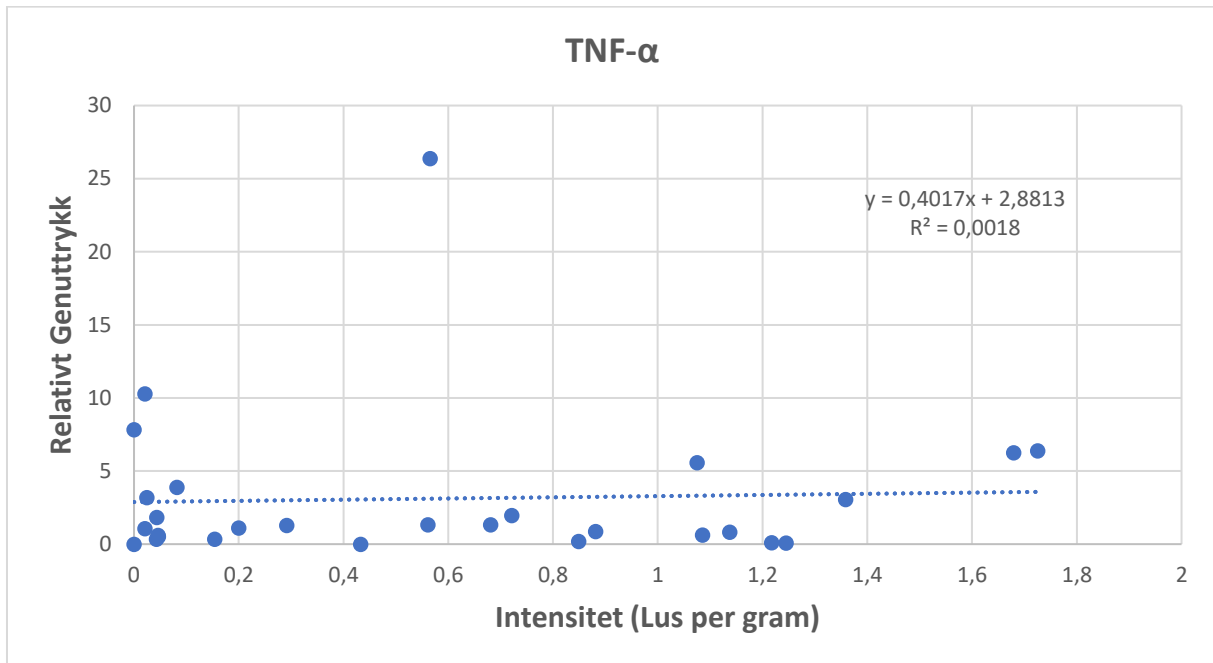
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.2251



Figur 3.5 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for TNF- α . Antall prøver analysert for TNF- α med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=26, og antall prøver analysert for TNF- α uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=10. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0018, dette tilsvarer 0,18 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



Figur 3.6 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for TNF- α på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

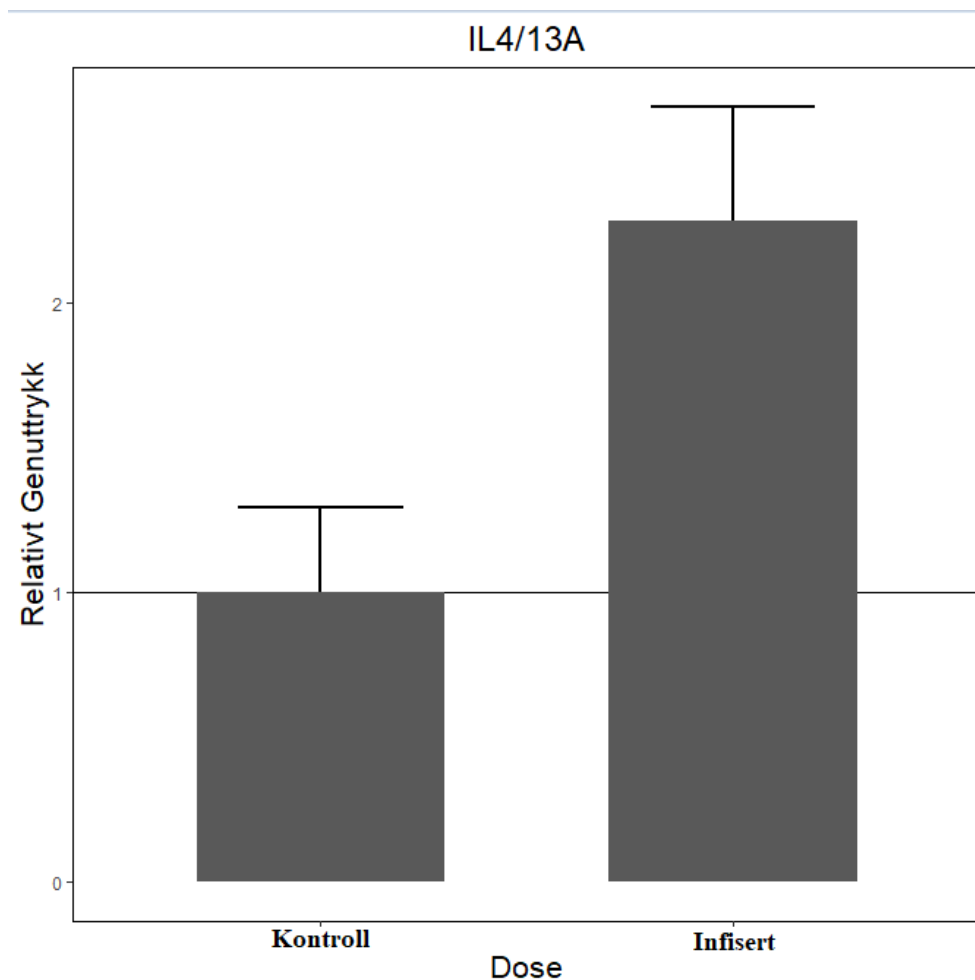
3.1.2 Anti-inflammatoriske gen

IL4-13A genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 2,28, som vist i figur 3.7.

Tabell 11 – P-verdier for IL4-13A

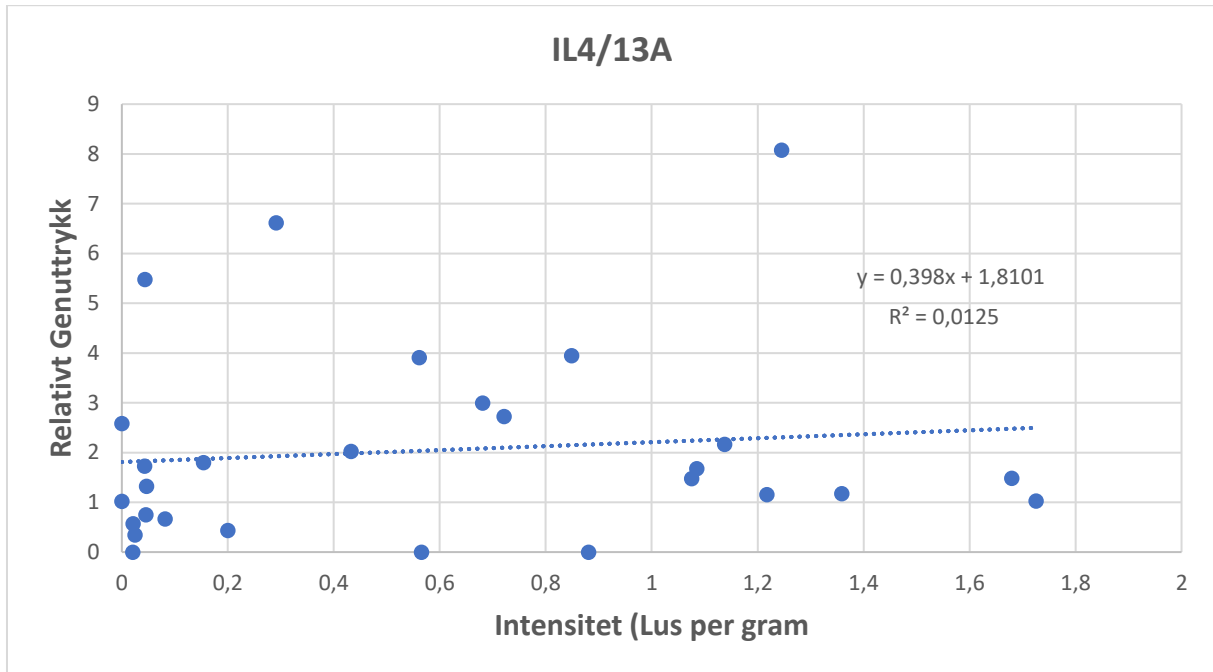
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.08173



Figur 3.7 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for IL4-13A. Antall prøver analysert for IL4-13A med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=25, og antall prøver analysert for IL4-13A uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=9. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0125, dette tilsvarer 1,25 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



Figur 3.8 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for IL4/13A på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

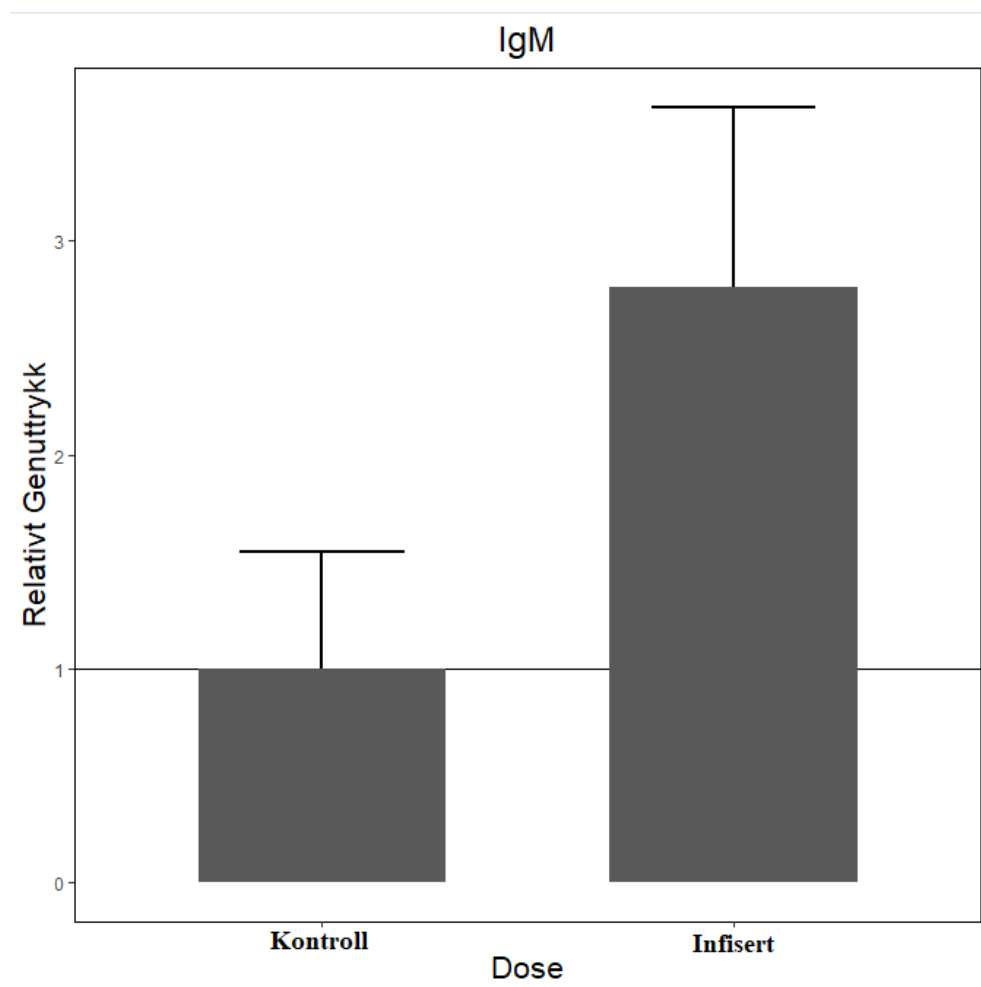
3.1.3 Immunoglobulin

IgM genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 2,79, som vist i figur 3.9.

Tabell 12 – P-verdier for IgM

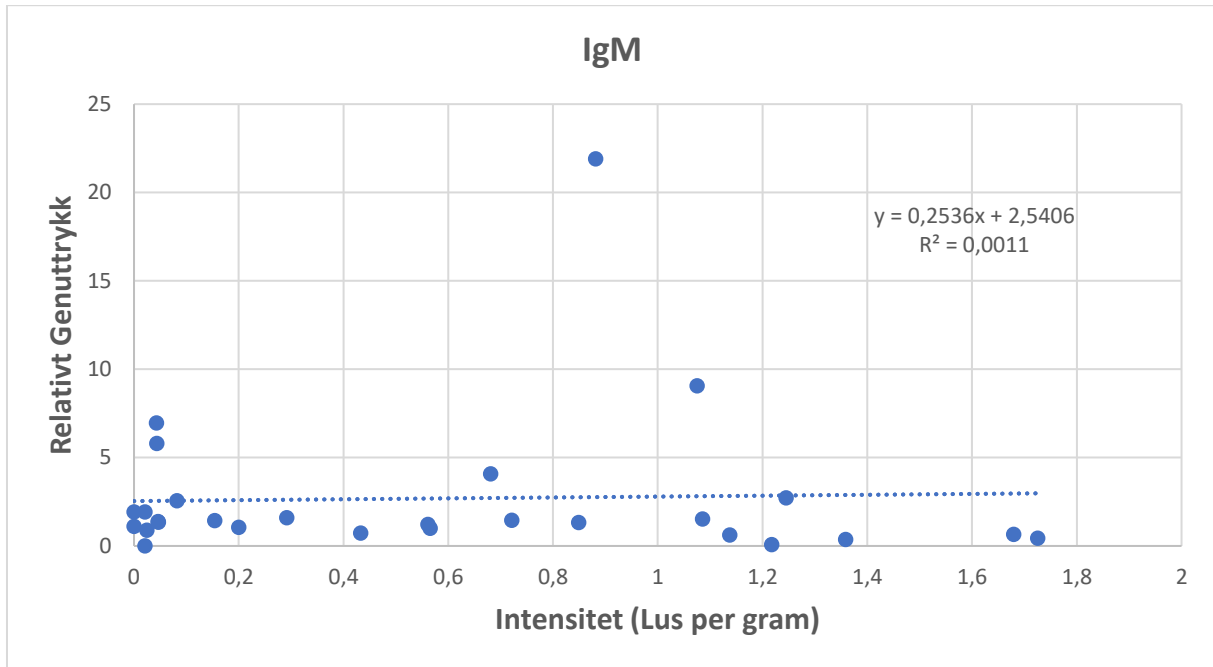
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.3445



Figur 3.9 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for IgM. Antall prøver analysert for IgM med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=27, og antall prøver analysert for IgM uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0011, dette tilsvarer 0,11 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



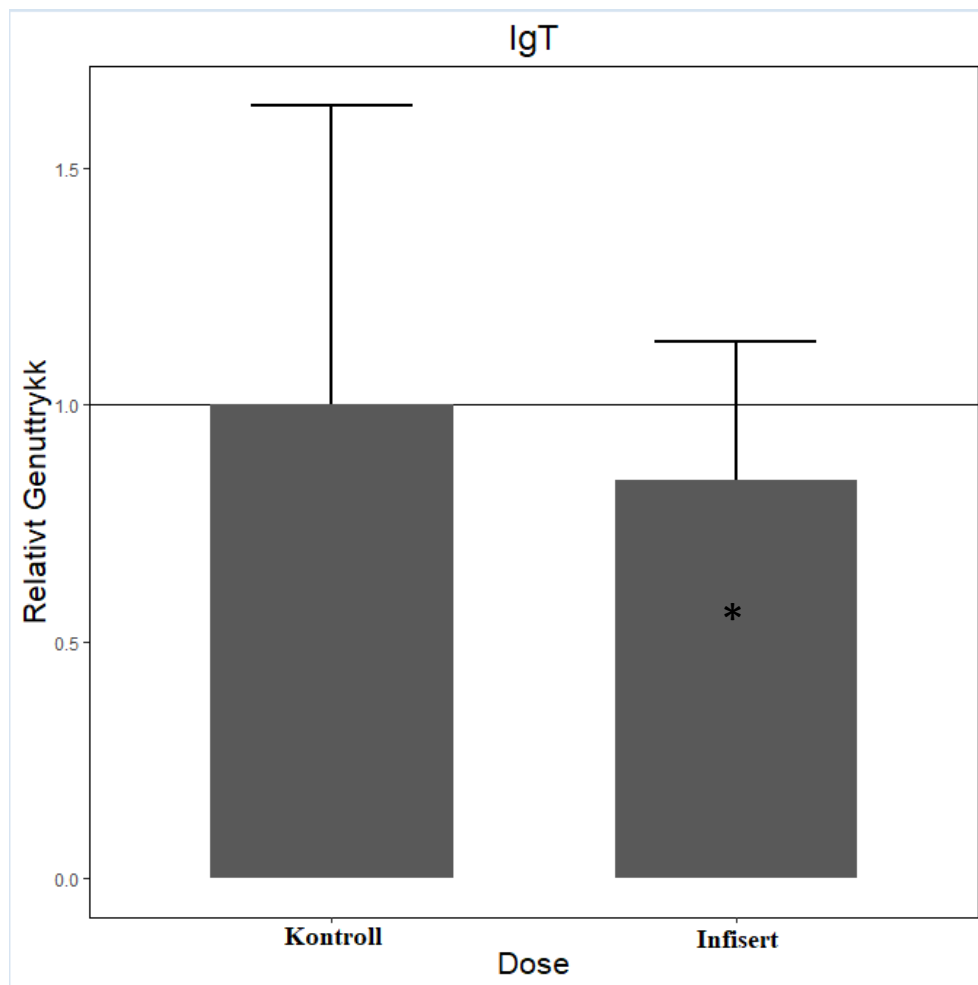
Figur 3.10 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for IgM på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

IgT genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et svakt nedregulert og signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 0,84, som vist i figur 3.11.

Tabell 13 – P-verdier for IgT

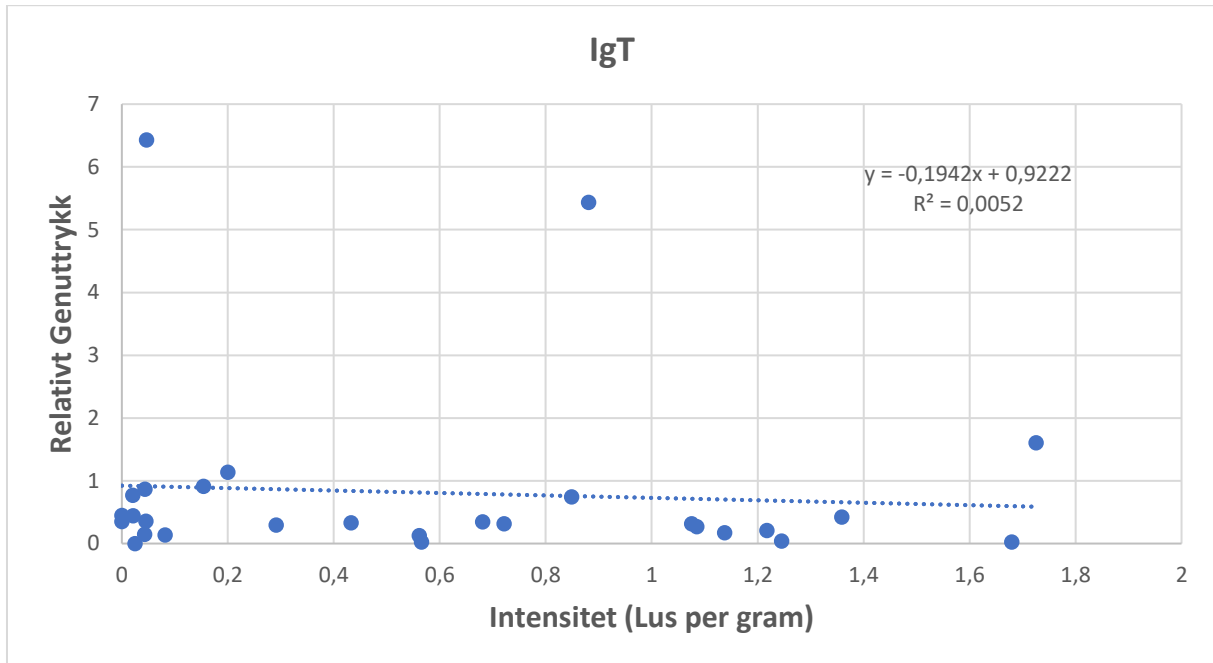
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.03686



Figur 3.11 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for IgT. Antall prøver analysert for IgT med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=27, og antall prøver analysert for IgT uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0052, dette tilsvarer 0,52 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



Figur 3.12 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for IgT på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

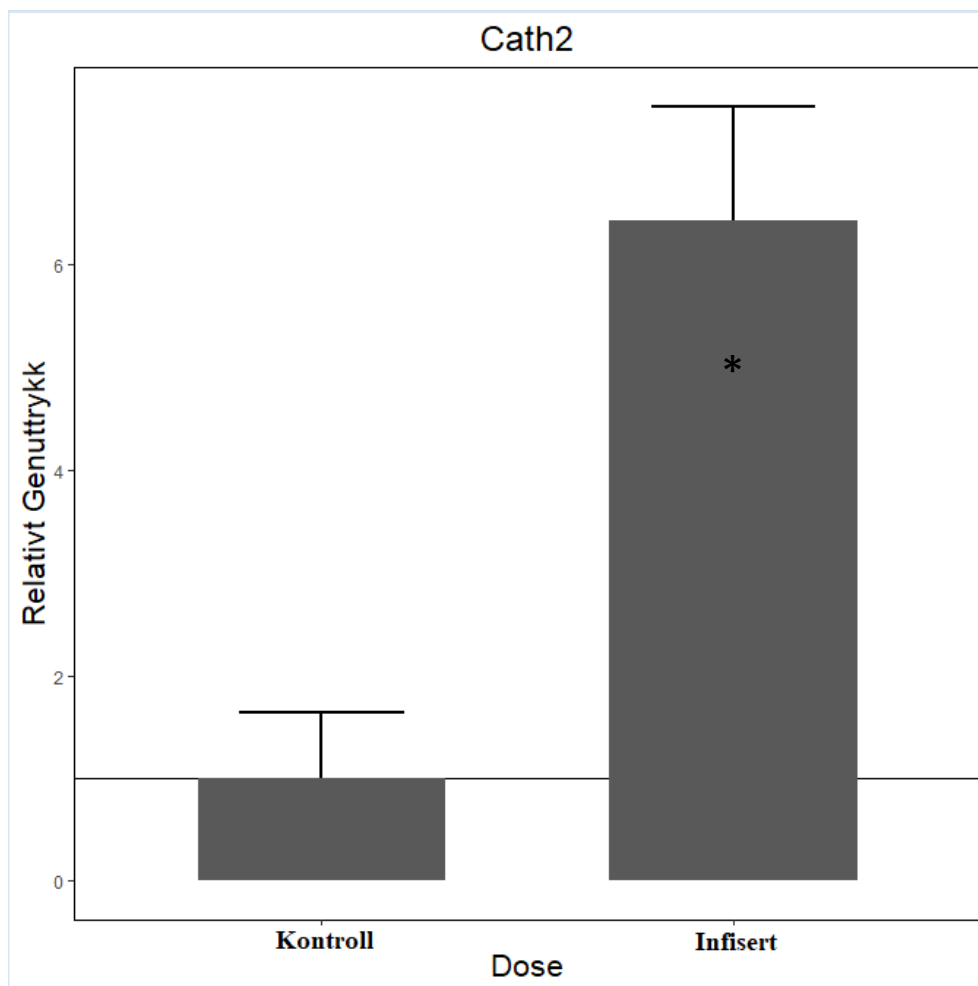
3.1.4 Cath2

Cath2 genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert og signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 6,42, som vist i figur 3.13.

Tabell 14 – P-verdier for Cath2

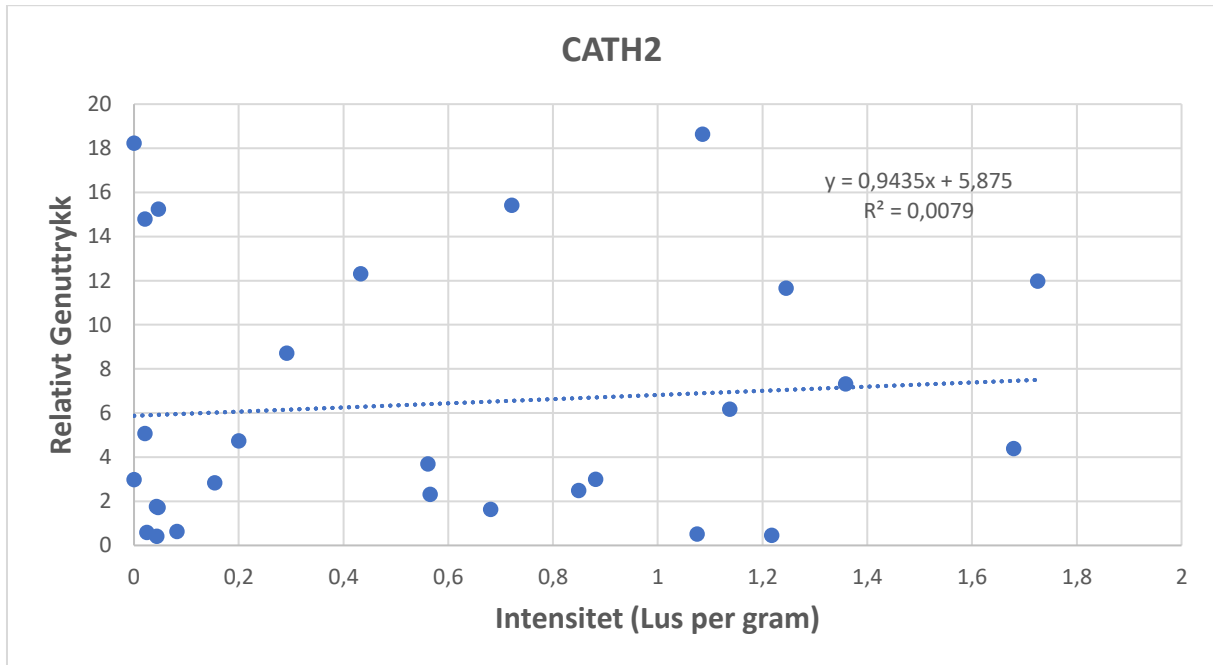
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.01429



Figur 3.13 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for Cath2. Antall prøver analysert for Cath2 med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=28, og antall prøver analysert for Cath2 uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi tilnærmet på 0,0079, dette tilsvarer 0,79 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



Figur 3.14 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for Cath2 på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

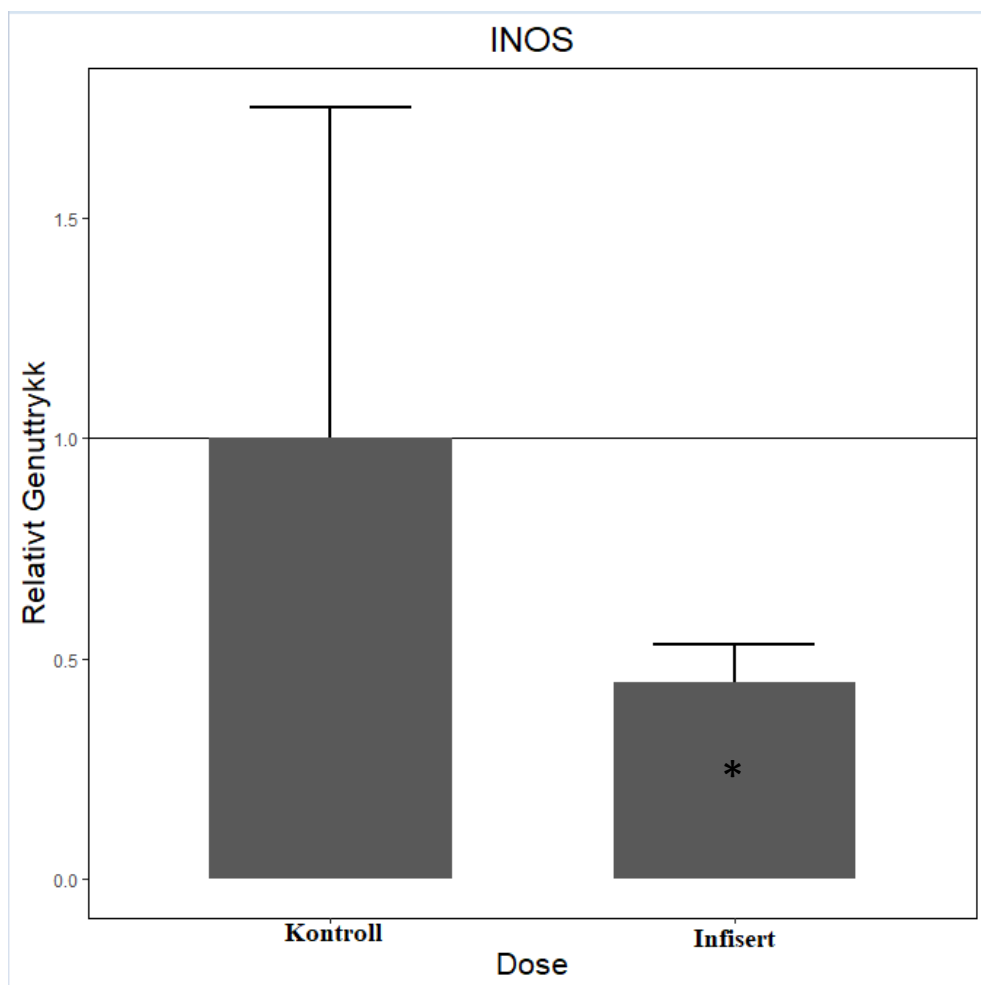
3.1.6 INOS

INOS genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et nedregulert og signifikant relativt genuttrykk med en Mean Fold Change verdi på 0,45, som vist i figur 3.15

Tabell 15 – P-verdier for INOS

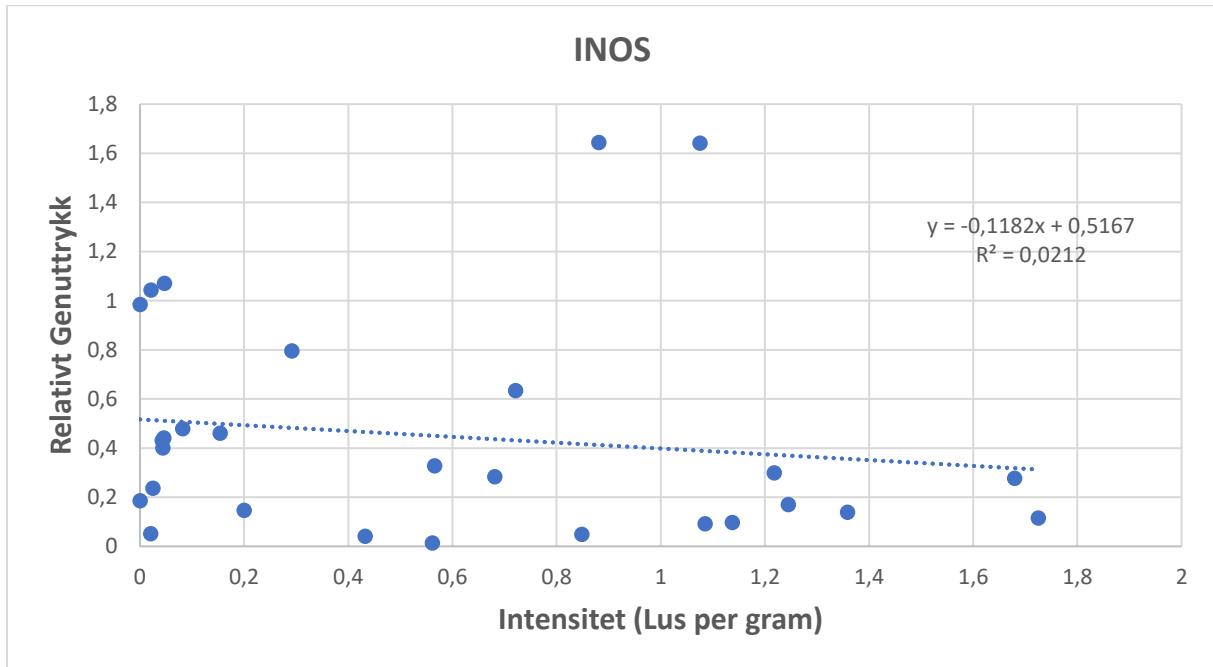
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.003138



Figur 3.15 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for INOS. Antall prøver analysert for INOS med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=28, og antall prøver analysert for INOS uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12. Standardfeil=standardavvik/kvadratrotten(N). * Betyr signifikant (P-verdi <0,05) mot kontroll.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0212, dette tilsvarer 2,12 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.



Figur 3.16 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for INOS på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

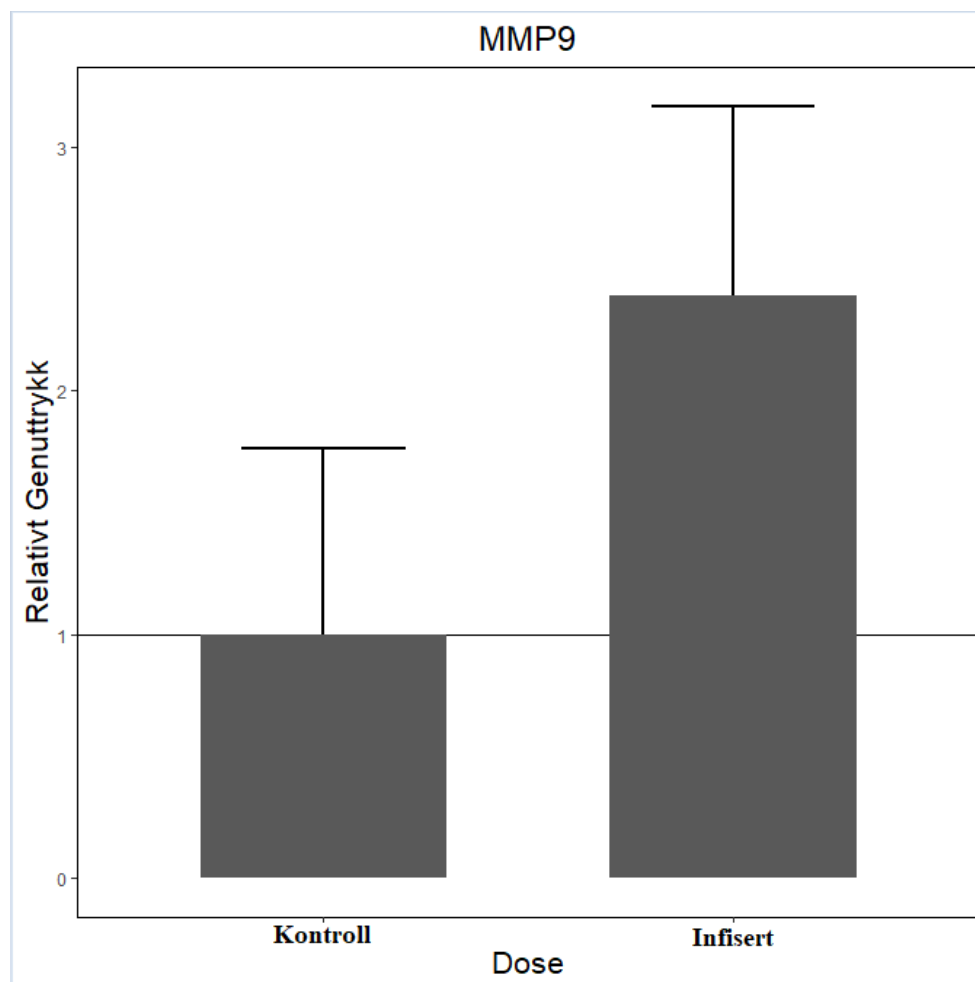
3.1.7 MMP9

MMP9 genuttrykk i hud

Infisert fisk sammenlignet mot kontroll hadde et oppregulert, men ikke signifikant relativt genuttrykk mot kontroll, med en Mean Fold Change verdi på 2,39, som vist i figur 3.17.

Tabell 16 – P-verdier for MMP9

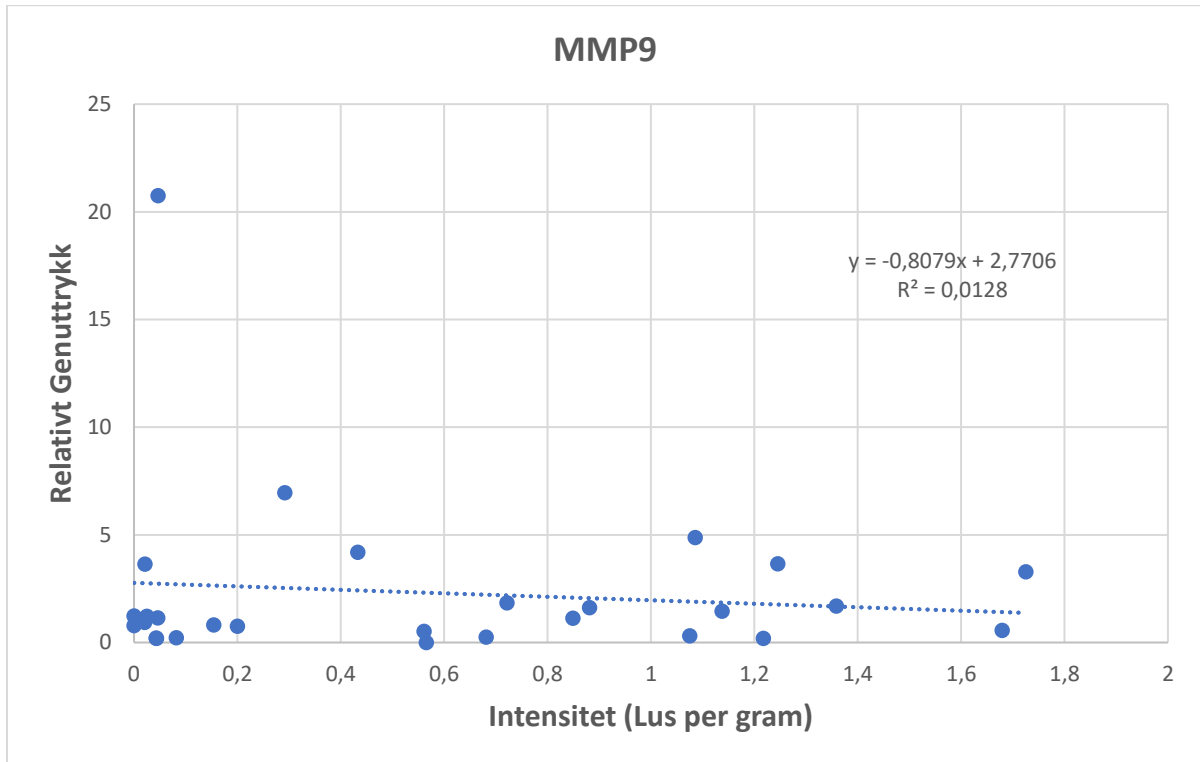
Gruppe	P-verdi
Infisert mot kontroll	0.7907



Figur 3.17 – Relativt genuttrykk fra hudprøver for infisert mot kontroll beregnet ut fra «mean fold change» ($2^{-\Delta\Delta CT}$) for MMP9. Antall prøver analysert for MMP9 med infeksjon av *L. salmonis* (infisert) er n=27, og antall prøver analysert for MMP9 uten infeksjon med *L. salmonis* (kontroll) er n=12.

Relativt genuttrykk i forhold til intensitet av infeksjon

Relativt genuttrykk satt opp mot intensitet ga R^2 verdi på 0,0128, dette tilsvarer 1,28 % korrelasjon, som er ubetydelig. Det relative genuttrykket hadde derfor ingen korrelasjon med intensiteten på infeksjonen.

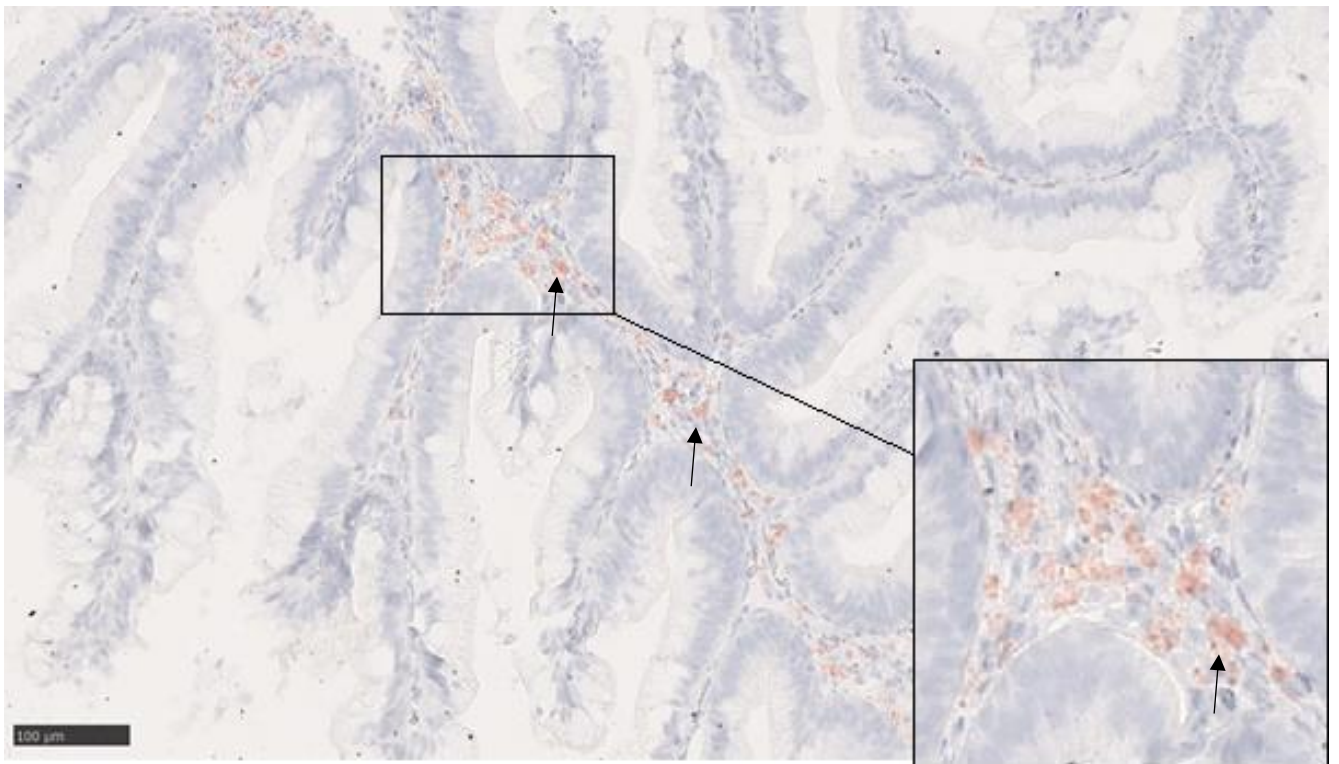


Figur 3.18 – Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fra hudprøver infisert med *L. salmonis* for MMP9 på Y-aksen mot intensitet (lus g^{-1}) på x-aksen. Kontrollverdier er ikke inkludert da figuren ser på forskjeller på dose. Lineær trendlinje viser forandringen i genuttrykket mot økning i intensiteten.

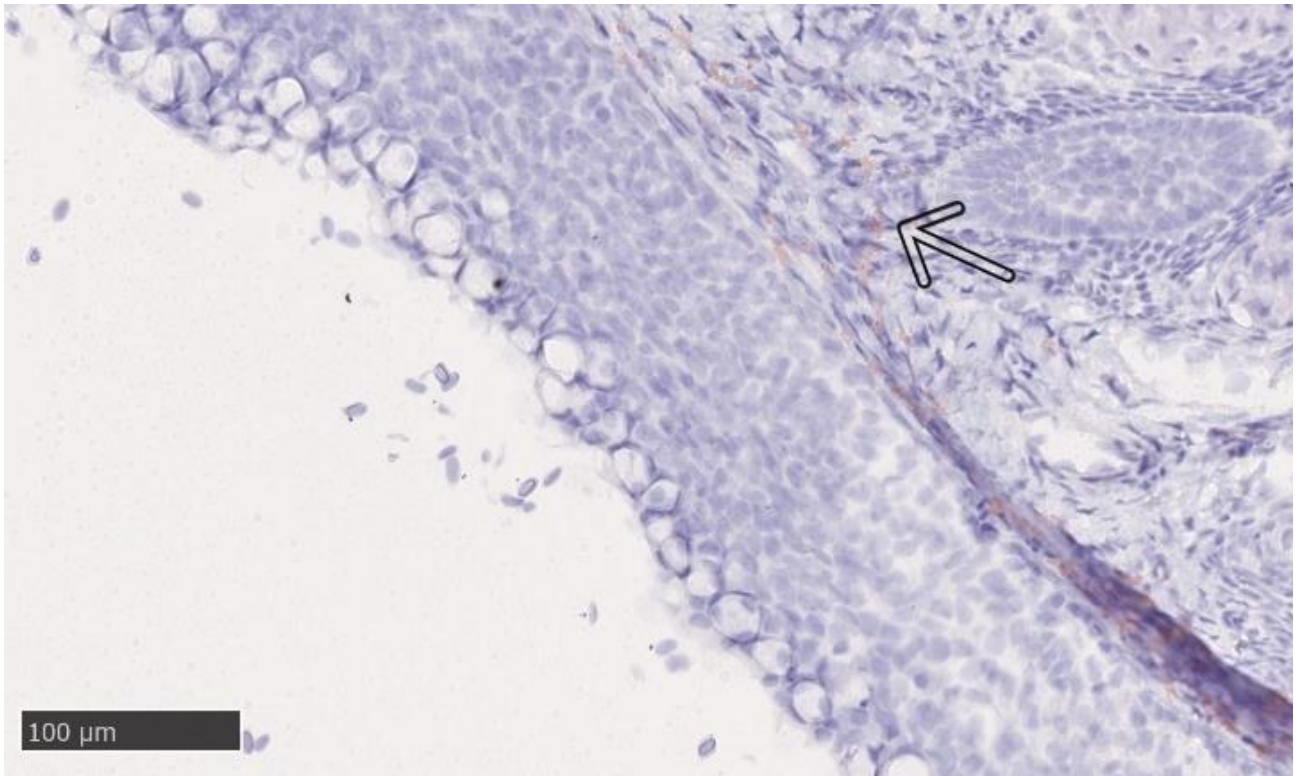
3.2 Histologi

Det ble laget 9 snitt farget med HES, og 9 snitt farget med en spesiell immunhistokjemisk teknikk for påvisning av TNF- α , bilder av noen av disse snittene er inkludert i resultatdelen under. Ingen av snittene ga positive resultater for TNF- α . Det ble kjørt kontrollsnitt av tarm sammen med snittene av hud, dette var også det eneste snittet som ga positive resultater for TNF- α , slik at man vet teknikken ble utført på korrekt måte i henhold til protokollen. De to bildene under (figur 3.19 og 3.20) er tatt i forbindelse med et annet forsøk på fiskens midttarm og gjeller, disse er inkludert for å illustrere hvordan et snitt positivt for TNF- α ville sett ut.

3.2.1 Eksempelbilder av snitt positive for TNF- α

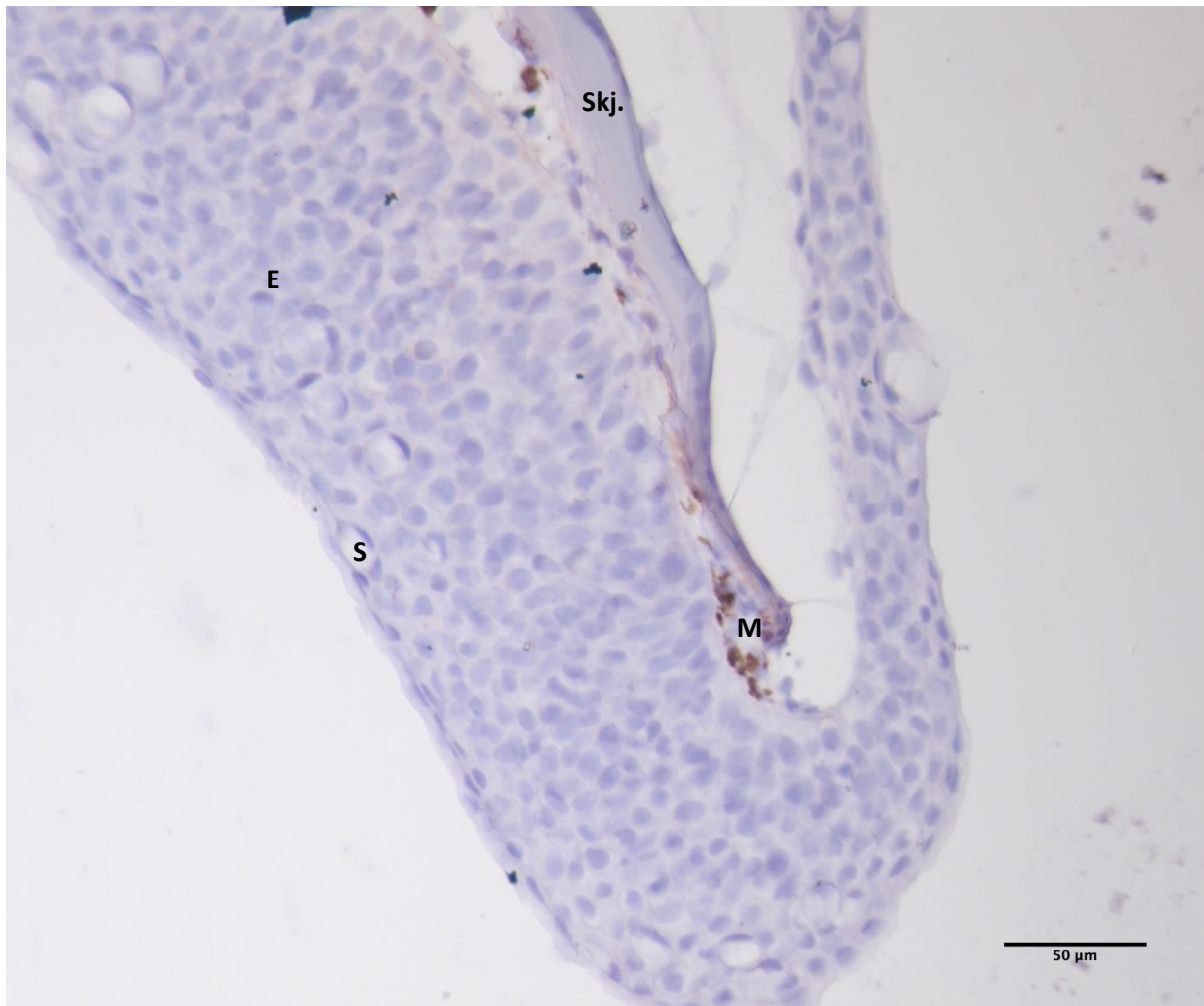


Figur 3.19 – Positiv kontroll farging av TNF- α G4 i Atlantisk laks fra posterior tarm, 20x. Pilene viser celler som er positive for TNF- α , og man kan tydelig se en stor tilstedeværelse av immungenet i submucosa/mucosa. Ruten nede til høyre viser et forstørret bilde av proteinene for TNF- α .

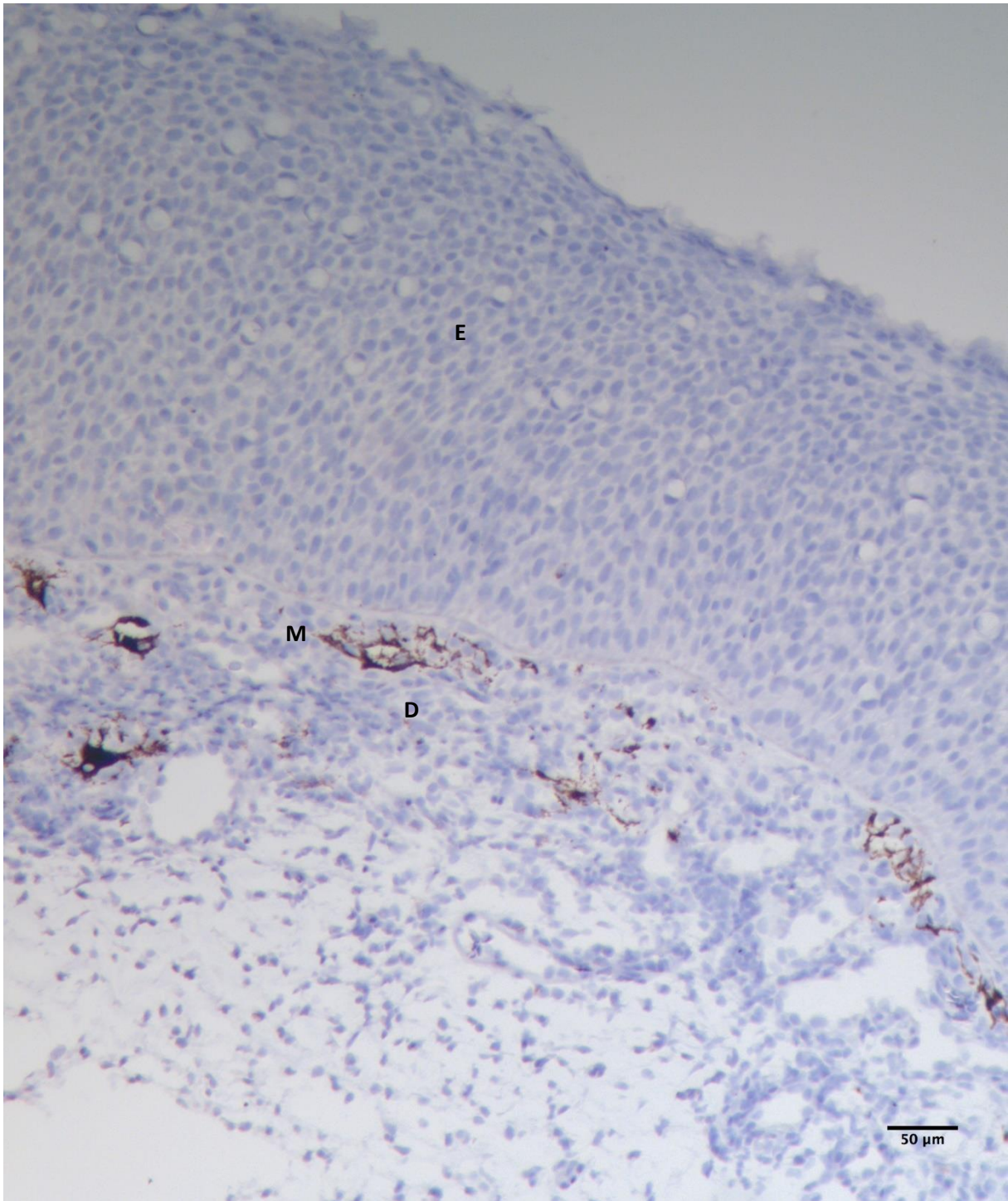


Figur 3.20 - positiv farging av TNF- α G4 i Atlantisk laks, snitt fra gjeller, 20x. Pilen viser tilstedeværelsen av proteinene for TNF- α .

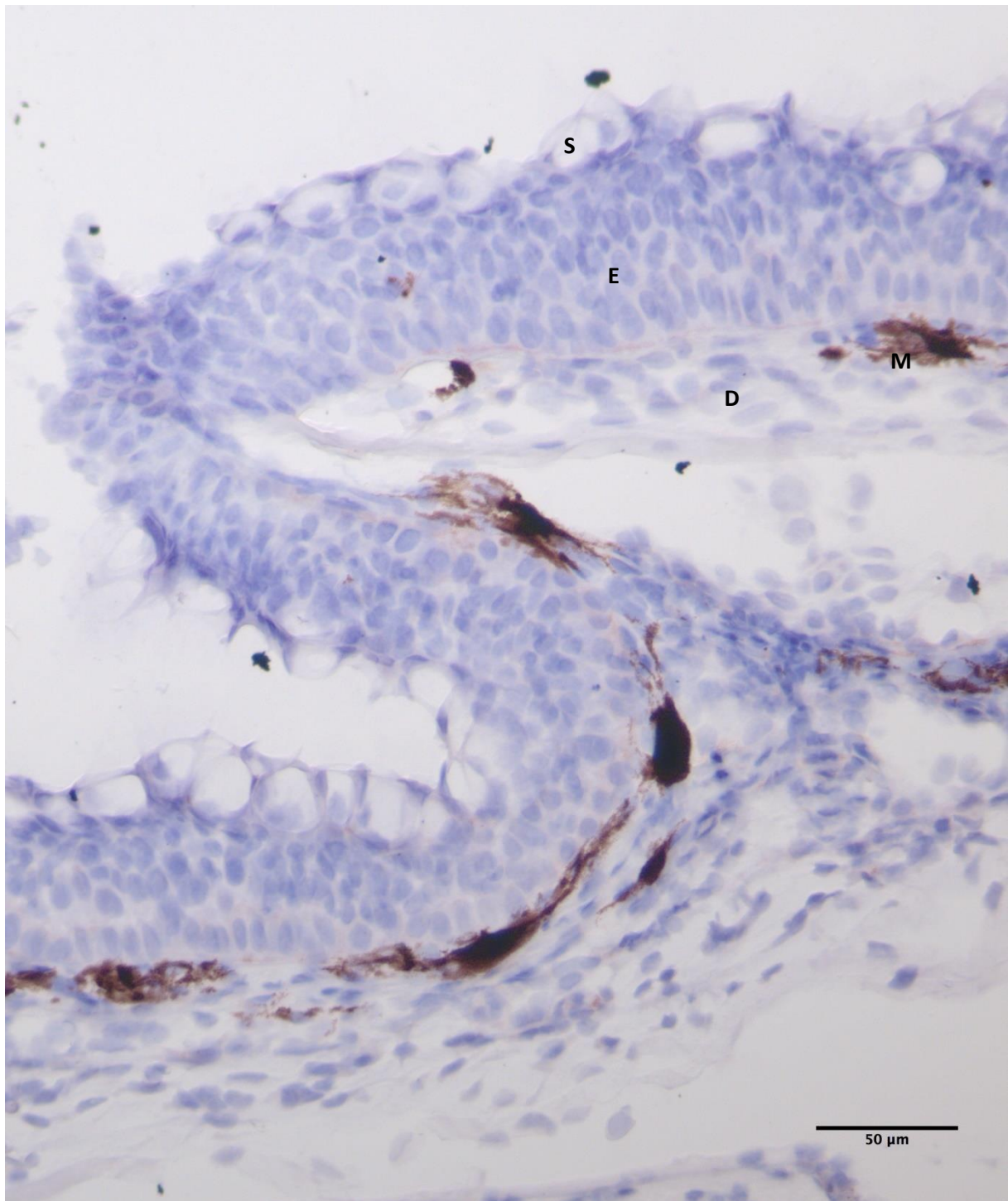
3.2.2 – Snitt av hud farget immunhistokjemisk teknikk for TNF- α



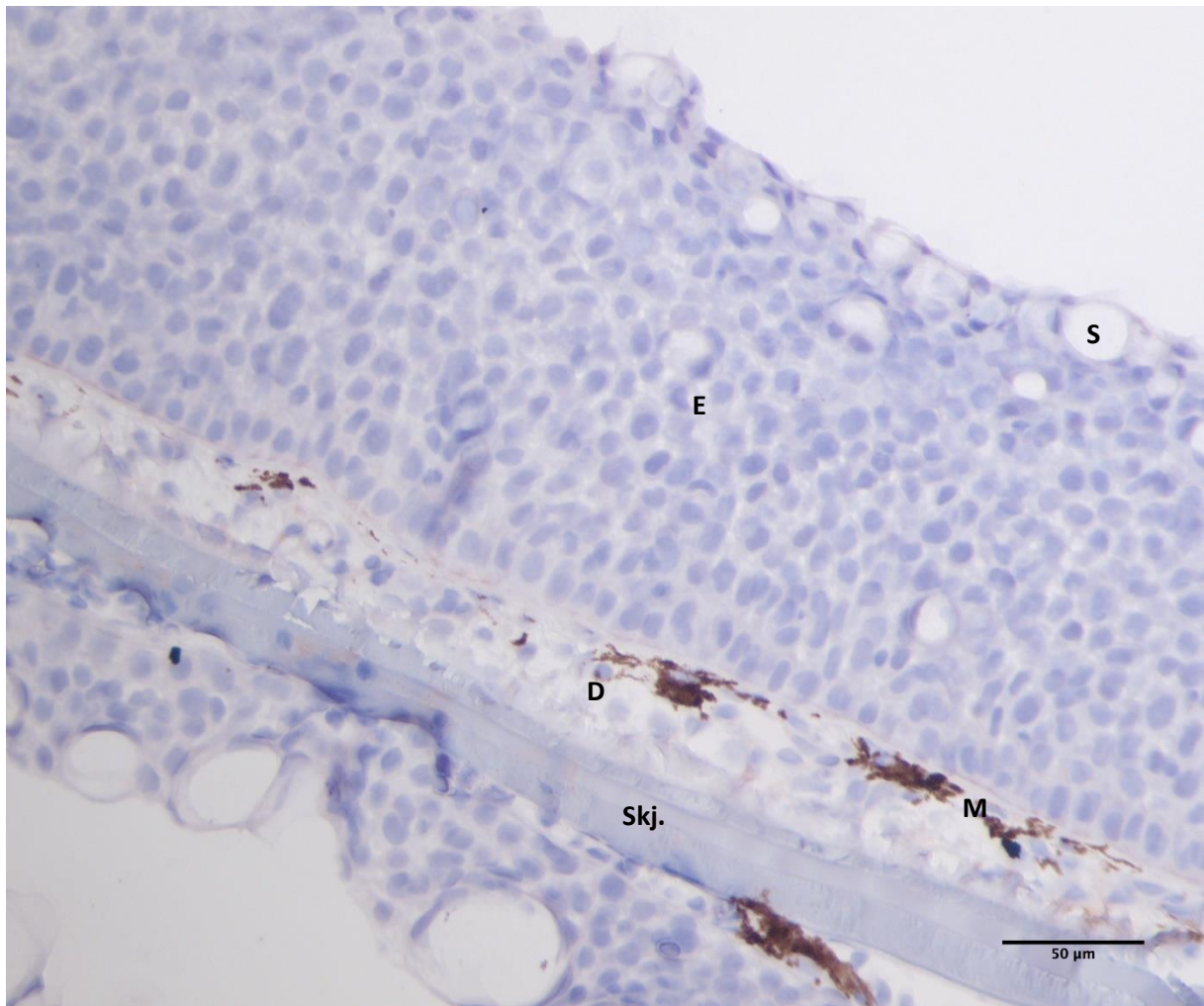
Figur 3.21 – Snitt fra infisert hud tatt like under lusen, negativt for TNF- α . a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter



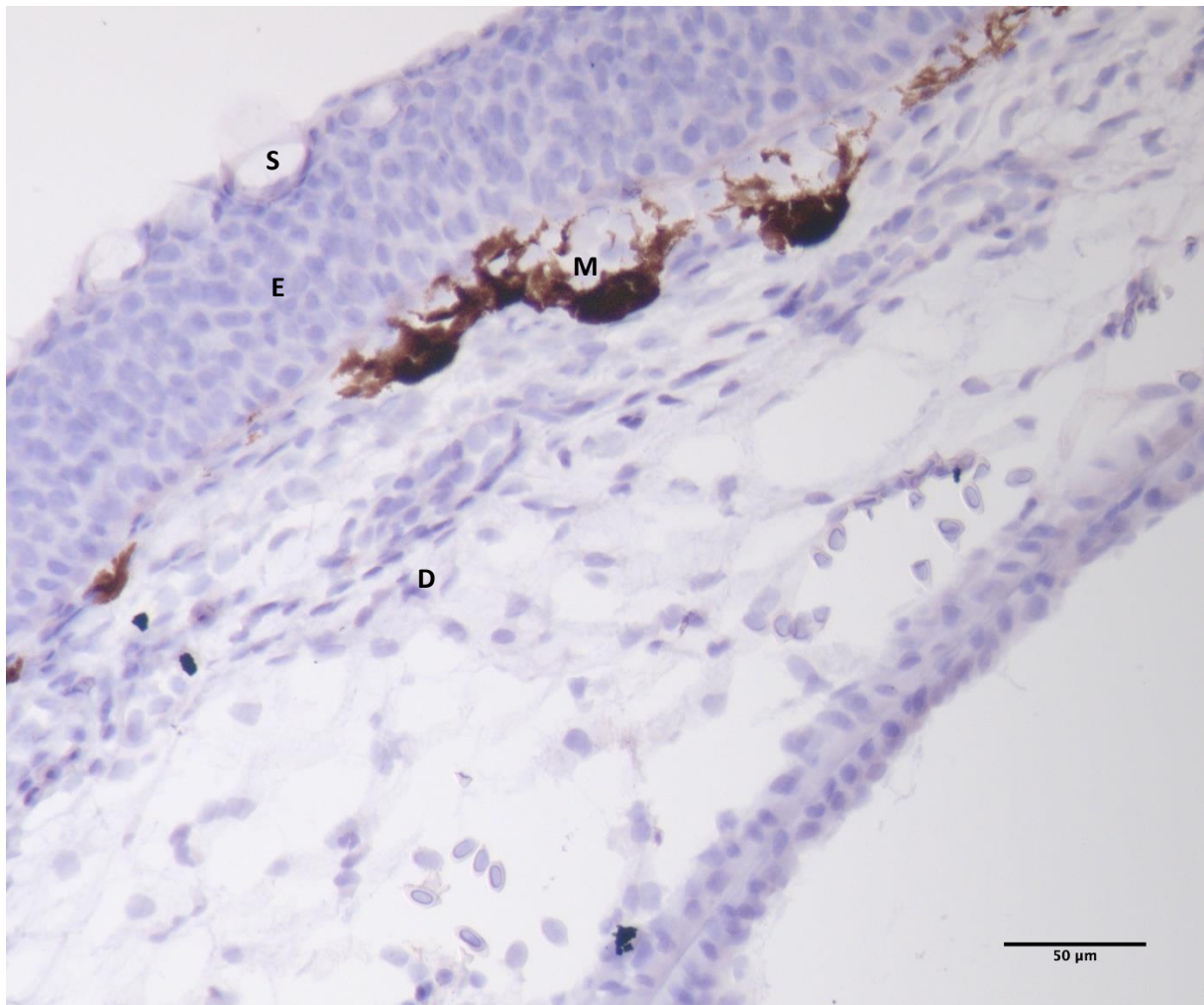
3.22 – Snitt fra infisert hud tatt like under lusene, negativt for TNF- α . a) Skj.=Skjell, b) S=Slimecelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter



Figur 3.23 - Snitt fra uinfisert hud, kontrollfisk. Snittet bærer preg av forvrenging under fargingen. a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter. Kontrollsnitt var tiltenkt å vise forskjeller på snitt positivt for immungenet mot kontroll, men da ingen av de infiserte prøvene ga positive resultater falt hensikten med kontrollsnitt mer eller mindre bort.

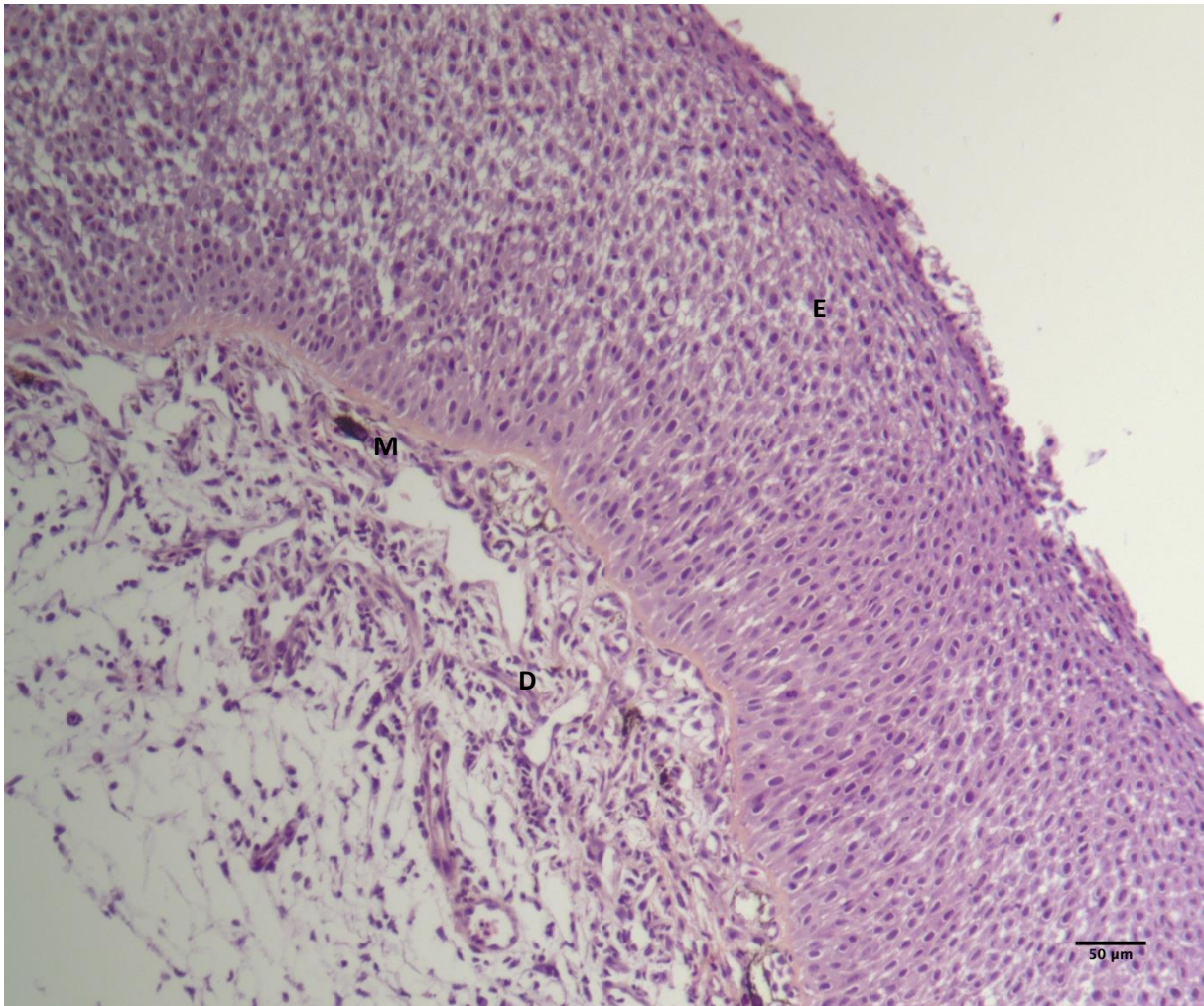


Figur 3.24 - Snitt fra infisert hud tatt like under lusen, negativt for TNF- α . a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter

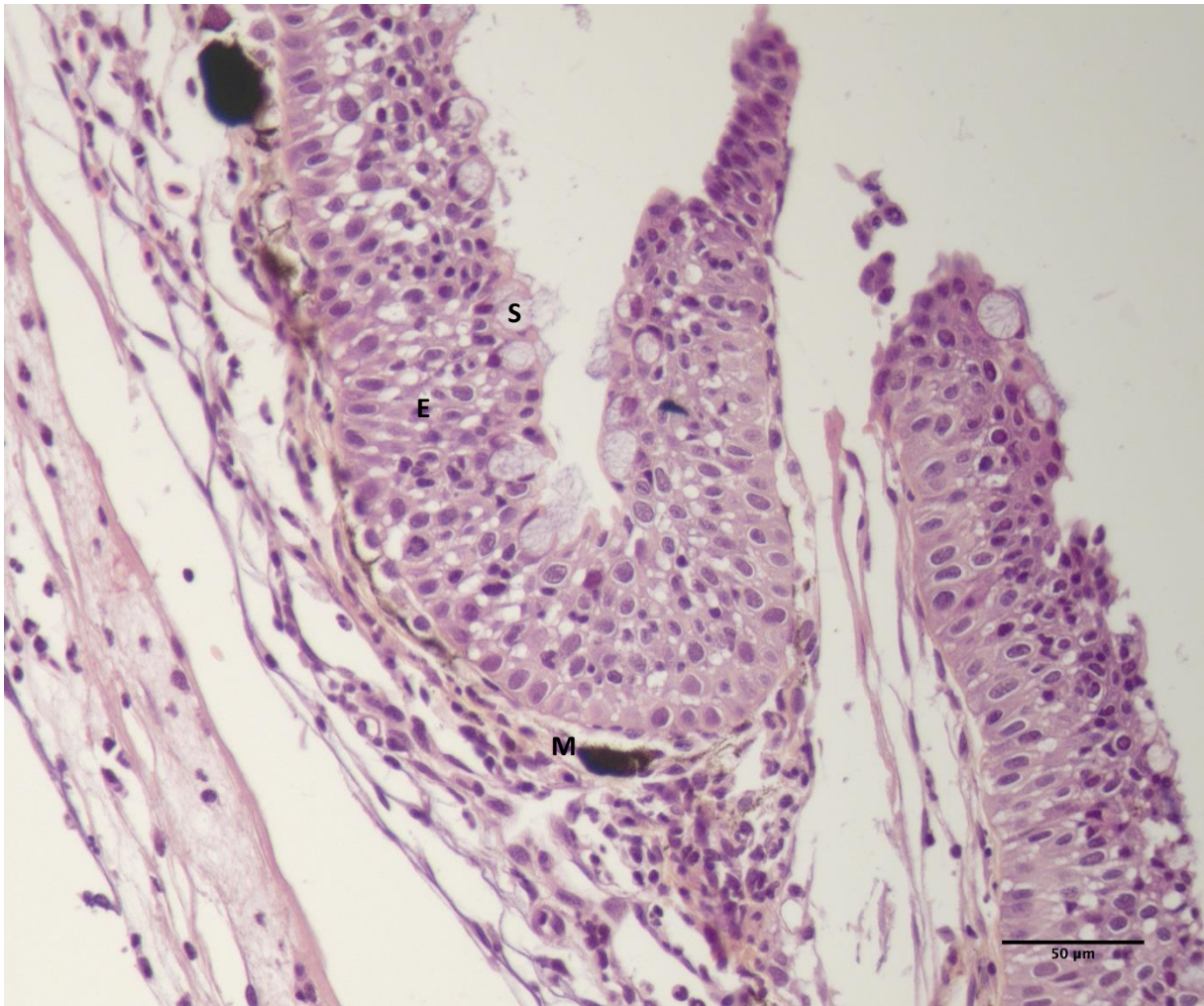


Figur 3.25- Snitt fra infisert hud tatt like under lusene, negativt for TNF- α . a) Skj.=Skjell, b) S=Slimecelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter

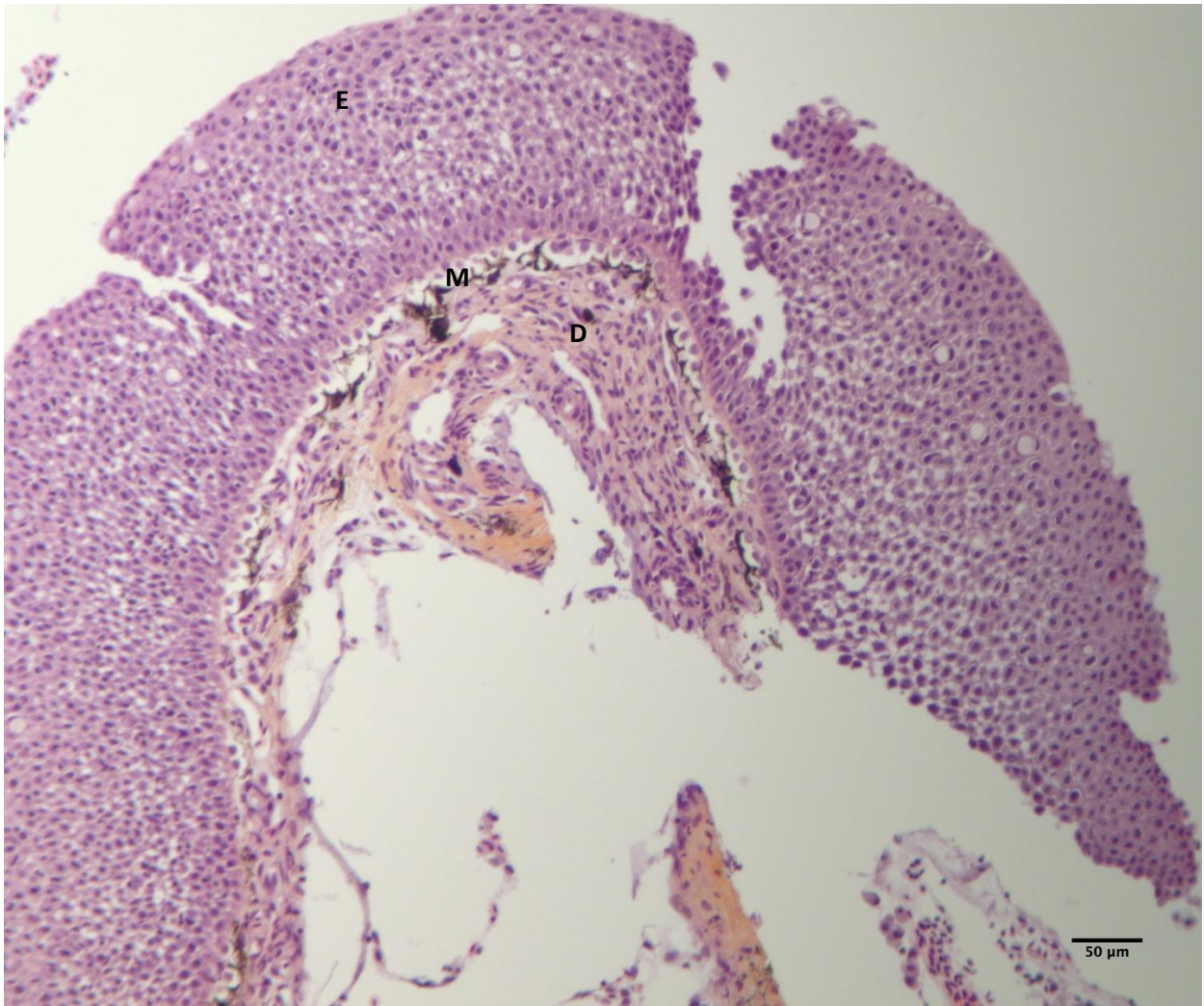
3.2.3 Snitt av hud farget med HES



Figur 3.26 – Snitt fra infisert hud tatt like under lusene, farget med HES. a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter



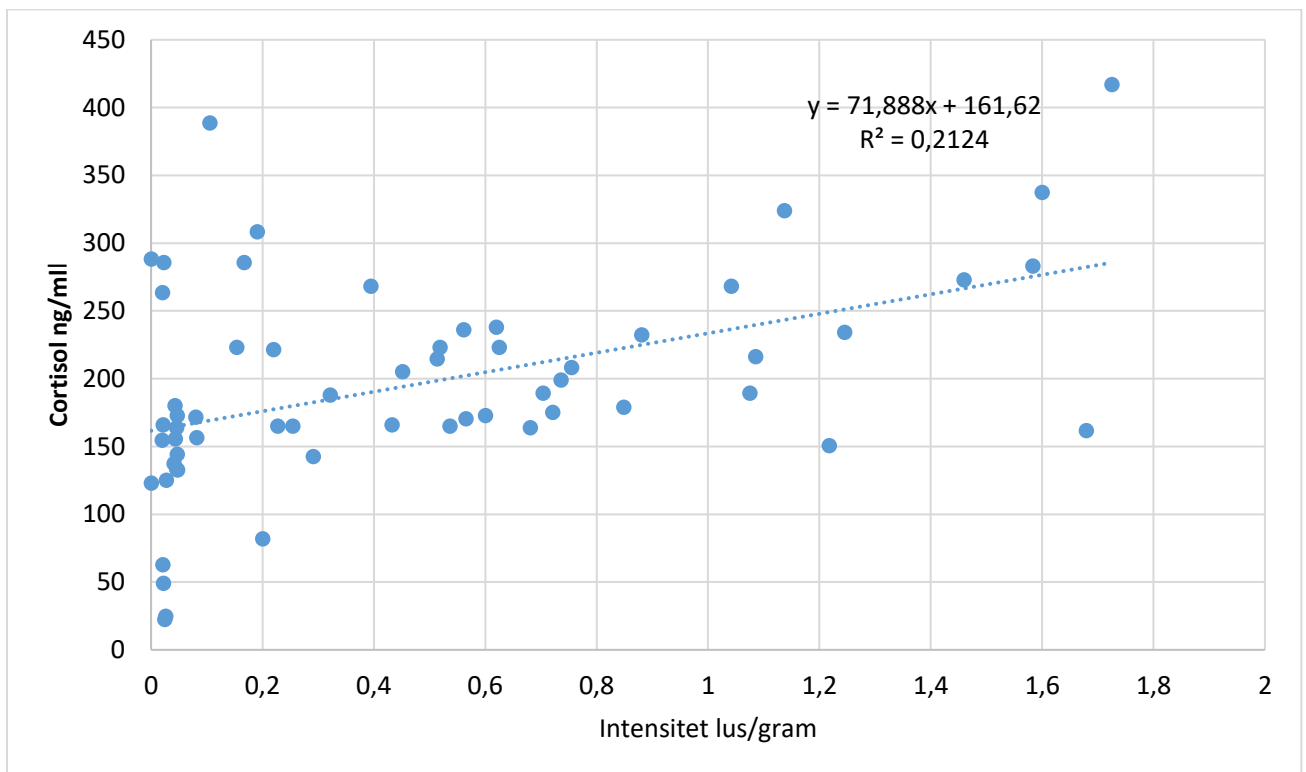
Figur 3.27 - Snitt fra uinfisert hud (kontrollsnitt), farget med HES. Snittet viser tegn til forvrengning, og er ikke et særlig bra kontrollsnitt. a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter



Figur 3.28 – Snitt fra infisert hud tatt like under lusen, farget med HES. a) Skj.=Skjell, b) S=Slimcelle, c) E=Epidermis, d) D=Dermis, e) H=Hypodermis, f) M=Melanocytter

3.3 Kortisolnivå – Stress

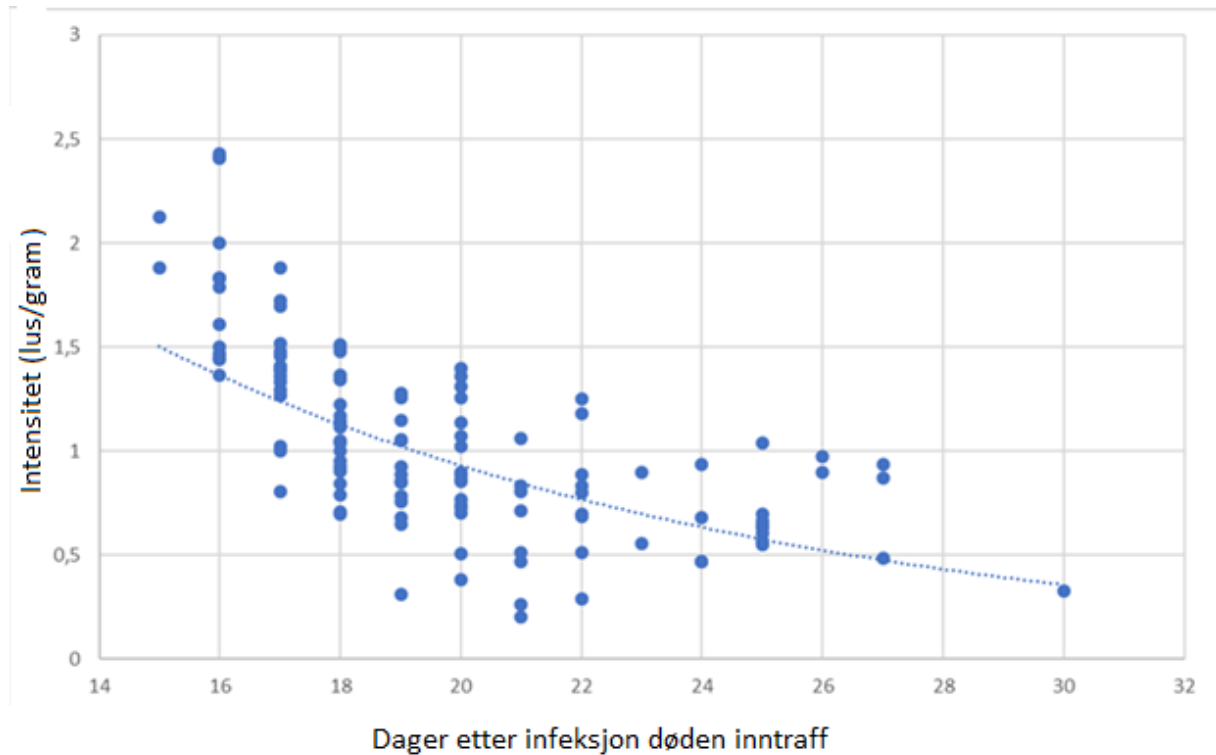
Nivå for plasmakortisol viste svak korrelasjon (21%) med intensiteten på infeksjon med *L. salmonis*. Lineær trendlinje i figur 3.30 viser tydelig svak stigning, og lav R^2 verdi.



Figur 3.29 – Nivå plasmakortisol oppgitt i ng/ml for hver fisk som ble samlet mot intensitet (lus/gram). Data for intensiteten er fra sampling når lusen befant seg i chalimus II stadiet. Figuren viser kun fisk infisert med lus n=50, kontrollfisk er ikke tatt med.

3.4 Dødelighet

Dataen til figuren 3.31 under stammer fra doseforsøket til Infest, og alle resultatene er ikke tilgjengelig da forsøket ikke er publisert enda.



Figur 3.30 - X-aksen viser dag fisken døde (dpi), y-aksen viser intensitet (lus g⁻¹). Data for intensiteten er fra sampling når lusene befant seg i chalimus II stadiet. Figuren viser at ingen fisk døde før 15 dpi hvor lusene befant seg i preadult stadiet.

4. Diskusjon

Denne oppgaven skal bidra med kunnskap om hvordan Lakselus påvirker immunresponsen hos atlantisk laks, med spesielt fokus på liten vill smolt sin respons på lus i chalimus stadiet. Foruten blodprøvene, er alle prøver av hud fra fisken. Et avgrenset fokus på responsen i huden til fisken og et enkelt livsstadium på parasitten er valgt for å avgrense oppgaven.

Det ble vist at infisert fisk hadde signifikant oppregulering av Cath2 sammenlignet mot kontroll. IL8, IL-1 β , TNF- α , IgM, MMP9 og IL4/13A hadde et høyere relativt genuttrykk sammenlignet mot kontroll, men resultatene for dissen var ikke av statistisk signifikans. Videre hadde Inos og IgT et lavere relativt genuttrykk sammenlignet mot kontroll og resultatene var av statistisk signifikans, nedreguleringen var betydelig for Inos og ubetydelig for IgT. Det ble ikke påvist tilstedeværelsen av proteinet for TNF- α i noen av snittene farget med immunhistokjemisk metode. Snittene farget med HES viste få eller ingen forandringer i vevet som følge av en lakselus infestasjon som var mulig å tyde ut fra snittene. Nivået på plasmakortisol hadde en veldig svak (muligens ubetydelig) korrelasjon til intensiteten. Figur 3.30 viser at ingen fisk døde før 15 dager etter infeksjon hvor lusen befant seg i preadult stadiet.

4.1 metodiske feilkilder

4.1.1 eksperimentelt oppsett

Fra resultatene kan man se tydelig regulering for mange av immungenene, og ved å sammenligne med tidligere forskning er det også forventet å observere signifikant regulering hos flere gener enn det resultatet viste. Det kan være flere årsaker til manglende signifikante forskjeller mellom gruppene i det nåværende forsøket, som for eksempel for få prøver som er samlet, for få replikater eller metodiske feil under labarbeidet.

I nyere forsøk på immunrespons i hud blir det som oftest tatt prøver direkte under lusen, mens prøver brukt til qPCR i dette forsøket samt en del eldre forsøk er det ikke gjort slik. I dette forsøket ble det tatt prøver av infisert fisk på omtrentlig det samme sted for alle individer. Et mulig problem med denne metoden er at man ikke tar høyde for den lokale immunresponsen som vil finne sted hvor lusen har festet seg.

Størrelse/alder og fiskens timing av smoltifisering kan også ha vært en faktor i hvordan immunresponsen og de ulike immungenene ble regulert. Fisken var fordelt i 5 ulike grupper og gjennomgikk de ulike fasene av eksperimentet med 1-4 ukers mellomrom, som betyr at de gjennomgikk smoltifisering, infeksjon og svømmeforsøket i ulike aldre og grupper. Et problem med å

ha flere grupper kan oppstå om man får en uforklarlig variasjon i resultatet samtidig som at forholdene og tankene tilsynelatende er like. Grunnen til forsinkelsen mellom gruppene var restriksjoner i forbindelse med hvor mange fisk som kunne være i svømmetunnel på samme tid. Til tross forsinkelsene før smoltifiseringen, gjennomgikk fisken resten av eksperimentet relativt like mange dager etter infeksjon og smoltifisering. Nå var fisken et par måneder allerede ved starten på forsøket slik at alder hadde nok ikke en særlig stor betydning. Fisk som er i de sene gruppene får likevel lengre tid til å vokse, utvikle immunforsvaret og muligens være bedre rustet for smoltifiseringen. Viktigheten av å sjøsette anadrom laksefisk på deres optimale tidspunkt for smoltifisering for best mulig adaptasjon til sjøvann er reflektert i en stadig voksende litteratur på de underliggende fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige forandringer som oppstår under transformasjonen fra parr til smolt (Folmar & Dickhoff, 1980). Det kan derfor ikke utelukkes at disse faktorene kan ha vært av betydning for immunresponsen, slik at et ideelt forsøk ville hatt like stor fisk i samme alder med synkronisert timing for smoltifiseringen og gjennomgått alle deler av eksperimentet under samme betingelser.

4.1.2 Infeksjon

I denne oppgaven ble det blant annet undersøkt genuttrykket til fisk utsatt for ulike doser lakselus. Før forsøket startet ble det bestemt å ha 5 ulike dosegrupper: Veldig høy, høy, medium, lav og kontroll. Imidlertid, siden infeksjonssuksess og overlevelse varierte mellom gruppene, endte man opp med lusetall fra samplingen som ikke samstemte med tiltenkt intensitet.

For å løse dette problemet, ble fisken i dataanalysen inndelt i nye grupper etter hvor mange lus den faktisk hadde ved sampling og ikke etter hvor mange lus den var infisert med. Slik at alle gruppene infisert med lus er slått sammen til en enkelt gruppe 'infisert' i figurene som viser relativt genuttrykk for infisert mot kontroll.

For figur 3.29 er det regnet ut lus per gram (intensitet). Det samme er gjort for figurene som viser lineær regresjon mellom relativt genuttrykk for infisert fisk mot intensitet. På denne måten blir det tatt hensyn til fiskens vekt noe som kan ha betydning for immunresponsen. På grunn av svært liten variasjon i vekt for individene i dette forsøket utgjorde dette ubetydelig forskjell for resultatene, og vekt sin påvirkning på immunrespons er heller ikke et fokus i denne oppgaven.

Suksessraten varierte hovedsakelig på grunn av aldersforskjellene på kopepodittene, ettersom de fem gruppene med fisk hadde forskjellig dato for infeksjon. Dette er en mulig feilkilde da forsøket ble satt opp til å undersøke forskjellene på fem ulike intensiteter (oppsummert i tabell 6), men pga. problemene rundt den ulike suksessraten på infeksjonen, stemte ikke tiltenkt intensitet med faktisk intensitet. På måten dataen i denne oppgaven er presentert blir det ikke tatt høyde for forskjellene

på tiltenkt intensitet og faktisk intensitet. Slik at fisk kan i utgangspunktet hatt en høy intensitet på et tidligere tidspunkt i forsøket som kan ha påvirket immunresponsen, og en lavere intensitet på tidspunktet fisken ble samlet med lus i chalimus II stadiet. Slik at ideelt sett skulle oppgaven hatt data fra flere samplingspunkt, og felles infeksjonsdato for alle gruppene slik at infeksjonssuksessen også blir tilsvarende for alle grupper.

4.2 Dødelighet

Figur 3.30 viser at ingen fisk døde før 15 dager etter infeksjon, hvor lusen befinner seg i preadult stadiet. Det betyr at det ikke ble observert dødelighet som følge av at lusen var i chalimus II stadiet, som er stadiet prøvene i dette forsøket stammer fra. Dette indikerer at skaden fra chalimus II er mer begrenset, noe som også vil vise seg på resultatene av genuttrykket til de ulike genene knyttet til immunresponsen. Figuren viser også at nesten all dødelighet forekommer hos fisk infisert med en intensitet på over $0,5 \text{ lus g}^{-1}$. Dette indikerer at dødelighet korrelerer med intensiteten på infeksjonen, som er forventet ettersom fisken dør som følge av en kombinasjon av mekaniske skader, stress og en kraftig immunrespons. Det var derfor også rimelig å anta at intensiteten ville ha betydning for uttrykket av immunresponsen, men resultatene i denne oppgaven viste svært liten eller ingen korrelasjon for dette forholdet. Dette blir videre diskutert i kapittel 4.6 *Oppsummering*.

4.3 Plasmakortisol - stress

L. salmonis infeksjon på verten atlantisk laks er kjent for den svært reduserte eller ikke eksisterende inflammatoriske responsen som er forventet ved slik skade på huden som parasitten medfører. Johnson & Albright, (1992) gjorde forsøk på immunresponsen til atlantisk laks i forbindelse med kortisol tilskudd, og fant at en reduksjon i kortisol svekket fiskens resistens mot parasitten betydelig. Det har derfor blitt spekulert i at Lakselus innehar immunmodulerende egenskaper knyttet til å dempe kortisolnivået, som er grunnen til den svært reduserte immunrespons ved en lakselus infeksjon (Fast, Muise, Easy, Ross, & Johnson, 2006). Dette var en teori som ble styrket etter det ble identifisert trypsin og Prostaglandin E_2 (PGE E_2) i sekretet til *L. salmonis* (Fast, Burka, Johnson, & Ross, 2003).

En artikkel av Eichner, Øvergård, Nilsen, & Dalvin, 2015 så på en PGE E_2 syntese ved navn LsPGES2, hvor de blant annet analyserte uttrykket av syntesen gjennom utviklingen av lusen og fant at nivået holdt seg stabilt, med unntak av frittstående stadier og spesielt voksne hunnlus. Syntetasen ble også funnet rundt muskelvev og observert rundt de reproduktive organene til lusen. Videre forsøk hvor de brukte «knock down» (nedregulering) gjennom RNA interferens av LsPGES2 uten å observere noen endringer i kopepodittens evne til å vokse og utvikle seg til adult stadiet eller dens evne til å

infisere en vert. Samme metode brukt på voksne hunn lus ga heller ingen forandringer på lusens reproduktive evner (Eichner, Øvergård, Nilsen, & Dalvin, 2015).

I en nyere artikkel av Dalvin, Eichner, Dondrup, & Øvergård, 2021 gjorde de videre analyser på ulike PGE₂ synteser for å undersøke om disse kan ha eventuelle immunmodulerende egenskaper men også lære mer om hvilke roller disse har i fisk. I det forsøket fant de flere argumenter mot PGE₂ som immunmodulator hos *L. salmonis*, deriblant manglende oppreguleringen av genuttrykk under overgangen til det infeksjøs stadium eller når parasitten hadde økt innhold i de eksokrine kjertlene. De fant også at ved å nedregulere de tre syntesene de gjorde forsøk på hadde ikke påvirkning på verken immunresponsen eller evnen lus har til å vellykket parasitere fisken. De fant likevel at disse syntesene hadde andre funksjoner knyttet til reproduksjon og håndtering av oksidativt stress knyttet til skallskifte og deres evne til å suge blod (Dalvin et al., 2021).

Nivået på plasmakortisol er likevel noe som kan ha betydning for inflammasjonsdelen av immunresponsen, men disse nyere artiklene indikerer at dette nivået må være regulert av andre molekyler enn PGE₂.

Figur 3.29 viste at nivået for kortisolnivå kun korrelerte 21% med intensitet, slik at det ikke er mulig å konkludere med at de har en betydelig korrelasjon da 79% må forklares av andre faktorer. Figuren tar f.eks. ikke hensyn til hvilken rekkefølge fisken er samlet, som er en viktig faktor i kortisolmålinger på grunn av responstid knyttet til håndtering og stress. Forsøket var heller ikke tilpasset kortisolmålinger, da dette ikke var et hovedfokus og slike målinger er i tillegg notorisk vanskelig å få gode data på.

Kortisolnivået på kontrollfisken hadde et gjennomsnitt på 139,5 ng/ml, mens fisk infisert med lus hadde et gjennomsnittlig kortisolnivå på 182,6 ng/ml. En økning i plasma kortisol er ofte brukt som en markør for akutt stress i fisk. En økning i sekresjonen av dette hormonet mobiliserer energi fra lager til muskler og stenger ned metabolske prosesser involvert i vekst og immunsystemet (Barton, 2002). Kortisol har også vist seg å nedregulere ulike gen involvert i sårheling, i tillegg har det blitt observert nedregulering av kollagen og andre strukturelle protein parallelt med en opptreden av proteinaser som degraderer ekstracellulær matrix som MMP9 og MMP13 (Krasnov, Skugor, Todorovic, Glover, & Nilsen, 2012). De fant også at kortisol reduserte uttrykket av gener som koder for proteiner involvert i ulike vevstrukturer, regulatorer for celledifferensiering og vekst faktorer.

4.4 Resultater genuttrykk av immungener og immunhistokjemi TNF- α

4.4.1 Pro-inflammatoriske gen

IL-1 β genuttrykk

IL-1 β er en viktig multifunksjonell inflammatorisk cytokin som stimulerer immunsystemet i respons til en rekke ulike patogener (Dinarello, 1996). I tillegg til å ha en sentral rolle i å fremme betennelse, aktiverer den også T-celler og makrofager (*Immunobiology*, Murphy and Weaver, 9th edition). Til tross for et relativt genuttrykk på 3,66 var resultatene for infisert mot kontroll ikke signifikante.

Disse resultatene stammer fra chalimus stadiet på førstegenerasjons villsmolt med en snittvekt på 47,8 gram ved samplingsdato for chalimus II. Fisk på denne størrelsen er noe det ikke er gjort mye forskning på og referansematerialet er veldig begrenset. Derfor blir det nærmeste å sammenligne genuttrykket med tidligere forskning gjort på større laks med lus fra adult stadiet. Resultatene for IL-1 β i det nåværende forsøket var ikke av statistisk signifikans. noe som kan komme av feil med forsøksoppsettet, at lus i dette stadiet gjør mindre skade, eller at de utøver en større grad av demping av immunresponsen. Resultater fra forskning gjort av Dalvin et al., 2020 som så på genuttrykket i hud hos regnbueørret (*O. mykiss*) fant at IL-1 β var det genet som var av høyest oppregulering og var signifikant for alle stadier (2,5,7,10,16,24 og 41 dpi) sammenlignet mot kontroll.

Øvergård et al. (2018) fant en moderat, men signifikant økning av IL-1 β ved festepunktet for lus, resultatene fra det forsøket er interessante for denne oppgaven ettersom det ble benyttet lus i kopepoditt og chalimus I stadiet. I den samme publikasjonen diskuteres det også om en mindre oppregulering av pro-inflammatoriske cytokiner hos chalimus sammenlignet med adulte lus kan være gunstig, ettersom hyperplasi i epitelet sammen med inflammatoriske celle infiltrasjoner noen ganger fullstendig innkapsler lus i chalimus stadiet (A. C. Øvergård et al., 2018). Dette er ikke en like stor utfordring for lus i de senere stadier ettersom de er mer mobile, og vil ikke oppholde seg på samme festepunkt i den grad chalimus gjør. Et unntak er voksne hunnlus som sitter i ro på samme sted over lengre tid, men måten disse fester seg er annerledes og de sekrer i tillegg en større mengde molekyler i fiskens hud (pers. kom. A. C. Øvergård).

IL-8 genuttrykk

IL-8 er også et pro-inflammatorisk cytokin, som tiltrekker seg nøytrofile granulocytter til stedet hvor skaden eller infeksjonen har oppstått (Laing & Secombes, 2004). IL-8 kan produseres av mange ulike celletyper som makrofager og epitelceller, men kan også induseres av faktorer som f.eks. IL-1 β (*Immunobiology*, Murphy and Weaver, 9th edition). IL-8 hadde et relativt genuttrykk på 3,83. Likevel må resultat tas i betraktning av at forskjellen mot kontroll ikke var av statistisk signifikans ($>0,05$). Til tross for et ikke signifikant resultat av T-test, var genuttrykket høyere enn grenseverdiene for oppregulering (MFC $>2,0$). I tillegg utspiller genet også en sentral rolle for inflammasjonen typisk for en slik infeksjon, sånn at det er rimelig å anta at det forekommer en viss grad av oppregulering av IL-8 under infeksjon med lakselus. Tidligere forskning støtter også oppunder at IL-8 oppreguleres under slike infeksjoner som medfører betennelse. Dalvin et al., 2020 fant at pro-inflammatoriske cytokin som TNF- α ikke ble induisert før lusene gjennomgikk skallskifte til chalimus stadiet, og at det også var her IL-1 β og IL-8 var på sitt høyeste.

TNF- α

Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α) er et annet pro-inflammatorisk cytokin, som sammen med IL-6 og IL-1 inducerer akuttfaseresponser, og produseres av makrofager på stedet for inflammasjon (*Immunobiology*, Murphy and Weaver, 9th edition). Resultatet av infisert mot kontroll i det nåværende forsøket var ikke av statistisk signifikans, til tross for at det relative genuttrykket indikerte oppregulering (3,35).

Fast et al., 2006, fant at genuttrykket for TNF- α var signifikant høyere for atlantisk laks infisert med *L. salmonis* ved 9 dpi, 26 dpi og 33 dpi. Dette samsvarer også til dels med resultatene fra dette forsøket selv om verdiene ikke var av statistisk signifikans. Mangel på signifikante verdier for uttrykket av TNF- α virker ikke å ha med at uttrykket av immungenet var for lavt, men at variasjonen i verdiene er for høy til å kunne tilegne dem statistisk signifikans. Det er også forventet å finne oppregulerte verdier av TNF- α ettersom den i likhet med IL-1 β har en sentral rolle i administreringen av inflammasjon. Dalvin et al., 2020 gjorde forsøk på regnbueørret *O. mykiss* når den ble utsatt for *L. salmonis* og så på hvilken påvirkning dette hadde for reguleringen av immungener som f.eks. TNF- α . Resultatene fra det forsøket viste at TNF- α som sagt ikke uttrykte noe særlig tegn til oppregulering før lusene gikk over i chalimus stadiet (7-10 dpi), og deretter gikk veldig tilbake når lusene var i adult stadiet (21 dpi+).

Det ble ikke påvist proteinene for TNF- α i noen av snittene som ble farget immunhistokjemisk. Det kan være flere årsaker til at denne metoden ikke ga noen resultater, ettersom man burde forvente å finne TNF- α i områder med betennelse. Mangel på eller for svak betennelse i forbindelse med immunrespons er også noe som kan være hovedårsaken til de negative resultatene. For å oppnå så tydelige resultater som vist i referansefigurene må det være tydelig tilstedeværelse av betennelse. I disse tilfeller vil man se tydelig rødbrune flekker som tydelig har farget proteinet for TNF- α . Det er godt mulig at betennelsesreaksjonen ikke var kraftig nok i prøvene benyttet i dette forsøket da lus ofte assosieres med svak immunrespons i forhold til skadene og lusetallet var dessuten ikke særlig høyt i disse prøvene. Det var også første gang vi brukte denne teknikken for TNF- α på hud av laks slik at det er mulig den må utbedres ytterligere, og utføres flere ganger før man er sikker på at alle steg i metoden er best mulige for denne hensikten. Negative resultater vil også være et resultat av interesse dersom det kan stadfestes at det er korrekt og ikke et resultat av metodiske feil. Fordi et negativt resultat ville indikert en immunrespons som er så dempet at betennelse ikke forekommer i det hele tatt, og dermed fravær av viktige immungener. Dette er et usannsynlig resultat da det finnes flere publikasjoner på uttrykt immunrespons i hud hos laks ved infeksjon av lakselus. Det er derfor nødvendig å utprøve denne metoden mer, og tilpasse den til man får positive resultater i prøver man vet TNF- α skal være påvist, på denne måten gjøre det mulig å skille mellom falske negative og metodiske feilkilder i resultatene.

Det er begrenset i hvor stor grad resultatene av qPCR kan sammenlignes opp mot resultatene fra den immunhistologiske fargeteknikken for TNF- α , da dataene stammer fra to ulike forsøk. Om prøvene hadde stammet fra samme forsøk og man hadde påvist en høy oppregulering av genet fra qPCR ville sannsynligheten vært mye større for å kunne påvise proteinet for genet immunhistokjemisk.

Det ville vært svært interessant å undersøke tilstedeværelsen av proteinet for flere gener i dette forsøket, dette for å påvise at de faktiske proteinene finnes i vevet. Kun relativt genuttrykk er utilstrekkelig, da det eneste det forteller er at «byggematerialet» for å lage proteinet er til stede.

4.4.2 Anti-inflammatoriske gen

IL-4/13A genuttrykk

IL4/13A er et cytokin som aktivt regulerer inflammasjon, ved at den oppregulerer IL-10 som har anti-inflammatoriske egenskaper og nedregulerer de proinflammatoriske IL1 β og IFN- γ (Wang et al., 2016b).

Det relative genuttrykket for IL-4/13A var oppregulert (2,28) mot kontroll (1), men resultatet var ikke av statistisk signifikans, igjen kan dette være grunnet høy variasjon i resultatene, for få replikater, manglende samplingspunkt som referanse eller andre mulige feilkilder knyttet til forsøket.

I et lignende forsøk gjort på Atlantisk laks infisert med *L. salmonis* var det signifikant oppregulering av IL4/13A 48 døgngader etter infeksjon, på dette punktet var de fleste lus enten i chalimus stadiet eller kopepoditter i skallskifteprosessen, men oppreguleringen økte betraktelig og var på det høyeste 72 døgngader etter infeksjon (A. C. Øvergård et al., 2018). Et annet forsøk utført av Dalvin et al., 2020, viste en signifikant oppregulering av IL4/13A 16 dager etter infeksjon hvor lusen befant seg i preadult I stadiet, mens hverken før eller etter viste det seg noe form for signifikant oppregulering. Lave verdier av IL4/13A under infeksjon med *L. salmonis* er noe som kan indikere en demping av T_H2 immunresponsen (Dalvin et al., 2020).

4.4.3 Immunoglobulin

IgM

Immunoglobulin har en veldig viktig rolle i aktiveringen av komplementsystemet ved at IgM kan aktivere det gjennom den klassiske aktiveringsveien. Dette kommer av at IgM er et antistoff med agglutinerende egenskaper (Boes, 2000). Relativt genuttrykk for infisert fisk mot kontroll var ikke signifikant for IgM i det nåværende forsøket. I forsøket utført av Dalvin et al., 2020, ble det kun observert en signifikant oppregulering av IgM 24 dager etter infeksjon fra prøver på huden hvor lusen ikke har vært til stede (lus negative prøver) sammenlignet mot kontroll. Det ble også gjort funn i det samme forsøket av signifikant, men lav nedregulering av IgM av positive prøver sammenlignet mot kontroll, og i de negative prøvene ble det observert nedregulering kun 41 dager etter infeksjon. I dette forsøket ble det dermed spekulert i om resultatene kan indikere en demping av komplement systemet, adaptiv immunitet og produksjon av nitrogenoksid (Dalvin et al., 2020).

Det kan være flere årsaker til at det ikke var signifikante verdier for oppregulering av IgM det nåværende forsøket. En sannsynlig årsak kan være at lusen i chalimus stadiet demper immunresponsen i større grad for å overleve, men størrelsen på fisken som i dette forsøket er liten, kan også være av betydning. Det kan også være knyttet til for stor variasjon i dataene, eller feil med forsøksoppsettet. Dette er vanskelig å svare på med kun data fra chalimus, og mer data fra flere stadier til lusen ville nok gitt et bedre svar på om dempingen av immunresponsen er stadium avhengig eller om det kan være problemer med forsøket.

IgT

IgT er et teleost spesifikt immunoglobulin som man finner i mucosa til fisken og har en rolle i forbindelse med immunresponsen som antistoff (Zhang et al., 2010). I det nåværende forsøket var det relative genuttrykket for infisert mot kontroll av statistisk signifikans. IgT infisert hadde et gjennomsnittlig relativt genuttrykk på 0,84 mot kontroll (1), . Når forskjellen er så små blir det vanskelig å slå fast om det faktisk har forekommet nedregulering, eller om det er tilfeldig variasjon. Relativt genuttrykk for IgT burde ligge på i det minste under 0,5 MFC om det skulle regnes som signifikant nedregulering. I et forsøk utført av Zhang et al., 2010 ble det sett på immunresponsen til atlantisk laks i forbindelse med det tidlige stadiet av en *L. salmonis* infeksjon. Forsøket til Zhang et al., så blant annet på genuttrykket til IgM, og IgT hvor de fant ikke fant noe særlig signifikant regulering før 10-15 dager etter infeksjon , hvor de begynte å se en gradvis økning av IgM og IgT. En økning av disse immunoglobulinene i hud og milt er noe som kan indikere en tilstedeværelse av adaptive immunresponser i det senere stadiet av infeksjonen (Zhang et al., 2010). Et annet viktig funn de gjorde var en tidlig oppregulering av pIgR, som er et viktig molekyl i forbindelse med transport av immunoglobuliner til mucosale overflater, i tillegg til å ha en rolle i den medfødte immunresponsen samt beskytte immunoglobulin mot proteolytisk degradering (Zhang et al., 2010). Den tidlige oppreguleringen av pIgR kombinert med fraværet av tidlig oppregulering av IgT/IgM kan tyde på at disse har en rolle i immunresponsen som man per i dag ikke vet nok om. Derfor vil videre forskning på funksjonen til disse immunoglobulinene spesielt IgT og pIgR være svært nyttig for å bedre tilpasse fremtidige forsøk på reguleringen av genuttrykket til disse.

4.4.4 Cathelicidin-derived antimicrobial peptide 2 (CATH2)

Er en immunmodulerende og antimikrobiell peptid, som blant annet hemmer IFN γ induerte Th1 responser, og blir selv induert av mikrobiellstimuli, eller induert i milten i respons av en luseinfeksjon hos atlantisk laks (Skugor et al., 2008).

Núñez-Acuña, G. et al. (2018) fant at *L. salmonis* kan oppdage CATH 2, som er et vannløselig peptid skilt ut fra huden til laks, og som utløser endret svømmeatferd hos kopepoditter eksponert for dette peptidet. I tillegg var gen som påvirker det sensoriske systemet hos lusen oppregulert når kopepodittene ble eksponert for det samme peptidet. Noe de konkluderte med indikerer en tett kobling mellom peptidet hos laks og det kjemikaliesensoriske systemet hos lakselus. I det nåværende forsøket var Cath2 signifikant oppregulert for infisert med et relativt genuttrykk på 6,42 mot kontroll. Dalvin et al., 2020 fant en moderat men signifikant oppregulering for alle prøvetakingspunkt i forsøket for cath2 i hud med unntak av den siste da all lusen på fisken befant seg i adult stadiet. Oppreguleringen var mye tydeligere i festepunktet hvor lusen hadde vært, sammenlignet med prøver av huden hvor lusen ikke har vært, men kun signifikant for enkelte stadier uten sammenheng. I det samme forsøket ble det observert en sammenheng mellom uttrykket av IL6 og Cath2, som tyder på at Cath2 i tillegg til å fungere som antimikrobielt peptid også har en funksjon i inflammasjonsresponsen (Dalvin et al., 2020)(Bridle, Nosworthy, Polinski, & Nowak, 2011). Det blir videre diskutert Cath2 sin rolle i å stimulere *L. salmonis*, blant annet blir det antydnet at peptidet kan brukes som et signalmolekyl av lusen til å finne en egnet vert å parasittere og/eller opprettholdelse av infestasjonen (Dalvin et al., 2020).

I det nåværende forsøket ble det som sagt observert en signifikant oppregulering av cath2 hos fisk infisert med lus i chalimus stadiet. Dette kan knyttes til en mulig rolle cath2 kan ha i stimuleringen av parasittens frontalfilament og uttrykking av gener assosiert med skallskifte som observert av Bridle et al., 2011, som fant et samspill mellom Cath2 hos atlantisk laks og *Caligus rogercresseyi* knyttet til disse funksjonene.

4.4.5 Inducible nitric oxide synthase (Inos)

Inos funksjon er å syntetisere nitrogenoksid som fungerer som et antimikrobielt molekyl og uttrykking av Inos blir regulert av cytokiner som IL-1 β og TNF- α (Bogdon, 2001, notert av Braden et al., 2012). Man kan observere en oppregulering av Inos allerede 48 timer etter infeksjon på festestedet til *L. salmonis* (Braden et al., 2012). Likevel har det ikke lyktes noen å finne at Inos har en definert rolle mot luseinfeksjoner, til tross for økte nivåer av IL-1 β og TNF- α i huden ved en *L. salmonis* infeksjon (Braden et al., 2012). I det nåværende forsøket var Inos det eneste immunogenet som hadde et signifikant nedregulert relativt genuttrykk (under 0,5). I forsøket til Holm et al., 2017 gjort på huden til Atlantisk laks med *L. salmonis* i de yngre stadiene fikk samme resultat hvor Inos var signifikant og nedregulert i høy grad. Det at det ble benyttet lus i tilsvarende stadier i forsøket som er referert som det er brukt i nåværende forsøk gjør at disse resultatene er mer sammenlignbare. Det ser ut til at Inos blir signifikant nedregulert uavhengig av størrelse og alder på fisk, og at lakselus i selv yngre stadier kan ha en dempende effekt på denne delen av immunresponsen. Det er likevel behov for ytterligere forskning på interaksjonen mellom Inos og lakselus da Inos ikke har en kjent rolle ved slike infeksjoner.

4.4.6 Matrix metalloproteinase (MMP9)

Matrix metalloproteinase er en endopeptidase, som tilhører en gruppe enzymer i stand til å bryte ned alle typer ekstracellulære matrix proteiner. De kan også være involvert i en lang rekke prosesser som kløyving og aktivering av cytokiner, utgivelse av cytokiner og vekstfaktorer fra ekstracellulær matrix og opprette en gradient for migrasjon av celler (Skugor et al., 2008).

Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) er en svært viktig komponent knyttet til re-modellering av vev og sårheling. Oppregulering av MMP9 har vist seg å være direkte knyttet til nylig infeksjon av Laksleus etterfulgt av en andre oppregulering rundt perioden lusen går over i den mobile fasen da sårheling responsen går fra akutt fase over til kronisk (Carvalho et al., 2020; Fast, 2014; Skugor et al., 2008).

Resultatene i det nåværende forsøket viste at MMP9 hadde et relativt genuttrykk på 2,39 som indikerer oppregulering, men dette resultatet var ikke av statistisk signifikans. Dette kan komme av som nevnt tidligere for høy variasjon i resultatene, feil med forsøksoppsettet eller feil med hvordan dataen behandles.

Skugor, Glover, Nilsen, & Krasnov, 2008 fant en signifikant oppregulering av MMP i takt med alder på lusen i flere vev inkludert hud. De satte dette funnet i sammenheng med at også flere gen var

oppregulert og konkluderte med at en parasittinfeksjon med lakselus fører til en kombinasjon av kronisk stress, begrenset sårheling og immunomodulering hos fisken. Braden et al., 2015 fant en lokal og signifikant oppregulering av flere pro-inflammasjonsgener hos Atlantisk laks infisert med adulte lakselus blant annet IL-1 β , IL-8 og TNF α i tillegg til enzymer knyttet til vevsreparasjon som MMP9 og MMP13. Chalimus er som nevnt på grunn av sin mangel på mobilitet ekstra utsatt for sårheling. Det kan derfor tenkes at lakselusen i dette stadiet vil ha større nytte av å dempe uttrykket av enzymer knyttet sårheling og vevsreparasjon. Mangel på signifikante resultater i dette forsøket, i tillegg til begrenset forskning på lus i chalimus stadiet gjør det imidlertid vanskelig å konkludere med forskjeller på genuttrykket til MMP9 hos adulte lus mot de yngre stadiene.

4.5 Histologi

Snitt av infisert hud var tiltenkt å benyttes til å se på histopatologien i festepunktet til lakselusen for å sammenligne det mot snitt av uinfisert hud. Det var likevel begrenset med hvor mye informasjon det gikk an å hente fra snittene som er presentert i oppgaven. Hovedårsaken er at det ble kun laget et fåtall snitt, spesielt for kontroll, men det var også mangel på gode infiserte snitt. I tillegg var kvaliteten på flere av disse veldig dårlig som følge av manglende erfaring på preparering og håndtering av vevet. Lakselusen har i tillegg kun parasittert verten i en kort periode i de sene stadiene, noe som vil ha stor betydning for hvor mye skade den rekker å gjøre innen sampling. For å kunne konkludere med om snittene man observerer viser tegn til hyperplasi eller lignende er det svært viktig å ha mange snitt både tatt fra samme område fra både infisert og kontrollfisk. I tillegg bør resultatene for infisert og kontroll sammenlignes snitt fra flere fisk så man er sikker på at størrelsen på vevet er forstørret hos infisert fisk. Å karakterisere vev er derfor en komplisert oppgave, og langt flere snitt samt bedre kvalitet er nødvendig for å bestemme klinikk.

4.6 Oppsummering

7 immungener var oppregulert, hvor Cath2 var eneste som ga resultater av statistisk signifikans, Inos var signifikant nedregulert. Det var ingen korrelasjon for noen av immungenene for intensitet av infeksjon og uttrykket av genet. Resultatet for plasmakortisolnivå indikerte en svak korrelasjon med intensiteten av infeksjonen, mens korrelasjonen var litt tydeligere for dødelighet, men dataen er ikke god nok til å trekke en endelig konklusjon. En mulig årsak til manglende korrelasjon mellom genuttrykk og intensitet kan være at prøvetakningsmetoden brukt i dette forsøket gir en indikasjon på den lokale immunresponsen, og gir i mindre grad indikasjon for immunresponsen i resten av kroppen. Man vet at immunrespons i form av mobilisering av diverse molekyler involvert, samt sårheling og det som følger med er en krevende prosess for fisken. Slik at jo flere områder denne responsen finner sted, desto større innvirkning har dette på kroppen til fisken som helhet, og immunsystemet er i større grad aktivert. Det er derfor et logisk resultat, at den lokale immunresponsen forholdsvis vil være tilnærmet lik, uavhengig av hvor mange lus som finnes på fisken. Samtidig vil en høyere intensitet kreve flere lokale immunresponser slik at den samlede responsen er høyere og mer krevende på fisken i form av dødelighet/stress.

4.7 Konklusjoner

Basert på hypotesene som danner utgangspunktet for oppgaven, resultatene, diskusjon og sammenligning mot tidligere forskning kan følgende konklusjoner dras:

1. Fisk infisert med *L. salmonis* viste signifikant oppregulering for Cath2 sammenlignet mot uinfisert kontrollfisk.

IL4/13A, MMP9, IgM, IL-1 β , IL-8 og TNF- α Var oppregulert (relativt genuttrykk >2,0), men resultatene for disse var ikke av statistisk signifikans ($P > 0,05$).

2. Fisk infisert med *L. salmonis* hadde signifikant nedregulering av Inos sammenlignet mot uinfisert kontrollfisk.

IgT hadde relativt genuttrykk lavere enn kontroll og resultatet var av statistisk signifikans ($P < 0,05$), men forskjellen fra kontroll var så liten (ikke under 0,5) at det ikke kan anses som nedregulert.

3. Ingen at immungenene viste tegn til korrelasjon med intensiteten på infeksjonen, og derav kan man anta at lokal immunrespons påvirkes i liten grad av omfanget på infestasjonen.

4. Manglende kvantitet og kvalitet på snitt av uinfisert og infisert fisk, farget med HES, gjorde det vanskelig å påvise de histologiske forandringene i festepunktet i forbindelse med en infestasjon av lakselus.

5. Ingen av hudsnittene farget for proteinet av TNF- α viste positive resultater for tilstedeværelsen av dette proteinet.

Begrenset antall replikater og andre feilkilder både metodiske og teoretisk oppsett knyttet til forsøket kan likevel ha hatt betydning for resultatene, og videre forskning med utbedringer vil derfor være nødvendig for å dra endelige konklusjoner.

4.8 Videre forskning

Om forsøket skulle gjentas eller om det skulle blitt gjort lignende forsøk ville det vært interessant å gjøre enkelte utbedringer i forsøksoppsettet, hatt flere replikater og brukt flere metoder for alle prøver. Listen under oppsummerer et par slike eksempler på endringer. Noen av punktene under er kun mangler som gjelder resultatene i denne oppgaven, dataen stammer fra et forsøk hvor flere av disse punktene er på plass ettersom det forsøket har mer data.

- Data fra alle stadier til lus for å sammenligne om forskjeller på immunresponsen også er avhengig av stadiet.
- Data fra flere vektgrupper for å se om fiskens størrelse har betydning for immunresponsen.
- Immunhistokjemiske undersøkelser for tilstedeværelsen av proteinet til flere gener, slik det ble gjort for TNF- α , for å påvise mer enn bare byggematerialet for de ulike genene.
- En mer utbedret immunhistokjemisk metode for påvisning av proteiner av immungener i hud, slik at man vet om resultatene er konkluderende.
- For histologidelen burde man ha mange flere snitt, eksempel benytte seriesnitting, slik at man har mye flere snitt fra samme sted, fra mange flere individer både for kontroll og infisert fisk. På denne måten blir det enklere å tyde forskjeller.
- Studere flere immungener knyttet til immunresponsen eller med ukjent funksjon. I tillegg til å finne mer ut om rollen til hvert enkelt gen (f.eks. Inos) for å kunne tilpasse fremtidige metoder for prøvetakning bedre til disse.

Referanser:

- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. In *Integrative and Comparative Biology* (Vol. 42, pp. 517–525). Society for Integrative and Comparative Biology. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology*, 37(18), 1141–1149. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00025-6)
- Braden, L. M., Barker, D. E., Koop, B. F., & Jones, S. R. M. (2012). Comparative defense-associated responses in salmon skin elicited by the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 7(2), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2011.12.002>
- Braden, L. M., Koop, B. F., & Jones, S. R. M. (2015). Signatures of resistance to *Lepeophtheirus salmonis* include a TH2-type response at the louse-salmon interface. *Developmental and Comparative Immunology*, 48(1), 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.015>
- Braden, L. M., Monaghan, S. J., & Fast, M. D. (2020a). Salmon immunological defence and interplay with the modulatory capabilities of its ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Parasite Immunology*, 42(8). <https://doi.org/10.1111/pim.12731>
- Braden, L. M., Monaghan, S. J., & Fast, M. D. (2020b). Salmon immunological defence and interplay with the modulatory capabilities of its ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *Parasite Immunology*, 42(8), e12731. <https://doi.org/10.1111/pim.12731>
- Bridle, A., Nosworthy, E., Polinski, M., & Nowak, B. (2011). Evidence of an Antimicrobial-Immunomodulatory Role of Atlantic Salmon Cathelicidins during Infection with *Yersinia ruckeri*. *PLoS ONE*, 6(8), e23417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023417>
- Carvalho, L. A., Whyte, S. K., Braden, L. M., Purcell, S. L., Manning, A. J., Muckle, A., & Fast, M. D. (2020). Impact of co-infection with *Lepeophtheirus salmonis* and *Moritella viscosa* on inflammatory and immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases*, 43(4), 459–473. <https://doi.org/10.1111/jfd.13144>
- Dalvin, S., Eichner, C., Dondrup, M., & Øvergård, A.-C. (2021). Roles of three putative salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) prostaglandin E2 synthases in physiology and host–parasite interactions. *Parasites & Vectors*, 14(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04690-w>
- Dalvin, S., Jørgensen, L. v. G., Kania, P. W., Grotmol, S., Buchmann, K., & Øvergård, A. C. (2020). Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* skin responses to salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: From copepodid to adult stage. *Fish and Shellfish Immunology*, 103, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.014>
- Dash, S., Das, S. K., Samal, J., & Thatoi, H. N. (2018, March 1). Epidermal mucus, a major determinant in fish health: A review. *Iranian Journal of Veterinary Research*. Shiraz University. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4849>
- Dinarello, C. A. (1996, March 15). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.6.2095.bloodjournal8762095>
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory Cytokines - CHEST. Retrieved November 19, 2020, from [https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(15\)51814-X/fulltext](https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(15)51814-X/fulltext)
- Eichner, C., Hamre, L. A., & Nilsen, F. (2015). Instar growth and molt increments in *Lepeophtheirus*

- salmonis (Copepoda: Caligidae) chalimus larvae. *Parasitology International*, 64(1), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.006>
- Eichner, C., Øvergård, A. C., Nilsen, F., & Dalvin, S. (2015). Molecular characterization and knock-down of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) prostaglandin E synthase. *Experimental Parasitology*, 159, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.09.001>
- Fast, M. D., Burka, J. F., Johnson, S. C., & Ross, N. W. (2003). ENZYMES RELEASED FROM LEPEOPHTHEIRUS SALMONIS IN RESPONSE TO MUCUS FROM DIFFERENT SALMONIDS. *Journal of Parasitology*, 89(1), 7–13. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0007:ERFLSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0007:ERFLSI]2.0.CO;2)
- Fast, M. D., Muise, D. M., Easy, R. E., Ross, N. W., & Johnson, S. C. (2006). The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, 21(3), 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.010>
- Finstad, B. (n.d.). *Økologiske og fysiologiske konsekvenser av lus på laksefisk i fjordsystemer*. Retrieved from <http://www.nina.no>
- Folmar, L. C., & Dickhoff, W. W. (1980, September 1). The parr—Smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids: A review of selected literature. *Aquaculture*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90123-4)
- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M. A., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., ... Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLoS ONE*, 8(9), e73539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin Isotypes in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166–177. <https://doi.org/10.3390/biom5010166>
- Johnson, S. C., & Albright, L. J. (n.d.). *The developmental stages of Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae)*. Retrieved from www.nrcresearchpress.com
- Johnson, S. C., & Albright, L. J. (1992). Effects of cortisol implants on the susceptibility and the histopathology of the responses of naive coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, 195–205. <https://doi.org/10.3354/dao014195>
- Krasnov, A., Skugor, S., Todorčević, M., Glover, K. A., & Nilsen, F. (2012). Gene expression in Atlantic salmon skin in response to infection with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*, cortisol implant, and their combination. *BMC Genomics*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-130>
- Laing, K. J., & Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5), 443–460. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>
- Mashoof, S., & Criscitiello, M. F. (2016, December 1). Fish immunoglobulins. *Biology*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>
- Núñez-Acuña, G., Gallardo-Escárate, C., Fields, D. M., Shema, S., Skiftesvik, A. B., Ormazábal, I., & Browman, H. I. (2018). The Atlantic salmon (*Salmo salar*) antimicrobial peptide cathelicidin-2 is a molecular host-associated cue for the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31885-6>
- Øvergård, A.-C., Hamre, L. A., Harasimczuk, E., Dalvin, S., Nilsen, F., & Grotmol, S. (2016). Exocrine glands of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae): Distribution, developmental

- appearance, and site of secretion. *Journal of Morphology*, 277(12), 1616–1630.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20611>
- Øvergård, A. C., Hamre, L. A., Grotmol, S., & Nilsen, F. (2018). Salmon louse rhabdoviruses: Impact on louse development and transcription of selected Atlantic salmon immune genes. *Developmental and Comparative Immunology*, 86, 86–95.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.023>
- Quinn, T. P. (1993). A review of homing and straying of wild and hatchery-produced salmon. *Fisheries Research*, 18(1–2), 29–44. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(93\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0165-7836(93)90038-9)
- Skugor, S., Glover, K. A., Nilsen, F., & Krasnov, A. (2008). Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-498>
- Tadiso, T. M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., & Nilsen, F. (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC Genomics*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-141>
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (n.d.). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Wang, T., Johansson, P., Abós, B., Holt, A., Tafalla, C., Jiang, Y., ... Secombes, C. J. (2016a). First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities. *Oncotarget*, 7(10), 10917–10946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7295>
- Wang, T., Johansson, P., Abós, B., Holt, A., Tafalla, C., Jiang, Y., ... Secombes, C. J. (2016b). First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities. *Oncotarget*, 7(10), 10917–10946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7295>
- Wikel, S. K. (1999). Modulation of the Host Immune System by Ectoparasitic Arthropods. *BioScience*, 49(4), 311–320. <https://doi.org/10.2307/1313614>
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., ... Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11(9), 827–835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>

C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik (2001) Garland Publishing, New York (2001)
 Janeway et al., (2001) *Immunobiology*

Murphy and Weaver, *immunobiology* 9th edition

Appendix A – Resultater av t-test for qPCR

Mean Fold Change og standardfeil (SE) for kontroll

Gen	Mean Fold Change	SE
	Kontroll	
CATH2	1	0.6398512
IL4/13A	1	0.2947205
INOS	1	0.75121484
MMP9	1	0.7650473
IgM	1	0.5480366
IgT	1	0.6329154
IL1B	1	0.713365
IL8	1	0.7455655
TNFalpha	1	0.7043135

Resultat t-test infisert mot kontroll

Gen	Mean Fold Change	SE	P-verdi	T-verdi	df
	Infisert mot kontroll				
CATH2	6.420270	1.1166540	0.01429	-2.7188	17.564
IL4/13A	2.285002	0.3930375	0.08173	-1.8502	17.009
INOS	0.448339	0.08562698	0.003138	3.3343	21,06
MMP9	2.389023	0.7772535	0.7907	-0.26961	17.159
IgM	2.786701	0.8394168	0.3445	-0.96939	19.072
IgT	0.8399194	0.2923016	0.03686	2.2322	20.58
IL1B	3.660575	0.8895391	0.1502	-1.4799	27.706
IL8	3.829464	1.0600332	0.4829	-0.70922	34.946
TNFalpha	3.352936	1.0618547	0.2251	-1.2619	15.991

Appendix B – CT verdier qPCR

CT-verdier referansegen

Behandling	Prøvenavn	RPL1	EF1A	Gjennomsnitt referansegen
Infisert	ACH2_1	26,2634449	16,4174652	21,3404551
Infisert	ACH2_4	27,1312561	17,8964901	22,51387310
Infisert	ACH2_11	23,9734936	16,7749176	20,3742056
Infisert	CCH2_2	24,2569637	17,4428864	20,849925
Infisert	BCH2_6	23,8864212	15,6470308	19,766726
Infisert	CCH2_8	24,527914	17,5443134	21,0361137
Infisert	ECH2_6	23,7636547	16,8365192	20,300087
Infisert	CCH2_13	24,4300919	17,5006771	20,9653845
Infisert	ACH2_3	23,1044254	16,3255901	19,7150078
Infisert	BCH2_11	23,6897354	15,8019276	19,7458315
Infisert	DCH2_7	24,1873875	17,0721283	20,6297579
Infisert	ACH2_7	22,9137955	16,421217	19,6675062
Infisert	CCH2_1	23,0321445	16,051239	19,5416918
Infisert	ACH2_12	23,0193405	16,554409	19,7868748
Infisert	CCH2_7	22,1190948	15,2453089	18,6822019
Infisert	ECH2_7	23,5406227	16,3574944	19,9490585
Infisert	ECH2_7	22,7453861	15,344573	19,0449796
Infisert	BCH2_12	24,97493935	15,87483978	20,42488956
Infisert	ACH2_5	23,82243729	17,15365028	20,48804379
Infisert	BCH2_14	22,97836876	15,29023457	19,13430166
Infisert	DCH2_9	25,04995728	17,54303741	21,29649734
Infisert	ACH2_9	24,80245781	17,73557472	21,26901627
Infisert	CCH2_3	22,91658783	15,93518734	19,42588758
Infisert	CCH2_9	22,98220444	16,34766006	19,66493225
Infisert	CCH2_5	23,95533180	16,20475578	20,08004379
Infisert	BCH2_10	22,63361740	15,78977203	19,21169472
Infisert	DCH2_8	23,60604477	17,35099792	20,47852135
Infisert	BCH2_15	21,77166748	16,19285965	18,98226357
Kontroll	BCH2_3	26,1086884	16,3609886	21,2348385
Kontroll	DCH2_1	23,990139	16,5857964	20,2879677
Kontroll	BCH2_1	24,3753357	16,4993916	20,4373636
Kontroll	DCH2_3	23,8570099	16,2580299	20,0575199
Kontroll	ECH2_1	26,43537331	17,09239197	21,76388264
Kontroll	DCH2_4	29,44291687	19,20947647	24,32619667
Kontroll	BCH2_4	22,94579506	16,65912819	19,80246162
Kontroll	ECH2_4	23,25567436	16,44929123	19,85248280
Kontroll	DCH2_5	26,61186790	18,41760254	22,51473522
Kontroll	ECH2_3	25,44010735	17,15252113	21,29631424
Kontroll	ECH2_2	23,77936935	18,02453613	20,90195274
Kontroll	BCH2_5	23,86779213	15,92353439	19,89566326
Gjennomsnitt		25,0091724	17,052724	21,0309482

CT-verdier Pro-inflammatoriske gen

Behandling	Prøvenavn	IL1B	IL8	TNFalpha
Infisert	ACH2_1	27,5136967	27,7963352	NA
Infisert	ACH2_4	27,9706249	27,4752235	28,7700176
Infisert	ACH2_11	26,2865639	26,2198715	29,6884727
Infisert	CCH2_2	24,3551083	23,4222984	28,3250484
Infisert	BCH2_6	23,40438080	22,1983833	27,3535652
Infisert	CCH2_8	17,9814835	21,732626	27,4628811
Infisert	ECH2_6	21,500246	21,7356205	26,4731789
Infisert	CCH2_13	22,81338310	22,4528255	28,0541401
Infisert	ACH2_3	25,9313374	26,3717976	29,7636375
Infisert	BCH2_11	25,9694004	22,3097801	27,4204826
Infisert	DCH2_7	21,1994801	21,5025234	24,8884411
Infisert	ACH2_7	27,1780548	24,3533459	28,6436863
Infisert	CCH2_1	22,9462414	21,3051395	29,3740864
Infisert	ACH2_12	25,789938	25,7674484	30,8985958
Infisert	CCH2_7	20,0297985	16,5825691	27,0307503
Infisert	ECH2_7	23,817915	24,7663441	30,6810837
Infisert	ECH2_7	23,817915	24,7663441	29,6048527
Infisert	BCH2_12	21,80367470	19,64652252	NA
Infisert	ACH2_5	24,96465111	26,82088852	28,35380936
Infisert	BCH2_14	23,05948067	23,34419823	26,11947632
Infisert	DCH2_9	22,03328133	21,71997070	27,96033478
Infisert	ACH2_9	28,31193924	27,86487961	30,38206291
Infisert	CCH2_3	23,38185120	20,98038483	27,41965294
Infisert	CCH2_9	22,25873756	21,23764038	26,56434441
Infisert	CCH2_5	23,40174866	22,77936554	28,06739616
Infisert	BCH2_10	21,89688683	21,81572914	25,54728699
Infisert	DCH2_8	24,83361053	32,80709839	29,70335770
Infisert	BCH2_15	23,09515381	24,40233803	26,91895103
Kontroll	BCH2_3	24,6335754	24,7416229	NA
Kontroll	DCH2_1	26,1000309	25,9130878	28,13221550
Kontroll	BCH2_1	26,9727077	26,6343155	28,2020779
Kontroll	DCH2_3	27,32271	25,5014114	32,2299652
Kontroll	ECH2_1	23,34070206	22,54514885	NA
Kontroll	DCH2_4	28,49714088	27,98590660	30,95131683
Kontroll	BCH2_4	25,94224358	24,98406982	27,07397079
Kontroll	ECH2_4	24,98680496	24,71925926	27,52098083
Kontroll	DCH2_5	27,51674843	26,10338593	32,03568649
Kontroll	ECH2_3	23,53192329	22,96396255	27,70508385
Kontroll	ECH2_2	24,19911003	23,45600700	28,89592552
Kontroll	BCH2_5	24,87851524	24,17499733	29,55777168
Gjennomsnitt		25,6601844	24,9769313	29,2304995

CT-verdier Anti-inflammatoriske gen

Behandling	Prøvenavn	IL-4/13A
Infisert	ACH2_1	NA
Infisert	ACH2_4	NA
Infisert	ACH2_11	27,9444084
Infisert	CCH2_2	26,9908772
Infisert	BCH2_6	24,1714764
Infisert	CCH2_8	27,3648434
Infisert	ECH2_6	23,9439068
Infisert	CCH2_13	26,5920353
Infisert	ACH2_3	24,5037308
Infisert	BCH2_11	26,0860558
Infisert	DCH2_7	27,8121662
Infisert	ACH2_7	25,2497711
Infisert	CCH2_1	25,7067184
Infisert	ACH2_12	23,7033825
Infisert	CCH2_7	22,0391121
Infisert	ECH2_7	25,470747
Infisert	ECH2_7	25,470747
Infisert	BCH2_12	NA
Infisert	ACH2_5	26,29857635
Infisert	BCH2_14	25,91818428
Infisert	DCH2_9	27,26661491
Infisert	ACH2_9	28,22296143
Infisert	CCH2_3	24,35132980
Infisert	CCH2_9	24,92247009
Infisert	CCH2_5	25,88037109
Infisert	BCH2_10	23,60106850
Infisert	DCH2_8	28,38577843
Infisert	BCH2_15	23,98394585
Kontroll	BCH2_3	NA
Kontroll	DCH2_1	27,3979931
Kontroll	BCH2_1	26,6140976
Kontroll	DCH2_3	27,853096
Kontroll	ECH2_1	NA
Kontroll	DCH2_4	NA
Kontroll	BCH2_4	26,03513908
Kontroll	ECH2_4	25,96383095
Kontroll	DCH2_5	29,81049538
Kontroll	ECH2_3	26,53193092
Kontroll	ECH2_2	25,63856125
Kontroll	BCH2_5	26,53337097
Gjennomsnitt		26,9309461

CT-verdier immunoglobuliner

Behandling	Prøvenavn	IgM	IgT
Infisert	ACH2_1	28,0051231	38,4301643
Infisert	ACH2_4	24,7351589	31,9028702
Infisert	ACH2_11	26,9697056	32,0204849
Infisert	CCH2_2	28,9692669	33,9290314
Infisert	BCH2_6	26,1596947	34,5742912
Infisert	CCH2_8	28,9112396	32,1868172
Infisert	ECH2_6	26,2981167	33,9044685
Infisert	CCH2_13	27,0334454	34,6942635
Infisert	ACH2_3	24,363266	33,0796928
Infisert	BCH2_11	26,2622795	33,0769043
Infisert	DCH2_7	26,3528862	33,6294327
Infisert	ACH2_7	23,5422363	34,2713509
Infisert	CCH2_1	29,9063931	33,6336594
Infisert	ACH2_12	23,9225826	31,8293209
Infisert	CCH2_7	23,9073334	35,2412758
Infisert	ECH2_7	26,1058598	31,910038
Infisert	ECH2_7	26,1058598	31,910038
Infisert	BCH2_12	NA	32,63302231
Infisert	ACH2_5	23,98190689	33,98286819
Infisert	BCH2_14	25,34961891	32,44807053
Infisert	DCH2_9	27,54617119	30,44378090
Infisert	ACH2_9	26,58209801	35,94664764
Infisert	CCH2_3	25,55182266	32,91997910
Infisert	CCH2_9	27,02147865	34,02915192
Infisert	CCH2_5	27,37196732	37,18108368
Infisert	BCH2_10	25,46844482	31,46933746
Infisert	DCH2_8	27,30396271	NA
Infisert	BCH2_15	24,70878601	31,97976685
Kontroll	BCH2_3	29,3254662	30,783968
Kontroll	DCH2_1	27,354847	31,9398022
Kontroll	BCH2_1	25,3451996	34,907093
Kontroll	DCH2_3	29,6258125	35,0368843
Kontroll	ECH2_1	25,84035110	33,05071640
Kontroll	DCH2_4	28,91347885	34,92987442
Kontroll	BCH2_4	25,22020912	33,60736847
Kontroll	ECH2_4	26,86950874	33,03798676
Kontroll	DCH2_5	29,65439987	31,48053932
Kontroll	ECH2_3	26,75005913	32,05923462
Kontroll	ECH2_2	28,57622719	31,13329506
Kontroll	BCH2_5	28,98981667	32,38576126
Gjennomsnitt		27,705448	32,8627103

CT-verdier gen uten felles kategori

Behandling	Prøvenavn	INOS	MMP9	CATH2
Infisert	ACH2_1	28,3183212	NA	21,9623089
Infisert	ACH2_4	27,1634827	23,2832527	22,76372910
Infisert	ACH2_11	28,5120716	22,2294922	19,9647446
Infisert	CCH2_2	29,0631027	21,5589409	19,8139038
Infisert	BCH2_6	31,3749199	22,158596	19,7179279
Infisert	CCH2_8	29,5147152	20,7846336	19,2888985
Infisert	ECH2_6	25,9965992	18,9663467	19,0115223
Infisert	CCH2_13	29,765255	20,1454945	18,5805187
Infisert	ACH2_3	26,9016838	23,1771584	20,8381805
Infisert	BCH2_11	27,5373535	20,9116077	20,0001068
Infisert	DCH2_7	25,9349022	20,2317791	20,1225109
Infisert	ACH2_7	26,2502689	23,366024	20,6862907
Infisert	CCH2_1	26,6468945	23,3275261	22,5037708
Infisert	ACH2_12	26,4720078	23,5675812	22,9034386
Infisert	CCH2_7	26,5983582	18,2799416	16,9729614
Infisert	ECH2_7	26,4316673	21,71041870	20,2815895
Infisert	ECH2_7	26,4316673	21,71041870	20,2815895
Infisert	BCH2_12	30,05743980	21,98940086	18,37286949
Infisert	ACH2_5	25,13998604	23,60077477	23,27915192
Infisert	BCH2_14	25,68177223	20,41212463	20,18683434
Infisert	DCH2_9	26,56435394	18,38705635	19,20119095
Infisert	ACH2_9	27,69843102	24,93587494	23,75232697
Infisert	CCH2_3	25,44949150	20,00817108	17,31397438
Infisert	CCH2_9	28,39409256	20,58120728	18,87335014
Infisert	CCH2_5	27,29925156	22,36113358	19,77928734
Infisert	BCH2_10	28,92033195	20,50714111	19,72892189
Infisert	DCH2_8	27,92200661	21,65632820	23,07683372
Infisert	BCH2_15	24,37052155	20,77901268	16,62824059
Kontroll	BCH2_3	26,9509773	20,8914757	21,6617603
Kontroll	DCH2_1	27,0693588	24,278368	25,7595921
Kontroll	BCH2_1	27,9657974	21,8461475	23,8402977
Kontroll	DCH2_3	26,128006	24,7468338	24,9761238
Kontroll	ECH2_1	24,04467964	20,10806274	21,01151848
Kontroll	DCH2_4	27,15486336	27,15628815	27,76412010
Kontroll	BCH2_4	26,93687439	19,36781693	20,49715996
Kontroll	ECH2_4	25,00491905	20,81559753	21,04758453
Kontroll	DCH2_5	28,93996048	26,76708984	24,85158157
Kontroll	ECH2_3	25,80072403	20,39560699	20,52849960
Kontroll	ECH2_2	24,74920654	20,69610977	20,63499069
Kontroll	BCH2_5	26,02468109	22,89124298	21,81826591
Gjennomsnitt		26,397504	22,49672	22,8659579

Appendix C - Syntax brukt i R studios

Syntax for å lage figurer i R studio

```
##kopier excel data fra fold change
```

```
> lus.df<-read.table("clipboard", header=T, na.string=NA)
```

```
> attach(lus.df)
```

```
> names(lus.df)
```

```
> library(plyr)
```

```
> library(nlme)
```

```
> lus1.df<-ddply(lus.df, c("Behandling"), summarise, N=sum(!is.na(GEN_NAVN)),  
mean=mean(CATH_2_SYBR, na.rm=TRUE), sd=sd(GEN_NAVN, na.rm=TRUE), se=sd/sqrt(N))
```

```
> lus1.df
```

```
##Endrer kontroll verdier til 1,0 og fjerner SD, kopier ny data.
```

```
> lus.df<-read.table("clipboard", header=T)
```

```
> lus.df
```

```
> library (ggplot2)
```

```
> ggplot(lus.df, aes(x=Behandling, y=gjennomsnitt))+geom_errorbar(aes(ymin=gjennomsnitt-se,  
ymax=gjennomsnitt+se),col="Black", width=0.4,  
size=0.8)+geom_hline(yintercept=1)+geom_col(data=lus.df,  
width=0.6)+theme(axis.title=element_text(size=16), plot.title=element_text(hjust= 0.5,  
size=18),panel.background=element_rect(fill="white"),panel.border=element_rect(colour="black",  
fill=NA,  
size=0.2),panel.grid.minor=element_blank(),panel.grid.major=element_blank()+xlab("Dose")+ylab("  
Relativt Genuttrykk")+ggtitle("GEN_NAVN")
```

Syntax for t-test

```
##Kopier data for DeltaCT verdier
```

```
> lus.df<-read.table("clipboard", header=T, na.string=NA)
```

```
> attach(lus.df)
```

```
> names(lus.df)
```

```
> lus1.df<-ddply(lus.df, c("Behandling"), summarise, N=sum(!is.na(GEN_NAVN)),  
mean=mean(CATH_2_SYBR, na.rm=TRUE), sd=sd(GEN_NAVN, na.rm=TRUE), se=sd/sqrt(N))
```

```
> lus1.df
```

```
> t.test(GEN_NAVN~Behandling,data=lus.df)
```

Appendix D - Rådata av lusetall, vekt og plasmakortisol for 75 fisk fra sampling 24.02.2020

Behandling	10dpi lus		Kortisol ng/ml
	totalt	10dpi. Vekt	
Kontroll	0	48	55,3
Kontroll	0	55	127,4
Kontroll	0	48	98,6
Kontroll	0	46	84,9
Kontroll	0	39	91,4
Kontroll	0	43	192,0
Kontroll	0	42	127,4
Kontroll	0	55	94,7
Kontroll	0	97	184,0
Kontroll	0	47	341,0
Kontroll	0	58	146,2
Kontroll	0	49	102,3
Kontroll	0	53	169,5
Kontroll	0	46	176,5
Kontroll	0	54	101,2
Infisert	23	41	236,1
Infisert	16	37	166,1
Infisert	22	41	165,0
Infisert	18	56	187,9
Infisert	28	33	179,0
Infisert	56	46	150,8
Infisert	72	45	337,5
Infisert	31	43	175,3
Infisert	50	48	268,2
Infisert	89	53	161,8
Infisert	1	45	49,0
Infisert	1	48	62,8
Infisert	1	41	22,4
Infisert	2	43	144,4
Infisert	1	38	24,8
Infisert	26	46	170,6
Infisert	39	53	199,1
Infisert	32	47	163,9
Infisert	37	42	232,3
Infisert	43	40	189,3
Infisert	76	48	283,2
Infisert	61	49	234,2
Infisert	69	40	417,2
Infisert	58	51	324,0
Infisert	54	37	273,1
Infisert	30	103	142,6
Infisert	8	52	223,2
Infisert	28	62	205,1

Infisert	21	35	172,9
Infisert	14	55	165,0
Infisert	2	43	172,9
Infisert	2	47	180,2
Infisert	2	44	133,5
Infisert	4	49	156,7
Infisert	4	50	171,8
Infisert	0	43	123,1
Infisert	1	49	263,5
Infisert	2	49	137,5
Infisert	2	44	163,9
Infisert	0	55	288,4
Infisert	9	41	221,5
Infisert	28	54	223,2
Infisert	15	38	268,2
Infisert	10	44	165,0
Infisert	19	37	214,7
Infisert	11	55	82,0
Infisert	2	46	155,6
Infisert	4	38	388,8
Infisert	6	36	285,8
Infisert	8	42	308,3
Infisert	40	53	208,2
Infisert	38	54	189,3
Infisert	51	47	216,4
Infisert	31	50	238,1
Infisert	35	56	223,2
Infisert	1	44	285,8
Infisert	1	37	125,2
Infisert	1	51	154,7
Infisert	1	46	166,1
Infisert	2	42	132,7