

Immunrespons mot *Pasteurella* spp. hjå
rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og
Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Eirin Ottesen



Master i Fiskehelse
Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen, Norge

Juni 2021

© Eirin Ottesen

2021

Immunrespons mot *Pasteurella* spp. hjå rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og Atlantisk laks (*Salmo salar* L.).

Universitetet i Bergen, 2021

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

II

Forord

Arbeidet med denne masteroppgåva blei gjennomført hjå Fiskeimmunologi gruppa ved Universitetet i Bergen.

Eg vil gjerne rette ein stor takk til rettleiarane mine Dr. Anita Rønneseth og Professor Heidrun I. Wergeland for all hjelp og rettleiing under arbeidet med masteroppgåva. Anita, takk for all hjelp og støtte under labarbeidet og i skriveprosessen. Eg er svært takknemleg for all den tida du har lagt ned for å hjelpe meg, det har vore uvurderleg. Heidrun, takk for rettleiinga under skrive delen av masteroppgåva mi. Eg vil òg takke Dr. Gyri T. Haugland, Harald S. Lunde og Rebecca Marie Ellul for praktisk rettleiing, nyttige tips og hjelp på laboratoriet.

I tillegg vil eg rette ein stor takk til mine medstudentar på fiskehelsestudiet. Tusen takk for fem flotte og minnerike år. Takk for hyggelege samarbeid, meir eller mindre relevante samtalar og artige påfunn i studiekvardagen.

Sist, men ikkje minst, vil eg takke familie, sambuar og vener for støtte og oppmuntring gjennom denne tida eg har skriven på oppgåva mi. Takk for hyggelege og etterlengta avkoplingar frå min elles travle studiekvardag i Bergen.

Bergen, juni 2021

Eirin Ottesen

Samandrag

Dei siste åra har ein sett ei dramatisk auke i tilfelle pasteurellose i norsk oppdrett av rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Sjukdommen førar til redusert fiskevelferd og kan innebere høg dødelegheit. Isolata av *Pasteurella* spp. som gjev sjukdom hjå rognkjeks og laks er nært i slekt, men likevel ulike. Veterinærinstituttet har føreslått arbeidsnamna *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri* og *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* for isolata henta frå henholdsvis rognkjeks og laks. Om ulikskapane funnen på genomnivå òg har noko å seie for virulens og immunogenisitet veit ein ikkje enno. Kunnskap om fiskane sine immunresponsar mot bakteriane kan nyttast for å finne førebyggjande tiltak og for å utvikle vaksiner, som er viktig for å få kontroll på sjukdommen. Aktivering av leukocyttar, fagocytose og intracellulært drap er viktige prosessar som initielt må setjast i gang for å oppnå ein beskyttande immunitet mot eit patogen. Fagocytterande leukocyttar tar opp infiserande patogen og brukar både oksygenavhengige og oksygenuavhengige mekanismar for å bryte ned patogenet. Ved oksygenavhengig nedbryting produserer leukocytten reaktive oksygenstoff (ROS) i ein prosess kalla respiratory burst. Hensikta med denne oppgåva var å karakterisere immunresponsen mot *Pasteurella* spp. *in vitro* i leukocyttar frå rognkjeks og laks, ved å undersøkje respiratory burst aktiviteten til leukocytane, samt undersøkje om serum frå rognkjeks immunisert med *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* kryssreagerar med protein hjå *P. atlantica* genomovar *salmonicida*. Dette kan bidra til å påvise antigene likskapar, noko som har betydning for utvikling av vaksinar og fiskens evne til å ha brei eller spesifikk beskyttelse mot ulike isolat.

Respiratory burst aktivitet mot to isolat av *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* og tre isolat av *P. atlantica* genomovar *salmonicida* blei undersøkt. Både rognkjeks- og lakseleukocyttar viste respiratory burst aktivitet ved bakteriestimulering, men i ulik grad for dei ulike isolata. Eitt *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* isolat skilde seg ut ved at det stimulerte til signifikant høgare respiratory burst aktivitet enn den til ustimulerte leukocyttar, frå både rognkjeks og laks. Dette tydar på at det er variasjon i virulens hjå ulike isolat av same bakterie. Serologiske analysar som western blot med serum frå rognkjeks immunisert med *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* viste tilstadeverelse av kryssreagerande antistoff mot protein hjå *P. atlantica* genomovar *salmonicida*. Dette betyr at det er antigene likskapar, men det var òg immunreaktive band som var særskilte for isolata.

Abstract

In recent years there has been a dramatic increase in reported cases of pasteurellosis in Norwegian aquaculture of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Reduced fish welfare and high mortalities are some of the consequences caused by the disease. The isolates of *Pasteurella* spp. causing disease in lumpfish and salmon are closely related but still different. The Norwegian Veterinary Institute have suggested the working nomenclature *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri* and *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* for isolates retrieved from lumpfish and salmon respectively. If the differences found on a genomic level have implications on virulence and immunogenicity is not known. Knowledge about the fish immune responses against these bacteria can support the identification of prophylactic measures and the development of vaccines, which are important measures to control the disease. Activation of leucocytes, phagocytosis and intracellular killing are important processes that initially needs to be started to acquire a protective immunity against a pathogen. Phagocytic leucocytes engulf infective pathogens and use both oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms to break down the pathogen. By oxygen-dependent degradation, the leucocyte will produce reactive oxygen species (ROS) in a process called respiratory burst. The purpose of this study was to characterize the immune response against *Pasteurella* spp. *in vitro* using leucocytes from lumpfish and Atlantic salmon, by analyzing the respiratory burst activity of the leucocytes and the cross reactivity of serum harvested from lumpfish immunized with *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* against proteins from *P. atlantica* genomovar *salmonicida*. This can contribute to identify antigenic similarities, which will be important for the development of vaccines and the ability of the fish to have broad or specific protection against different isolates.

Respiratory burst activity against two isolates of *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* and three isolates of *P. atlantica* genomovar *salmonicida* were investigated. Both lumpfish and salmon leucocytes showed respiratory burst activity in response to bacterial exposure, but in varying degrees. One *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* isolate stood out by stimulating both lumpfish and salmon leucocytes to significantly higher respiratory burst activity than unstimulated leucocytes, indicating that there are differences in virulence among different isolates of the same bacteria. Serological analyses by western blot using serum from lumpfish immunized with *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* showed the presence of cross-reacting antibodies to proteins from *P. atlantica* genomovar *salmonicida*. This means that there are antigenic similarities, but there were also immuneoreactive bands that were specific for the isolates.

Forkortingar

Forkorting	Engelsk/Norsk
APC:	Antigen presenting cell/antigenpresenterande celle
CD4:	Cluster of differentiation 4
CD8:	Cluster of differentiation 8
Cfu:	Colony forming unit/kolonidannande eining
CR:	ColorRapid
DHR:	Dihydrorhodamine
dsRNA:	Double stranded RNA/dobbeltrådig RNA
FCS:	Foetal calf serum/føtalt kalveserum
HKL:	Head kidney leucocytes/leukocyttar frå hovudnyre
HRP:	Horseradish peroxidase/pepperrot peroksidase
MHC I:	Major histocompatibility complex class I /vevsforlikelegheitsgenkompleks klasse I
MHC II:	Major histocompatibility complex class II /vevsforlikelegheitsgenkompleks klasse II
MPO:	Myeloperoxidase/myeloperoksidase
NCC:	Non-specific cytotoxic cell/uspesifikk cytotoksisk celle
OD:	Optical density/optisk tettleik
PAMP:	Pathogen associated molecular pattern/patogenassosierte molekylære mønster
PBS:	Phosphate-buffered saline
PRR:	Pattern recognizing reseptor/mønster atkjennande reseptorar
RHO:	Flourescent rhodamine/fluorescerande rhodamine
ROS:	Reactive oxygen species/reaktive oksygenstoff
Rpm:	Revolutions per minute/omdreiningar per minutt
RT:	Room temperature/romtemperatur
SDS-PAGE:	Sodium-dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
SOD:	Superoxide dismutase/superoksid dismutase
TBS:	Tris-buffered saline
Th ₂ -celle:	Type 2 helper T cell/type 2 T-hjelpecelle
TTBS:	Tris-buffered saline with tween
TCR:	T-cell reseptor/T-celle reseptor

TSA: Tryptic soy agar
TSB: Tryptic soy broth
WB: Western blot
x g: Relative centrifugal force/relativ sentrifugalkraft

Innholdsliste

1 - Innleiing	1
1.1 Pasteurellose.....	1
1.2 <i>Pasteurella</i> spp. infeksjon hjå oppdretta fisk i Noreg.....	2
1.3 Fiskens immunsystem	5
1.4 Fagocytose.....	7
1.4.1 Respiratory burst	8
1.5 Målet med oppgåva	11
2 - Materiale og metodar	12
2.1 Bakteriar	12
2.1.1 Dyrking av bakteriar.....	12
2.1.2 Vekstkurvar	13
2.1.3 OD – Colony forming units (cfu) korrelasjon	13
2.1.4 Frysing av bakteriar	14
2.1.5 SDS-PAGE og sølvfarging.....	14
2.1.6 Western blot	15
2.1.7 Stripping av western blot.....	16
2.2 Isolering av leukocytter.....	16
2.2.1 Rognkjeks	16
2.2.2 Laks	17
2.2.3 Teljing av celler.....	18
2.2.4 CytoSpin	18
2.2.5 ColorRapid (CR)	18
2.2.6 Myeloperoksidase assay (MPO).....	19
2.3 Flow cytometry	19
2.3.1 Respiratory burst måling	21
2.3.2 Statistikk	21
3 - Resultat	22
3.1 Vekstkurver	22
3.1.1 <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i>	22
3.1.2 <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>	22
3.2 OD-cfu korrelasjon.....	23
3.2.1 <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i>	23
3.2.2 <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>	24
3.3 SDS-PAGE og sølvfarging	25
3.4 Western blot	26
3.5 Cytospinpreparat og farging med ColorRapid og MPO	27
3.5.1 Rognkjeksleukocytter.....	27

3.5.2 Lakseleukocytter	28
3.6 Flow cytometry analyse av respiratory burst	29
3.6.1 Rognkjeksleukocytter eksponert for bakteriar	29
3.6.2 Lakseleukocytter eksponert for bakteriar	36
4 - Diskusjon	42
4.1 Bakteriar – proteinprofil og antistoffreaksjon	43
4.2 Immunresponsar mot <i>Pasteurella</i> spp. <i>in vitro</i> i isolerte leukocytter frå rognkjeks og laks.....	45
4.2.1 Respiratory burst aktivitet hjå leukocytter stimulert med <i>Vibrio anguillarum</i>	48
4.2.2 Respiratory burst aktivitet hjå leukocytter stimulert med <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i>	49
4.2.3 Respiratory burst aktivitet hjå leukocytter stimulert med <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>	50
4.3 Konklusjon og forslag til vidare arbeid.....	51
5 - Kjelder	52
6 - Appendix.....	57
6.1 Lister over løysingar og kjemikaliar	57

1 - Innleiing

1.1 Pasteurellose

Pasteurellose er namnet på sjukdom som er forårsaka av bakteriar i slekta *Pasteurella*. Ein av dei vanlegaste artane i slekta er *Pasteurella multocida*, som forårsakar infeksjon hjå fleire dyr og menneskje. Nokre av sjukdommane bakterien forårsakar er fuglekolera hjå fugl, hemoragisk septikemi hjå kyr og atrofisk rhinitt hjå svin. Menneskje kan og få infeksjon med *P. multocida*, og det hendar som regel via bitt frå hund eller katt (May et al., 2001). Hjå fisk er det infeksjon med bakterien *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* og *Pasteurella skyensis* som tradisjonelt er kjende årsakar til pasteurellose. Første gong pasteurellose blei rapportert hjå fisk, var i 1963 i USA under eit tilfelle av stor dødelegheit av kvitabbor (*Morone americana*) og stripete havabbor (*Morone saxatilis*). Dei morfologiske og biokjemiske eigenskapane viste likskapar med bakteriar i slekta *Pasteurella*, og på bakgrunn av dette blei bakterien taksonomisk plassert i her (Snieszko et al., 1964). Fire år seinare undersøkte Janssen & Surgalla bakterien nærmare, og fann ut at den fysiologisk og serologisk skilde seg frå andre bakteriar i *Pasteurella* slekta, og at dette måtte vere ein eigen art. Artsnamnet *Pasteurella piscicida* blei dermed foreslått for bakterien (Janssen & Surgalla, 1968). Nokre år seinare blei pasteurellose eit problem hjå fleire fiskeartar i Japan, bl.a. yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), blackhead seabream (*Acanthopagrus szhlegelii*) og oval filefish (*Navodan modestus*) (Romalde, 2002). Første tilfelle av pasteurellose i Europa var i 1990, i Spania, og råka oppdretta gilthead seabream (*Sparus aurata*), og sidan dette har pasteurellose vore ei stor utfordring for oppdrett av seabream og seabass i middelhavet (Romalde, 2002). I 1995 gjennomførte Gauthier et al. ein fylogenetisk analyse av 16S rRNA genet hjå *P. piscicida* og fann ut at bakterien berre hadde 80% likskap i genomet med *Photobacterium damsela*, og difor blei det foreslått at bakterien skulle få ei ny taksonomisk plassering og eit nytt namn; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Gauthier et al., 1995).

Pasteurellose blei ikkje rapportert hjå laksefisk før seint på 90-talet. Rapportane kom i 1995, 1997 og 1998 frå skotsk oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), der dei opplevde dødelegheit assosiert med ein *Pasteurella*-liknande mikroorganisme (Birkbeck et al., 2002; Foyle et al., 2003). Biokjemiske og fysiologiske testar beviste at mikroorganismen var ein bakterie som høyrde til i familien *Pasteurellaceae* (Birkbeck et al., 2002). Bakteriececellene var Gram-negative, stavforma, ubevegelege og pleomorfe, og krevja salt og blod i mediet for å vekse (Birkbeck et al., 2002). Analyse av 16S rRNA sekvensar viste at bakterien hadde 97,1%

likskap med '*Pasteurella phocoenarum*' og berre 85,5% likskap med *P. damsela* subsp. *piscicida* (Birkbeck et al., 2002). Skilnaden i dei biokjemiske eigenskapane og 16S rRNA sekvensen frå andre bakteriar i familien *Pasteurellaceae* beviste at denne bakterien var ein ny art som fekk namnet *Pasteurella skyensis* (Birkbeck et al., 2002). Denne bakterien er, i motsetning til *P. damsela* subsp. *piscicida*, eit ekte medlem av familien *Pasteurellaceae* (Reid & Birkbeck, 2015). *P. skyensis* har vore årsak til høg dødelegheit i skotsk lakseoppdrett sidan den blei rapportert første gongen, og fram til 2020 var den ikkje vore funnen i norsk oppdrett (Veterinærinstituttet, 2020). I oktober 2020 blei det for første gong bekrefta funn av *P. skyensis* frå sjuk oppdrettslaks i Noreg (Veterinærinstituttet, 2020). Funnet av bakterien er urovekkande for norsk lakseoppdrett og visar at det er eit stort behov for meir kunnskap om *Pasteurella*-bakteriar.

1.2 *Pasteurella* spp. infeksjon hjå oppdretta fisk i Noreg

I 1991 blei pasteurellose hjå norsk oppdrettslaks for første gong beskriven. Sjukdommen blei først oppdaga i Finnmark og fekk namnet «varracalbmi», som er samisk for blodauge (Valheim et al., 2000). Som namnet tilseier, er det mest karakteristiske kliniske teiknet ved sjukdommen blodige auger, som kjem av panoftalmitt; eit resultat av nekrotiserande og hemoragiske lesjonar (Valheim et al., 2000). Andre vanlege funn ved denne sjukdommen er hudlesjonar og teikn på septikemi som forstørra milt, petekkie blødingar og grå område på lever og nyre, samt subdermale abcessar på ryggen og sida av fisken (Valheim et al., 2000). Bakterien som forårsakar varracalbmi er stavforma, Gram-negativ, ubevegeleg og fakultativ anaerob med optimal vekst ved 15°C (Valheim et al., 2000), og er ein *Pasteurella*-bakterie som er i nær slekt med *P. skyensis* (Hjeltnes, 2014). Frå 1989 har det vore sporadiske utbrot av varracalbmi både i Nord-Noreg og Sør-Noreg. (Brun et al., 2020).

Første tilfelle av pasteurellose hjå rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) var i 2012 på ein lokalitet i Sør-Noreg (Hjeltnes, 2014). Fisken hadde sår og granulom på indre organ, og bakterien *Pasteurella* sp. blei påvist. Sidan 2012 har *Pasteurella* sp. vore isolert frå rognkjeks kvart år, med ein topp på 28 positive lokalitetar i 2016 (Brun et al., 2020). Fiskehelse rapporten 2020 rapporterer om utbrot av pasteurellose på 36 lokalitetar i 2020, men dette talet kan ikkje direkte samanliknast med tidlegare tal, då fiskehelse rapporten for 2020 inkluderer tal frå både Veterinærinstituttet og private laboratoriar (Sommerset et al., 2021). Sjukdommen råkar rognkjeks i alle stadiar, frå juvenile på 6-8 g og opp til stamfisk på 340 g (Alarcón et al., 2016).

Vanlege kliniske teikn ved pasteurellose hjå rognkjeks er finneråte, hudlesjonar i form av kvite flekkar og bløding i gjeller, ved finnebase og hale (Alarcón et al., 2016; Ellul et al., 2018). Ved obduksjon kan ein sjå blødingar og granulom på indre organ, og histopatologisk kan ein finne mikrokoloniar i dei indre organa, hud og gjeller. Fokal nekrose og infiltrasjon av betennescellar kan òg bli observert, samt danning av granulom (Alarcón et al., 2016). Bakterien er i nær slekt med, men serologisk distinkt frå *P. skyensis*, og fenotypisk lik, men genetisk distinkt frå *Pasteurella* sp. isolat som forårsakar varracalbmi hjå Atlantisk laks (Alarcón et al., 2016). Bakterien er ein ubevegeleg Gram-negativ coccobacilli som krev salt og blod for å vekse (Ellul et al., 2018). Etter 48 timars inkubering ved 22°C på blodagar med 2% NaCl, får ein nøyaktige, fullstendige, ikkje-hemolytiske, ugjennomsiktige små og grå koloniar. Ved lengre inkubering, vil ein kunne sjå svak alfa-hemolyse (Alarcón et al., 2016). *Pasteurella* sp. som forårsakar pasteurellose hjå rognkjeks og *Pasteurella* sp. som forårsakar varracalbmi hjå laks visar seg å vere meir genetisk lik kvarande enn dei er lik *P. skyensis* (Alarcón et al., 2016). Gensekvensanalysar av norske rognkjeks isolat av *Pasteurella* sp. og 'varracalbmi' isolat samanlikna med *P. skyensis* gav 97,1-98,0% likskap i sekvensen for 16rRNA og 92,7-96,8% likskap i sekvensen for *rpoB* (Alarcón et al., 2016).

Frå 2018 har det vore ei dramatisk auke i tilfelle av *Pasteurella* sp. infeksjon hjå laks i norsk fiskeoppdrett. Til tross for kohabitering med rognkjeks, har det sidan 2012 ikkje vore registrert pasteurellose hjå norsk oppdretta laks, men i 2018 blei det registrert 7 tilfelle, i 2019 14 tilfelle og i 2020 blei det registrert heile 57 tilfelle (Brun et al., 2020, Sommerset et al., 2021). Tala frå 2020 kan ikkje direkte samanliknast med tala frå 2018 og 2019, då fiskehelse rapportane før 2020 kun hadde tal frå Veterinærinstituttets eige laboratorie, medan i 2020 er det inkludert tal frå både Veterinærinstituttet og private laboratoriar. Likevel er auka dramatisk og urovekkande. Under gruppa norske laksevariantar av *Pasteurella* sp. er det funnen at eldre isolat assosiert med sjukdommen «varracalbmi» er noko annleis enn isolata frå 2018 og fram til i dag, og at dei dermed har spreidd seg frå eit felles opphav for relativ kort tid sidan (Gulla et al., 2020). Ein ser store variasjonar i både klinikk og alvorlegheitsgrad, med alt frå nokre få fisk med kliniske teikn, til utbrot med signifikant auke i dødelegheit (Legård & Strøm, 2020). Dei vanlegaste kliniske teikna som er observert er purulent peritonitt, blakka væske i hjartehola og eksoftalmi, men teikn som abcessar, sår og fistlar kan òg førekome. Histopatologisk er det funnen bakteriar i blodårar i gjellene, pseudobranken, hjarta, lever, milt og auger, saman med epikarditt, nekrose, granulom, bløding og trombose i vevet rundt blodårane (Legård & Strøm, 2020). Sjukdommen blir rekna som ein «emerging disease» i Noreg, som betyr at ein er redd

for at denne nye sjukdommen skal føre til konsekvensar som store økonomiske tap og redusert fiskevelferd i oppdrettsnæringa (Brun et al., 2020).

Veterinærinstituttet har i 2020 heilgenomsekvensert over 80 *Pasteurella* isolat frå norsk og skotsk oppdretta laks og rognkjeks, med mål om å kunne tildele offisiell nomenklatur til dei to patogene *Pasteurella* sp. variantane som ikkje enno har eit offisielt namn (Veterinærinstituttet, 2019, Gulla et al., 2020,). Basert på foreløpige resultat har veterinærinstituttet foreslått ein «arbeids-nomenklatur» for dei fiskepatogene *Pasteurella* variantane i Noreg. Den norske laksevarianten *Pasteurella* sp. visar ein genetisk skilnad frå *P. skyensis* som er stor nok til å kunne seie at dei to er ulike bakterieartar. Veterinærinstituttet har foreslått arbeidsnamnet på den norske laksevarianten til å vere *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* (Gulla et al., 2020). *Pasteurella* sp. frå rognkjeks visar seg å vere ei svært homogen gruppe bakteriar, uansett geografisk opphav. Rognkjeksvarianten visar ein klar genetisk skilnad frå *P. atlantica* genomovar *salmonicida*, men den er ikkje så ulik at dei to er ulike artar. Veterinærinstituttet har foreslått arbeidsnamnet på rognkjeksvarianten til å vere *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri* (Gulla et al., 2020). Denne føreslåtte arbeidsnomenklaturen vil difor nyttast vidare i denne oppgåva.

I felt er det observert at utbrot av pasteurellose hjå laks ofte skjer 14 dagar etter lusebehandling, og for rognkjeks er det registrert auka dødelegheit 2-4 veker etter fisken har blitt ustatt for stress i form av handtering eller overføring til laksemerder (Alarcón et al., 2016; Legård & Strøm, 2020). Auke i bruk av mekanisk og termisk behandling mot lus dei siste åra kan vere ein medverkande faktor til kvifor ein har sett ei auke i prevalens av pasteurellose hjå laks dei siste åra. For laks er det kjend at stress påverkar immunsystemet negativt (Tripp et al., 1987; Espelid et al., 1996; Rønneseth et al., 2005). Laks rammast oftast av pasteurellose ved nær slakteklar storleik (over 3 kg) og ved temperaturar mellom 7,9°C og 18°C (Legård & Strøm, 2020). Fisken har då ofte gjennomgått fleire hyppige lusebehandlingar, som kan vere ein stressor som kan medføre nedsett immunsystem og klinisk manifestasjon av sjukdom. I Fiskehelse rapporten 2020 blei underliggjande sjukdom rapportert som ein årsak til stor dødelegheit ved medikamentfri lusebehandling, og i spørjeundersøkinga for fiskehelsepersonell i samanheng med rapporten svarte 17% at dei sjeldan hadde erfart utbrot med pasteurellose innan to veker etter medikamentfri avlusing, og 14% svarte at dei ofte hadde erfart utbrot med pasteurellose innan to veker etter medikamentfri avlusing (Sommerset et al., 2021). Dei resterande 69% svarte at dei anten ikkje visste, eller at dei ikkje hadde erfaring med det. I same

spørjeundersøking blei pasteurellose nemnd av fiskehelsepersonell som det tiande største problemet i produksjon av laks som matfisk i Noreg, og for respondentar frå produksjonsområda frå svenskegrensa til Hustadvika er sjukdommen rangert på fyrste plass som tiltakande problem. Ein annan smitteveg og risikofaktor er bruk av arbeidsbåtar og brønnbåtar, då me ikkje veit om *Pasteurella* spp. dannar biofilm. Om bakterien kan det, er det mogleg at bakterien overlev på og i båtane og kan smitte mellom anlegga dei legg til ved.

Smittevegen til bakterien er enno usikker, men i nokre tilfelle har Veterinærinstituttet fått påvist sjukdom med same variant av bakterien *Pasteurella* sp. hjå både laks og rognkjeks ved same lokalitet (Veterinærinstituttet, 2019, Sommerset et al., 2021). Heilgenomsekvensering gjennomført av Veterinærinstituttet viste at det er *P. atlantica* genomovar *salmonicida* som har forårsaka sjukdom i desse tilfella (Sommerset et al., 2021). Sidan pasteurellose har vore relativt vanleg hjå rognkjeks i nesten 10 år, kan rognkjeks som går saman med laksen i merdane sjåast på som ein potensiell smittekjelde for laksen, men det kan òg vere laksen som har overført smitte til rognkjeks. Våren 2020 blei eit smitteforsøk på laks og rognkjeks gjennomført, der laks og rognkjeks blei badsmitta og kohabitantsmitta med *P. atlantica* genomovar *salmonicida* og *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (Sandlund et al., 2021). Resultata viste at rognkjeksen utviklar pasteurellose etter smitte med begge bakterieisolata, men at sjukdomsforløpet er raskare etter smitte med *P. atlantica* genomovar *salmonicida* enn med *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (Sandlund et al., 2021). Laksen derimot, viste ingen teikn til sjukdom uansett smitteveg eller bakterieisolat.

1.3 Fiskens immunsystem

Fisk lev i eit miljø der dei er i konstant kontakt med potensielle patogene organismar. Immunsystemet er forsvarsmekanismen mot desse sjukdomsframkallande mikroorganismane. Som den tidligaste klassen av vertebratar, kan fiskens immunsystem delast inn i det medfødde og det erverva immunsystemet. Det medfødde immunsystemet består av fysiske, humorale og cellulære komponentar som aktiverast direkte ved infeksjon, og er velutvikla i førehald til høgareståande vertebratar. Det erverva immunsystemet derimot er mindre utvikla hjå fisk enn hjå høgareståande vertebratar, er meir temperaturavhengig og kan bruke opp mot 12 veker på å aktiverast. Denne delen av immunsystemet består av humorale og cellulære komponentar som spesifikt kjennar att patogena (Plouffe et al., 2005; Magnadóttir, 2006). Skilnaden på utviklinga av det medfødde og det erverva immunsystemet hjå fisken kan forklarast av den evolusjonære

statusen i førehald til pattedyr, samt fiskens poikiloterme fysiologi. Dette førar til avgrensing i antistoffrepertoaret, cellemodninga og cellehukommelsen til det erverva immunsystemet, og sein lymfocyttoproliferasjon.

Hud og fiskeskjell fungerer som ei fysisk barriere mellom det ytre og indre miljøet til fisken (Ángeles Esteban, 2012). Huda består av epidermis og dermis, og dekkjer heile fisken. Fisken er spesielt følsam for sår og tap av skjell, då dette blir ein stor innfallsport for patogen i det akvatiske miljøet (Ángeles Esteban, 2012). Den humorale delen av det medfødde immunsystemet består av dei løyselege bindingane som ein finn i t.d. blod og mucosa. Dette er viktige bindingar, som t.d. transferrin, anti-proteasar, interferon, haemolysin og lysozym, som skal identifisere framande substansar og setje i gang viktige immunologiske prosessar (Magnadóttir, 2006; Whyte, 2007). Ein viktig del av den humorale medfødde immunresponsen til fisk, er komplementsystemet. Dette er ei gruppe løyselege protein som fins i fiskens blod og andre kroppsvæsker. Komplementsystemet er ein kaskadereaksjon av protein, som vil føre til kjemotakse av fagocytar, opsonisering eller at den ukjende mirkoboen går i lysis (Murphy & Weaver, 2017).

Den cellulære delen av det medfødde immunsystemet består av immuncellene som skal kjenne att framande substansar og patogen, og skilje dei frå fiskens eigne, friske celler. Celletypene som fins er monocytar, som modnast til makrofagar, granulocytar (neutrofile, eosinofile og basofile), non-spesific cytotoxic cells (NCC) og dendrittiske celler (Fletcher & Secombes, 2015). Tilstadeverelsen av dei forskjellige typene varierer frå fiskeart til fiskeart. Hjø salmonidar fins det mest neutrofile granulocytar, medan dei eosinofile og basofile granulocytane er få eller ikkje tilstades i det heile (Rønneseth et al. 2006). Haugland et al. (2012) har karakterisert immuncellene til rognkjeks, og fann ut at monocytar/makrofagar, lymfocytar, neutrofile og dendrittisk-liknande celler alle er tilstades i rognkjeksen, og at dei likna meir leukocytar frå zebrafisk, aure og torsk enn dei frå laks.

Fleire av desse cellene er antigenpresenterande cellar (APC), som presenterar prosesserte antigen for det erverva spesifikke immunsystemet. Dette gjer cellene med det membranbundne glykoproteinet major histocompatibility complex klasse II (MHC II) (Cuesta et al., 2006). Profesjonelle APC i fisk er makrofagar/monocytar, B-celler og dendrittiske celler (Bassity & Clark, 2012). Når desse cellene fagocytterar eit patogen, vil dei presentere ein del av dette patogenet, eit peptid, for naive CD4⁺ T-celler (Fletcher & Secombes, 2015). CD4 vil binde seg

til MHC II, og T-celle reseptor (TCR) på overflata til T-cella vil binde seg til det presenterte peptidet, dette er eit av signala som må til for å aktivere T-cella. Dei aktiverte Th₂-cellene vil då skilje ut interleukin som vil stimulere til B-celle proliferasjon. B-celler vart differensiert til plasmaceller, som vil produsere spesifikke antistoff mot patogenet, og hukommelseceller, som vil hugse patogenet til moglege framtidige infeksjonar med same patogen (Wilson, 2017).

MHC klasse II er viktig under infeksjonar med ekstracellulære patogen. Antigen frå intracellulære infeksjonar derimot, presenterast via MHC klasse I. MHC I molekylet finn ein i alle celler som har cellekjerne, og når eit intracellulært patogen (t.d. virus og intracellulære bakteriar) infiserer vertscella, vil MHC I presentere eit peptid frå patogenet på overflata av cella. Cytotoxiske CD8⁺ T-celler vil kjenne att MHC I og peptidet via TCR, binde seg til cella, bli aktivert og vil drepe den, i ein prosess som er kjend som cellemediert spesifikk immunitet (Wilson, 2017). APC og MHC I og II er dermed eit viktig bindeledd mellom det medfødde immunsystemet og det erverva immunsystemet, som avhenger av kvarandre.

Cellene i det medfødde immunsystemet har mønster gjenkjennande reseptorar «pattern recognition receptors» (PRR) som kjennar att patogen assosierte molekylære mønster «pattern associated molecular patterns» (PAMP) som t.d. lipopolysakkarid, flagellin, peptioglykan eller dsRNA som er vanlege strukturar spesifikke for virus og bakteriar (Whyte, 2007). Ei gruppe av desse PRRane, dei fagocytiske, finn ein på overflata til dei fagocyterande cellene og har den viktige oppgåva i det medfødde immunsystemet; å initiere fagocytose av patogen som har komen seg inn i fisken.

1.4 Fagocytose

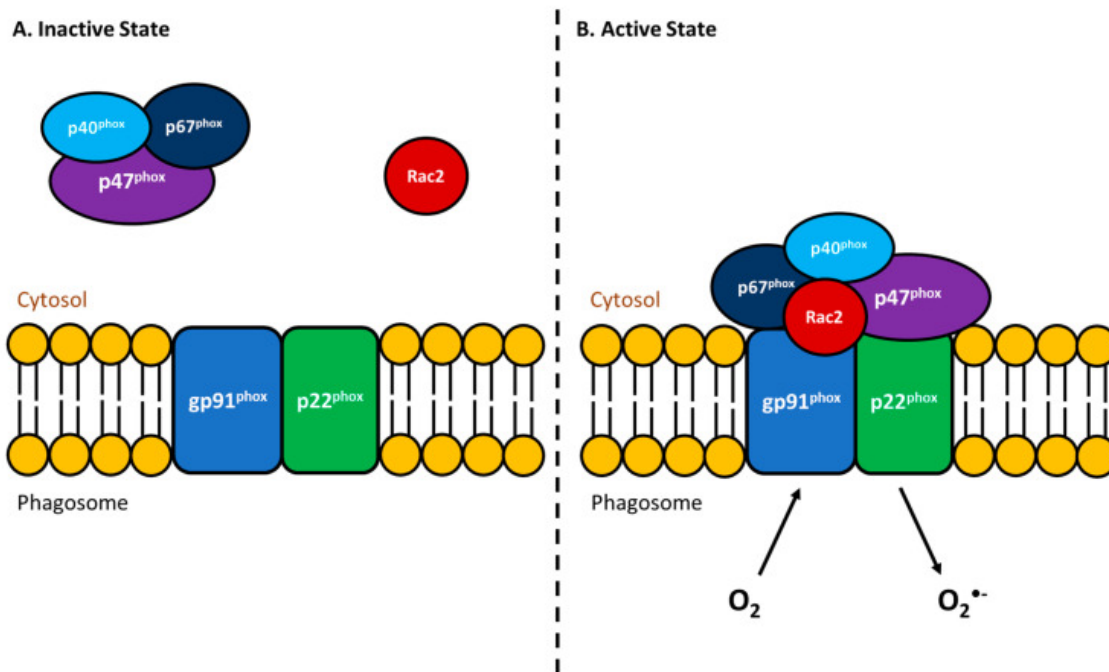
Fagocytose er den eldste og mest universelle mekanismen for fjerning av framande substansar, då ein veit at eincella eukaryote organismar brukar denne mekanismen til opptak av næring og som eit forsvar. Fagocytose er ein forsvarsreaksjon på infeksjon og invasjon i kroppen, og er ein form for endocytose. Cella slukar patogenet og dannar endocytiske vesiklar kalla fagosom (Neumann et al., 2001; Esteban et al., 2015). Fagocytose er ein del av førstelinjeforsvaret, og skal avgrense initial oppformering og vekst av den framande substansen som infiserer verten (Neumann et al., 2001). Makrofagar, neutrofile granulocytar, B-celler og umodne dendrittiske celler er fiskens viktigaste fagocyterande celler, og jobben til desse er å fjerne patogen som bakteriar og andre mikroorganismar, gamle raude blodceller, apoptotiske celler og celleavfall

(Uribe et al., 2011; Haugland et al., 2012; Esteban et al., 2015). Cellene blir aktiverte til å ta opp den framande substansen når PAMP bind seg på PRR som fins på overflata til cellene.

Den fagocytiske prosessen består av ei rekkje steg, som alle heng saman: (1) oppdaging og gjenkjenning av den framande substansen; (2) festing av den framande substansen på fagocytten; (3) sluking av den framande substansen inn i ein vesikkel kalla eit fagosom; (4) fusjon av fagosom med eit lysosom og danning av eit fagolysosom; (5) intracellulær dreping og fordøying av substansen; (6) utslepp av nedbroten materiale. (Esteban et al., 2015). Lysosoma som smeltar saman med fagosomet inneheld granularar med antimikrobielle molekyl som drep patogenet, denne mekanismen kallast oksygenavhengig drap. Desse kan vere nedbrytande enzym som proteasar, esterasar, lipidasar, nukleasar og fosfatar, eller neutrofile peptid eller protein som aktivt øydelegg patogenet (Neumann et al., 2001).

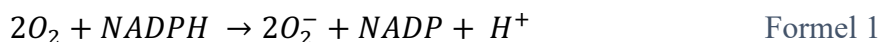
1.4.1 Respiratory burst

Fagocytar av typen makrofagar og neutrofile granulocytar har fleire oksygen-avhengige mekanismar for å drepe eit patogen inni fagolysosomet (Fletcher & Secombes, 2015). Ei av dei viktigaste mekanismane er respiratory burst, som er danninga av reaktive oksygenstoff (ROS) som drep patogenet i fagolysosomet (Esteban et al., 2015). Respiratory burst vart rekna som ein potent respons i fagocytiske celler, og då spesielt i monocytar, makrofagar og neutrofile granulocytar (Kalgraff et al., 2011). Enzymet NADPH oksidase omdannar molekylært oksygen til superoksidanionar som vil drepe mikroorganismane som har blitt tatt opp av fagocytten. NADPH oksidase vart danna når fagocytten blir aktivert av ytre stimuli. Dei fire cytosolske komponentane p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} og Rac2 dannar eit kompleks med dei transmembrane komponentane gp91^{phox} og p22^{phox} i membranen til fagolysosomet, og dette komplekset er den aktiverte NADPH oksidasen (Figur 1) (Semple & Dixon, 2020).



Figur 1. NADPH oksidase aktiverting, bilete lånt frå Semple & Dixon, 2020.

Når enzymet er aktivert vil det stå for omdanning av molekylært oksygen til superoksidanion (O_2^-) (Formel 1) (Beutler, 2004).

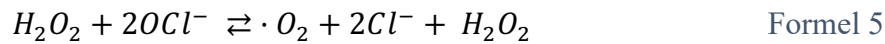
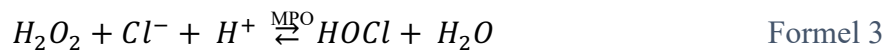


Superoksidanion (O_2^-) er ikkje i seg sjølv ein reaktiv oksidant, men blir brukt til produksjon av andre ROS, gjennom produksjon av hydrogenperoksid (H_2O_2) (Formel 2). Reaksjonen vært katalysert av enzymet superoksid dismutase (SOD), og det er ein nøkkelreaksjon for vidare produksjon av ROS (Beutler, 2004).



Hydrogenperoksid er, i motsetning til superoksidanionar, mikrobicid i seg sjølv, men kan òg reagere vidare med andre komponentar for å danne andre ROS som har potente mikrobicide eigenskapar (Kalgraff et al., 2011). I ein reaksjon katalysert av enzymet myeloperoksidase (MPO) kan hydrogenperoksid reagere med klor (Cl^-) og hydrogen (H^+) for å danne hypoklorsyre ($HOCl$) og vatn (H_2O) (Formel 3), eller dersom det ikkje er hydrogen tilstades vil det reagere med klor og danne hypokloridionar (OCl^-) og vatn (Formel 4).

Hydrogenperoksid kan så vidare reagere med hypokloridionar og danne singlet oksygen ($\cdot O_2$), klor og hydrogenperoksid (Formel 5) (Kalgraff et al., 2011).



Alle disse nemnde reaktive oksygenstoffa drep patogen ved å reagere med forskjellige mål i patogenet, som t.d. lipid, protein og nukleinsyrer (Beutler, 2004).

Respiratory burst aktivitet er vist å være ein viktig forsvarsmekanisme hjå både laks og rognkjeks (Kalgraff et al., 2011; Haugland et al., 2012). Flow cytometry analysar gjennomført på leukocyttar frå hovudnyre til laks, har vist at cellene som har respiratory burst aktivitet varierar i storleik og granularitet, og mest sannsynleg består i hovudsak av neutrofile granulocyttar og makrofagar. I tillegg blei det funnen nokre små, ikkje-granulerte celler som moglegvis er B-celler (Kalgraff et al., 2011). Tilsvarende analysar av rognkjeks leukocyttar frå hovudnyre viste at det typisk var store, granulære celler som hadde respiratory burst aktivitet (Haugland et al., 2012).

Nokre bakteriar har forsvarsmekanismar som kan beskytte dei mot ROS nedbryting i fagocytten. Ein av desse responsane er uttrykking av forskjellige enzym som angrip ROS for å redusere toksisitet (Cavinato et al., 2020). Enzym som katalasar, peroksidasar og superoksid dismutasar (SOD) angrip ROS som er produsert i fagocyttane. Kombinasjonen av desse tre enzyma vil direkte avgifte superoksidanionar produsert i fagocyttane av NADPH oksidase. SOD vil dismutere O_2^- til H_2O_2 , medan katalase og peroksidase vil angripe H_2O_2 og produsere H_2O og O_2 (Cavinato et al., 2020). Hjå Gram-negative bakteriar vil desse ROS angripande enzyma opphalde seg i ulike delar av cella. SOD vil ein finne i periplasma, som er rommet mellom den indre cytoplasmiske membranen og yttermembranen til bakterien, medan katalase og peroksidase vil opphalde seg i cytoplasma. Denne kompartmentaliseringa gjer det effektivt for bakterien å angripe O_2^- og danne H_2O_2 som vil bli angripen i cytoplasma (Cavinato et al., 2020).

1.5 Målet med oppgåva

P. atlantica genomovar *cyclopteri* og *P. atlantica* genomovar *salmonicida* er begge ubevegelege Gram-negative bakteriar som krev salt og blod for å vekse (Ellul et al., 2018; Legård & Strøm, 2020). Kliniske teikn på sjukdom hjå rognkjeks er kvite lesjonar i hud, finneråte og blødingar, medan hjå laksen ser ein ofte sår, abcessar og fistlar, og variasjonen av alvorlegheitsgrad kan vere stor frå utbrot til utbrot (Alarcón et al., 2016; Legård & Strøm, 2020). Sidan det er funnen at *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* og *P. atlantica* genomovar *salmonicida* er to variantar av same bakterieart, er det viktig å undersøkje om dei har ulike virulenseigenskapar eller likheitlar med tanke på immunogene komponentar. Immunsystemet til fisken kan handtere desse bakteriane på ulike måtar. I starten av infeksjonsforløpet vil det medfødde immunsystemet slå inn, der den humorale delen (komplementsystemet og løyselege forbindingar) og den cellulære delen (fagocytose) vil arbeide for å fjerne bakteriane. Gjennom antigenpresentasjon, vil det spesifikke immunsystemet slå inn og starte produksjon av patogen spesifikke antistoff. Kunnskap kring immunsystemets evne til attkjenning av bakteriane og stimulering til respiratory burst, samt moglege kryssreagerande antistoff, er eit viktig steg på vegen mot å velje isolat som kan nyttast i vaksinar. Måla i denne oppgåva er difor satt til:

- Karakterisere immunrespons mot *Pasteurella* spp. *in vitro* i leukocytter frå rognkjeks og laks.
- Undersøkje om antistoff retta mot *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* kryssreagerar med protein hjå *P. atlantica* genomovar *salmonicida*.

2 - Materiale og metodar

2.1 Bakteriar

I denne studien blei fem ulike isolat av bakterien *Pasteurella* spp. og eit isolat *Vibrio anguillarum* inkludert (Tabell 1). Tre av *Pasteurella* spp. isolata var isolert frå klinisk sjuk laks, og dei resterande to var isolert frå klinisk sjuk rognkjeks. Eitt av isolata frå rognkjeks var delt av veterinærinstituttet. *V. anguillarum* var serotype O1, og isolert frå klinisk sjuk rognkjeks. Ein oversikt over isolata med forkortingar og opphav er presentert i Tabell 1. Alle bakteriane blei halden ved – 80°C hjå Fiskeimmunologi gruppa ved UiB.

Tabell 1. Oversikt over bakterieisolat

Bakterie	Serotype	Opprinning	Forkorting	Stamme
<i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i>		Rognkjeks, 2019	PR1	Delt av Veterinærinstituttet. Id: NVI-50-354
<i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i>		Rognkjeks, 2013	PR2	UiB P1-2013
<i>Vibrio anguillarum</i>	O1	Rognkjeks, 2018	VR	UiB VIR-2018
<i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>		Laks, 2020	PL1	UiB P3-2020
<i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>		Laks, 2019	PL2	UiB P2-2019
<i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i>		Laks, 2020	PL3	UiB P4-2020

2.1.1 Dyrking av bakteriar

I studien blei bakteriane dyrka i medium tilpassa næringskrava deira, slik vist i Tabell 2. Alle dei seks bakterieisolata blei dyrka i tryptic soy broth (TSB) med 1,5% tilsett NaCl (appendix). *Pasteurella* spp. krev salt og blodkomponentar i mediet, og blei dyrka i 50 ml røyr (Falcon, Sigma) med 36 ml TSB 2% NaCl tilsett 4 ml kalveserum (FCS). *V. anguillarum* blei dyrka i 20 ml TSB 2% NaCl i 50 ml røyr (Falcon, Sigma). Alle bakteriane blei inkubert ved 20°C og 200 rpm (Infors HT minitron).

Tabell 2. Oversikt over vekstmedium og vekstførehald brukt til kvart bakterieisolat.

Bakterie	Flytande medium		Agar	
	Vekstmedium	Vekstførehald	Vekstmedium	Vekstførehald
PR1	TSB 2% NaCl + 10% FCS	20°C og 200 rpm	Blodagar 2% NaCl	15°C
PR2	TSB 2% NaCl + 10% FCS	20°C og 200 rpm	Blodagar 2% NaCl	15°C
VR	TSB 2% NaCl	20°C og 200 rpm	TSA 2% NaCl	15°C
PL1	TSB 2% NaCl + 10% FCS	20°C og 200 rpm	Blodagar 2% NaCl	15°C
PL2	TSB 2% NaCl + 10% FCS	20°C og 200 rpm	Blodagar 2% NaCl	15°C
PL3	TSB 2% NaCl + 10% FCS	20°C og 200 rpm	Blodagar 2% NaCl	15°C

2.1.2 Vekstkurvar

Under forsøka i denne studien skal bakteriane haustast under den sein-eksponentielle vekstfasen. For å vite når denne fasen er, må det etablerast vekstkurver for kvart isolat. Vekstkurve for PL2, PL3, PR2 og VR var allereie etablert, vekstkurver for PL1 og PR1 blei etablert i denne studien. Bakteriane blei dyrka som forklart i kapittel 2.1.1, og optisk tettleik «optical density» (OD) blei målt over tid for å framstille vekstkurva. OD er brukt til å måle tettleiken til bakteriar i ein suspensjon. I denne studien blei OD målt i eit spektrofotometer (Spectroquant® Pharo 300, Merck) ved bølgjelengd 600 nm. Før målinga blei spektrofotometeret nulljustert med vekstmediet brukt ved dyrking. Måling blei gjennomført ved å tilsette 1,5 ml bakteriesuspensjon i ei kyvette (VWR Cuvettes PS macro, VWR), som så blei plassert i spektrofotometeret og målt. OD blei målt frå bakteriekulturen blei satt opp, og fram til kurva flata ut (stasjonær fase).

2.1.3 OD – Colony forming units (cfu) korrelasjon

OD-cfu korrelasjon er ein måte å kvantifisere antal levedyktige bakteriar ved å bruke OD målingar. Bakteriane blei hausta i den sein-eksponentielle vekstfasen. For å måle OD blei det laga ei to-folds fortynningsrekke av bakteriesuspensjon i TSB. Cfu blei måla ved å telje bakteriekoloniar på agarplatar. For å finne cfu/ml blei det laga ei ti-folds fortynningsrekke av bakteriesuspensjon i PBS (appendix). 100µl av fortynningane av bakteriesuspensjon blei plata ut på blodagar med 2% NaCl og fordelt ut forsiktig med bøygde sterile pasteurpipetter. Platene blei inkubert ved 15°C (Panasonic MIR-154-PE) fram til det var danna koloniar. Koloniane på utvalde platar med tellbare koloniar blei talde, og cfu/ml blei kalkulert ved å bruke Formel 6:

$$\text{Antal celler (cfu) pr. ml} = \frac{\text{Antal koloniar pr. plate}}{\text{Fortynningsfaktor}}$$

Formel 6

Korrelasjonen mellom OD og cfu blei visualisert ved å plote OD mot cfu i ein graf.

2.1.4 Frysing av bakteriar

For å ha nok bakteriar frå same stock løysing til forsøka blei kvart bakterieisolat dyrka, hausta i sein eksponentiell vekstfase og fryst ned ved -80°C i glyserolkulturar. Bakteriane blei dyrka som beskriven i kapittel 2.1.1 og hausta i den sein-eksponentielle vekstfasen. 8 ml bakteriesuspensjon blei tilsett 2 ml glyserol (100%) og blanda godt. Frå denne suspensjonen blei det overført 1 ml til Cryo røyr (CryoTubeTM). Røyra blei merka og fryst ned ved -80°C .

2.1.5 SDS-PAGE og sølvfarging

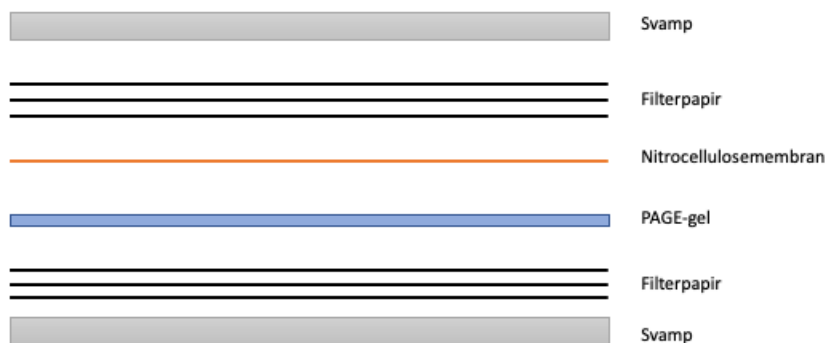
Sodium-dodecyl sulfat – polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) blei gjennomført for å undersøkje og samanlikne proteinprofilen til dei fem *Pasteurella* spp. isolata. Dette er ein metode der proteina i bakterien blir fraksjonert i ein 12% SDS-polyacrylamid gel etter molekylvekt.

Bakteriane blei hausta i den sein-eksponentielle fasen og sentrifugert ved hastighet $2500 \times g$ (Allegra[®] X-15R, Beckman Coulter) i 10 min ved 4°C . Bakteriepellet blei resuspendert i PBS (appendix) og celledetal målt i CASY celledetektor, før celledetektoren i dei ulike bakteriesuspensjonane blei justert slik at alle prøvar inneheldt 3×10^8 celler/ml. Deretter blei 40 μl av celledetektoren overført til eit eppendorfrøyr saman med 40 μl prøvebuffer (appendix) med β -mercaptoetanol (Sigma). Bakteriesuspensjonen blei så varmebehandla i ei varmeblokk ved 98°C i 5 min.

Gelen blei støypa i glassplatar, med resolving gel (12%) (appendix) nederst og stacking gel (4%) (appendix) øvst med brønnar. 10 μl av kvar bakteriesuspensjon blei lagt i brønnane, i tillegg til 6 μl molekylvekt standard (Bio-Rad: 161-0304) i første brønn. Gelen blei elektroforesert ved 190V i 50 min. Etter elektroforesing blei gelen forsiktig tatt ut av stativet og fiksert i 20 min i fikseringsløysing (appendix), etterfølgt av 2 x 10 min vask i deionisert vatn. Proteinbanda på gelen blei visualisert ved å farge med Silver Stain Plus kit (Bio-Rad). Når proteinbanda var fine, blei gelen overført til 5% Acetic acid (appendix) for å stoppe reaksjonen. Gelen blei fotografert i Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ system (Bio-Rad).

2.1.6 Western blot

For å undersøkje om antistoff i serum henta frå rognkjeks immunisert med isolat *PR2* vil binde seg på nokre av proteina til *Pasteurella* spp. isolata, blei det gjennomført ein western blot (WB). Proteinprofilen på PAGE-gelen, produsert som skildra i kapittel 2.1.5, men med molekylvekt standard Kaleidoscope™, måtte overførast på ein 0.2 µm nitrocellulosemembran (Bio-Rad), som blir brukt vidare i blottingsprosessen. PAGE-gel og nitrocellulosemembran blei lagt i 1 x blottebuffer (appendix) i 30 min før montering i buffertank. Svampar og filterpapir i same storleik som gelen og membranen blei metta med 1 x blottebuffer. I ein gelhaldar blei svampar, filterpapir, PAGE-gel og nitrocellulosemembran montert som følgjande: eit svampeunderlag nederst, så tre filterpapir, PAGE-gel, nitrocellulosemembran og tre nye filterpapir og eit svampeunderlag på toppen (Figur 2). Gelen blei så elektroblotta i 60 minutt ved 100V for å overføre proteina på PAGE-gelen til membranen.



Figur 2. Skjematisk oversikt over montering av svamp, filterpapir, PAGE-gel og nitrocellulosemembran i gelhaldar.

Dei neste stega, blokkering, vasking og immundetektering, blei gjennomført i romtemperatur (RT) og med forsiktig risting (IKA® KS 260 basic). Etter blotting blei dei ubundne setane på membranen blokkert med blokkeringsløyning (appendix) i 60 minutt. Membranen blei så vaska 2x5 minutt i TTBS (appendix), og denne vaskeprosedyren blei gjennomført mellom kvart steg i immundetekteringen. Membranen blei så inkubert i ei primærantistoffløyning over natt. Primærantistoffløyninga bestod av antiserum frå immunisert rognkjeks og antistoff buffer (appendix), i førehaldet 2:100. I tillegg til immundetektering med antiserum frå rognkjeks, blei to kontrollar inkludert. Første kontroll inkluderte preserum frå rognkjeks og antistoff buffer i førehaldet 2:100 som primærantistoffløyning, medan den andre kontrollen var tilsett antistoff buffer utan primærantistoff. Etter inkubering med primærantistoff blei membranen inkubert med sekundærantistoff. Sekundærantistoffløyninga bestod av kanin anti-rognkjeks IgM og blei

blanda med antistoff buffer med eit førehald på 1:1000. Kontroll tilsett antistoffbuffer utan primærantistoff, vart tilsett preserum frå kanin blanda med antistoff buffer i eit førehald på 1:1000. Membranen blei inkubert i denne løysinga i 2 timar. Tredje inkubering var med konjugatløysing beståande av geit anti-kanin IgG konjugat med HRP (Dako) og antistoff buffer med førehald 1:1000. Etter siste vask blei membranen lagt i 1 x TBS (appendix) i 5 minutt, like før framkalling. Antistoffa blei visualisert ved å bruke kitet Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad), der membranen blei bada 5 min i 3,5 ml av kvar av dei to løysingane i kitet (enhancer solution og peroxide solution). Membranen blei så fotografert med Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad).

2.1.7 Stripping av western blot

For å kunne bruke nitrocellulosemembranen med den overførte proteinprofilen frå PAGE-gelen fleire gongar, blei stripping av western blotet gjennomført. Dette er ein prosess der ein strippar membranen for alle antistoff og blokkeringsprotein som har bunde seg til membranen under WB prosessen (skildra i kapittel 2.1.6), medan proteinprofilen som er overført blir verande like heil igjen på membranen. På denne måten kan ein blokkere membranen og merke med antistoff på nytt, og på den måten kan man samanlikne identisk PAGE-gel merka med ulike antistoff.

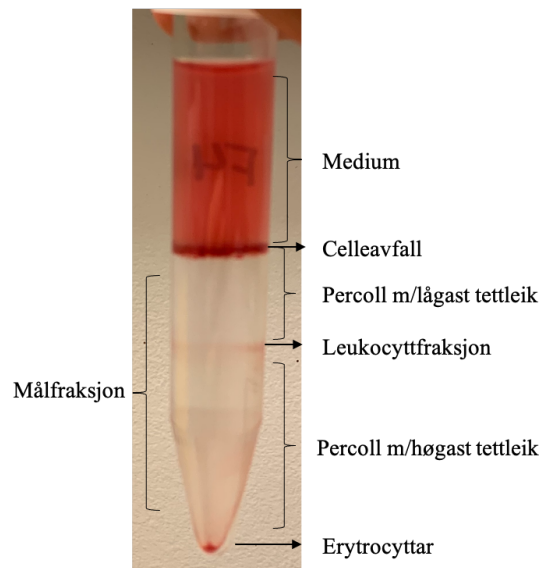
Alle dei følgjande stega blei utført ved romtemperatur og forsiktig risting. Membranen blei bada i stripebuffer (appendix) i 2 x 10 min, etterfulgt av 2 x 10 min vask i PBS og 2 x 5 min vask i TTBS. Membranen var så klar for blokkering (kapittel 2.1.6).

2.2 Isolering av leukocytter

2.2.1 Rognkjeks

Hovudenyrevev frå rognkjeks blei aseptisk dissekert ut og overført til gentleMACS™ C røyr på is, som på førehand var tilsett 4,5 ml kaldt L-15 medium (appendix). Det blei isolert leukocytter frå hovudnyre (HKL) til 9 rognkjeks, som hadde ei gjennomsnittleg vekt på 527,5 g ± 71,7 g og ein gjennomsnittleg lengd på 20,3 cm ± 1,2 cm. Vevsprøvene blei så homogenisert med ein gentleMACS Dissociator, med innstillinga «D». Dei fortynna nyreprøvene i suspensjon (4,5 ml) blei så forsiktig pipettert over i eit sentrifugerøyr med percollgradientar. Percollgradientane (appendix) brukt til rognkjeks hadde tettleikane 1,070 g/ml og 1,050 g/ml. 3 ml av percolløysinga med høgast tettleik blei pipettert nederst i sentrifugerøyra, medan 2,5 ml av løysinga med lågast tettleik blei pipettert forsiktig, med ei pasteurpipette, over den andre

løysinga slik at ein kunne sjå eit tydeleg skilje mellom dei to tettleikane. Percollgradientane med nyreprøvar blei så sentrifugert (Allegra® X-15R, Beckman Coulter) ved 400 x g og 4°C i 40 min. Etter sentrifugering blei leukocytfraksjonen, sjå Figur 3, pipettert ut, overført til eit nytt sentrifugerøyr og vaska i L-15 medium i 10 min ved 200 x g og 4°C (Allegra® X-15R, Beckman Coulter). Supernatanten blei tømd av og pelleten blei resuspendert forsiktig i L-15 medium.



Figur 3. Sentrifugerøyr med percollgradient og nyreprøve, etter sentrifugering. Leukocytfraksjonen blei henta ut ved å pipettere ut målfraksjon.

2.2.2 Laks

Hovudenyrevev frå laks blei aseptisk dissekert ut og overført til gentleMACS™ C røyr på is, som på førehand var tilsett 2 ml kaldt L-15 medium (appendix). Det blei isolert leukocytar frå hovudnyre (HKL) til 7 laks, med ei gjennomsnittleg vekt på $687 \text{ g} \pm 115,5 \text{ g}$ og ein gjennomsnittleg lengd på $35,9 \text{ cm} \pm 1,1 \text{ cm}$. Prøvane blei så homogenisert med ein gentleMACS Dissociator, med innstillinga «liver-02», to gongar. Dei fortynna nyreprøvane (2 ml) blei så forsiktig pipettert over percollgradientar tilsett i eit sentrifugerøyr. Percolløysingane (appendix) brukt til laks hadde tettleikane 1,075 g/ml og 1,060 g/ml. 4 ml av løysinga med høgast tettleik blei pipettert nederst i sentrifugerøyra, medan 3 ml av løysinga med lågast tettleik blei pipettert forsiktig, med ei pasteurpipette, over den andre slik at ein kunne sjå eit klart skilje mellom dei to gradientane. Percollgradientane med nyreprøvar på toppen blei så sentrifugert (Allegra® X-15R, Beckman Coulter) ved 400 x g og 4°C i 40 min. Etter sentrifugering blei leukocytfraksjonen, sjå Figur 3, pipettert ut, overført til eit nytt sentrifugerøyr og vaska i L-15

medium i 10 min ved 200 x g og 4°C (Allegra® X-15R, Beckman Coulter). Supernatanten blei tømd av og pelleten blei resuspendert forsiktig i L-15 medium.

2.2.3 Teljing av celler

For vidare justering av celletal, blei leukocyttane tald i ein CASY celleteljer (CASY, Inovatis). Maskina gjer ein rask analyse av antal celler per ml, samt opplysningar om aggregeringsfaktor (gjennomsnittleg kor mange celler som heng saman) og kor mange levande celler som er i prøva. Før teljing blei 10 µl leukocyttuspensjon tilsett i 10 ml filtrert CASYton. Cellene blei talde på eit førehandsprogrammert program for hovudnyrevev frå hhv. rognkjeks og laks. Talet på levande celler per ml blei brukt for vidare justering av celletal til 5×10^6 celler/ml for dei vidare analysane.

2.2.4 CytoSpin

For å kunne studere dei ulike typane av leukocyttar i prøvane, blei det laga CytoSpin preparat av dei isolerte leukocyttane. Etter teljing, som forklart i kapittel 2.2.3, blei celletalet justert til 1×10^6 celler/ml, slik at ein får ei fin fordeling av enkeltceller på preparatet. Objektglas blei montert i ein Cytoclip saman med eit filter og prøvekammer. I kvart prøvekammer blei det lagt 100 µl leukocyttuspensjon, før dei blei sentrifugert i 3 min ved 1000 rpm (Shandon Cytospin 3 cytosentrifuge). Preparata blei tørka ved RT i mørket i 24 timar, før dei blei farga.

2.2.5 ColorRapid (CR)

ColorRapid er ein rask og enkel måte å farge cytospinpreparat av leukocyttar før mikroskopering. Eit kit (ColorRapid-set, LucernaChem) med tre ColorRapid løysingar blei brukt til å farge preparata, ved å dyppe preparata 5 gonger 1 sekund i kvar løysing. Først blei preparata dyppa 5 x 1 sek. i ei fikseringsløysing (100 wt% metanol), så 5 x 1 sek. i fargeløysing 1 og til slutt 5 x 1 sek i fargeløysing 2. Mellom kvar løysing blei enden av preparatet forsiktig satt på eit filterpapir for å fjerne overflødig væske. Etter siste fargeløysing blei preparata skylja under rennande vatn, med baksida opp for å unngå å øydeleggje cellene på preparatet. Preparata blei så lagt til tørk i 24 timar i mørket.

2.2.6 Myeloperoksidase assay (MPO)

Myeloperoksidase assay farging er ein metode for å farge enzymet myeloperoksidase i celler. Dersom cellene er positive, vil ein sjå brune granulat i cella, medan negative celler vil vere fargelause. Ein PAP penn (Sigma) blei brukt til å omringe leukocytane på cytospinpreparatet. Preparata blei så fiksert i 30 sekund i ei fikseingsløysing av 10% formalin og 90% etanol, for så å bli reinsa i rennande vatn i 10 minutt og tørka i mørket i 10 minutt. Cellene blei så dekkav ei fargeløysing av SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablettar løyst i 15 ml deionisert vatn, og inkubert i eit mørkt, fuktig miljø i 30 min. Preparata blei så reinsa i rennande vatn i 10 min, og kontrastfarga med Mayer's hematoxilyn (Sigma) i 10 min, for så igjen bli reinsa under rennande vatn i 10 min. Preparata blei dekkav dekkglas, ved å ha på ein liten dråpe monteringsmedium (DPX Mountant for histology, slide mounting medium, Sigma) på dekkglaset som blei forsiktig trykka på preparatet for å unngå danning av bobler. Limen fekk tørke i 24 timar i mørket før mikroskopering.

2.3 Flow cytometry

Flow cytometry er ein metode som vært brukt til å gje raske kvalitative og kvantitative målingar på eit bestemt tal celler. I denne oppgåva blei flow cytometry brukt til å måle andelen av leukocytar frå rognkjeks og laks som utførte respiratory burst, når dei var eksponert for *P. atlantica* genomovar *cyclopteri*, *P. atlantica* genomovar *salmonicida* og *V. anguillarum*.

Tabell 3 visar oversikt over kva for kontrollar og prøvar som er brukt i dette forsøket, og kva som blei tilsett i desse. DHR vil i kontakt med oksygen oksiderast til fluorescerande rhodamine (RHO). Positiv kontroll inneheldt leukocytar, DHR og H₂O₂, og skal vise at leukocytane kan drive respiratory burst aktivitet. Leukocyt kontroll inneheldt berre leukocytar, og skal kontrollere at leukocytar i seg sjølv ikkje avgjer fluorescens som kan tolkast som respiratory burst aktiverte celler. Ustimulert kontroll inneheldt leukocytar og DHR, og skal vise at DHR åleine ikkje påverkar leukocytane til å avgje fluorescens. DHR kontroll inneheldt bakteriar og leukocytar, og skal kontrollere at leukocytar og bakteriar i seg sjølv ikkje avgjer fluorescens som kan tolkast som aktiverte celler. Prøvar inneheldt bakteriar, leukocytar og DHR, og er dei som analyserast for om bakterien stimulerer leukocytane til å utføre respiratory burst.

Tabell 3. Oversikt over kva som blir tilsett i dei forskjellige kontrollane og prøvane brukt i forsøket.

Røyrnr.	Bakteriar	Leukocyttar	DHR	H ₂ O ₂	Prøve
1	-	+	+	+	Positiv kontroll
2	-	+	-	-	Leukocyttd kontroll
3	-	+	+	-	Ustimulert kontroll
4	+	+	-	-	DHR kontroll
5	+	+	+	-	Prøvar

Isolerte HKL frå rognkjeks og laks, som beskriven i kapittel 2.2.1 og 2.2.2, blei talde i CASY celleteljar og celletalet blei justert til 5×10^6 celler/ml med L-15 medium. Bakteriane som lista i kapittel 2.1 (Tabell 1), blei henta ut i den sein-eksponentielle vekstfasen, og tald i CASY celleteljar. Konsentrasjonen blei justert til $2,5 \times 10^8$ bakteriar/ml med L-15 medium. Leukocyttsuspensjon og bakteriesuspensjon, 500 µl av kvar, blei blanda i 5 ml røyr (5 ml Polystyrene round bottom tube, BD Falcon) og inkubert i 3,5 timar ved 15°C (Panasonic MIR-154-PE). I kontrollane utan bakteriar blei det tilsett 500 µl sterilt L-15 medium.

Etter inkubasjon blei suspensjonen forsiktig pipettert over i eit nytt 5 ml røyr på toppen av 3 ml glukosepute (appendix) og sentrifugert i 10 min ved 100 x g og 4°C (Allegra® X-15R, Beckman Coulter), dette for å fjerne bakteriar i løysinga og bakteriar festa utanpå cellene. Etter sentrifugering blei topplaget pipettert vekk og supernatanten vart forsiktig helt av. Pelleten av leukocyttar blei så forsiktig resuspendert i 0,9 ml PBS 380 mOsm m/heparin (appendix), og prøvane som skulle ha DHR blei tilsett 25 µl DHR (appendix) og blanda på vortex ristar i ca. 3 sek, før dei blei satt til inkubering igjen i mørket ved 15°C i 30 min (Panasonic MIR-154-PE). Positiv kontroll blei først inkubert i 20 min, før ein tilsette 50 µl H₂O₂, og inkuberte vidare i 10 min. Når røyra var ferdig inkubert, blei dei satt på is og tilsett 300 µl PBS 380 mOsm m/heparin.

Cellesuspensjonane blei analysert i ein BD FACSCalibur, og resultatane blei analysert med tilpassa protokollar for laks- og rognkjeksleukocyttar i programmet CellQuestPro. Frå kvar prøve blei det tald 10 000 celler. Cellene var analysert for lysspreiing framover (FS) og lysspreiing til sidane (SS), som separerer cellene i førehald til henholdsvis storleik og granularitet i scatter plot. Ved respiratory burst aktivitet, vil DHR oksiderast til fluorescerande rhodamine (RHO), og avgitt fluorescens blir målt i flow cytometeret og angjevast i eit histogram. Histogramma brukast til å kalkulere andelen celler som aktivt driv respiratory burst,

og visar styrken av fluorescens som gjevast frå cellene Prøvane utan tilsett DHR er leukocyt kontroll og DHR kontroll, og desse er med for å undersøkje fluorescensen avgitt av leukocytar med og utan bakteriar i seg sjølv. Prøvane som var tilsett DHR blei analysert ved FL1 = 365nm, medan prøvane utan tilsett DHR blei analysert ved FL1 = 600 nm. Data filane blei så overført til analyseprogrammet Cytobank (Beckman Coulter) for vidare arbeid med resultatata.

2.3.1 Respiratory burst måling

Prøvane blei analysert i programmet Cytobank (Beckman Coulter). For å kalkulere % aktiverte leukocytar i prøvane, blei først cellepopulasjonar i scatter-plot av ustimulert kontroll vald til analyse. Utvalet blei gjennomført for å unngå at døydde celler og cellerestar blir med i analysane. Den valde cellepopulasjonen til den ustimulerte kontrollen blei så visualisert som eit FL1-histogram. På histogrammet blei det lagt på ein markør som blei satt til 2% RHO positive celler. Denne markøren blei vidare lagt til på histogramma frå dei stimulerde prøvane. Markøren viste då kor stor prosentandel celler i den stimulerde prøven som var RHO positive. For å kalkulere andelen aktiverte leukocytar blei % RHO positive celler i den ustimulerte kontrollen trekt fra % RHO positive celler i dei stimulerde prøvane. Resultata blei presentert som histogram og scatter-plot. Det blei analysert 9 parallellar for kvart bakterieisolat og kontrollar på HKL frå rognkjeks, og 7 parallellar for kvart bakterieisolat og kontrollar på HKL frå laks. På denne måten blei HKL frå kvart individ, av laks og rognkjeks, analysert etter eksponering for alle bakterieisolata. Gjennomsnittet av % RHO positive celler blei kalkulert for kvart bakterieisolat og presentert i eit stolpediagram.

2.3.2 Statistikk

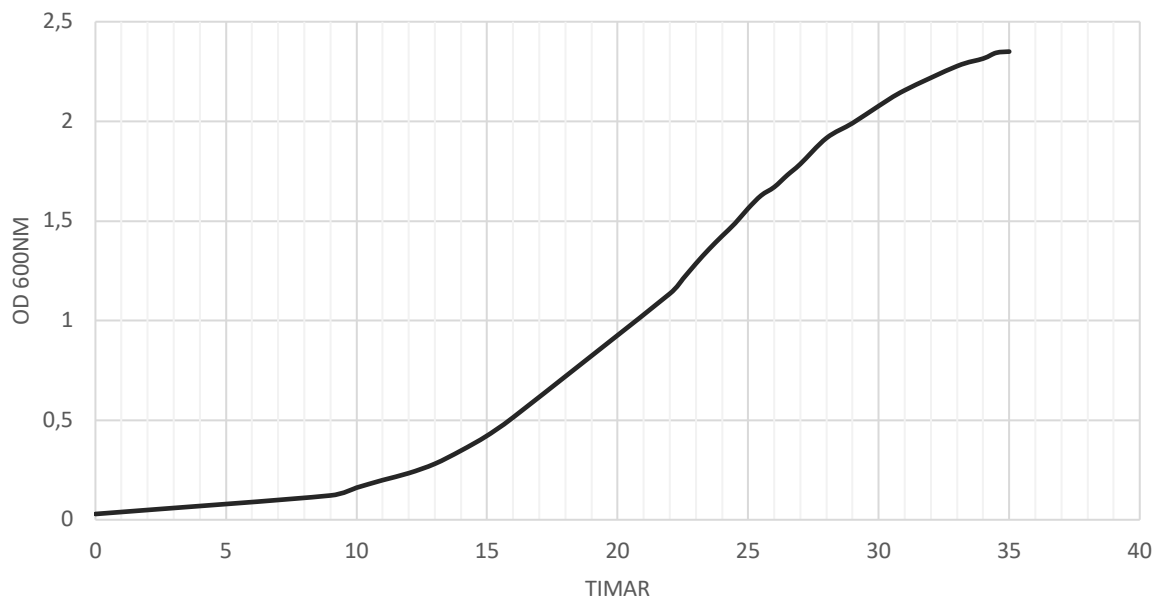
I GraphPad Prism 5 blei einvegs ANOVA test gjennomført på resultatata frå ustimulert kontroll og prøvane stimulert med bakteriar. Dataa blei analysert med Tukey's Multiple Comparison Test. Resultata blei rekna som signifikante dersom $P < 0,05$. I Prism 5 er $P > 0,05 = n.s.$, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ og $***P \leq 0,001$.

3 - Resultat

3.1 Vekstkurver

3.1.1 *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*

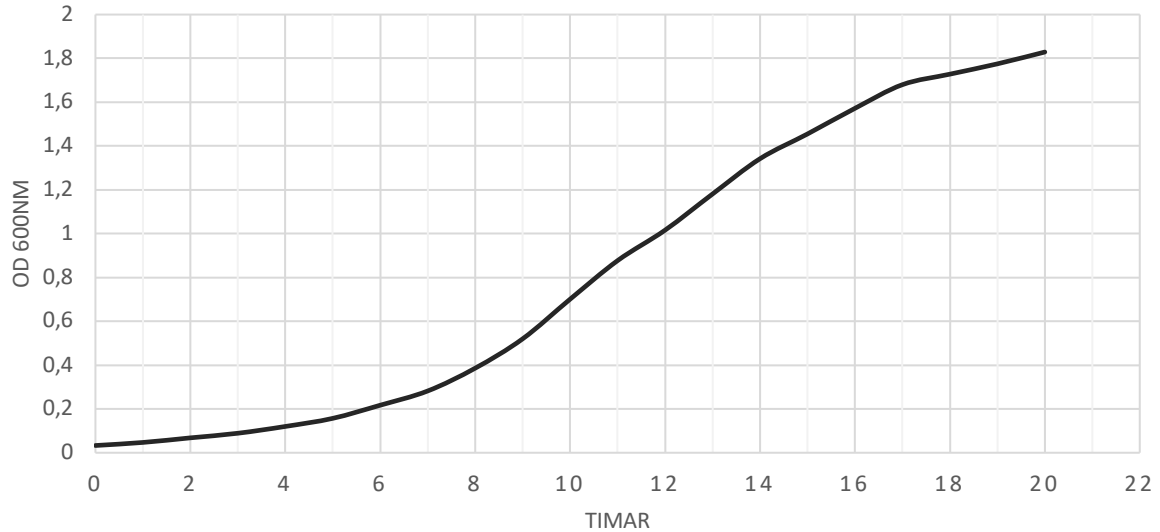
PR1 veks moderat fram til tidlig eksponentiell vekstfase inntreff etter 10 timar. Stasjonær fase er nådd etter ca. 30 timar. Vekstkurva visar at sein-eksponentiell vekstfase er ved OD 1,5-2,0 (Figur 4).



Figur 4. Vekstkurve for *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (PR1), dyrka i TSB 2% NaCl tilsett 10% FCS ved 20°C og 200 rpm. X-aksen visar timar etter inokulering og y-aksen visar OD målt ved 600nm.

3.1.2 *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*

PL1 veks moderat fram til den når tidleg eksponentiell vekstfase etter 6 timar. Stasjonær fase er nådd etter 16 timar. Vekstkurva visar at sein-eksponentiell vekstfase er ved OD 1,2-1,6 (Figur 5).



Figur 5. Vekstkurve for *P. atlantica* genomovar *salmonicida* (PL1), dyrka i TSB 2% NaCl tilsett 10% FCS ved 20°C og 200 rpm. X-aksen visar timar etter inokulering og y-aksen visar OD målt ved 600nm.

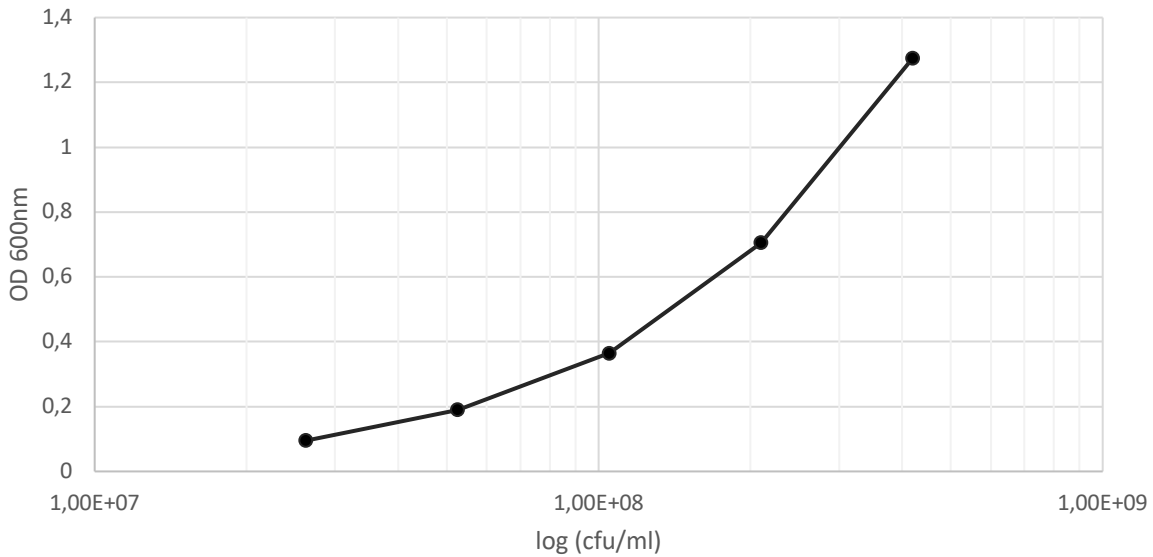
3.2 OD-cfu korrelasjon

3.2.1 *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*

For å kalkulere cfu/ml for PR1 blei agarplatar inokulert med fortynning 10^{-7} bakteriesuspensjon vald ut. Antal koloniar på plata var 84, og cfu/ml blei kalkulert ved å bruke formel 6, som presentert i 2.1.3:

$$\text{Antal celler (cfu) pr. ml} = \frac{84}{10^{-7}} = 8,4 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$$

OD/cfu korrelasjonen for PR1 er vist i Figur 6, og kombinerar OD målt i to-folds fortynningsrekke av bakteriesuspensjon og kalkulert celletal ved fortynningane basert på cfu/ml. I eksponentiell vekstfase ved OD 1,2 har ein $1,3 \times 10^8$ cfu/ml.



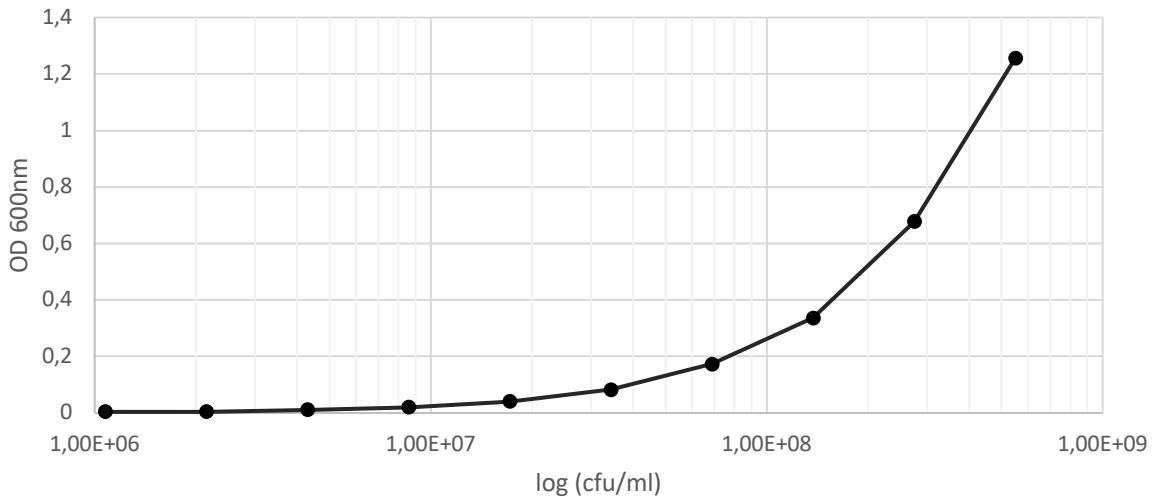
Figur 6. OD-cfu korrelasjon for *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (PR1), dyrka i TSB 2% NaCl tilsett 10% FCS ved 20°C og 200 rpm. X-aksen visar log(cfu /ml) og y-aksen visar OD målt ved 600nm.

3.2.2 *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*

For å kalkulere cfu/ml for PL1 blei agarplatar som var inokulert med fortynning 10⁻⁸ bakteriesuspensjon vald ut. Antal koloniar på plata for parallell ein var 6 og koloniar på plata for parallell to var 16. Dette gjer eit gjennomsnitt på 11 koloniar. Cfu/ml blei kalkulert ved å bruke formel 6, som presentert i 2.1.3:

$$\text{Antal celler (cfu) pr. ml} = \frac{11}{10^{-8}} = 1,1 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$$

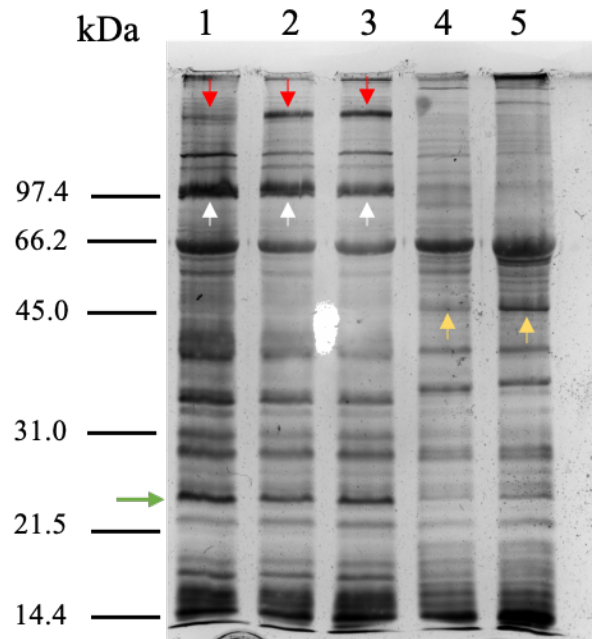
OD/cfu korrelasjonen for PL1 er vist i Figur 7, og kombinerar OD målt i to-folds fortynningsrekke av bakteriesuspensjon og kalkulert celledetal ved fortynningane basert på cfu/ml. I eksponentiell vekstfase ved OD 1 har ein 1,3 x 10⁸ cfu/ml.



Figur 7. OD-cfu korrelasjon for *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* (PL1), dyrka i TSB 2% NaCl tilsett 10% FCS ved 20°C og 200 rpm.. X-aksen visar log(cfu /ml) og y-aksen visar OD målt ved 600nm.

3.3 SDS-PAGE og sølvfarging

Proteinprofilen til PL1, PL2 og PL3 blei samanlikna med proteinprofilen til PR1 og PR2. Dei tre lakseisolata har liknande proteinprofilar og dei to rognkjeksisolata har liknande proteinprofilar. Proteinprofilen til dei to rognkjeksisolata skiljar seg frå proteinprofilen til isolata frå laks (Figur 8). I Figur 8 markerar raude pilar proteinband som befinn seg over 97,4 kDa som dukkar opp hjå lakseisolata, men som er fråverande hjå rognkjeksisolata. Kvite pilar markerar sterke band på ca. 97,4 kDa hjå lakseisolata som samanlikna er veldig svake hjå rognkjeksisolata. På omtrent 45,0 kDa markerar gule pilar proteinband tilstades hjå rognkjeksisolata som er fråverande hjå lakseisolata. I tillegg ser ein i Figur 8, litt over 21,5 kDa, eit band som blir sterkare uttrykka hjå lakseisolata enn hjå rognkjeksisolata, markert med horisontal grøn pil.

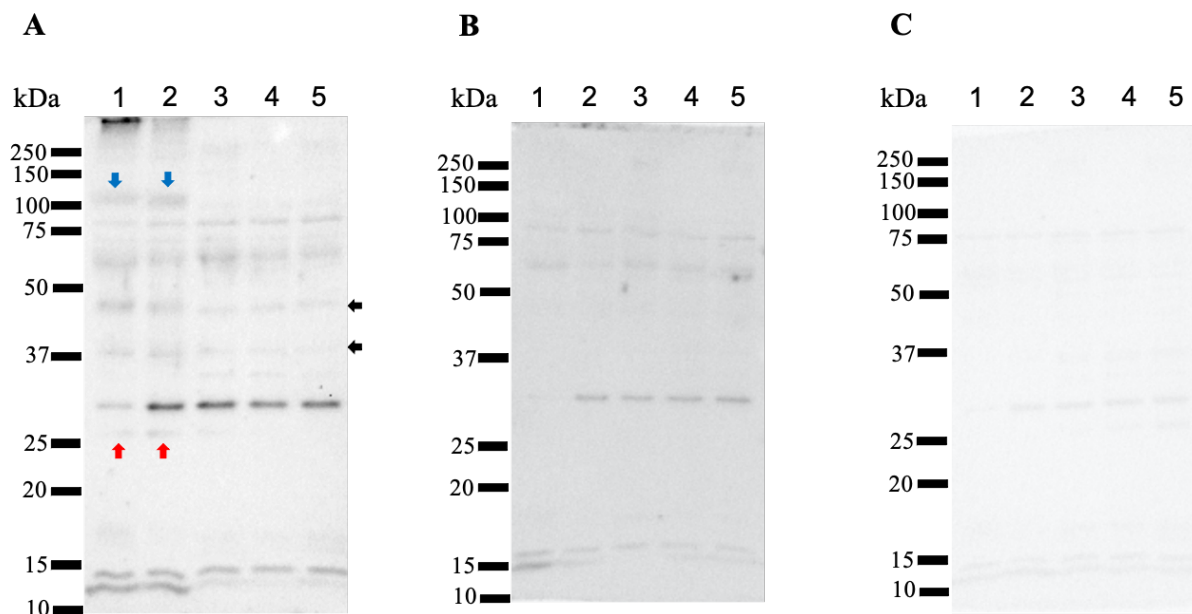


Figur 8. Proteinprofilen til dei fem *Pasteurella* spp. isolata. 1: PL2, 2: PL3, 3: PL1, 4: PR2, 5: PR1. Raude pilar markerar der lakseisolata har band, men ikkje rognkjeksisolata. Gule pilar markerar der rognkjeksisolata har band medan lakseisolata ikkje har. Kvite pilar og grøn horisontal pil markerar der det er sterkare band hjå lakseisolata enn hjå rognkjeksisolata.

Resultata visar at *Pasteurella* isolata henta frå rognkjeks i hovudsak er ganske like med tanke på storleiken til protein som er uttrykka i sein-eksponentiell vekstfase. Tilsvarande er *Pasteurella* isolata henta frå laks like med tanke på storleiken til protein som er uttrykka i sein-eksponentiell vekstfase. Resultata visar òg at isolata henta frå rognkjeks er ulik isolata henta frå laks.

3.4 Western blot

WB av *Pasteurella* spp. isolata PL1, PL2, PL3, PR1 og PR2 visar at antistoff produsert i rognkjeks immunisert med PR2 bind seg på protein frå bakterieisolata. Figur 9 A visar WB med serum frå immunisert rognkjeks. Blå pilar markerar der antistoff har bunde seg på protein ved ca. 100 kDa hjå rognkjeksisolata, men ikkje hjå lakseisolata. Raude pilar markerar antistoff bunden på protein ved ca. 25 kDa hjå rognkjeksisolata, men ikkje hjå lakseisolata. Svarte, horisontale pilar markerar der ein har antistoff bunden på protein på litt under 50 kDa og på ca. 37 kDa hjå alle dei fem *Pasteurella* spp. isolata. Figur 9 B visar WB med preserum frå rognkjeks. Her ser ein ikkje band på dei same plassane som blå, raude og svarte pilar merkar i Figur 9 A. Figur 9 C visar WB med preserum frå kanin. Her ser ein ikkje band ved dei plassane blå, raude og svarte pilar markerte ved i Figur 9 A. For alle blot, A, B og C, er membranen eksponert i 1 sek for framkalling.



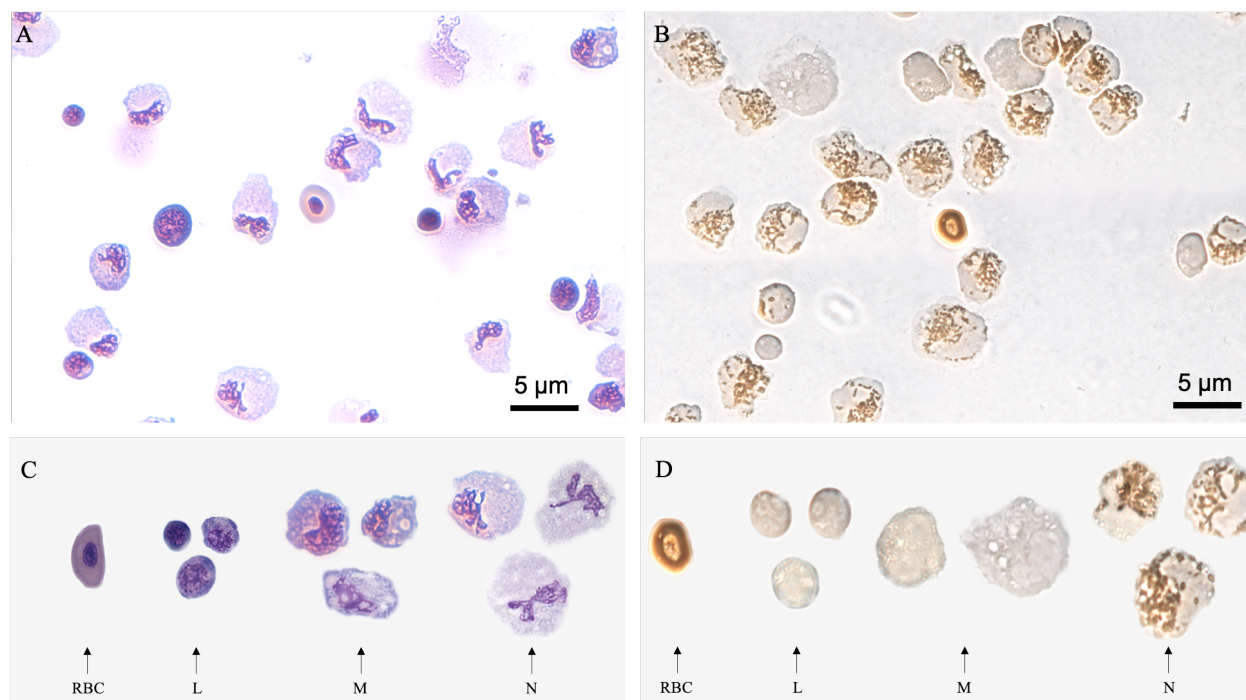
Figur 9. Western blot av dei fem *Pasteurella* spp. isolata brukt i denne oppgåva. For alle bileta gjeld: 1: PR1, 2: PR2, 3: PL1, 4: PL2 og 5: PL3. A: Western blot dekket med serum frå rognkjeks immunisert med PR2. B: Kontroll, dekket med pre-serum frå rognkjeks. C: Kontroll, dekket med pre-serum frå kanin. Raude og blå pilar merkar der serum frå immunisert rognkjeks kun har bunde seg på protein til rognkjeksisolata av *Pasteurella* sp. Svarte pilar merkar der serum frå immunisert rognkjeks har bunde seg til protein på alle *Pasteurella* spp. isolata og er immunreaktive protein som ikkje førekjem i kontrollane.

3.5 Cytospinpreparat og farging med ColorRapid og MPO

3.5.1 Rognkjeksleukocytter

Cytospinpreparat av HKL frå rognkjeks farga med ColorRapid (Figur 10 A og C) visar forskjellige typar leukocytter. Det blei i hovudsak observert store polymorfnukleære celler, store mononukleære celler med nyreformerte kjerne, og nokre mindre runde celler med stor rund kjerne og lite cytoplasma. Dette er truleg henholdsvis neutrofile granulocytter, makrofagar og lymfocytter. I tillegg vart det observert nokre raude blodceller.

Cytospinpreparat av HKL frå rognkjeks farga for MPO (Figur 10 B og D) visar celler som er farga brune og celler som har svak bakgrunnsfarge av Hematoxylin. Det blei i hovudsak observert store celler med brune granuler, store celler som ikkje er farga, og mindre runde celler som ikkje er farga. Dette er truleg henholdsvis neutrofile granulocytter, makrofagar og lymfocytter. I tillegg blei det observert nokre raude blodceller, som er sterkt farga brun fordi dei har endogen peroxidase.

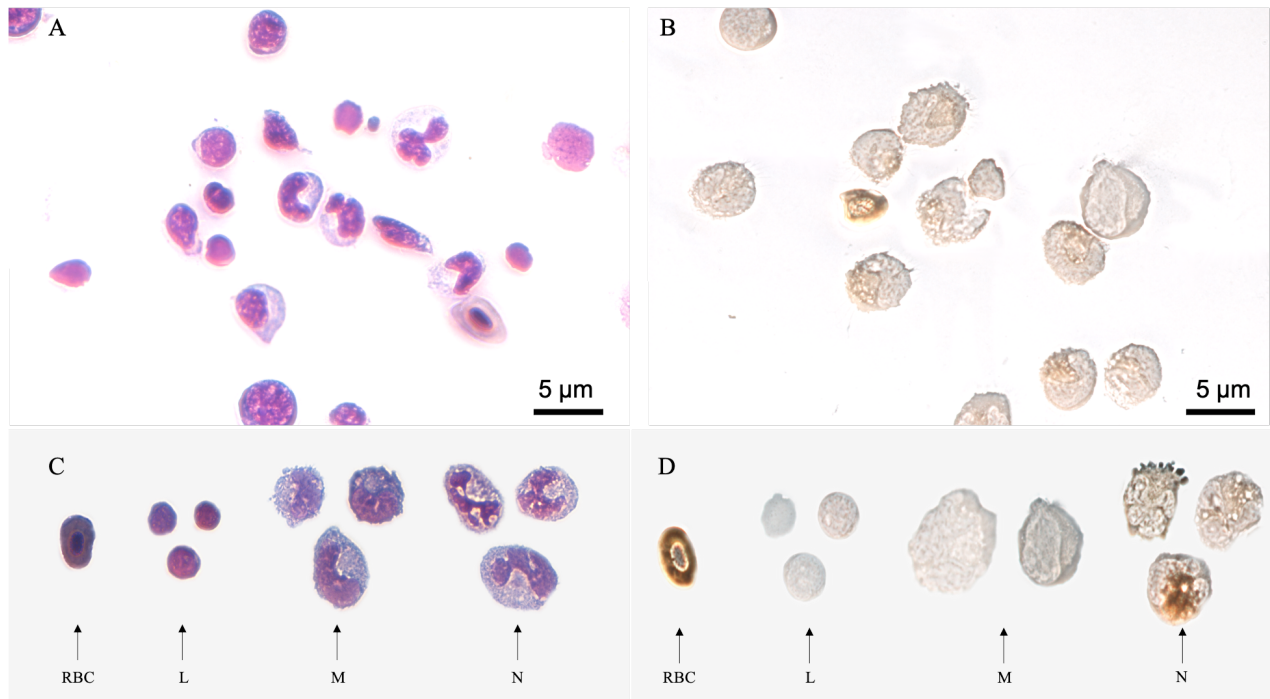


Figur 10. Oversikt over HKL frå rognkjeks farga med ColorRapid (A og C) og for MPO (B og D), 100x forstørring, scale bar = 5 μm . A og B er oversiktsbilete. C og D visar ulike celletypar funnen hjå rognkjeks: raude blodceller (RBC), lymfocytter (L), makrofagar (M) og neutrofile granulocytter (N). Bileta er redigert i GIMP – 2.10 (versjon 2.10.14).

3.5.2 Lakseleukocytter

Cytospinpreparat av HKL frå laks farga med ColorRapid (Figur 11 A og C), visar forskjellige typar av leukocytter. Fleire forskjellige leukocytter kunne observerast, og det var i hovudsak store polymorfnukleære celler, store mononukleære celler med nyreforma kjerne og nokre små runde celler med store runde kjernar og lite cytoplasma som blei observert. Henhaldsvis er desse truleg neutrofile granulocytter, makrofagar og lymfocytter. I tillegg kunne ei og anna raud blodcelle observerast.

I cytospinpreparat av HKL frå laks farga for MPO (Figur 11 B og D) kunne det observerast forskjellige celler, anten farga brune eller grålege i fargen etter bakgrunnsfarging med Hematoxylin. I hovudsak blei det observert store celler med brune granular, store grålege celler og små runde grålege celler. Her er trulegvis desse cellene henhaldsvis neutrofile granulocytter, makrofagar og lymfocytter. I tillegg blei det òg observert ei og anna raud blodcelle, som var sterkt farga brune fordi dei har endogen peroxidase.



Figur 11. Oversikt over HKL frå laks farga med ColorRapid (A og C) og for MPO (B og D), 100x forstørring, scale bar = 5 μm. A og B er oversiktsbilete. C og D visar ulike celletypar funnen hjå laks: raude blodceller (RBC), lymfocytter (L), makrofagar (M) og neutrofile granulocytter (N). Bileta er redigert i GIMP – 2.10 (versjon 2.10.14).

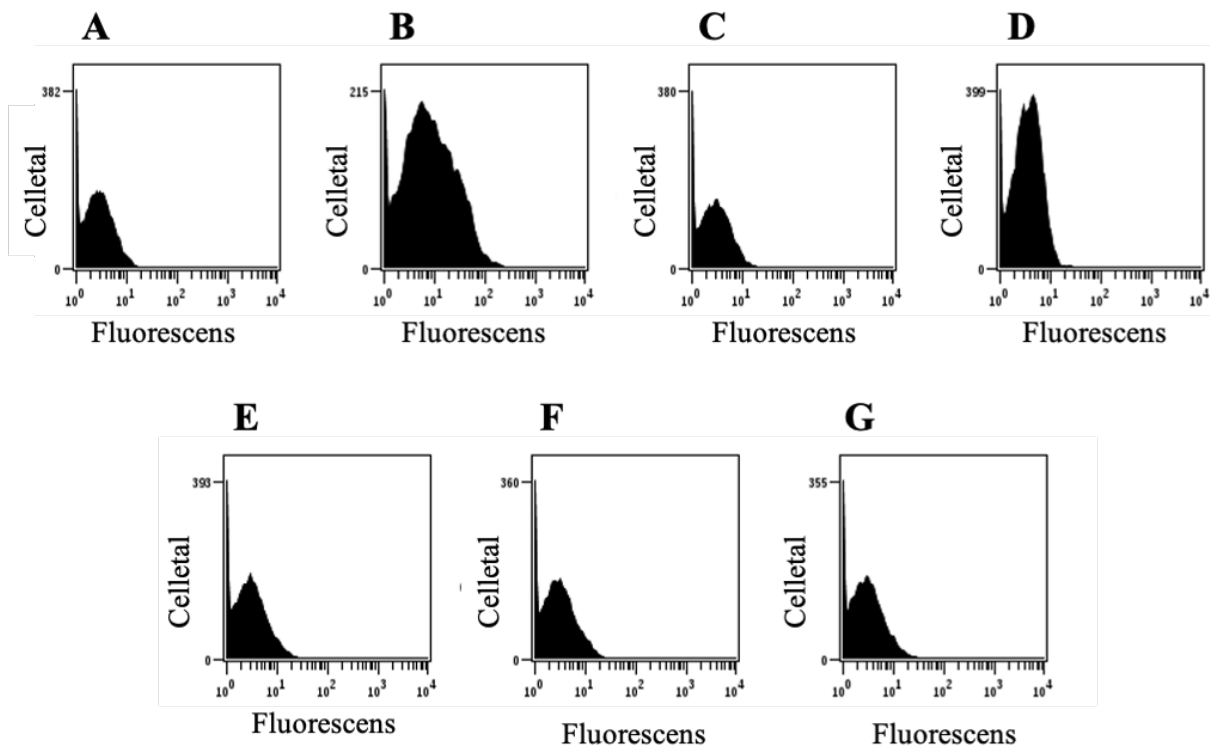
3.6 Flow cytometry analyse av respiratory burst

3.6.1 Rognkjeksleukocytter eksponert for bakteriar

I dette forsøket blei det brukt isolerte leukocytter frå hovudnyre til 9 rognkjeksar. For kvar av dei 9 fiskane blei effekten av eksponering for tre isolat av *P. atlantica* genomovar *salmonicida*, to isolat av *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* og eitt isolat av *V. anguillarum* (Tabell 1) analysert for respiratory burst aktivitet og samanlikna opp mot leukocytter kun tilsett DHR (ustimulert kontroll), leukocytter stimulert med H_2O_2 (positiv kontroll), leukocytter som ikkje var eksponert for bakteriar og ikkje tilsett DHR (leukocytt kontroll) og leukocytter tilsett bakteriar, men ikkje DHR (DHR kontroll) (Tabell 3). Representative prøvar blei vald ut for kvart av bakterieisolata for å presentere resultata i histogram i dei følgjande figurane. Gjennomsnittleg respiratory burst respons hjå rognkjeksleukocytter stimulert med kvart isolat, er framstilt som stolpediagram.

Det blei analysert ein leukocytt kontroll (Tabell 3) for kvar fisk som blei brukt i forsøket, og ein representativ prøve blei vald ut og presentert i Figur 12 A. I tillegg blei det gjennomført DHR kontroll for kvart bakterieisolat for kvar fisk, som er presentert i Figur 12 B-G. Alle

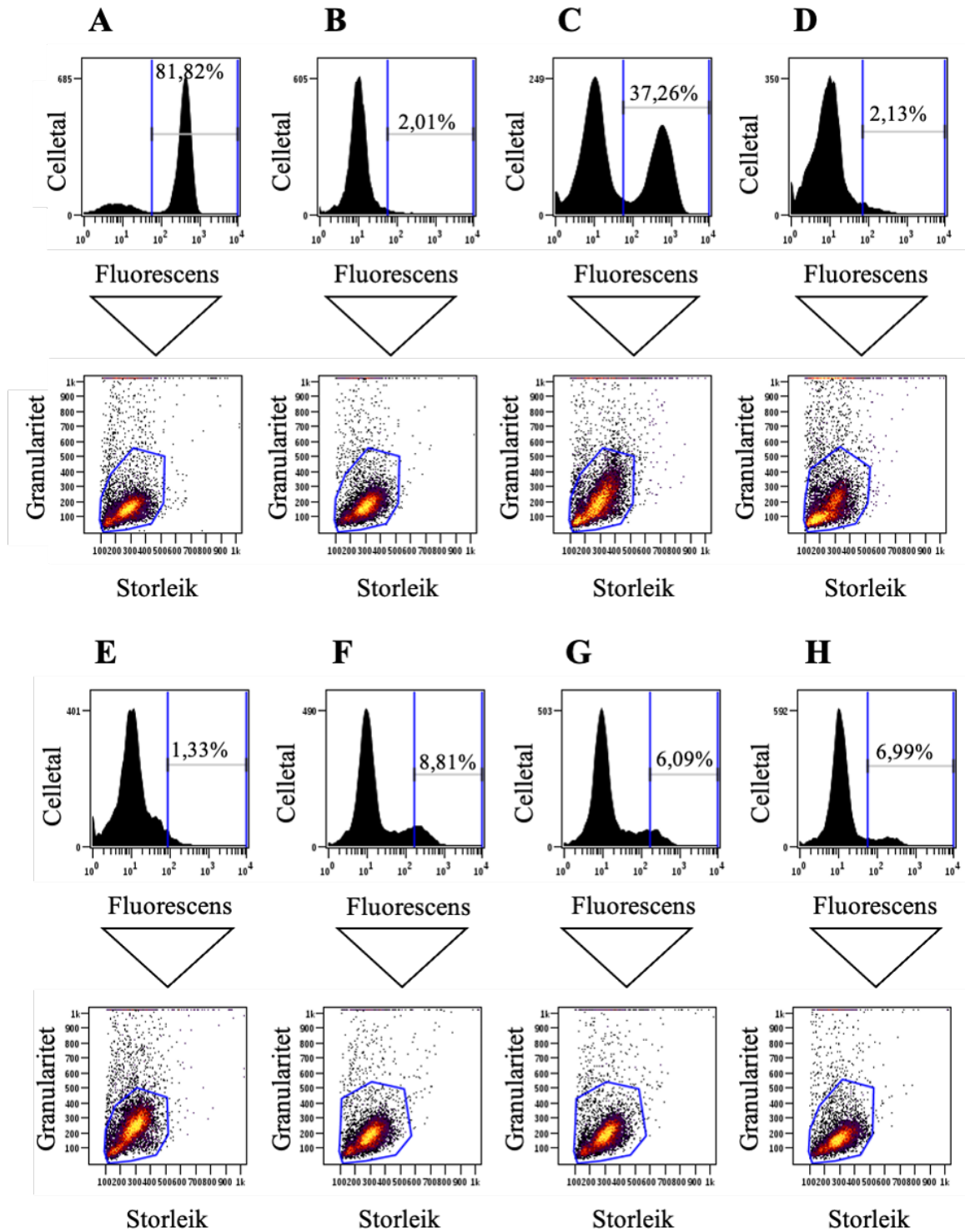
kontrollane i Figur 12 hadde ein topp med leukocyttar som låg mellom 10^0 og 10^2 i fluorescens, og ingen av kontrollprøvene viste ein fluorescens over 10^2 .



Figur 12. Leukocyt kontroll og DHR kontrollar for respiratory burst analysar av HKL frå rognkjeks. Leukocyt kontroll inneheldt kun leukocyttar. DHR kontrollar inneheldt bakteriar og leukocyttar. FL1 histogram som visar fluorescens på x-aksen og celltetal på y-aksen. A: Leukocyt kontroll. B: DHR kontroll for PR1. C: DHR kontroll for PR2. D: DHR kontroll for V/R. E: DHR kontroll for PL1. F: DHR kontroll for PL2. G: DHR kontroll for PL3.

Representative prøvar av ustimulert kontroll (leukocyttar tilsett DHR, men utan bakteriar) og leukocyttar stimulert med kvart bakterieisolat blei vald ut til å presentere resultatane i Figur 13. Figuren viser ein oversikt over respiratory burst analysar ved flow cytometry for positiv kontroll (A), ustimulert kontroll (B) og prøvar stimulert med dei seks bakterieisolata (Tabell 1) brukt i dette forsøket (C-H). Positiv kontroll kontrollerer at leukocyttopulasjonen kan drive respiratory burst aktivitet, medan ustimulert kontroll kontrollerer korleis leukocyttopulasjonen ser ut utan å ha blitt stimulert med korkje bakteriar eller H_2O_2 . I prøvane stimulert med bakteriar undersøkjast det kor stor andel av cellepopulasjonen som driv respiratory burst etter eksponering for bakteriar, samanlikna med den ustimulerte prøven. Resultata blir presentert som FL1 histogram, med tilhøyrande scatter-plot (under). Figurane er bearbeida som forklart i kapittel 2.3.1.

Positiv kontroll for HKL isolert frå rognkjeks gav 81,82% RHO positive celler (Figur 13 A). I histogrammet er det ein liten topp og ein stor topp. Den minste toppen representar celler som ikkje utfører respiratory burst, og ligg på 10^1 i fluorescens, medan den største toppen representerer celler som utfører respiratory burst, og ligg på mellom 10^2 og 10^3 i fluorescens. Den representative prøven av HKL stimulert med PR1 gav 37,26% positive celler (Figur 13 C). Histogrammet har to toppar; den første ved 10^1 i fluorescens, celler som ikkje aktivt driv respiratory burst, og den andre like før 10^3 i fluorescens, celler som aktivt driv respiratory burst. HKL stimulert av PR2 gav 2,13% positive celler (Figur 13 D). HKL stimulert med VR gav 1,33% positive celler (Figur 13 E). HKL stimulert med PL1 gav 8,81% positive celler, og histogrammet har ein høg topp ved 10^1 i fluorescens og ein litt mindre topp mellom 10^2 og 10^3 i fluorescens (Figur 13 F). HKL stimulert med PL2 gav 6,09% positive celler, og ein høg topp ved 10^1 og ein mindre topp mellom 10^2 og 10^3 i fluorescens i histogrammet (Figur 13 G). HKL stimulert med PL3 gav 6,99% positive celler, og ein topp i histogrammet ved 10^1 i fluorescens (Figur 13 H).

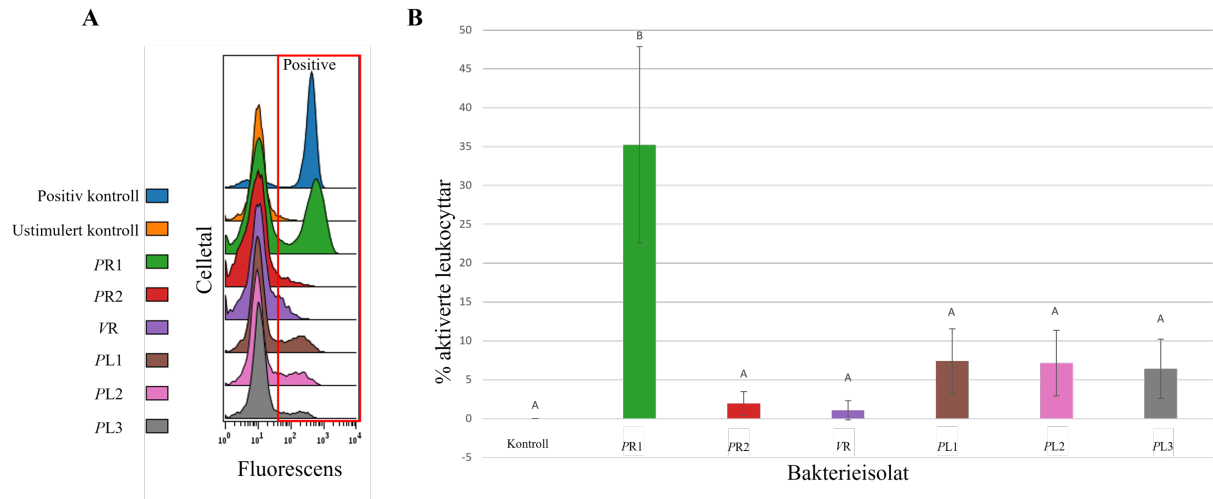


Figur 13. Flow cytometry analysar av HKL frå rognkjeks som visar respiratory burst aktivitet i dei forskjellige prøvane. Representative FL1 histogram visar fluorescens på x-aksen og celletal på y-aksen. Markøren er definert som 2% RHO positive ustimulerte leukocyttar, og angjev den kalkulererte prosentandelen RHO positive celler i prøven etter positive ustimulerte leukocyttar er trekt frå. Tilhørande scatter-plot visar storleik på x-aksen og granularitet på y-aksen, med utval for respiratory burst analysar (blå sirkel). **A**: Positiv kontroll (HKL stimulert med H₂O₂) **B**: Ustimulert kontroll (HKL tilsett DHR) **C**: HKL stimulert med PR1. **D**: HKL stimulert med PR2. **E**: HKL stimulert med 1/R. **F**: HKL stimulert med PL1, **G**: HKL stimulert med PL2. **H**: HKL stimulert med PL3. For **C-H** er HKL tilsett bakteriar, inkubert i 3,5 timar og tilsett DHR.

Resultata visar at av 10 000 analyserte celler i kvar prøve, er det berre ein liten andel av den totale leukocyttpopulasjonen som aktivt driv respiratory burst 3,5 timar etter eksponering for dei ulike bakterieisolata. Høgaste respiratory burst respons for leukocyttar frå rognkjeks blei funnen etter stimulering med *PR1*, kor 37,26% av leukocytane var aktiv 3,5 timar etter eksponering for bakterien.

Dei representative prøvane frå Figur 13 er òg presentert i eit overlagt histogram i Figur 14 A. Kvar prøve har sin farge; blå er positiv kontroll, oransje er ustimulert kontroll, grøn er HKL stimulert med *PR1*, raud er HKL stimulert med *PR2*, lilla er HKL stimulert med *VR*, brun er HKL stimulert med *PL1*, rosa er HKL stimulert med *PL2* og grå er HKL stimulert med *PL3* (Figur 14 A). Alle histogramma har ein topp som identifiserer celler som ikkje driv respiratory burst, ved ca. 10^1 i fluorescens. I tillegg har det blå, grønne, brune, rosa og grå histogrammet ein liten topp av aktive celler på same plass; mellom 10^2 og 10^3 i fluorescens.

Gjennomsnittleg % aktiverte leukocyttar av 9 parallellar for kvart bakterieisolat, er presentert i Figur 14 B. Gjennomsnittleg % aktiverte HKL stimulert med *PR1* var 35,2%, medan for HKL stimulert med *PR2* var 1,9% positive. For HKL stimulert med *VR* var det gjennomsnittleg 1,06% positive. For lakseisolata var det 7,4% positive leukocyttar stimulert med *PL1*, 7,1% positive leukocyttar stimulert med *PL2* og 6,4% positive leukocyttar stimulert med *PL3*. Standardavvik er markert med ei svart linje på kvar stolpe, og signifikans er markert med bokstavar over stolpene.



Figur 14. A: Overlay FL1 histogram av HKL frå rognkjeks som visar respiratory burst aktivitet i dei forskjellige prøvane. Positiv kontroll visar HKL stimulert til respiratory burst med H₂O₂. Ustimulert kontroll visar HKL tilsett DHR. Dei resterande prøvane visar HKL stimulert med bakteriar i 3,5 timar og som er tilsett DHR. X-aksen visar fluorescens og y-aksen visar celletal. Raud boks markerar respiratory burst positive leukocytter. B: Stolpediagram som visar gjennomsnittleg % aktiverte leukocytter for ustimulert kontroll (kontroll) og HKL stimulert med kvart bakterieisolat. X-aksen visar bakterieisolat og y-aksen visar % aktiverte leukocytter. Svarte linjer visar standardavvik og bokstavar over stolpane markerar signifikans.

Einvegs ANOVA test av dataa viste at gjennomsnittleg % aktiverte leukocytter stimulert med isolat PR1 er signifikant høgare i førehald til ustimulerte leukocytter og leukocytter stimulert med dei fem resterande bakterieisolata , med ***P ≤ 0,001 (Tabell 4).

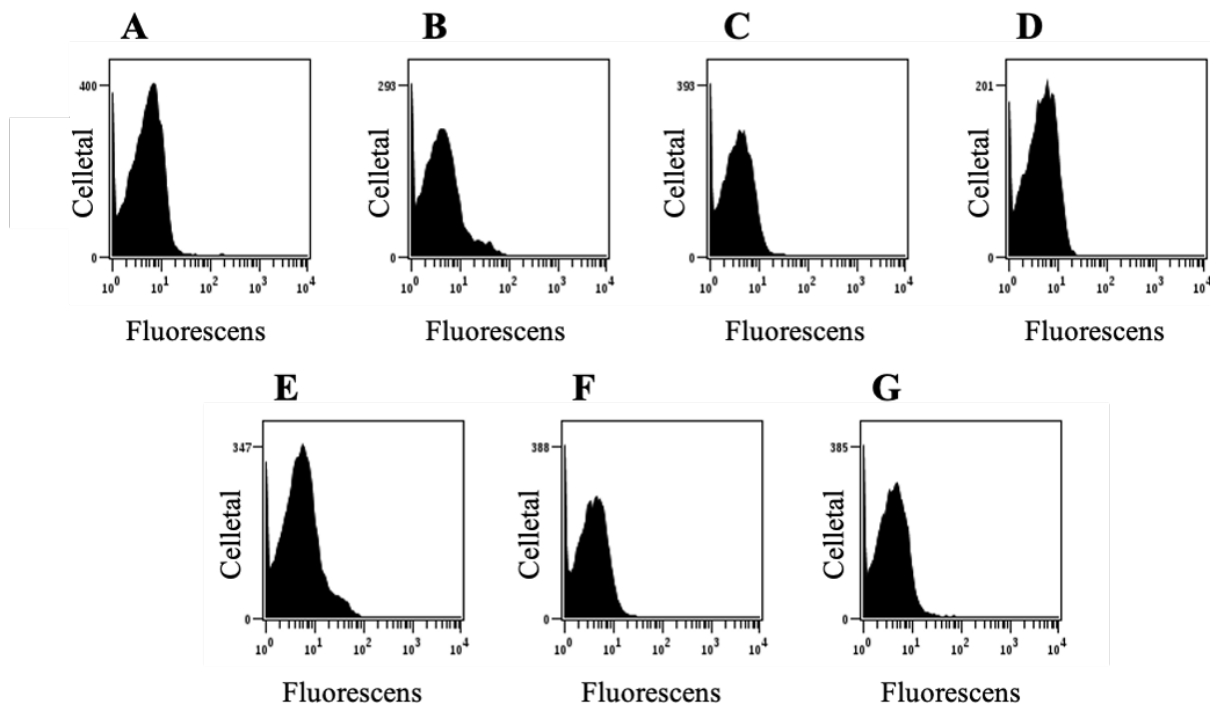
Tabell 4. Einvegs ANOVA test gjennomført i GraphPad Prism 5 av ustimulerte leukocytter (K) frå rognkjeks og leukocytter stimulert med to isolat *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*, tre isolat *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* og eitt isolat *Vibrio anguillarum*. Testen undersøker om det er signifikant skilnad i % respiratory burst aktiverte leukocytter mellom dei forskjellige prøvane. Signifikansnivå er definert som $P > 0,05 = \text{n.s.}$, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ og $***P \leq 0,001$. Gjennomsnitt er gjennomsnittleg stimulerte leukocytter 3,5 timar etter eksponering.

Analyseprøvar	% aktiverte leukocytter	Signifikansnivå
K vs PR1	0% vs 35,2%	***
K vs PR2	0% vs 1,9%	n.s.
K vs VR	0% vs 1,06%	n.s.
K vs PL1	0% vs 7,4%	n.s.
K vs PL2	0% vs 7,1%	n.s.
K vs PL3	0% vs 6,4%	n.s.
PR1 vs PR2	35,2% vs 1,9%	***
PR1 vs VR	35,2% vs 1,06%	***
PR1 vs PL1	35,2% vs 7,4%	***
PR1 vs PL2	35,2% vs 7,1%	***
PR1 vs PL3	35,2% vs 6,4%	***
PR2 vs VR	1,9% vs 1,06%	n.s.
PR2 vs PL1	1,9% vs 7,4%	n.s.
PR2 vs PL2	1,9% vs 7,1%	n.s.
PR2 vs PL3	1,9% vs 6,4%	n.s.
VR vs PL1	1,06% vs 7,4%	n.s.
VR vs PL2	1,06% vs 7,1%	n.s.
VR vs PL3	1,06% vs 6,4%	n.s.
PL1 vs PL2	7,4% vs 7,1%	n.s.
PL1 vs PL3	7,4% vs 6,4%	n.s.
PL2 vs PL3	7,1% vs 6,4%	n.s.

3.6.2 Lakseleukocytter eksponert for bakteriar

Det blei brukt isolerte leukocytter frå 7 laks i dette forsøket. For kvar av dei 7 fiskane blei effekten av eksponering for tre isolat av *P. atlantica* genomvar *salmonicida*, to isolat av *P. atlantica* genomvar *cyclopteri* og eitt isolat av *V. anguillarum* (Tabell 1) analysert for respiratory burst aktivitet og samanlikna opp mot leukocytter kun tilsett DHR (ustimulert kontroll), leukocytter stimulert med H₂O₂ (positiv kontroll), leukocytter ikkje eksponert for bakteriar og utan tilsett DHR (leukocytt kontroll) og leukocytter tilsett bakteriar men ikkje DHR (DHR kontroll) (Tabell 3). Representative prøvar frå kvart bakterieisolat og kvar kontroll blei vald ut til å presentere resultat i dei følgjande figurane. Gjennomsnittleg respiratory burst respons hjå lakseleukocytter stimulert med kvart isolat er framstilt som stolpediagram.

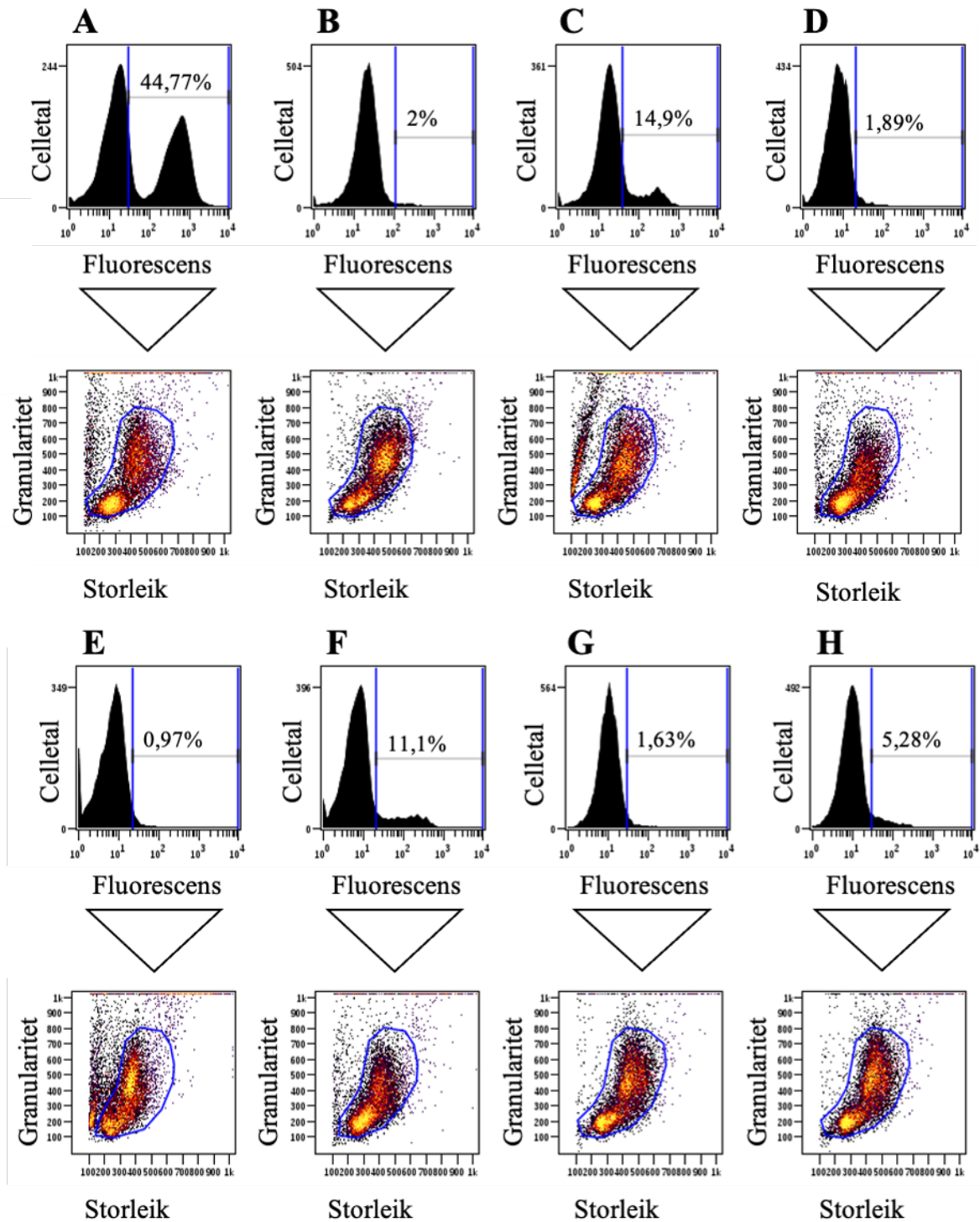
Figur 15 visar ein representativ leukocytt kontroll (A) og DHR kontrollane for kvart bakterieisolat (B-G) presentert i FL1 histogram. Ingen av kontrollane gav fluorescens over 10², og alle hadde ein topp like før 10¹ i fluorescens.



Figur 15. Leukocytt kontroll og DHR kontrollar for respiratory burst analysar av HKL frå laks. Leukocytt kontroll inneheldt kun leukocytter. DHR kontrollar inneheldt bakteriar og leukocytter. FL1 histogram som visar fluorescens på x-aksen og celletal på y-aksen. A: Leukocytt kontroll. B: DHR kontroll for PR1. C: DHR kontroll for PR2. D: DHR kontroll for VR. E: DHR kontroll for PL1. F: DHR kontroll for PL2. G: DHR kontroll for PL3.

Figur 16 visar resultatene av respiratory burst analyse ved flow cytometry for positiv kontroll (stimulert med H₂O₂) (A), og ein representativ prøve frå ustimulert kontroll (leukocyttar kun tilsett DHR) (B) og prøvar stimulert med kvart bakterieisolat (C-H). Positiv kontroll kontrollerer at leukocyttpopulasjonen kan drive respiratory burst aktivitet, medan ustimulert kontroll kontrollerer korleis leukocyttpopulasjonen ser ut kun tilsett DHR, utan å ha blitt stimulert med korkje bakteriar eller H₂O₂. I prøvane stimulert med bakteriar undersøkjast det kor stor andel av cellepopulasjonen som driv respiratory burst etter eksponering for bakteriar, samanlikna med den ustimulerte prøven. Figurane blei arbeida med på same måte som skildra i kapittel 2.3.1.

Positiv kontroll for HKL isolert frå laks gav 44,77% positive celler, og histogrammet visar to toppar; ein ved ca. 10¹ i fluorescens, som representerer celler som ikkje utførar respiratory burst, og ein litt før 10³ i fluorescens som representerar celler som utførar respiratory burst (Figur 16 A). Den representative prøven med leukocyttar stimulert med PR1 gav 14,9% positive celler. Histogrammet av denne prøven hadde ein høg topp, og ein mindre topp; den høge på ca. 10¹ i fluorescens representerar celler som ikkje aktivt driv respiratory burst og den mindre på litt under 10³ i fluorescens som representerar celler som aktivt driv respiratory burst (Figur 16 C). Prøven stimulert med PR2 gav 1,89% positive celler (Figur 16 D). Prøven stimulert med VR hadde 0,97% positive celler (Figur 16 E). Prøven stimulert med PL1 gav 11,1% positive celler, og hadde to toppar i histogrammet. Den største toppen er ved ca. 10¹ i fluorescens, og ein mindre topp mellom 10² og 10³ i fluorescens (Figur 16 F). Prøven stimulert med PL2 gav 1,63 % positive celler, og hadde ein topp i histogrammet på 10¹ i fluorescens (Figur 16 G). Prøven stimulert med PL3 gav 5,28% positive celler og ein topp i histogrammet på 10¹ i fluorescens (Figur 16 H).

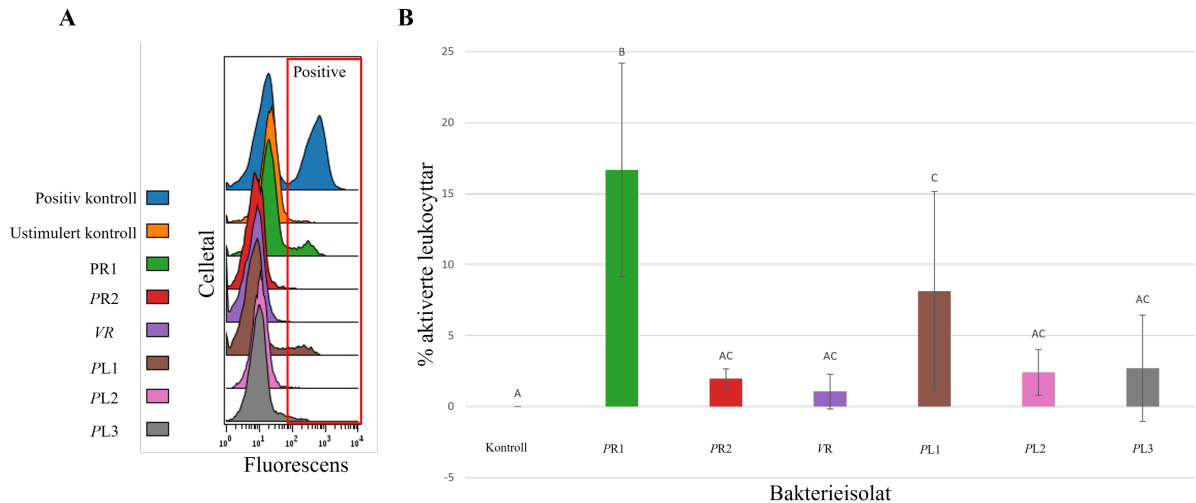


Figur 16. Flow cytometry analysar av HKL frå laks som visar respiratory burst aktivitet. Representative FL1 histogram visar fluorescens på x-aksen og celletal på y-aksen. Markøren er definert som 2% RHO positive ustimulerte leukocyttar, og angjev prosentandel RHO positive celler i prøven etter at positive ustimulerte leukocyttar er trekt frå. Tilhørande scatter-plot visar storleik på x-aksen og granularitet på y-aksen, med utval for respiratory burst analyser (blå sirkel). A: Positiv kontroll (HKL stimulert med H₂O₂) B: Ustimulert kontroll (HKL tilsett DHR) C: HKL stimulert med PR1. D: HKL stimulert med PR2. E: HKL stimulert med VR. F: HKL stimulert med PL1, G: HKL stimulert med PL2. H: HKL stimulert med PL3. For C-H er HKL tilsett bakteriar, inkubert i 3,5 timar og tilsett DHR.

Resultata visar at av 10 000 analyserte celler i kvar prøve, er det berre ein liten andel av den totale leukocyttpopulasjonen som aktivt driv med respiratory burst 3,5 timar etter eksponering for dei ulike bakterieisolata. Høgaste respiratory burst respons for leukocyttar frå laks blei funnen etter stimulering med *PR1*, kor 14,9% av leukocytane var aktiv 3,5 timar etter eksponering for bakterien.

Dei representative prøvane frå Figur 16 er òg presentert i eit overlagt histogram i Figur 17 A. Kvar prøve har sin farge; blå er positiv kontroll, oransje er ustimulert kontroll, grøn er HKL stimulert med *PR1*, raud er HKL stimulert med *PR2*, lilla er HKL stimulert med *VR*, brun er HKL stimulert med *PL1*, rosa er HKL stimulert med *PL2* og grå er HKL stimulert med *PL3* (Figur 17 A). Alle histogrammane har ein topp som identifiserar celler som ikkje driv respiratory burst ved ca. 10^1 i fluorescens. I tillegg har det blå, grønne og brune histogrammet ein liten topp av aktive celler på same plass; mellom 10^2 og 10^3 i fluorescens.

Gjennomsnittleg % aktiverte leukocyttar av 7 parallellar for kvart bakterieisolat, er presentert i Figur 17 B, og brukar dei same fargane for bakterieisolata som i Figur 17 A. *PR1* gav eit gjennomsnitt på 16,66% aktiverte leukocyttar, *PR2* gav eit gjennomsnitt på 1,97% aktiverte leukocyttar, *VR* gav eit gjennomsnitt på 1,06% aktiverte leukocyttar, *PL1* gav eit gjennomsnitt på 8,13% aktiverte leukocyttar, *PL2* gav eit gjennomsnitt på 2,40% aktiverte leukocyttar og *PL3* gav eit gjennomsnitt på 2,70% aktiverte leukocyttar. Standardavvik er markert med svart linje på kvar stolpe, og signifikans er markert med bokstavar over stolpane.



Figur 17. **A:** Overlay FL1 histogram av HKL frå laks som visar respiratory burst aktivitet i forskjellige prøvar. Positiv kontroll visar HKL stimulert til respiratory burst med H_2O_2 . Ustimulert kontroll visar HKL tilsett DHR. Dei resterande prøvane visar HKL stimulert med bakteriar i 3,5 timar og er tilsett DHR. X-aksen visar fluorescens og y-aksen viser celletal. Raud boks markerar respiratory burst positive leukocytter. **B:** Stolpediagram som visar gjennomsnittleg % aktiverte leukocytter for ustimulert kontroll (kontroll) og HKL stimulert med kvart bakterieisolat. X-aksen visar bakterieisolat og y-aksen viser % aktiverte leukocytter. Svarte linjer visar standardavvik og bokstavar over stolpane markerar signifikans.

Einvegs ANOVA test viste at gjennomsnittleg % aktiverte leukocytter stimulert med PR1 og PL1 er signifikant høgare i førehald til ustimulerte leukocytter. Gjennomsnittleg % aktiverte PR1 stimulerte leukocytter er signifikant høgare med $***P \leq 0,001$, og leukocytter stimulert med PL1 er signifikant høgare med $*P \leq 0,05$. I tillegg er gjennomsnittleg % aktiverte leukocytter stimulert med PR1 signifikant høgare med $***P \leq 0,001$ i førehald til stimulering med PR2, VR, PL2 og PL3, og signifikant høgare med $**P \leq 0,01$ i førehald til stimulering med PL1 (Tabell 5).

Tabell 5. Einvegs ANOVA test gjennomført i GraphPad Prism 5 av ustimulerte leukocytter (K) frå laks og leukocytter stimulert med to isolat *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*, tre isolat *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* og eitt isolat *Vibrio anguillarum*. Testen undersøker om det er signifikant skilnad i % aktiverte leukocytter mellom dei forskjellige prøvane. Signifikansnivå er definert som $P > 0,05 = \text{n.s.}$, $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ og $***P \leq 0,001$. Gjennomsnitt er gjennomsnittleg stimulerte leukocytter 3,5 timar etter eksponering.

Analyseprøver	% aktiverte leukocytter	Signifikansnivå
K vs PR1	0% vs 16,66%	***
K vs PR2	0% vs 1,97%	n.s.
K vs VR	0% vs 1,06%	n.s.
K vs PL1	0% vs 8,13%	*
K vs PL2	0% vs 2,40%	n.s.
K vs PL3	0% vs 2,70%	n.s.
PR1 vs PR2	16,66% vs 1,97%	***
PR1 vs VR	16,66% vs 1,06%	***
PR1 vs PL1	16,66% vs 8,13%	**
PR1 vs PL2	16,66% vs 2,40%	***
PR1 vs PL3	16,66% vs 2,70%	***
PR2 vs VR	1,97% vs 1,06%	n.s.
PR2 vs PL1	1,97% vs 8,13%	n.s.
PR2 vs PL2	1,97% vs 2,40%	n.s.
PR-2 vs PL3	1,97% vs 2,70%	n.s.
VR vs PL1	1,06% vs 8,13%	n.s.
VR vs PL2	1,06% vs 2,40%	n.s.
VR vs PL3	1,06% vs 2,70%	n.s.
PL1 vs PL2	8,13% vs 2,40%	n.s.
PL1 vs PL3	8,13% vs 2,70%	n.s.
PL2 vs PL3	2,40% vs 2,70%	n.s.

4 - Diskusjon

Pasteurellose har sidan 2012 vore eit betydeleg problem for oppdretta rognkjeks, medan for oppdretta laks var ikkje sjukdommen rapportert før i 2018 (Hjeltnes, 2014, Sommerseth et al., 2021). Sjukdommen hjå rognkjeks er vanskeleg å behandle med antibakterielle midlar når den er i merden saman med laks, og ein veit lite om oral antibiotika behandling har effekt hjå laks. Immunførebyggjande tiltak som vaksinasjon og stimulering av immunsystemet er avgjerande for å unngå alvorlege infeksjonar. Difor er kunnskap om både *Pasteurella* og korleis bakteriane kan utvikle infeksjon som førar til alvorleg og dødeleg sjukdom, heilt avgjerande i arbeidet med vaksineutvikling.

Heilgenomsekvensering av aktuelle bakterieisolat kan danne grunnlag for å skaffe informasjon som kan nyttast både i fylogenetiske studiar, men òg innan andre område som t.d. antibakteriell resistens, virulens og antigen strukturar. I tillegg til genomstudiar er funksjonelle studiar naudsynte for å forstå samanhengar, effektar og verifisere det ein finn på genomnivå. Ulike fiskeartar handterer infeksjonen forskjellig, og vertens immunsystem er avgjerande i tillegg til mogeleg vertsspesifikk tilpassing hjå bakterien.

Sekvenseringsstudiar har vist at *Pasteurella* bakteriar som gjer sjukdom hjå laks og rognkjeks er same art, men er ulike variantar (Gulla et al., 2020, Sommerset et al., 2021). Ein veit likevel ikkje kva for art av rognkjeks og laks som er hovudverten for variantane, og om dei kan smitte mellom artane er det usikkerheit om. Ved eksperimentell smitte av rognkjeks og laks er det vist at rognkjeks er mottakeleg for *Pasteurella* spp. isolat frå både rognkjeks og laks, og at isolatet frå laks viste seg å vere spesielt virulent for rognkjeks (Sandlund et al., 2021). Studien peikar og på at infeksjon hjå oppdretta laks kan vere opportunistisk, då laks som blei badsmitta ikkje utvikla sjukdom, og at det mogleg må ein stressor til for at fisken skal utvikle sjukdom.

Tradisjonelle inaktiverte heilbakterie vaksiner mot pasteurellose, som foreløpig er testa, gjer ikkje god nok beskyttelse mot pasteurellose hjå rognkjeks (Ellul et al., 2019) og difor er arbeidet med å samanlikne ulike *Pasteurella* isolat, isolert frå både rognkjeks og laks, og undersøking av immunresponsen mot dei, viktig for å gje informasjon som seinare kan nyttast i strategiar for profylaktiske tiltak og utvikling av vaksinar.

4.1 Bakteriar – proteinprofil og antistoffreaksjon

I denne studien blei det nytta tre isolat av *P. atlantica* genomovar *salmonicida* og to isolat av *P. atlantica* genomovar *cyclopteri*. Tidlegare studiar gjennomført av Ellul et al. (2018), har vist at *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* har særskilte næringskrav og kan vere vanskeleg å dyrke opp i konsentrasjonen som er naudsynt for å produsere og teste vaksinar. *P. atlantica* genomovar *salmonicida* har òg særskilte næringskrav, men vekstrate og oppnåeleg konsentrasjon har ikkje vore kartlagt tidlegare. For å samanlikne vekstrate og bakteriekonsentrasjonar, blei et etablert vekstkurvar for *PR1* og *PL1*. Vekstkurvene blei brukt til å sikre at bakteriane var på same stad i vekstfasen då dei skulle nyttast i vidare studiar. Dette er viktig for å sikre at alle analysane som blir utført er gjort på samanliknbare bakteriar, her i sein eksponentiell vekstfase. Ein kan ikkje sjå bort frå at bakterien produserer og uttrykkjer komponentar ulikt avhengig av næringstilgang og vekst. Vekstkurvane visar at *PR1* veks meir langsamt enn *PL1*. *PR1* brukar omlag 30 timar på å nå stasjonær fase, og når ein OD på over 2, medan *PL1* brukar 16 timar, og når ein OD på 1,8. Dette samsvarar med funn i ein tidlegare studie, der det er vist at *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (*PR2*) veks meir langsamt, og dermed brukar lengre tid på å nå stasjonær fase, enn *P. atlantica* genomovar *salmonicida* (*PL2* og *PL3*) (Tolås, 2020), og difor kan ikkje bakteriane haustast etter same tid i kultur.

Analysar av sølvfarga SDS-PAGE gel viste at dei to isolata *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* i hovudsak har same proteinprofil av uttrykka protein, og at dei tre isolata av *P. atlantica* genomovar *salmonicida* har meir lik proteinprofil av uttrykka protein. Samanliknar ein dei to genomovar gruppene ser ein at det er nokre skilnadar. Med molekylvekt på over 97,4 kDa finn ein protein hjå lakseisolata, men ikkje hjå rognkjeksisolata. Ved molekylvekt 97,4 kDa finn ein band av protein hjå alle isolata, men hjå lakseisolata er banda sterkare enn hjå rognkjeksisolata. Ved molekylvekt 45,0 kDa er det protein hjå rognkjeksisolata men ikkje hjå lakseisolata. Ved litt over 21,5 kDa finn ein proteinband hjå alle isolata, men dei er sterkare hjå lakseisolata enn hjå rognkjeksisolata. Utanom dette er proteinprofilane til isolata førehaldsvis like. Dette visar at på eit proteinnivå er det skilnadar på *P. atlantica* genomovar *salmonicida* og *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* i førehald til relativ mengd av uttrykka protein og storleiken deira. Denne skilnaden kan og indikere skilnadar i virulens og/eller antigenisitet. For å detektere bakterie spesifikk immunreaksjon kan ELISA nyttast, men for å undersøkje reaktivitet med dei enkelte proteinbanda vart WB nytta.

Sjølv om ein ved sølvfarging visualiserar protein med same molekylvekt hjå alle isolata, er det ikkje naudsynt at det er dei same proteina som ligg i bandet. Gelen sorterer proteina etter storleik, så i kvart band vil det kunne ligge mange forskjellige protein. Denne måten å visualisere proteina til bakteriar identifiserer ikkje proteina som ligg ved dei forskjellige storleikane. Det fins foreløpig ingen kunnskap om kva for protein som befinn seg ved dei forskjellige molekylvektane til desse *Pasteurella* bakteriane. For kunne finne ut av det må vidare undersøkingar, som t.d. sekvensering, gjennomførast, og ein kan dra nytte av genom kunnskap. Proteinprofilane gjer ein indikasjon om at *Pasteurella* spp. isolert frå laks og rognkjeks har ulike protein tilstades, samstundes som dei òg mogleg har ein del like protein. Denne kunnskapen kan òg nyttast til å identifisere immunogene protein som er like eller ulike mellom isolat, for målretta val av vaksineantigen som anten vil vere spesifikk for isolat eller dekkje fleire typar isolat, t.d. frå både rognkjeks og laks.

WB av dei fem *Pasteurella* isolata visar at serum frå rognkjeks immunisert med *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* (PR2) bind seg til fleire protein hjå alle dei fem *Pasteurella* isolata. Med bakgrunn i kontrollprøvane (Figur 9 B og C), blotta henholdsvis med preserum frå rognkjeks og preserum frå kanin, er det synleg svake band nokre plassar etter framkalling. Banda som visualiserast på kontrollane kan truleg forklarast ved at preserum vil naturleg innehalde antistoff, og nokre av desse antistoffa kan ha kryssreagerande eigenskapar mot protein frå *Pasteurella* bakteriar. Ved 25 og 100 kDa på blottet med serum frå immunisert rognkjeks, men ikkje preserum, har antistoff bunde seg på proteina til *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* isolata. Antistoff har ikkje bunde seg på protein av same storleik hjå *P. atlantica* genomovar *salmonicida* isolata. Den immuniserte rognkjeksens har dermed spesifikke antistoff mot protein som har desse storleikane hjå rognkjeksisolata, men dei kryssreagerar ikkje med protein av same storleik hjå lakseisolata. Ved 37 og 50 kDa er det danna seg band på alle dei fem *Pasteurella* isolata. Dette betyr at antistoff har bunde seg på protein hjå både rognkjeksisolata og lakseisolata, og det er ein kryssreaksjon. Sett i samanheng med proteinprofilane på SDS-PAGE gel ser ein at det er tydelege proteinband hjå alle bakterieisolata ved 37 kDa, medan det er tynne, svake band ved 50 kDa, noko som tydar på at det er danna spesifikke antistoff som er retta mot protein som er tilstades hjå alle bakterieisolata. Det er sannsynleg at proteina ved desse molekylvektane er overflateprotein, sidan det er danna antistoff mot dei, men det finst ikkje litteratur på kva for protein det kan vere. For å finne ut av dette må det andre undersøkingar til, som sekvensering. Om desse antistoffa har beskyttande eigenskapar er ikkje mogleg å vite ved denne typen undersøking, og om det skal vise seg at antistoffa som har

kryssreaksjon har beskyttande eigenskapar, vil det bety at det kan vere mogleg å lage ei vaksine som vil beskytte fiskane mot både variantane av *Pasteurella*. Høge titer av *Pasteurella* spesifikke antistoff etter vaksinasjon av rognkjeks er vist tidlegare (Ellul et al., 2019). Likevel gav desse vaksinane relativ svak og ikkje fullstendig beskyttelse mot sjukdom. Dersom antistoffa som blir produsert ikkje bind til eller er spesifikt retta mot store overflate cellekomponentar hjå bakterien, er det mogleg å få høge titer av antistoff, men lav beskyttelse mot sjukdom (Ellul et al., 2019). Det er difor viktig å få utvikle ei vaksine som stimulerer til produksjon av spesifikke antistoff som har beskyttande eigenskapar.

4.2 Immunresponsar mot *Pasteurella* spp. *in vitro* i isolerte leukocyttar frå rognkjeks og laks

Det er tidlegare vist at leukocyttar frå hovudnyre (HKL) har høgast fagocytisk aktivitet hjå både rognkjeks og laks (Kalgraff et al., 2011; Haugland et al., 2012), og difor er det isolerte HKL som blei nytta i denne oppgåva. Leukocyttar isolert frå rognkjeks og laks har ulik morfologi (Haugland et al., 2010, Haugland et al., 2012), og undersøking av celler i cytospinpreparat viste at dei hadde god kvalitet. ColorRapid farging viste dei forskjellige subpopulasjonane morfologisk. Hjå HKL frå rognkjeks blei det identifisert makrofagar, neutrofile granulocyttar, lymfocyttar og ei og anna raud blodcelle. Der var flest neutrofile granulocyttar, som forventet, og det samsvarar med tidlegare undersøkingar (Haugland et al., 2012). Hjå HKL frå laks blei det òg identifisert makrofagar, neutrofile granulocyttar, lymfocyttar og nokre frå raude blodceller. Her, som hjå rognkjeks, blei det òg identifisert flest neutrofile granulocyttar som og samsvarar med tidlegare undersøkingar av lakseleukocyttar (Lamas & Ellis, 1994; Rønneseth et al., 2006; Haugland et al., 2010).

Aktivering av leukocyttar, fagocytose og intracellulært drap er viktige prosessar som initielt må settast i gang for å drepe patogenet, starte antigenpresentasjon og oppnå ein beskyttande immunitet mot eit patogen. Kunnskap omkring tidlege uspesifikke cellulære immunresponsar mot *Pasteurella* vil gje nyttig informasjon som seinare kan nyttast i strategiar for profylaktiske tiltak og for utvikling av vaksinar. Profesjonelt fagocytterande celler hjå fisk er neutrofile granulocyttar, makrofagar, B-celler og umodne dendritiske celler (Esteban et al., 2015). Av desse har makrofagar og neutrofile granulocyttar evne til å bruke oksygenavhengige mekanismar, i ein prosess kalla respiratory burst, for å drepe fagocyterte patogen (Fletcher & Secombes, 2015), og produserer enzymet myeloperoxidase (MPO) som katalyserar

omdanninga av oksygen til ROS. I hematologiske analysar nyttast identifikasjon av MPO som cytokjemisk fargemetode for å identifisere neutrofile granulocytter. Dei neutrofile granulocyttane har store mengder MPO tilstades i sine lysosom. I cytospinpreparat farga mot MPO blei det identifisert brune granular i det som truleg er neutrofile granulocytter hjå både rognkjeks og laks. Tilstadeverelsen av mange MPO positive celler i dei farga cytospinpreparata indikerer tilstadeverelsen av profesjonelle fagocytiske celler i leukocyttopopulasjonen til baa fiskeartane. Tidlegare studiar har vist at leukocytter frå rognkjeks har høg fagocytisk kapasitet, med nesten maks fagocytisk kapasitet nådd ein time etter eksponering for latex kuler (Haugland et al., 2012). Som forventat visar farginga at neutrofile granulocytter har MPO i sine granular. Makrofager og monocytter har òg evne til å produsere MPO (Fletcher & Secombes, 2015), og under normale førehald er det berre små mengder av enzymet som er tilstades i lysosoma, medan under inflammasjon produserast enzymet i store mengder.

Tidlegare studiar har vist at både rognkjeks- og lakseleukocytter har evne til respiratory burst. I desse studiane gjennomført av Kalgraff et al. (2011) og Haugland et al. (2012) var PMA nytta som reseptor uavhengig stimulator for å stimulere cellene til respiratory burst reaksjon. Det er tidlegare vist at respiratory burst aktivitet blir inhibert hjå leukocytter frå Atlantisk torsk ved å stimulere med *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* (Kalgraff et al., 2011; Vestvik et al., 2013.). *Francisella noatunensis* er ein obligat intracellulær bakterie, og sidan det er antydning at *Pasteurella* frå rognkjeks kan ha intracellulære eigenskapar vil det vere interessant å undersøkje respiratory burst aktiviteten hjå leukocytter stimulert med *Pasteurella* spp.. For å ha noko å samanlikne stimuli med *Pasteurella* bakteriar, er *V. anguillarum* inkludert som kontrollbakterie i denne studien. *V. anguillarum* er kjent for å vere ein sterkt immunogen bakterie med god evne til å stimulere immunsystemet.

Ved å måle respiratory burst aktiviteten til rognkjeks- og lakseleukocytter 3,5 timar etter eksponering for *Pasteurella* spp. og *V. anguillarum* er det mogleg å seie noko om kor stor rolle denne aktiviteten spelar inn i fiskane sine forsvar mot desse patogena, og om det er ulik aktivitet i førehald til isolat vs vert og *V. anguillarum* samanlikna med *Pasteurella*. Eksponeringstid for leukocytter med bakteriar *in vitro* er bastert på tidlegare studiar (Vestvik et al., 2013; Kaldestad et al., 2014; Eggestøl et al., 2018) som visar at ved dette tidspunktet kan man forvente ein målbar respons både for leukocytter frå rognkjeks og leukocytter frå laks. Respiratory burst aktivitet blei i denne oppgåva påvist ved å tilsette DHR til leukocytter stimulert med bakteriar. I kontakt med oksygen vil DHR omdannast til fluorescerande rhodamine, og ved bruk av flow

cytometry blei fluorescensen målt og analysert, for å kunne seie noko om kor stor andel av leukocytane som aktivt utførte respiratory burst. Respiratory burst aktiviteten blei målt for rognkjeksleukocytar stimulert med bakteriar (Tabell 1) og det blei gjennomført 9 parallellar for kvart bakterieisolat. For lakseleukocytar stimulert med bakteriar (Tabell 1) blei det gjennomført 7 parallellar for kvart bakterieisolat.

For å verifisere resultatane frå slike analysar er det viktig å inkludere tilstrekkelege og riktige kontrollprøvar, sjå Tabell 3. Ustimulerte leukocytar utan tilsett DHR (leukocyt kontroll) og stimulerte leukocytar utan tilsett DHR (DHR kontroll) er med for å sikre kvaliteten på prøvane som analyserast, undersøkje bakgrunnstøy i førehald til autofluorescens frå daude celler og autofluorescens som følgje av bakteriane si påverknad på cellene, som ikkje skuldast respiratory burst aktivitet. Leukocyt kontroll frå både rognkjeks og laks visar cellepopulasjonen med ei fin fordeling av celler frå $10^0 - 10^1$ i fluorescens på FL1 histogrammet. Dersom det hadde vore mange daude celler i prøvane ville det kunne blitt avgitt autofluorescens, som hadde blitt sett som ein liten topp med høgare fluorescens enn den levande cellepopulasjonen har. Autofluorescens har ikkje dukka opp i FL1 histogramma, og det kan dermed slåast fast at rognkjeksleukocytane og lakseleukocytane i seg sjølv ikkje har fluorescerande eigenskapar som kan feiltolkast som RHO-fluorescens.

DHR kontrollane for kvart bakterieisolat inneheldt leukocytar stimulert med bakteriar, men er ikkje tilsett DHR. Desse kontrollane har alle ein fin fordeling i cellepopulasjonen frå $10^0 - ca. 10^2$ i fluorescens. Samanlikna med leukocyt kontroll har ikkje tilsetjinga av bakteriar endra utsjånaden på cellepopulasjonen i FL1 histogramma. Det er ikkje avgitt autofluorescens frå cellene som kan feiltolkast som RHO-fluorescens hjå rognkjeksleukocytar og lakseleukocytar.

For å kunne seie noko om kor stor prosentandel av leukocytar stimulert med bakteriar som aktivt utførte respiratory burst etter 3,5 timar inkubering, blei fluorescensen til stimulerte leukocytar tilsett DHR, samanlikna med den til ustimulerte leukocytar tilsett DHR (ustimulert kontroll). Det et blei satt ei tillaten grense på 2% RHO positive leukocytar i den ustimulerte kontrollen, då det vart rekna med at nokre celler vil stimulerast av t.d. pipettering, rørsle eller kontakt med overflatar under isolering og preparering. Dette for å unngå at ein risikerer å utelate eller overestimere RHO positive celler frå resultatane. Denne grensa på 2% positive ustimulerte leukocytar har òg blitt brukt i ein liknande studie utført av Kalgraff et al. (2011).

Den positive kontrollen for rognkjeksleukocytter, prøven som var stimulert i 10 minutt med H₂O₂, gav 81,82% RHO positive celler, i FL1 histogrammet. Ein ganske stor andel av rognkjeksleukocytter har dermed evne til å respondere med respiratory burst, slik som tidligare funnen i ein studie utført av Haugland et al. (2012). Tilhøyrande scatter-plot over positiv kontroll viser at cellepopulasjonen liknar i stor grad på scatter-plottet til den ustimulerte kontrollen. Dette viser at cellene i cellepopulasjonen til desse to prøvane er tilnærma lik med tanke på storleikar og granularitet. Sidan den positive kontrollen er stimulert med H₂O₂, vil ikkje cellene stimulert til respiratory burst bli meir granulære, fordi dei ikkje tar opp partiklar under fagocytose.

Den positive kontrollen for lakseleukocytter gav 44,77% RHO positive celler. FL1 histogrammet har ein celletopp ved 10¹ i fluorescens, dette er dei ustimulerte cellene, og ein topp ved ca. 10³ i fluorescens som er dei cellene som aktivt utførar respiratory burst. Det er dermed ein mindre andel av lakseleukocytter som driv respiratory burst enn hjå rognkjeksleukocytter, som hadde 81,82% RHO positive celler etter like lang tid. Det er likevel nesten halvparten av cellepopulasjonen av lakseleukocytter som driv respiratory burst, når eksponert for H₂O₂, og ut frå MPO farging av desse leukocyttane er det forventat at det i hovudsak er neutrofile granulocytter som er dei positive cellene. Dette samsvarar med resultat funnen i ein studie gjennomført av Lamas et al. (1994), der neutrofile granulocytter utgav 30-75% av isolerte leukocytter frå laks.

4.2.1 Respiratory burst aktivitet hjå leukocytter stimulert med *Vibrio anguillarum*

VR var det isolatet som stimulerte minst gjennomsnittleg respiratory burst aktivitet hjå både rognkjeks- og lakseleukocytter, og det var ikkje signifikant aktivitet i førehald til den ustimulerte kontrollen. *V. anguillarum* er ein bakterie som er kjend for å stimulere det spesifikke immunsystemet godt, og er difor ein immunogen bakterie som gjer beskyttande immunitet sjølv i vannbaserte vaksiner (Brudeseth et al., 2013; Bøgwald & Dalmo, 2019). I eit smitteforsøk utført på gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) blei den uspesifikke immunresponsen mot *V. anguillarum* infeksjon undersøkt, og det blei funnen at 4 timar etter infeksjon starta mobiliseringa av eosinofile granulocytter, og at respiratory burst aktivitet av desse cellene starta 48 timar etter infeksjon (Chaves-Pozo et al., 2005). Det er dermed mogleg at 3,5 timar ikkje var lang nok inkuberingstid for å få høg respiratory burst aktivitet ved stimulering med VR. Resultata i dette forsøket peikar på at det kan vere andre drapsmekanismar som står for tidlegare immunresponsar mot *V. anguillarum* bakteriar. I ein studie gjennomført

av Eggestøl et al. (2018), blei det undersøkt tidlig immunrespons hjå isolerte HKL frå rognkjeks stimulert med *V. anguillarum*, og her blei det funnen at komplementsystemet og TLR-signalisering var dei mest oppregulerte prosessane i det uspesifikke immunsystemet. TLR5S viste seg å vere det mest signifikant regulerte genet 24 timar etter eksponering. TLR5S er ein løyseleg reseptor som kjennar att flagellin, og som triggjar ein nedstrøms signaliseringsveg som resulterer produksjon av pro-inflammatoriske cytokinar (Eggestøl et al., 2018). Scatter-plotta av dei utvalde representative prøvane av rognkjeks- og lakseleukocyttar stimulert med *VR* visar at cellene i desse prøvene er meir granulære celler enn cellepopulasjonane i dei ustimulerte kontrollprøvane. Dette tydar på at det fins fagocyttar hjå både rognkjeks og laks har tatt opp bakteriane gjennom fagocytose, men sidan det ikkje er signifikant meir RHO positive celler i desse prøvane enn hjå ustimulert kontroll ser det ikkje ut som at respiratory burst mekanismen er den mekanismen som blir brukt i størst grad.

4.2.2 Respiratory burst aktivitet hjå leukocyttar stimulert med *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*

Bakterieisolatet som i gjennomsnitt stimulerte flest celler til å aktivt drive respiratory burst hjå rognkjeksleukocyttar var *PR1*. Dette bakterieisolatet var det einaste som stimulerte respiratory burst aktivitet signifikant (***) i førehald til den ustimulerte kontrollen og stimulering med dei fem andre bakterieisolata. Ein ting å merke seg er den store skilnaden i gjennomsnittleg RHO positive celler hjå rognkjeksleukocyttar stimulert med *PR1* og *PR2*. Dette kan tyde på at det er skilnadar mellom dei to isolata med tanke på korleis dei stimulerer immuncellene, til tross for at isolata henta frå rognkjeks har i hovudsak liknande proteinprofil visualisert på proteingel.

PR1 var òg for lakseleukocyttar det isolatet som stimulerte gjennomsnittleg flest celler til å utføre respiratory burst. Prosentandelen aktiverte leukocyttar etter stimulering med dette isolatet var signifikant høgare i førehald til den ustimulerte kontrollen og *PR2*, *VR*, *PL2* og *PL3*, med signifikansnivå ***, medan i førehald til *PL1* var prosentandelen aktiverte leukocyttar signifikant høgare med signifikansnivå **. Som for rognkjeksleukocyttar, var det stor skilnad i gjennomsnittleg RHO positive celler hjå lakseleukocyttar stimulert med *PR1* og *PR2*. *PR1* var dermed det isolatet som stimulerte både rognkjeks- og lakseleukocyttar til å drive respiratory burst i størst grad. Proteinprofilane til *PR1* og *PR2*, illustrert på SDS-PAGE gel, er vist å vere ganske like, men likevel kan ein sjå at leukocyttar frå både rognkjeks og laks har lettare for å aktivt drive respiratory burst når stimulert med *PR1*. Variasjon i virulens mellom forskjellige isolat frå same art er ikkje ukjent, og det kan difor vere at desse to isolata har ulike

eigenskapar som påverkar virulensen til bakteriane. Ein moglegheit kan vere at *PR1* har ein eller fleire PAMPar som ikkje *PR2* har, noko som gjer det lettare for fagocytane å oppdage, fagocyttere og bryte dei ned. Ein annan moglegheit er at *PR1* lettare kan aktivere komplementsystemet og blir opsonisert, og på den måten blir lettare å oppdage. Det kan òg vere eigenskapar ved *PR2* som gjer at bakterien klarar å unngå eller gøyme seg for immuncellene, eller at dei har forsvarsmekanismar som beskyttar dei mot ROS nedbryting, t.d. katalasar, peroksidasar og superoksid dismutasar (Cavinato et al., 2020). Ein skal heller ikkje sjå vekk frå at immunsystemet brukar andre mekanismar enn oksygenavhengig drapsmekanisme for å fjerne *PR2*. Tidlegare forsøk med dette bakterieisolatet har vist at det er svært virulent (Alarcón et al., 2016; Ellul et al., 2018, 2019), noko som samsvarar med funna gjort i dette forsøket. Det er òg vist at isolatet festar seg på immuncellene til rognkjeks, noko som kan føre til suboptimal eliminering av bakteriar (Ellul et al., 2019). Vidare undersøkingar, som heilgenom sekvensering og *in silico* analyser, vil kunne seie noko om dei har ulike komponentar eller eigenskapar som vil ha noko å seie for virulens.

4.2.3 Respiratory burst aktivitet hjå leukocyttar stimulert med *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*

Pasteurella isolata isolert frå laks, *PL1*, *PL2* og *PL3*, stimulerte ganske lik andel celler til respiratory burst aktivitet hjå rognkjeksleukocyttar, med 7,4%, 7,1% og 6,4% RHO positive celler respektivt. Hjå lakseleukocyttar gav dei same isolata gjennomsnittleg 8,13%, 2,40% og 2,70% RHO positive celler. Respiratory burst aktivitet etter eksponering med isolat *PL1* var ikkje signifikant forskjellig i førehald til den ustimulerte kontrollen hjå rognkjeksleukocyttar, men hjå lakseleukocyttar gav same isolat signifikant (*) høgare andel celler med respiratory burst i førehald til den ustimulerte kontrollen. Dei to resterande isolata, *PL2* og *PL3*, gjer ikkje signifikant høgare andel celler som driv respiratory burst enn dei ustimulerte kontrollane hjå korkje rognkjeks- eller lakseleukocyttar, sjølv om rognkjeksleukocyttar har høgare gjennomsnittleg andel RHO positive celler enn lakseleukocyttar. Dette kan indikere at immunceller frå laks oppdagar isolat *PL1* i større grad enn det immunceller frå rognkjeks gjer, og dermed moglegvis kan vere meir virulent for rognkjeks enn for laks. Ein annan moglegheit er at isolata *PL2* og *PL3* er meir virulent for laks enn for rognkjeks. Derimot, i smitteforsøket gjennomført av Sandlund et al. (2021) blei kryssmitte mellom rognkjeks og laks undersøkt, og resultatane gav at badsmitta og kohabitant smitta laks ikkje utvikla sjukdom av *Pasteurella* spp. isolert frå laks og rognkjeks. Funna peikar på at laksen er meir motstandsdyktig mot

pasteurellose enn det rognkjeks er, då rognkjeks i same studie utvikla sjukdom frå både isolata. Funna i smittforsøket indikerer at lakseisolat er meir virulent for rognkjeks enn for laks.

PL1, *PL2* og *PL3* er vist å ha like proteinprofilar på SDS-PAGE gel, likevel er det ein liten skilnad i prosentandel RHO positive leukocytter etter eksponering. *PL2* og *PL3* kan ha mekanismar som gjer at dei hindrar respiratory burst nedbryting, som ikkje *PL1* har, eller at dei har mekanismar for å unngå immunsystemet. *PL1* kan og ha overflatekomponentar, PAMPar, som ikkje *PL2* og *PL3*. Sekvensering av isolata vil kunne avdekke om det er skilnadar i komponentane og eigenskapane deira, som kan ha noko å seie for virulensen til bakteriane.

4.3 Konklusjon og forslag til vidare arbeid

Den store auka i *Pasteurella* infeksjonar i norsk oppdrett, både hjå rognkjeks og laks, gjer det endå viktigare å auke kunnskapen om desse bakteriane. I dette forsøket er det funnen at *Pasteurella* spp. bakteriar stimulerer den medfødde immunresponsen ved respiratory burst til både rognkjeks og laks. Responsen er av ulik grad for *P. atlantica* genomovar *cyclopteri* og *P. atlantica* genomovar *salmonicida*, til og med innan same genomovar ser ein ulik grad av stimulering. Størst skilnad i respiratory burst respons ser ein ved eksponering med dei to rognkjeksisolata, og den gjenspeilast i både fiskeartane. Dette kan antyde at *PR1* er mindre virulent enn *PR2*. For dei tre lakseisolata ser ein at rognkjeksleukocytane har tilnærma lik respons på alle tre, medan for lakseleukocytane er responsen størst for *PL1*, og tilnærma lik for *PL2* og *PL3*. Isolata som gav minst respons er isolat som mogleg er meir virulente enn dei som i større grad aktiverte leukocytane, og som kan ha mekanismar for å unngå oppdaging eller oksygenavhengig nedbryting. I tillegg blei det i denne studien òg funnen kryssreaksjon hjå antistoff i serum frå rognkjeks immunisert med *P. atlantica* genomovar *cyclopteri*, som hadde bunde seg på protein hjå *Pasteurella* isolat frå både rognkjeks og laks. Framover vil det vere viktig å målrette arbeidet mot å få utvikle vaksiner. Forslag til vidare arbeid vil vere å identifisere immunogene komponentar og virulensfaktorar hjå dei forskjellige bakterieisolata.

5 - Kjelder

- Alarcón, M., Gulla, S., Røsæg, M. V., Rønneseth, A., Wergeland, H., Poppe, T. T., Nilsen, H. & Colquhoun, D. J. (2016). Pasteurellosis in lumpsucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 39(4), 489–495. <https://doi.org/10.1111/jfd.12366>
- Ángeles Esteban, M. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, 2012, 1–29. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Bassity, E., & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033196>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Birkbeck, T. H., Laidler, L. A., Grant, A. N., & Cox, D. I. (2002). *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 699–704. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-699>
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A. & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1759-1768 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Brun, E. (redaktør), Sommerset, I., Walde, C. S., Bang Jensen, B. & Haukaas, A. (2020). Fiskehelse rapporten 2019, utgitt av Veterinærinstituttet 2020.
- Bøgdal, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on immersion vaccines for fish: An update 2019. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>
- Cavinato, L., Genise, E., Luly, F. R., Di Domenico, E. G., Del Porto, P., & Ascenzioni, F. (2020). Escaping the Phagocytic Oxidative Burst: The Role of SODB in the Survival of *Pseudomonas aeruginosa* Within Macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00326>
- Chaves-Pozo, E., Muñoz, P., López-Muñoz, A., Pelegrín, P., García Ayala, A., Mulero, V., & Meseguer, J. (2005). Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell and Tissue Research*, 320(1), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1063-7>
- Cuesta, A., Ángeles Esteban, M., & Meseguer, J. (2006). Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology*, 43(8), 1275–1285.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.004>

- Eggestøl, H. O., Lunde, H. S., Rønneseth, A., Fredman, D., Petersen, K., Mishra, C. K., Furmanek, T., Colquhoun, D. J., Wergeland, H. I. & Haugland, G. T. (2018). Transcriptome-wide mapping of signaling pathways and early immune responses in lumpfish leukocytes upon *in vitro* bacterial exposure. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23667-x>
- Ellul, R. M., Bulla, J., Brudal, E., Colquhoun, D., Wergeland, H., & Rønneseth, A. (2019). Protection and antibody reactivity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) following vaccination against *Pasteurella* sp. *Fish and Shellfish Immunology*, 95, 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.016>
- Ellul, R. M., Walde, C., Haugland, G. T., Wergeland, H., & Rønneseth, A. (2018). Pathogenicity of *Pasteurella* sp. in lumpsuckers (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 42(1), 35–46. <https://doi.org/10.1111/jfd.12905>
- Espelid, S., Løkken, G. B., Steiro, K., & Bøgwald, J. (1996). Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 6(2), 95–110. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0011>
- Esteban, M., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., & Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in Teleosts. Implications of the New Cells Involved. *Biology*, 4(4), 907–922. <https://doi.org/10.3390/biology4040907>
- Fletcher, T. C., & Secombes, C. J. (2015). Immunology of Fish. *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000520.pub3>
- Foyle, L., Turnbull, T., Ellis, A., Barnes, A., Adams, A., & Ferguson, H. W. (2003). Pasteurellosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: immunohistochemistry of the naturally-occurring disease. *Journal of Fish Diseases*, 26(6), 373–376. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00465.x>
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 139–144. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-139>
- Gulla, S., Nilsen, H., Olsen, A. B. & Colquhoun, D. (2020). Fiskepatogene *Pasteurella* i Norge. *Norsk Fiskeoppdrett* 11, 2020, 46-47.
- Haugland, G. T., Jakobsen, R. A., Vestvik, N., Ulven, K., Stokka, L., & Wergeland, H. I.

- (2012). Phagocytosis and Respiratory Burst Activity in Lump sucker (*Cyclopterus lumpus* L.) Leucocytes Analysed by Flow Cytometry. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047909>
- Haugland, G. T., Pettersen, E. F., Sviland, C., Rønneseth, A., & Wergeland, H. I. (2010). Immunostaining of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.07.008>
- Hjeltnes, B. (redaktør) (2014). Fiskehelse rapporten 2013, utgitt av Veterinærinstituttet 2014.
- Janssen, W. A., & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, Physiology, and Serology of a *Pasteurella* Species Pathogenic for White Perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*, 96(5), 1606-1610.
- Kaldestad, M., Haugland, G. T., Rønneseth, A., Wergeland, H. I., & Samuelsen, O. B. (2014). Antibiotic uptake by cultured Atlantic cod leucocytes and effect on intracellular *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* replication. *Diseases of Aquatic Organisms*, 108(1), 11–21. <https://doi.org/10.3354/dao02696>
- Kalgraff, C. A. K., Wergeland, H. I., & Pettersen, E. F. (2011). Flow cytometry assays of respiratory burst in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(3), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.028>
- Lamas, J., & Ellis, A. E. (1994). Atlantic salmon (*salmo salar*) neutrophil responses to *aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 4(3), 201–219. <https://doi.org/10.1006/fsim.1994.1019>
- Legård, B. K., & Strøm, S. B. (2020). Pasteurellosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Western Norway. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 40(4), 148-155.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2), 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S., & Kapur, V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3460–3465. <https://doi.org/10.1073/pnas.051634598>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2017). *Janeway's immunobiology* (9th ed.). New York: Garland Science.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., & Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*. 25(8-9), 807-825.

[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00037-4)

- Plouffe, D. A., Hanington, P. C., Walsh, J. G., Wilson, E. C., & Belosevic, M. (2005). Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, *12*(4), 266–277. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x>
- Reid, H. I., & Birkbeck, T. H. (2015). Characterization of two groups of *Pasteurella skyensis* isolates from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., based on serotype and 16S rRNA and rpoB gene partial sequences. *Journal of Fish Diseases*, *38*(4), 405–408. <https://doi.org/10.1111/jfd.12240>
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, *5*(1), 3-9. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6>
- Rønneseth, A., Pettersen, E. F., & Wergeland, H. I. (2005). Leucocytes of anadromous and landlocked strains of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the smolting period. *Fish and Shellfish Immunology*, *19*(3), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.005>
- Rønneseth, A., Pettersen, E. F., & Wergeland, H. I. (2006). Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish and Shellfish Immunology*, *20*(4), 610–620. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.08.004>
- Sandlund, N., Rønneseth, A., Ellul, R. M., Nylund, S., & Sandlund, L. (2021). *Pasteurella* spp. Infections in Atlantic salmon and lumpsucker. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.13381>
- Semple, S. L., & Dixon, B. (2020). Salmonid antibacterial immunity: An aquaculture perspective. *Biology*, *9*(10), 1-35. <https://doi.org/10.3390/biology9100331>
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, *88*(6), 1814–1815. <https://doi.org/10.1128/JB.88.6.1814-1815.1964>
- Sommerset, I. (redaktør), Bang Jensen, B., Bornø, B., Haukaas, A. & Brun, E. (2021). Fiskehelse rapporten 2020, utgitt av Veterinærinstituttet 2021
- Tolås, A. H. P. (2020). Bacteriophages targeting pathogenic bacteria isolated from lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). The University of Bergen. Retrieved from <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/2711958>
- Tripp, R. A., Maule, A. G., Schreck, C. B., & Kaattari, S. L. (1987). Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses *in vitro*. *Developmental and Comparative Immunology*, *11*(3), 565–576. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(87\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0145-305X(87)90045-0)

- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Review Article Veterinarni Medicina*, 56(10), 486-503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Valheim, M., Håstein, T., Myhr, E., Speilberg, L., & Ferguson, H. W. (2000). *Varracalbmi*: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 23(1), 61–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00209.x>
- Vestvik, N., Rønneseth, A., Kalgraff, C. A. K., Winther-Larsen, H. C., Wergeland, H. I., & Haugland, G. T. (2013). *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* replicates within Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes and inhibits respiratory burst activity. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(3), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.002>
- Veterinærinstituttet (2019, 18. desember). Veterinærinstituttet skal forske på pasteurellose i laks. Henta 20.mai 2021 frå <https://www.vetinst.no/nyheter/veterinaerinstitutttet-skal-forske-pa-pasteurellose-i-laks>
- Veterinærinstituttet (2020, 5. oktober). *Pasteurella skyensis* identifisert i Norge for første gang. Henta 13. oktober 2020 frå <https://www.vetinst.no/nyheter/pasteurella-skyensis-identifisert-i-norge-for-forste-gang>
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6), 1127-1151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005>
- Wilson, A. B. (2017). MHC and adaptive immunity in teleost fishes. *Immunogenetics*, 69(8-9), 521-528. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1009-3>

6 - Appendix

6.1 Lister over løysingar og kjemikaliar

Tabell 6. Liste over vekstmedium og bufferar brukt i studien.

Ingrediensar	Kvantitet	Leverandør
TSB 2% NaCl		
I: TSB	30 g	Dickinson and company
II: NaCl	15 g	VWR chemicals
III: Destillert H ₂ O	1000 ml	
	Tilsett I og II til III og bland til pulveret er oppløyst. Steriliserast ved autoklaving.	
PBS, pH 7.3		
I: Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0.72 g	Sigma-Aldrich
II: KH ₂ PO ₄	0.27 g	Sigma-Aldrich
III: NaCl	8.5 g	VWR chemicals
IV: Destillert H ₂ O	1000 ml	
	Tilsett I, II og III til 900 ml IV. Bland godt til pulveret er oppløyst. Juster pH til 7.3 og bring totalvolumet opp til 1000 ml med dH ₂ O. Steriliserast ved autoklaving.	
PBS + E, pH 7.3		
I: BSA	5.0 g	Sigma-Aldrich
II: EDTA	4.65 g	Triplex
III: PBS	500 ml	
	Tilsett I, II og 400 ml III. Bland godt til pulveret er oppløyst. Juster pH til 7.3 og bring totalvolumet opp til 500 ml med PBS. Steriliserast ved autoklaving før tilsetjing av EDTA	

PBS 380 Osm, pH 7.3		
I: Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0.854 g	Sigma-Aldrich
II: KH ₂ PO ₄	0.254 g	Sigma-Aldrich
III: NaCl	11.104 g	VWR chemicals
IV: dH ₂ O	1000 ml	
Tilsett I, II og III til 900 ml IV og bland til pulveret er oppløyst. Juster pH til 7,3 og bring totalvolumet opp til 1000 ml med dH ₂ O. Autoklaver.		

Tabell 7. Liste over løysingar brukt til SDS-PAGE og sølvfarging.

Ingrediensar	Kvantitet	Leverandør
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8		
I: Tris base	27.23 g	Sigma-Aldrich
II: dH ₂ O	150 ml	
Løys I til 80 ml II. Juster pH til 8.8 og bring totalvolumet opp til 150 ml med dH ₂ O.		
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8		
I: Tris base	6 g	Sigma-Aldrich
II: dH ₂ O	100 ml	
Løys I til 60 ml II. Juster pH til 6.8 og bring totalvolumet opp til 100 ml med dH ₂ O.		

<p>10x TGS</p> <p>I: Tris base</p> <p>II: Glycine</p> <p>III: SDS</p> <p>IV: dH₂O</p>	<p>30.3 g Sigma-Aldrich</p> <p>144 g Sigma-Aldrich</p> <p>10 g Sigma-Aldrich</p> <p>1 l</p> <p>Tilsett I, II og III til IV og bland til pulveret er oppløyst.</p>
<p>Resolving gel (12%)</p> <p>I: dH₂O</p> <p>II: Acrylamide</p> <p>III: 1.5M TrisHCl, pH 8.8</p> <p>IV: 10% SDS</p> <p>V: APS</p> <p>VI: TEMED</p>	<p>4.4 ml</p> <p>3 ml Sigma-Aldrich</p> <p>2,5 ml</p> <p>100 µl</p> <p>50 µl ThermoFisher</p> <p>5 µl Sigma-Aldrich</p> <p>Bland I, II, III og IV. Tilsett V og VI rett før støyping av gel.</p>
<p>Stacking gel (4%)</p> <p>I: dH₂O</p> <p>II: Acrylamide</p> <p>III: 0.5M TrisHCl, pH 6.8</p> <p>IV: 10% SDS</p> <p>V: APS</p> <p>VI: TEMED</p>	<p>6.4 ml</p> <p>1 ml Sigma-Aldrich</p> <p>2,5 ml</p> <p>100 µl</p> <p>50 µl ThermoFisher</p> <p>10 µl Sigma-Aldrich</p> <p>Bland I, II, III og IV. Tilsett V og VI rett før støyping av gel.</p>

Prøvebuffer	
I: dH ₂ O	3.55 ml
II: 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.24 ml
III: Glycerol	2.5 ml Sigma
IV: 10% SDS	2.0 ml
V: 0.5% Bromophenol Blue	0.2 ml Merck
VI: β-mercaptoethanol	50 μl Sigma
Bland I, II, III, IV og V. Før bruk tilsetjast VI til 950 μl av løysinga.	
Fikseringsløysing	
I: Metanol	100 ml Honeywell
II: Acetic acid	20 ml Honeywell
III: Fixative Enhancer Concentrate	20 ml Bio-Rad
IV: dH ₂ O	20 ml
Bland I, II, III og IV.	
Silver stain til gel kit	
I: dH ₂ O	35 ml
II: Silver complex solution	5 ml Bio-Rad
III: Reduction moderator solution	5 ml Bio-Rad
IV: Image development reagent	5 ml Bio-Rad
V: Development accelerator solution (romtemperert)	50 ml Bio-Rad
Tilsett I i ein erlenmeyer kolbe. II, III, IV og V blir så tilsett i rekkefølge rett før bruk.	
5% Acetic acid	
I: Acetic acid	5 ml Honeywell
II: dH ₂ O	95 ml
Tilsett I i II.	

Tabell 8. Liste over løysingar brukt til Western Blot.

Ingrediensar	Kvantitet	Leverandør
10x blottebuffer		
I: Tris	7.57 g	Sigma-Aldrich
II: Glycin	36 g	Sigma-Aldrich
III: dH ₂ O	250 ml	
	Løys I og II i III. Før bruk: tilsett 100 ml av løysinga i 200 ml metanol og 700 ml dH ₂ O.	
10x TBS, pH 7.5		
I: Tris	12.11 g	Sigma-Aldrich
II: NaCl	146.1 g	VWR chemicals
III: dH ₂ O	500 ml	
	Tilsett I og II til 400 ml III. Juster pH til 7.5 og bring totalvolumet opp til 500 ml med dH ₂ O.	
1 x TBS		
I: 10 x TBS	100 ml	
II: dH ₂ O	900 ml	
	Tilsett I til II.	
TTBS		
I: Tween-20	350 µl	Sigma-Aldrich
II: 1 x TBS	700 ml	
	Tilsett I i II og bland godt.	
Blokkeringsløysing		
I: Tørrmelk	5 g	Sigma-Aldrich
II: TBS	100 ml	
	Løys I i II.	

Antistoff buffer	
I: Tørrmelk	2 g Sigma-Aldrich
II: TTBS	200 g
	Løys I i II.
Strippebuffer, pH 2.2	
I: Glycin	15 g Sigma-Aldrich
II: SDS	1 g Sigma-Aldrich
III: Tween 20	10 ml Sigma-Aldrich
IV: dH ₂ O	1000 ml
	Løys I, II og III i 800 ml av IV. Juster pH til 2.2 og bring totalvolumet opp til 1000 ml med dH ₂ O.

Tabell 9. Liste over løysingar brukt til isolering av leukocytter og flow cytometry.

Ingredienser	Kvantitet	Leverandør
1.5 M NaCl		
I: NaCl	21.915 g	VWR chemicals
II: dH ₂ O	250 ml	
	Tilsett I i II og bland godt til saltet er oppløyst. Autoklaver.	
0.36 M NaCl		
I: NaCl	5.26 g	VWR chemicals
II: dH ₂ O	250 ml	
	Tilsett I i II og bland godt til saltet er oppløyst. Autoklaver.	

<p>0.46 M NaCl</p> <p>I: NaCl</p> <p>II: dH₂O</p>	<p>6.72 g VWR chemicals</p> <p>250 ml</p> <p>Tilsett I i II og bland godt til saltet er oppløyst. Autoklaver.</p>
<p>Percoll 1.050 g/ml</p> <p>I: 1.5 M NaCl</p> <p>II: Percoll</p> <p>III: dH₂O</p>	<p>1 ml</p> <p>3.4 ml Cytiva</p> <p>5.6 ml</p> <p>I og II blir tilsett i III.</p>
<p>Percoll 1.070 g/ml</p> <p>I: 1.5 M NaCl</p> <p>II: Percoll</p> <p>III: dH₂O</p>	<p>1 ml</p> <p>4.9 ml Cytiva</p> <p>4.1 ml</p> <p>I og II blir tilsett i III.</p>
<p>Percoll 1.060 g/ml</p> <p>I: Percoll</p> <p>II: 0.36 M NaCl</p>	<p>30 ml Cytiva</p> <p>33.9 ml</p> <p>I blir tilsett II.</p>
<p>Percoll 1.075 g/ml</p> <p>I: Percoll</p> <p>II: 0.46 M NaCl</p>	<p>45 ml Cytiva</p> <p>31.9 ml</p> <p>I blir tilsett II.</p>

<p>Løysing A</p> <p>I: NaCl</p> <p>II: NaHCO₃</p> <p>III: Glukose</p> <p>IV: dH₂O</p>	<p>2.4 g VWR chemicals</p> <p>2.8 g VWR chemicals</p> <p>0.66 g Sigma-Aldrich</p> <p>100 ml</p> <p>Tilsett I, II og III til IV og bland til pulveret er oppløyst. Steriliserast ved filtrering gjennom eit 0.2 µl filter.</p>
<p>L-15, 370 mOsm</p> <p>I: Løysing A</p> <p>II: L-15</p>	<p>5 ml</p> <p>95 ml BioWhittaker</p> <p>Tilsett I til II.</p>
<p>L-15 medium</p> <p>I: Heparin sodium salt</p> <p>II: 200mM glutamin (2mM)</p> <p>III: 1M HEPES (15mM)</p> <p>IV: L-15 (370 mOsm)</p>	<p>200 µl Sigma-Aldrich</p> <p>1 ml BioWhittaker, Lonza</p> <p>1.5 ml Sigma-Aldrich</p> <p>til 100 ml</p> <p>Tilsett I, II og III til IV.</p>
<p>PBS 380 mOsm m/heparin</p> <p>I: Heparin sodium salt</p> <p>II: PBS 380 mOsm</p>	<p>200 µl Sigma-Aldrich</p> <p>100 ml</p> <p>Tilsett I til II.</p>
<p>Glukosepute</p> <p>I: BSA</p> <p>II: D-glukose</p> <p>III: PBS</p>	<p>3 g Sigma-Aldrich</p> <p>4.5 g Sigma-Aldrich</p> <p>100 ml</p> <p>Tilsett I og II til III og bland godt til pulveret er oppløyst.</p>

DHR (206 µm)	
I: DHR (5mM)	8,24 µl Invitrogen
II: PBS 380 mOsm m/heparin	191,6 µl
	Tilsett I til II.