



UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges Fiskerihøgskole

Antigen- og plasmid baserte vaksiner mot pankreas sykdom forårsaket av salmonid alphavirus (SAV-3) i atlantisk laks (*Salmo salar L.*)

Kristian Gillebo Sørmo

Mastergradsoppgave i Akvamedisin (60 Stp)

Mai 2018



Forord

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø – Norges arktiske universitet. Norges veterinærhøgskole - Oslo (NMBU) og Havbruksstasjonen i Kårvika, i perioden 2017-2018.

Først vil jeg si tusen takk til min hovedveileder **Roy Ambli Dalmo** som har inkludert meg i et svært spennende prosjekt. Samtidig har du vært en utmerket veileder og jeg takker for trivelige samtaler og kaffepauser. Deretter vil jeg takke **Heng Chi** og **Jaya Kumari**, som har vært gode samarbeidspartnere og læremestere på laboratoriet.

Takk til **Hetroney Mweemba Munangandu** og **Øystein Evensen** ved veterinærhøgskolen i Oslo som tok meg imot med en varm velkomst, tiden jeg fikk tilbringe hos dere var veldig verdifull og lærerik.

Jeg vil også takke familie og venner for 5 fantastiske år her i Tromsø!

Kristian Gillebo Sørmo

Tromsø, mai 2018

Sammendrag

Pankreassykdom utgjør et stort problem i norsk oppdrettsnæring, og forårsaker store økonomiske tap samt redusert fiskevelferd. Selv ved vaksiner med dagens kommersielle vaksiner er utbruddene fortsatt økende som antyder at dette er en fremtidig trussel og det kreves ytterligere tiltak for å få bukt med problemet.

Inaktiverte helvirusvaksiner benyttet i dagens næring, har vist seg effektiv mot ekstracellulære patogener, men fremstår mindre effektiv mot intracellulære patogener. Imidlertid har nye vaksinestrategier vist seg lovende, hvor blant annet DNA-vaksiner har vist seg meget effektive mot enkelte virussykdommer. Det er antatt at DNA vaksinasjon induserer både cellulær og humoral immunrespons – som er viktig for beskyttelse mot virus. For å styrke den cellulære immunresponsen kan molekylære adjuvanter benyttes. Transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes har vist seg å være sentrale ved T-celle differensiering til ulike T-effektor celler, og preliminare resultater har vist at plasmider kodende for disse er kandidater for å øke vaksinerespons mot patogener.

I dette studiet ble det til sammen testet 6 ulike vaksiner mot salmonid alphavirus (SAV-3), vaksinene var inaktiverte helvirusvaksiner, vaksiner med plasmid molekylære adjuvanter og DNA vaksine. De molekylære adjuvantene bestod av plasmid kodende for transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes. Disse ble gitt i kombinasjon med inaktivert helvirusvaksine. Fisken injisert med vaksinene ble undersøkt i et immuniseringsforsøk og smitteforsøk, hvor fokus var tilvekst, antistoffrespons og histopatologiske endringer. Disse tre ble også benyttet som indikator på beskyttelse. Resultatene fra immuniseringsforsøket antydde at vaksinene ikke påvirket tilvekst etter immunisering, og noen vaksiner induserte god antistoff respons – spesielt vaksine basert på høy dose av inaktiverte helcellevirus. Tas alle indikatorene med, viste DNA vaksinen, og noen vaksiner med molekylære adjuvanter (Eomes og GATA-3) også god effekt.

Forkortelser

ANOVA	Analysis of variance
APC	Antigen presenterende celle
BCR	B-celle reseptor
CD3	Cluster og Differentiation 3
CD28	Cluster og Differentiation 28
CD45	Cluster og Differentiation 45
cDNA	Komplement DNA
CHSE	Chinook salmon embryo
CHH	Chinook salmon heart
CTL	Cytotoksiske T-celler
DNA	Deoksyribonukleinsyre
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LPS	lipopolysakkarider
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
NK	Natural killer cells
nm	Nanometer
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige institutt
OD	Optical density (Optisk tetthet)
PAMP	Pattern Recognition Receptors
PBS	Fosfatbufret saltvann
PD	Pankreassykdom
PRR	Pattern recognition reseptor
RNA	Ribonukleinsyre
RT qPCR	Kvantitativ real-time polymerase chain reaction
SAV	Salmonid alphavirus
SGR	Spesific growth rate (Spesifikk vekstrate)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T _H	T-hjelper celle CD4 ⁺
TLR	Toll lignende reseptor
TNF	Tumor necrosis factor

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Salmonid alphavirus (SAV) – pankreas sykdom.....	2
1.2.1	<i>Epidemiologi</i>	3
1.3	Immunsystemet.....	4
1.3.1	<i>Immunologiske organer.....</i>	4
1.3.2	<i>Det medfødte immunsystem.....</i>	5
1.3.3	<i>Det adaptive immunsystemet.....</i>	6
1.3.4	<i>Humoral adaptiv immunrespons</i>	7
1.3.5	<i>Celle-mediert adaptiv immunrespons.....</i>	8
1.4	Transkripsjonsfaktorer og cellulære immun responser	10
1.4.1	<i>GATA-3.....</i>	10
1.4.2	<i>T-bet og Eomes.....</i>	10
1.5	Vaksinasjon i norsk akvakultur	12
1.5.1	<i>Kommersielle vaksiner mot PD.....</i>	12
1.5.2	<i>DNA-vaksine.....</i>	13
1.6	Hensikt og problemstilling	14
2	Material og Metoder	15
2.1	Forsøksoppsett	15
2.1.1	<i>Fisk.....</i>	15
2.1.2	<i>Vevs – og organuttak samt blodprøver.....</i>	17
2.1.3	<i>Tankoppsett</i>	18
2.2	Cellelinjer	19
2.2.1	<i>Chinook Salmon Embryo Cells (CHSE-214 celler).....</i>	19
2.2.2	<i>Chinook Salmon Heart Cells (CHH-1 celler).....</i>	19
2.2.3	<i>Vedlikehold av cellekultur</i>	19
2.3	Produksjon av virus	20
2.4	Produksjon av vaksiner.....	20
2.4.1	<i>Tillaging av inaktiverede virus vaksiner.....</i>	20
2.4.2	<i>Produksjon av plasmider kodende for transkripsjonsfaktorer.....</i>	20
2.4.3	<i>Kloning av gener.....</i>	21
2.4.4	<i>Tillaging av plasmider til vaksinestudiet.....</i>	22
2.4.5	<i>DNA-Vaksine</i>	23
2.4.6	<i>Anti-SAV3 IgY.....</i>	23
2.4.7	<i>Kommersielle vaksiner</i>	23
2.4.8	<i>Tomt Plasmid (pTagRFP og pTagTurboFP635).....</i>	24

2.5	Dyrking og transfeksjon av cellekultur	25
2.5.1	Transfeksjon av cellelinjen.....	25
2.5.2	Cellefiksering og DAPI farging.....	25
2.6	<i>In Vivo</i> -Immunisering og smitteforsøk.....	26
2.7	Immunisering (Vaksinering).....	26
2.8	Smitte med SAV3.....	27
2.9	Analysar.....	27
2.9.1	Vekstutvikling	27
2.9.2	Utvikling av ELISA.....	28
2.9.3	Utvikling av virus nøytraliserings analyse.....	31
2.9.4	Histologi.....	34
2.9.5	Uttrykk av T-bet, GATA-3 og Eomes i muskel.....	36
2.9.6	Histoscore.....	36
2.9.7	Statistiske analyser og grafiske fremstillinger	38
3	Resultater	39
3.1	Transfeksjon av CHSE-celler (<i>in vitro</i>).....	39
3.1.1	Uttrykk av plasmid i muskel (<i>In vivo</i>).....	40
3.2	Vekt etter immunisering	41
3.2.1	Vektøkning etter immunisering.....	41
3.2.2	Spesifikk vekst rate (SGR) etter immunisering	44
3.3	Smitteforsøk.....	46
3.3.1	Vektøkning etter smitte	47
3.3.2	Spesifikk vekst rate (SGR) etter smitte.....	50
3.3.3	Antistoff produksjon mot SAV-3	54
3.3.4	ELISA.....	55
3.3.5	Virus nøytraliserings Analyse.....	57
3.3.6	Histopatologiske forandringer etter SAV-3 smitte	59
4	Diskusjon	66
4.1	<i>In vitro</i> studier	66
4.1.1	Uttrykk av kodende gen i CHSE-214 -celler (<i>in vitro</i>).....	66
4.2	Immunisering.....	67
4.2.1	Uttrykk av plasmid kodende transkripsjonsfaktorer.....	67
4.2.2	Tilvekst.....	67
4.2.3	Tilvekst etter immunisering	68
4.3	Smitteforsøk.....	70
4.3.1	Antistoffrespons - ELISA og virus nøytraliserings analyse.....	73
4.3.2	Histopatologiske endringer – samt en helhetlig vurdering	77
4.3.3	Effekten av molekylære adjuvaner.....	80

4.3.4	<i>Vurdering av forsøksdesign og statistiske undersøkelser</i>	81
4.3.5	<i>Praktiske anvendelser av resultatene og videre forskning</i>	83
5	Konklusjon	84
6	Referanser	85
7	Appendiks	93

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Pankreassykdom (PD) forårsaker i dag store utfordringer for norsk oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar* L.), i 2017 ble det registrert 176 nye tilfeller av PD, dette er det høyeste antallet som noen gang har vært registrert (Hjeltnes et al., 2018). Derfor ser det utarbeidet nye lover og retningslinjer som er beskrevet i ny og revidert utgave av «forskrift mot PD» (Forskrift 2017-08-29 nr. 1318), som tilsier strenge krav til vaksiner, rutinemessige prøveuttak, soneinndeling, smitteforebyggende tiltak, brakklegging og utslakting. Formålet med forskriften er å redusere konsekvensene av pankreassykdom (PD) i en PD-sone, hindre smitte langs norskekysten, og samtidig begrense utbredelsen av ulike subtyper av «salmonid alphavirus» (SAV) (Forskrift 2017-08-29 nr. 1318).

Det finnes kommersielle vaksiner basert på inaktivert virus (For eksempel Norvax Compact PD – MSD Animal welfare) som har blitt brukt i norsk akvakultur siden 2007. En studie av vaksinsens effekt mot pankreas sykdom konkluderte med at vaksinen hadde positiv effekt og reduserte antall utbrudd, og akkumulert dødelighet, samt antall fisk destruert ved slakting (Jensen et al., 2012). Da antall PD utbrudd fortsatt er økende, blir man nødt til å sette et spørsmålstegn mot vaksinsens effektivitet (Hjeltnes et al., 2018). Det har blitt foreslått at ved å øke mengde av inaktivert virus i vaksinen vil også beskyttelsen forbedres, ulemper vil være økte produksjonskostnader, og vaksinen vil ikke lenger være såpass kostnadseffektiv (Munang'andu et al., 2013a). Dette tvinger næringen til å ta nye grep og finne andre metoder for å utvikle effektive vaksiner.

Det har blitt gjort noen studier med overekspresjon av ulike transkripsjonsfaktorer også kjent som «molekylære adjuvanser», og disse har vist induksjon av immunologiske responser som kan virke både intracellulære og ekstracellulære patogener (Dalmo, 2018; Kumari et al., 2009; Kumari et al., 2015; Munang'andu et al., 2013b). Ved brede og omfattende studier av «molekylære adjuvanser» vil næringen kanskje etter hvert kunne skreddersy vaksiner - med adjuvanser mot spesifikke sykdommer.

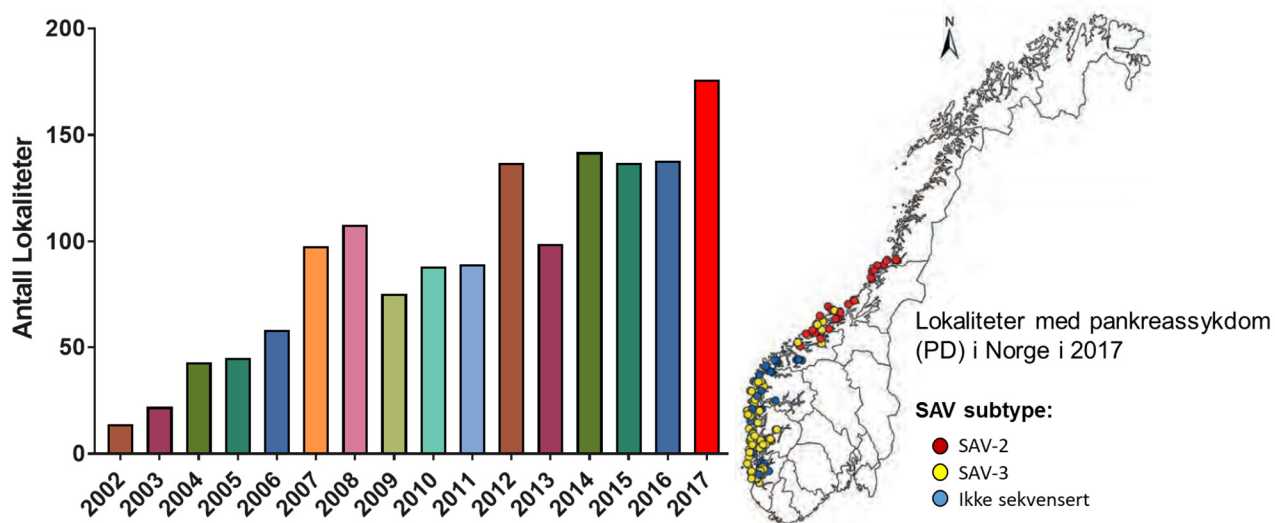
1.2 Salmonid alphavirus (SAV) – pankreas sykdom

Pankreas sykdom ble for første gang beskrevet hos oppdrettslaks i Skottland i 1976 (Munro et al., 1984). Agenset som forårsaket sykdommen ble senere identifisert som salmonid alphavirus (SAV) og tilhører virusfamilien *Togaviridae* (Nelson et al., 1995). Viruset er et kappekledd sfærisk virus med en diameter på 60-70 nm, og arvematerialet består av et enkeltrådig RNA med en lengde på 12 kb (Powers et al., 2001; Strauss & Strauss, 1994; Weston et al., 1999). I Norge ble viruset for første gang oppdaget i 1989 (Poppe et al., 1989), og har siden forårsaket store økonomiske tap for norsk oppdrettsnæring i form av økt dødelighet, redusert tilvekst og slaktekvalitet (Aunsmo et al., 2010). Det har til nå blitt beskrevet seks forskjellige subtyper av viruset basert på fylogenetiske analyser av genene E2 (koder for strukturelt glykoprotein forankret i membranen) (Brown et al., 2018), og nsp3 (koder for ikke-strukturelt protein 3) (Guo et al., 2014), hvor subtypene SAV-1, 4, 5 og 6 har blitt isolert fra atlantisk laks utenfor Irland og Skottland (Fringuelli et al., 2008; Graham et al., 2012). Subtypen SAV-2 deles inn i to varianter, SAV-2 ferskvann, og marin SAV-2. Ferskvanns varianten av SAV-2 er ofte assosiert med «sovesyken» i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og er et utbredt problem på fastlandet i Europa og Storbritannia (Graham et al., 2007). Den marine varianten av SAV-2 forårsaker pankreas sykdom i sjøfasen til både regnbueørret og atlantisk laks (Fringuelli et al., 2008). Marin SAV-2 har blitt påvist langs norskekysten (Jansen et al., 2017). For å begrense spredningen både innenfor og utenfor endemisk sone som strekker seg fra Hustadvika til fylkesgrensen mellom sør-nord- Trøndelag, har det blitt opprettet en egen soneforskrift (Forskrift 2012-11-06 nr. 1056).

SAV-3 regnes i dag som den særnorske varianten av viruset, og endemisk sone strekker seg fra Vestlandet til Hustadvika. -Av naturlig årsak fungerer Hustadvika som en effektiv smittebarriere og forhindrer spredning av viruset nordover (Hjeltnes et al., 2018; Jansen et al., 2017). Dette kommer av at Hustadvika består av en 18 km lang havstrekning fri for oppdrettsanlegg, samtidig er strømforholdene dominert av den nordøstlige kyststrømmen som svekker transport av virus forbi Hustadvika. I tillegg gjennomføres det strenge smittehygieniske tiltak spesielt i område rett sør for smittebarrieren (Lillehaug et al., 2012). Selv med en effektiv smittebarriere forekommer det sporadiske utbrudd av PD nord for Hustadvika, hvor viruset sprer seg hovedsakelig mellom lokaliteter passivt via havstrømmer. En risikovurdering har vist at viruset kan spre seg aktivt gjennom menneskelig aktivitet der utilstrekkelig desinfeksjon av

Introduksjon

utstyr, brønnbåaktivitet, transport av smolt og ballastvann kan være årsaken, (Lillehaug et al., 2012; Lyngstad et al.; Stene et al., 2014).



Figur 1: Grafen viser antall lokaliteter påvist med pankreassykdom (SAV-2 og SAV-3) i Norge fra år 2002 til år 2017. Kartet viser oversikt over posisjonen til ulike lokalitetene påvist med pankreas sykdom i 2017. Data er hentet fra fiskehelse rapporten 2017 (Hjeltnes et al., 2018).

1.2.1 Epidemiologi

Pankreassykdom i atlantisk laks påvises hyppigst hovedsakelig det første året etter utsett i sjøvann, og det har blitt observert at antall utbrudd øker om sommeren og mot høsten (Rodger & Mitchell, 2007). Virusets målceller har enda ikke blitt identifisert, men en antar at fisk blir smittet via hud, gjeller og/ eller tarm (McLoughlin & Graham, 2007). Sykdommen har et dynamisk forløp og ved den akutte fasen av utbruddet, kan det bli påvist store mengder virus i prøver spesielt fra, hjerte, blod og hodenyren. Virus utskillelse har vist seg å forekomme via naturlig sekresjon der (SAV RNA) har blitt påvist i avføring og mukus (Jansen et al., 2017).

Kliniske tegn under den akutte fasen beskrives fisken «kaketisk», hvor adferd og symptomer som avmagring, lav/ingen appetitt, letargisk og apatisk. Histopatologiske endringer observeres i målorganene; pankreas, hjerte og skjellett Muskel. Omfanget og fordelingen av lesjoner varierer gjennom sykdomsforløpet. De første lesjonene etter infeksjon gir akutte nekroser i akinærcellene i eksokrin pankreas, med variabel inflammatorisk respons, som ender med degresjon eller fravær av eksokrin pankreas. Senere observeres det hjerte lesjoner, med alvorlig degenerasjon, myokarditt og multifokale nekroser som omfatter både spongiøst og kompakt del i ventrikkelen. Fire uker etter infeksjon i pankreas og hjerte observeres det ofte lesjoner og

nekroser både i hvit og rød skjelettmuskulatur, der rød muskulatur påvirkes i større grad (Bruno et al., 2013). Dødeligheten i naturlige utbrudd varierer mye - fra nesten ubetydelig til over 50% (Jansen et al., 2017). Fisk som overlever infeksjonen viser varierende utfall, pankreas kan regenereres slik at fisken begynner å ta til seg næring, men det blir derimot observert fisk som utvikler kroniske lesjoner med et signifikant tap av akinærceller i eksokrin pankreas. Dette fører til at fisken mistrives, og siden evnen til næringsopptak begrenses utvikles disse til såkalte «PD-pinner» (Bruno et al., 2013).

1.3 Immunsystemet

Hovedoppgaven til fiskens immunsystem er å beskytte verten mot diverse patogener som virus, bakterier og parasitter. Mekanismen bak dette er kompliserte immunresponser som kan benyttes til å inaktivere eller drepe patogener. Kartleggingen av fiskens immunsystem krever fortsatt mye forskning, selv om det antydes at både morfologi og funksjon er nokså lik pattedyrenes immunforsvar (Poppe & Bergh, 2002). Det vil si at de fleste beinfisk (*Teleostei*) både har et medfødt og adaptivt immunforsvar (Magnadottir, 2010), med bakgrunn fra en evolusjoner divergens mellom (*chondrichthyes*) og (*agnathans*) for 450 millioner år siden (Marchalonis & Schluter, 1998).

1.3.1 Immunologiske organer

Immunsystemet til beinfisken mangler lymfeknuter, lymfeårer og benmarg som er viktige bloddannende og immunologiske organer hos pattedyr. Isteden har beinfisk to primære lymfoide organer: Hodenyren og tymus. Disse kan også fungere som sekundære lymfoide organer i samarbeid med milten. (Press & Evensen, 1999; Secombes & Wang, 2012). Primære lymfoide organer produserer B- og T- lymfocytter, mens sekundære lymfoide organer fungerer som kontrollposter, som er viktig for opptak av antigener og interaksjoner mellom adaptive immunceller og antigen presenterende celler (APC) (Abbas et al., 2014). Fysiske barrierer som hud, gjeller og tarm har også immunologiske funksjoner, og utskiller mukus inneholdende for eksempel antibakterielle peptider, lektiner og immunglobuliner, samt andre potensielle antimikrobielle molekyler (Ángeles Esteban, 2012).

I beinfisk er tymus et «paret» organ lokalisert i øvre del av gjellehulen og består av en ytre (korteks) og en indre (medulla) del, funksjonen til organet i fisk er foreslått som relativt lik som i andre høyerestående dyr (Nakanishi et al., 2015), hvor det fungerer som et modningscenter der T-lymfocytter proliferer og differensierer. Umodne T-lymfocytter migrerer til tymus via

Introduksjon

blodstrømmen, her gjennomgår T-cellene en positiv seleksjon i korteks, hvor cellen testes mot kroppens egne antigen via MHC molekyler. Dette for å unngå en autoimmun respons der T-cellene angriper vertens egne celler. Deretter vandrer de umodne T-cellene til medulla, og hvor TCR testes mot APCs MHC molekyler, ved interaksjon forekommer det en differensiering av T-lymfocytter (for eksempel T_{H1} - T_{H2} , T_{H17} , og CTL) (Foey & Picchiatti, 2014; Ladi et al., 2006).

Nyren deles inn i tre seksjoner – hhv. hodenyre midt - og baknyre, som har spesialiserte oppgaver. Immunologisk sett fremstår hodenyren som kanskje det viktigste immunologiske organet. I beinfisk består denne delen av lymfoid og hematopoetisk vev og plasmacellene her produserer store mengder antistoffer (Parra et al., 2013; Press & Evensen, 1999). Det lymfoide vevet har en stor bestanddel av B-lymfocytter og det har vist seg at hodenyren er særdeles viktig i modning samt aktivering av naive B-celler (Zwollo et al., 2005). Samtidig finner man et komplisert system av sinusoider som er delvis kledd med fagocytter og endocyterende endotelceller. Oppgaven til sistnevnte celletyper er hovedsakelig opptak av antigener og patogener fra blodet, og kanskje for å initiere en immunologisk respons (Poppe & Bergh, 2002).

Milten deles inn i to seksjoner rød og hvit pulpa, den røde pulpaen opptar det meste av milten inneholdende blodfylte ellipsoider, hematopoetisk vev og diverse immunceller som makrofager og lymfocytter. Den hvite pulpaen kan deles inn i to viktige seksjoner, melanomakrofager, og ellipsoider som ser ut til å ha spesialiserte funksjoner innenfor plasma filtrering og opptak av fremmede substanser, særlig immunkomplekser (Foey & Picchiatti, 2014). Milten fremstår sentralt i aktiveringen og differensieringen av B-celler, der modne B-lymfocytter vandrer fra hodenyren til milten og blir aktivert via MHC-molekyler fra APCs, og differensierer til antistoff sekreterende celler (Zwollo et al., 2005).

1.3.2 Det medfødte immunsystem

Fisken er konstant utsatt for et smittepress fra patogener i vannet, derfor har den utviklet en rekke mekanismer for å beskytte seg. Det medfødte immunsystemet er derfor kritisk i vertens førstelinjeforsvar som kan bekjempe akutte infeksjoner (Abbas et al., 2014). De underliggende mekanismene kan deles inn i tre «seksjoner»: Mukuslag/hudepitel, humorale parametre og cellulære komponenter. Hudepitel og mukuslaget som dekker gjeller, hud og fordøyelsessystemet er ekstremt viktig for verten, da dette fungerer som en fysisk barriere. Samtidig sekreteres det antimikrobielle peptider, immunglobuliner, lysozym, lektiner og

Introduksjon

proteaser i dette vevet (Ellis, 2001). De humorale parameterne uttrykkes i plasma, serum og andre sekreter. Dette inkluderer også komplementsystemet som er et effektivt system mot mikroorganismer, der patogenene kan lyses. Komplementsystemet kan aktiveres på forskjellige måter - enten via den alternative veien og/eller ved lektinsporet, eller via klassiske antistoffmediert kaskadereaksjon (Boshra et al., 2006).

Det medfødte cellulære forsvaret består i stor grad av fagocytiske leukocytter og ikke-spesifikke cytotoksiske celler (Chaves-Pozo et al., 2017). Leukocytene til fisk består i stor grad av nøytrofiler, dendritiske celler og monocytter/makrofager (Jørgensen, 2014; Magnadottir, 2010). Disse har en gruppe reseptorer kalt «Pattern Recognition Receptors» (PRR), som gjenkjenner «Pathogen Associated Molecular Patterns» (PAMP). Dette kan for eksempel være lipopolysakkarider (LPS) og mikrobielle nukleinsyrer (Abbas et al., 2014). Viktige reseptorer i PRR-familien er Toll-lignende reseptorer (TLR), disse gjenkjenner en rekke PAMPs (Medzhitov & Janeway Jr, 2000)

Natural killer (NK) celler ligner lymfocytter, og gjenkjenner stressede eller infiserte celler og responderer med å drepe disse og sekreterer inflammatoriske cytokiner. I pattedyr har NK-celler en viktig rolle i beskyttelsen mot virus, både ved å drepe virusinfiserte celler og produsere IFN- γ som medierer antivirale responser. I kontrast til T-lymfocytter kan NK-celler drepe vertens celler uten at TCR (T-celle reseptor) gjenkjenner virus peptider presentert på MHC (major histocompatibility complex). Bevis på at fisk har NK celler kommer fra både *in vivo* og *in vitro* studier, for eksempel har det blitt vist at leukocytter i fisk kan drepe virusinfiserte celler uten immunisering (Jørgensen, 2014).

1.3.3 Det adaptive immunsystemet

Ofte har patogener utviklet kompliserte mekanismer for å bekjempe eller unngå vertens medfødte immunforsvar, og kan dermed invadere og etablere en infeksjon i verten. Når dette skjer iverksettes det adaptive immunforsvaret i samarbeid med celler fra det medfødte immunforsvaret (makrofager og dendritiske celler) (Mutoloki et al., 2014). Det adaptive immunsystemet deles inn i to seksjoner; et humoralt og et cellulært, der B- og T- lymfocytter og makrofager er sentrale i de forskjellige seksjonene (Magnadottir, 2010).

Lymfocyttenes hovedoppgave er antigengjenkjennelse av peptider presentert på MHC hos antigenpresenterende celler. T-celle reseptoren til lymfocytter er unik fra celle til celle, dette oppnås ved somatisk rekombinering av gensegmenter (VDJ gener). Denne prosessen foregår

trolig likt både i pattedyr og beinfisk, hvor RAG-1/2 (recombination-activating genes 1/2) gener er sentrale. Når det riktige antigenet presenteres forekommer det en modning av naive T og B-lymfocytter (Fillatreau et al., 2013).

1.3.4 Humoral adaptiv immunrespons

Det humorale immunforsvaret består av blant annet av B-lymfocytter og plasmaceller, disse produserer og sekreterer immunglobuliner (Ig) som sirkulerer i verten og kan nøytralisere ekstracellulære patogener og toksiner. I pattedyr kan en humoral-mediert immunrespons deles inn i en primær respons og sekundær respons. I primærresponsen befinner «inaktiverte» B-lymfocytter seg i et hvilestadium (naive B-celler), disse har membranbundne immunglobuliner som kan fungere som reseptorer (B-celle reseptor) mot spesifikke antigen. Ved aktivering av B-celle reseptorer, vil de naive B-cellene gå igjennom en modningsprosess og differensiere til plasmaceller som sekretærer immunglobuliner. Plasmacellene som viser høy affinitet ovenfor antigenet gjennomgår «affinitets modning» og differensierer til hukommelsesceller. Sekundærresponsen i pattedyr er mye kraftigere, antigenspesifikke hukommelses celler med høy affinitet som befinner seg i benmargen differensierer hurtig til plasmaceller ved aktivering, og immunglobulin produksjonen øker eksponentielt (Abbas et al., 2014).

Primærresponsen i beinfisk har blitt dokumentert (Mutoloki et al., 2014), men sekundærresponsen og utviklingen av hukommelseceller krever fortsatt flere studier. Da fisk mangler benmarg, har studier på regnbueørret foreslått at primærresponsen og modningen av naive-B-celler forekommer i hodenyren som distribueres til perifere vev (milt) via sirkulasjonssystemet. Ved møte og aktivering av antigen forekommer det en modning og differensiering til plasmaceller (Ye et al., 2011). Studier gjort både *in vivo* og *in vitro* på regnbueørret foreslår at aktiverte plasmaceller kan vandre til hodenyren, differensiere til hukommelseceller, hvorpå «affinitetsmodning» skjer. Eksakt mekanisme er fortsatt ukjent (Kaattari et al., 2002; Magor, 2015). Dette kan antyde at beinfisk også innehar tilsvarende immunologiske egenskaper som pattedyr, hvor en eventuell sekundærrespons trolig har utspring fra hodenyren (Bromage et al., 2004; Kaattari et al., 2005; Ye et al., 2010). Det har til nå blitt identifisert tre grupper immunglobuliner hos beinfisk, dette er IgM og IgD som også er funnet i de fleste pattedyr, og IgT/Z som er en særtype for beinfisk og ble første gang oppdaget i regnbueørret (IgT) og zebrafisk (IgZ) (Flajnik & Kasahara, 2010; Hansen et al., 2005). Av disse dominerer IgM i det systemiske kretsløpet som produseres av aktiverte plasmaceller, og

innehar en sentral oppgave i humoral immunitet hvor nøytralisering av fremmede patogener og toksiner er sentralt (Hordvik, 2015). IgD har blitt påvist i stor grad i mukusekretorerende vev hos salmonider, men dens funksjon er lite studert (Castro et al., 2014; Ramirez-Gomez et al., 2012).

1.3.5 Celle-mediert adaptiv immunrespons

T-lymfocytter organiserer celle-medierte immunresponser i det adaptive forsvaret, og deles inn i to hovedgrupper; hjelper T-celler ($CD4^+$ -T-celler) og cytotoksiske T-celler ($CD8^+$ -T-celler) - begge uttrykker T-celle reseptorer (TCR) som interagerer med MHC. Naive T-lymfocytter ($CD4^+$ og $CD8^+$) deler noen fellestrekk, disse er TCR, CD28, CD3 og CD45 som enten er membranbundne molekyler eller som er involvert i patogen gjenkjenning og signalisering. Til felles med B-celler har TCR ulike antigenseter som dannes ved genrearrangering, men forskjellen er at TCR komplekset kan kun interagere ved celle til celle kontakt via MHC som er membranbundet til vertsceller og APCs (Mutoloki et al., 2014).

For at naive hjelper T-celler skal kunne respondere må disse aktiveres og differensiere til T_H -effektorceller, hvor blant annet T-bet og GATA-3 er avgjørende transkripsjonsfaktorer i denne utviklingen. Naive $CD4^+$ -T-celler kan blant annet differensiere til T_H1 -, T_H2 - og T_H17 - celler som produserer forskjellige cytokiner og har ulike effektor mekanismer (Abbas et al., 2014; Aune et al., 2009). Om fisk innehar samme T-celle differensieringsmønster som i høyerestående dyr er ikke kjent, men det er sterke indikasjoner på at det er tilfelle (Dee et al., 2016; Nakanishi et al., 2015; Yamaguchi et al., 2015) Ved aktivering vil hjelper T-lymfocytter produsere cytokiner som er kritiske i cellulære og humorale immunresponser (Mutoloki et al., 2014). T_H1 -celler produserer høye nivåer med interferon- γ (IFN- γ), TNF- β , og IL-2 som promoterer en effektiv immunrespons mot intracellulære patogener, dvs. cellulær immunrespons. T_H2 -cellene er effektive mot ekstracellulære parasitter og medierer allergiske reaksjoner via sekresjon av IL-4, IL-5, IL6 og IL-13 (Abbas et al., 1996). IFN- γ er sentralt i «klassisk» aktivering (proinflammatorisk) av makrofager som igjen kan føre til økt cellulær respons – for eksempel økt opptak og degradering av patogener inni makrofagen. I tillegg induserer IFN- γ B-celle aktivering og differensiering. Cytokinene IL-4, IL-5 og IL-13 stimulerer og aktiverer B-celler til produksjon av immunoglobuliner, i tillegg vil IL-4 og IL-13 aktivere den «alternative» veien i makrofager som har en sentral rolle i vevsreparasjon og virker inflammasjondempende (anti-inflammatorisk) (Abbas et al., 2014).

Introduksjon

Cytotoksiske T-Lymfocytter (CTL) som også kalles CD8⁺ T-celler, er effektor celler (etter aktivering) og forårsaker den cytotoksiske responsen. Disse uttrykker reseptorene CD8 og TCR som interagerer med MHC-I molekyler på overflaten til infiserte vertsceller. Hvis CTL aktiveres av antigen (dvs. ved TCR-MHC I interaksjon), drepes virusinfiserte celler ved celle til celle kontakt. Denne mekanismen spiller en essensiell rolle mot intracellulære virusinfeksjoner (Nakanishi et al., 2002). CTL kan drepe målet via to mekanismer, som begge krever direkte kontakt mellom effektor celle og målcelle, det vil si; sekretorisk og ikke sekretorisk vei. Til felles induserer begge måtene apoptose av målcellen. Den ikke sekretoriske veien involverer reseptor interaksjoner mellom målcellens og effektorcellenes Fas ligand reseptor, som resulterer i en klassiske caspase-avhengige apoptose (Nagata & Golstein, 1995). I den sekretoriske veien, blir cytoplasmiske granulære toksiner, en kalsiumavhengig membranforstyrrende protein kjent som perforiner, og granzymmer sekretert av effektorcellen som sammen induserer apoptose av målcellen (Nakanishi et al., 2011).

I høytstående dyr vil en liten andel av antigen aktiverte T-lymfocytter differensieres til antigenspesifikke «langlevende» hukommelses celler, dette er da celler som «overlever» etter at infeksjonen er over. Hukommelses T-celler blir observert i perifere vev, spesielt i hud, mukus og sirkulasjonssystemet. For å overleve over lengre tid krever disse cellene vedlikehold i form av cytokinet IL-7. Funksjonen til hukommelses T-cellene er ikke å drepe eller produsere cytokiner, men heller fungere som et «arkiv» hvor hukommelses cellene hyppig kan differensiere til effektor T-celler ved gjenkjenning av antigenet som de opprinnelig ble eksponert for (Abbas et al., 2014). Studier av effektor T-celler og av typiske genuttrykk indikerer at beinfisk har tilsvarende celle-mediert immunrespons som pattedyr har blitt påvist, men det kreves fortsatt flere undersøkelser om teleoster innehar samme egenskaper og forekomsten av differensiering av effektor T-celler til hukommelseceller (Nakanishi et al., 2015; Secombes & Belmonte, 2016)

1.4 Transkripsjonsfaktorer og cellulære immunresponser

Transkripsjonsfaktorer er DNA-bindende proteiner som kan oppregulere eller nedregulere transkripsjon av gener. Dette kalles også for regulatoriske proteiner og virkningsmekanismen består av å binde spesifikke domener på genomet, og inducere transkripsjon av målsekvensene. Affiniteten til slike regulatoriske proteiner kan være opptil 10^6 ganger sterkere for målsekvensen sammenlignet med andre DNA-sekvenser, som indikerer at disse proteinene er høyst spesifikke (Nelson et al., 2008). I laks har det vist seg at det er flere gener som medvirker i T/B-celle differensiering, der GATA-3, T-bet og Eomesodermin (Eomes) har vist å være tilstedeværende transkripsjonsfaktorer hos kontrollfisk og i fisk under immunisering av (Munang'andu et al., 2013b).

1.4.1 GATA-3

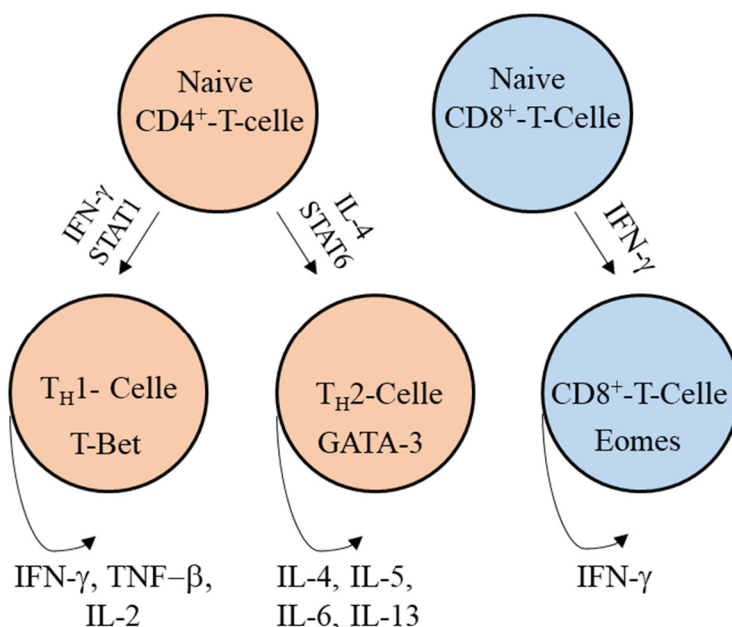
GATA-3 er medlem av GATA-familien som er et zinkfinger-proteiner og fungerer som transkripsjonsfaktor. I pattedyr har det til nå blitt oppdaget seks forskjellige GATA-proteiner (GATA-1 til GATA-6). GATA-familien kan deles inn i to undergrupper basert vevsdistribusjon, der GATA-1, GATA-2 og GATA-3 uttrykkes hovedsakelig i hematopoetiske celler, mens GATA-4, GATA-5 og GATA-6 er funnet i endodermalt vev, for eksempel hjerte og tarm (Burch, 2005; Ho & Pai, 2007). Immunologisk sett spiller GATA-3 en viktig funksjon i det adaptive immunsystemet som en nøkkelregulator innenfor differensieringen av naive $CD4^+$ -T-celler til T_H2 -celler. Mekanismen bak dette er produksjon og aktivitetene cytokinene som sekreteres ved interaksjon mellom APCs og T-cellen. Ved differensiering til T_H2 -celler initieres denne prosessen via IL-4/STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) veien som er en kaskadereaksjon startet av IL-4, videre oppreguleres produksjonen av GATA-3 i $CD4^+$ T-celler. Målsekvensen til transkripsjonsfaktoren GATA-3 fører til at nedstrømsgenene IL-4, IL-5, IL-6 og IL-13 uttrykkes og kan sekreteres (Ho & Pai, 2007).

1.4.2 T-bet og Eomes

T-box transkripsjonsfaktor familien er nøkkelregulatorer i en rekke genuttrykk som er nødvendig for celle differensiering ved organ og embryonisk utvikling (Naiche et al., 2005). T-box familien deles inn i 17 ulike gener som er organisert i fem underfamilier, der disse spiller en stor rolle innenfor hematopoesen spesielt i T-celler, der T-box transkripsjonsfaktoren T-bet fremmer differensiering av naive $CD4^+$ -T-celler til T_H1 -celler (Naiche et al., 2005; Szabo et al.,

2000). Mekanismen til differensieringen igangsettes av kaskadereaksjonen via IFN- γ /Stat1 veien, denne reaksjonen aktiveres av cytokinet IFN- γ som sekreteres fra blant annet T-celler og makrofager ved MHC interaksjon mellom CD4⁺ T-celle og APCs (Ho & Pai, 2007). Studier har vist at STAT1 veien oppregulerer produksjonen av T-bet, som igjen promoterer transkripsjon av IFN- γ som indikerer at dette genet er et nedstrømsgen (Szabo et al., 2002). I tillegg til å virke på T-celler, er også T-bet en viktig transkripsjonsfaktor som induserer utvikling og differensiering av B-celler (Harris et al., 2005).

Nylige studier har vist at Eomes i pattedyr har samme egenskaper som T-bet og fungerer som en nøkkelregulator innenfor celle-mediert immunitet (Pearce et al., 2003). Genet kodende for Eomes er relativt likt T-bet genet og blir uttrykt i aktiverte CD8⁺ T-celler og i aktiverte/hvilende NK-celler (Intlekofer et al., 2005). Eomes har derfor vist seg å inngå i differensiering og aktivering av CD8⁺ T-celler og samtidig inngå i cytolytiske funksjoner til cellen (Atreya et al., 2007; Pearce et al., 2003). Overekspresjon og antagonisme studier ved å benytte dominante negative faktorer har foreslått at Eomes og T-bet kan ha samarbeidende og overflødige funksjoner i reguleringen av gener som koder for IFN- γ og cytolytiske molekyler i CD8⁺ T-celler (Pearce et al., 2003). I tillegg har over ekspresjon av Eomes vist seg å inducere uttrykk av IFN- γ , perforin og granzym B, via STAT1 og/eller STAT4 veien som kan indikere at disse genene er direkte «nedstrømsgener» aktivert av Eomes (Glimcher et al., 2004).



Figur 2: Transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes og hvilken trinn i T-celle differensieringen disse er aktive i (forenklet), basert på teoriene presentert i delkapittelet «1.4 Transkripsjonsfaktorer og cellulære immun responser»

1.5 Vaksinasjon i norsk akvakultur

De fleste kommersielle vaksiner i dagens oppdrettsnæring er komponert av inaktiverede virus og bakterier i en oljeemulsjon, et nøkkelement er at dette fremkaller en immunrespons i det medfødte og adaptive immunforsvaret, og utvikler spesifikke antistoffer og hukommelse celler. Effektiviteten til vaksinene blir som regel målt i smittforsøk. I pattedyr er antistoff respons en god indikator på hvor effektive vaksinene er, men i fisk kan denne være varierende da beinfisk kan ha ulike responser avhengig av art (Biering et al., 2005; Magnadottir, 2010).

Mange bakterie vaksiner har vist seg svært effektive og har redusert antibiotika bruken i norsk oppdrettsnæring betraktelig (Hastefnl et al., 2005), disse er komponerte av inaktiverede bakterier og kan benyttes som injeksjonsvaksiner, immersjonsvaksiner eller badvaksiner. Generelt har vaksinene god beskyttelse med få bivirkninger (Magnadottir, 2010). Dagens vaksiner har ofte sub-optimal effekt mot infeksjoner forårsaket av virus og intracellulære bakterier (Gudding & Van Muiswinkel, 2013). Det er derfor utviklet effektive DNA-vaksiner som mot virus, (Tonheim et al., 2008a), en av disse er «Clynav» (Dalmo, 2018)

1.5.1 Kommersielle vaksiner mot PD

Kommersielle vaksiner mot pankreas sykdom i dagens oppdrettsnæring, består av inaktiverede virus (SAV-3) og adjuvans. Vaksinens innhold er oftest høyst hemmeligholdt, og det vil derfor være vanskelig å få innsikt i en slik oppskrift grunnet konkurranse mellom større aktører, noe som også gjør det vanskelig å finne referanser på slike forsøk. De mest populære monovalente vaksinene mot pankreas sykdom i norsk oppdrettsnæring er ALPHA JECT® micro-1 PD (PHARMAQ AS) og Norwax Compact PD (MSD Animal Health). Beskyttelsen disse vaksinene inducerer kan være varierende og resultatene fra smittforsøk er gjerne avhengig av hvilken aktør som tester vaksinen. Effekten er ulik og studier har påstått å senke dødeligheten med fra 50 % til 100 %, avhengig av vaksine og aktør. I et komparativt studie mellom nevnte vaksiner fra PHARMAQ og MSD viste PHARMAQ sine vaksiner en beskyttelse på 98,5% målt i kumulativt dødelighet sammenlignet mot MSD sin vaksine som viste 51% (Karlsen et al., 2012).

1.5.2 DNA-vaksine

Plasmid DNA (pDNA) kan bli benyttet som en vektor for gener som ønskes uttrykt - til pattedyr og beinfisk. Plasmid DNA er et sirkulært molekyl som består av en dobbeltrådig DNA - ikke ulikt kromosomalt DNA. Rekombinant plasmid kan isoleres fra bakterier, hvor det aktuelle genet kan bli transkribert i eukaryote celler etter for eksempel intramuskulær injeksjon. Plasmidene blir «skreddersydde» og inneholder som regel en promotor, og «enhancer» sekvens, genet av interesse, en poly-adenylation sekvens, termineringssekvens og ofte antibiotika resistens gen. Plasmid DNA gir muligheter innenfor to områder: Gen-terapi og DNA-vaksinasjon (Tonheim et al., 2008a). Genet av interesse trenger ikke å indusere immunresponser i seg selv, selv om det ofte er tilfelle. Etter injeksjon av kodende plasmid DNA i fisk vil hovedsakelig muskelceller bli transfekterte og uttrykke genet av interesse – i form av protein. Proteinet kan bli uttrykt på cellemembranen hos muskelceller, noe som kan føre til en cytotoxisk immunrespons (drap av egne celler) og frigivelse av antigenet. Det transgene proteinet kan også bli sekretert fra muskelceller. Transgene proteiner kan bli tatt opp av APC som prosesserer proteinet før det blir presentert på hovedsakelig MHC II (Restifo et al., 2000; Tonheim et al., 2008a).

Spesialiserte APC som makrofager og dendrittiske celler har blitt påvist å inneholde pDNA etter administrering (Casares et al., 1997; Chattergoon et al., 1998). Hvorvidt endocyttert pDNA induserer transkripsjon av genet av interesse er uklart eller mindre sannsynlig. I så fall må plasmidet bli fraktet fra endocytiske vesikler til cytosol. DNA vaksinerer vil indusere både cellulær og humoral immunrespons. Den humoral responsen (antistoffrespons) følges av at antigen presenterende celler tar opp løselige antigener som er sekretert fra andre transgen produserende celler, prosessere dette og presentere dette i MHC klasse II molekyler på celleoverflaten (Banchereau & Steinman, 1998). DNA vaksinerer kan som nevnt også indusere cellulær immun respons da plasmid DNA ofte innehar CpG motif – som binder seg til for eksempel TLR9 (Ishii & Akira, 2006). Dette vil i seg selv indusere antiviral respons. I tillegg vil transgen bli uttrykt i eller på transfekterte celler, som innehar MHC I, etter DNA vaksinasjon. Transgent peptid vil kunne bli presentert via MHC I og føre til en cytotoxisk immun respons. Hukommelses celler, primet mot slike peptider via DNA vaksinasjon, vil kunne agere hurtig i en påfølgende infeksjon dersom virusinfeksjonen også resulterer i presentasjon av like peptider på MHC I. På basis av dette kan DNA vaksiner medføre aktivering av både humoralt og cellulært immunforsvar (Liu, 2003).

1.6 Hensikt og problemstilling

DNA- vaksiner har vist seg svært effektive mot enkelte virussykdommer. Beskyttelsen induisert er mest sannsynlig mediert av antistoffer og cytotoxisk antiviral respons. Inaktiverede helcellevaksiner har vist god beskyttelse mot ekstracellulære patogener, men beskyttelsen mot intracellulære patogener har vist seg mangelfull, dette kan indikere at disse vaksinene inducerer en for svak cellulær og/eller humoral immunrespons. Det er derfor fordelaktig å prøve og utvikle mer effektive virusvaksiner. Transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes (molekylære adjuvanser) har vist seg sentrale i differensieringen av CD4⁺/CD8⁺ T-celler til effektorceller hos pattedyr, disse genene er også beskrevet hos fisk. Teoretisk vil man ved injeksjon av plasmid kodende for transkripsjonsfaktor i kombinasjon med antigen kunne inducere en sterkere og målstyrt immunrespons – alt etter hvilken transkripsjonsfaktor som velges.

Hensikten med dette studiet var å undersøke effektene av immunisering med ulike plasmid vektorer kodende for T-bet, GATA-3 og Eomes og smitte med SAV-3 med hensyn til:

- 1) Fiskens tilvekst
- 2) Antistoff produksjon
- 3) Histopatologiske forandringer i pankreas og hjerte etter smitte

2 Material og Metoder

2.1 Forsøksoppsett

Studiet omfatter 12 ulike behandlinger og antigenleveringer mot pankreas sykdom presentert i Tabell 1. Forsøket er et gjennomgående studie fordelt på immunisering og påløpende prøveuttak 42 dager post immunisering (42 dpi) og 70 dager post immunisering (70 dpi), og et smitteforsøk med prøveuttak ved 7, 28, 42 og 70 dager post smitte (dps) (Fig. 3).

Tabell 1: Oversikt over vaksinerte grupper. Hver gruppe inneholdt 80 fisk. IHV: Inaktivert helcelle vaksine. IgY: Høns IgY, HD: høy dose, LD: lav dose. Fisk i gruppene 6-8 og 11 ble injisert med plasmid vektorer kodende for hhv. T-bet, GATA-3, Eomes og IFN C.

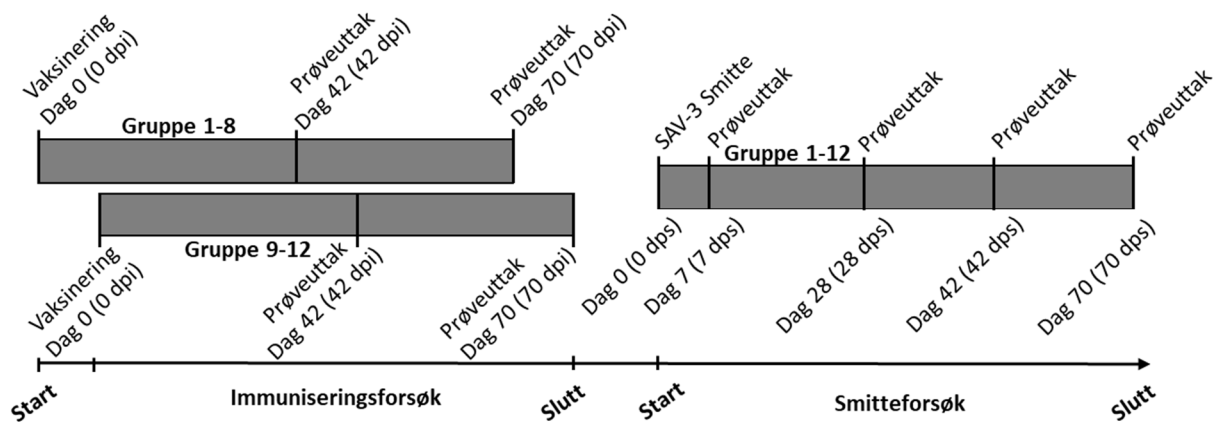
Gruppe nr.	Vaksinegrupper	Antall fisk:
1	Kontroll – Uvaksinert	90
2	IHV – LD	80
3	IHV – HD	80
4	Pharmaq (IHV)	80
5	MSD (IHV)	80
6	IHV-LD + T-bet	80
7	IHV-LD + GATA-3	80
8	IHV-LD + Eomes	80
9	IgY	80
10	DNA-Vaksine	80
11	Interferon C	80
12	Ikke kodende plasmid-kontroll	80
Totalt:		970

2.1.1 Fisk

All fisk, atlantisk laks (*Salmo salar*) brukt i forsøket var individuelt merket med PitTag. Den ble produsert ved Havbruksstasjonen i Kårvika - HiT (Tromsø) fra samme batch rogn (Aquagen AS -Kyrksæterøra) klekket i 2016. Studiet involverte 970 fisk i et gjennomgående forsøk fordelt på immunisering og smitteforsøk. Parr (gjennomsnittsvekt 45 g) ble holdt på ferskvann ved naturlig temperatur (ca. 4°C) og «12/12» lys frem til en uke før forsøkstart (13. oktober 2017). Fisken ble tilvent høyere temperatur (0.5 °C per døgn) (6.2 → 10°C) i løpet av én uke før vaksinasjon (dvs. forsøksstart). Fisken ble satt til smoltifisering 30. oktober som da innbefattet

Material og Metoder

lysstyring («24/0» lys) og innblanding av sjøvann, og fisken ble sjøsatt uke 50. Personell ved HiT utførte sjøvannstest på noen fisk for å undersøke smoltifiseringsstatus og sjøvannstoleranse. Gruppeinndelingen er gjengitt i tabell 1. Fisk i gruppe 9-12 ble vaksinert 2. november 2017 da det tok ekstra tid for å lage til disse vaksinene. Ved påfølgende uttak av fisk for prøvetaking ble dette (forsinket vaksinerings for gruppe 9-12) tatt hensyn til – da dette krevde ekstra prøveuttak for å «utjevne» immuniseringsperioden mot fisk i de øvrige gruppene. Fisken ble overflyttet til Fiskehelselaboratoriet ved HiT (26. januar 2018), gruppene ble fordelt jevnt på fire kar og akklimatisert i tre dager. All fisk ble smittet med SAV3 1×10^8 TCID₅₀ (via intraperitoneal injeksjon) den 29. januar. Fóringsregimet (vedlikeholdsfóring) var likt under hele eksperimentet (Skretting Olympic 2mm Immuniseringsforsøk/3mm- Smitteforsøk). Fisk i smitteforsøket gikk på 10°C sjøvann og «24/0» lysstyring. Forsøket ble gjennomført i henhold til dyrevelferdsloven og forskrift om forsøk med dyr (Forskrift 2017-04-05 nr.451). Forsøket var godkjent av Mattilsynet med prosjektnummer ID11949. Helsetilstanden til forsøksfisken ble i november 2017 fiskehelsetjenesten (v/Christian Koren) vurdert som meget god.



Figur 3: Tidslinje som illustrerer prøveuttak ved immuniseringsforsøk og smitteforsøk. Immuniseringsforsøket ble startet 13.10.2017 (gruppe 1-8) og 02.11.2017 (gruppe 9-12). Immuniseringsforsøket ble avsluttet 22.12.2017 (gruppe 1-8) og 11.01.2018. (9-12). Smitteforsøket med samtlige grupper ble startet 29.01.2018 og avsluttet 12.04.2018.

2.1.2 Vevs – og organuttak samt blodprøver

Ved samtlige prøveuttak for *in vitro* studier av antistoffer og histologi ble 10 fisk fra hver gruppe avlivet med overdose med benzokain. Fiskens pitTag ble avlest, samtidig ble vekt og lengde notert. Vevs- og organprøver (ca. 100 mg) ble tatt ut med skalpell, saks og pinsett, og fiksert på RNA-later (1ml), samt litt større vevs- og organprøver på 4% formalin (12 ml) som ble erstattet med 70% etanol etter 24 timers fiksering i romtemperatur. Blodprøver ble tatt fra *Vena caudalis* med sprøyte og kanyle, disse ble oppbevart på is før prøvene ble sentrifugert ved 3000 rpm (1000 g i 10min) før serum ble pipettert og fryst (-20°C). Det ble tatt prøver fra ti fisk per gruppe per tidspunkt.

Blodprøver:	Prøver ved samtlige uttak (undersøke antistoffrespons og virus nøytralisering).
Prøver-RNA-Later:	(i) Mål organ: Hjerte, muskel og pankreas (ii) Lymfoide organer: Hode nyre og milt (iii) Andre organer: Lever, tarm og gjeller. (iv) Organer og vev til virus kvantifisering og gen uttrykk (analyseres senere)
Prøver til histopatologisk undersøkelse:	(i) 4% Formalin (pankreas, hjerte og muskel)
Biometriske data:	Måle vekt og lengde ved samtlige prøveuttak (viktig ved SAV3 infeksjon).

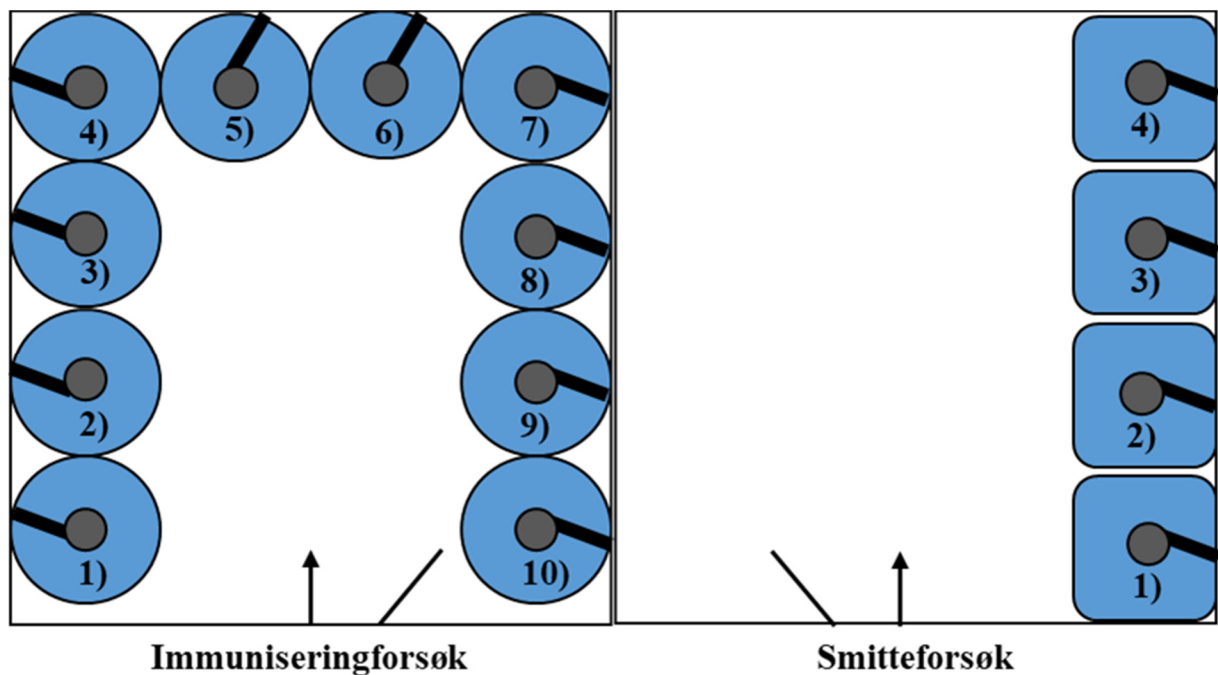
2.1.3 Tankoppsett

Forsøket ble delt inn i to deler, immunisering og smitteforsøk. I immuniseringsforsøket ble fisken fordelt på 10 kar etter vaksinerings, med 8 fisk fra hver gruppe i hvert kar, til sammen 96 fisk per kar. Karoppsettet blir oppgitt i Figur 4. Karene benyttet i immuniseringsforsøket var sirkulære med et volum på 500 liter. Automatiske fôringsdispensere var plassert over karene, disse var sirkulær slik at fôret ble fordelt jevnt i karet.

Før smitteforsøket ble fisken flyttet til fiskehelselaboratoriet den 26.01.2018, hvor fisken ble fordelt på 4 kar med 180 fisk per kar, med like mange fisk fra hver gruppe i hvert kar. Karene var firkantete med avrundede hjørner, og rommet 900 liter vann. Fôringsdispenser var av typen sirkulær og fordelte fôret jevnt i karene.

Oksygenmetning under handteringen av fisk med tilhørende injeksjon av SAV3 var 80% og vannstrømmen tilsvarte 40 l/min. Ellers var oksygenmetningen rundt 100%.

Ved prøveuttak, ble det tatt like mange fisk fra hvert kar.



Figur 4: Tankoppsett for immuniseringsforsøk og smitteforsøk. Inngangsdør er markert med pil. Fôringsdispensere, vanninntak/uttak, størrelse og lysforhold var like i alle kar.

2.2 Cellelinjer

Til *in vitro* forsøk ble det benyttet «Chinook Salmon Heart Cells) (CHH-1) (ECACC 92110412) og «Chinook Salmon Embryo Cells» (CHSE-214) (ECACC 91041114). Alt arbeid med cellene ble utført i sterilkabinett (laminar air flow).

2.2.1 Chinook Salmon Embryo Cells (CHSE-214 celler)

CHSE-214 celler ble dyrket i L-15 medium (Gibco) som inneholdt 8% kalveserum (FCS), 1 % ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og penicillin. Cellene ble dyrket i 645 ml Nuncflasker (Thermo scientific) med 25 ml vekstmedium.

2.2.2 Chinook Salmon Heart Cells (CHH-1 celler)

CHH-1 celler ble dyrket i L-15 medium (Gibco) som inneholdt 8% kalveserum (FCS), 1 % ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og penicillin. Cellene ble dyrket i 645 ml Nuncflasker (Thermo scientific) med 25 ml vekstmedium.

2.2.3 Vedlikehold av cellekultur

Vekstmediet ble fjernet fra Nuncflasken, og cellene (CHSE-214 og CHH-1) ble vasket to ganger med 10 ml PBS. 1,5 ml 5x trypsin (Sigma) buffer ble tilsatt slik at cellene løsnet fra flaskebunnen. Cellene ble resuspendert i 10 ml vekstmedium uten penicillin og deretter pipettert ut av flaskene. For å opprettholde cellekulturen ble 25 ml vekstmedium med penicillin tilsatt og 2 ml av cellekulturen ble overført til flaskene og satt til vekst ved 20 °C i 48 timer.

2.3 Produksjon av virus

Organer fra fisk påvist med SAV3 virus ble tilsendt fra felt. Hodenyrren og hjerte ble valgt ut, da disse organene har i tidligere studier blitt påvist med høy konsentrasjon av virus (Jansen et al., 2017). Organene ble homogenisert og supernatanten ble tilsatt CHH-1 celler (Nuncflaske; 5ml). CHH-1 cellene og virus ble inkubert i en uke for virusreplikasjon, hvorpå cellene lyserte. Hvor lysering skjedde ble supernatanten (LB-15-mediet) overført videre til 40 ml nuncflasker med CHH-1 celler, og inkubert videre i en uke. Dette ble repetert inntil ønsket virusmengde var oppnådd. For å undersøke at det faktisk var salmonid alphavirus subtype SAV-3 ble det utført RT qPCR som bekreftet viruset. Deretter ble viruskonsentrasjonen målt ved å dyrke CHH-1 celler i nittiseks-brønners mikro-titer plater (Nunc MaxiSorp Thermo Fisher Scientific Inc., USA), viruset ble tilsatt i fortyningsserie slik at TCID₅₀ kunne beregnes (LaBarre & Lowy, 2001), cellene inkubert i en uke. TCID₅₀ ble beregnet ved å telle antall brønner med lyserte celler.

2.4 Produksjon av vaksiner

Før immuniseringen ble vaksinene: lav- og høy dose inaktivert virus, DNA-vaksine, og vektorer transkripsjonsfaktorene GATA-3, T-bet og Eomes laget til.

2.4.1 Tillaging av inaktiverede virus vaksiner

SAV-3 virus dyrket i CHH-1 celler ble inaktiverede ved å fikser viruspartiklene i 0,5 % formalin i 48 timer etterfulgt av dialyse i 48 timer med magnetisk omrøring. Vaksinen med IHV-LD ble tillaget med 1×10^9 TCID₅₀ og vaksinen med høy virusdose (IHV-HD) ble tillaget med konsentrasjonen 1×10^{10} TCID₅₀. Inaktivert virus ble formulert i 7,4 (adjuvans) /2,6 (vandig fase) i olje adjuvans brukt var [Montanide ISA763 A VG (Seppic)].

2.4.2 Produksjon av plasmider kodende for transkripsjonsfaktorer

I dette forsøket ble alle PCR utført med 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem). Mikser, sykluser og temperaturer er oppgitt i appendiks. Ved sentrifugering ble det benyttet Eppendorf Centrifuge 5417R, Multifuge 15R (Heraeus) og Avanti J-26XP (Beckman Coulter).

2.4.3 Kloning av gener

Det ble gjennomført PCR med primere (Tabell 2) for GATA-3, Eomes og T-bet på cDNA preparert fra RNA fra hodenyre. PCR-produkt (10 µl) ble pipettert fra PCR tubene til gel brønner mikset med 2 µl «loading dye». Som kontroll ble 2µl «GelPilot wide range ladder (100 bp)» anvendt. Produktene ble ekstrahert fra gelen etter gel elektroforesen ved å benytte seg av en UV-lampe slik at plasmidstripene i gelen ble synlig og kunne kuttes ut. Gelstripene ble så rensset ved å benytte «QIAquick Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Inc.), vedlagt protokoll fra produsent ble fulgt. Konsentrasjonen av genene fra gel rensingen ble avgjort med Nanodrop® (ND-1000 Spektrofotometer).

Tabell 2: Primere og primeresekvenser benyttet i plasmidproduksjon.

Gen-primer	Sekvens	Genbank
GATA-3 forward GATA-3 reverse	TCAGATCTCGAGATGGAAGTATCCGCCGACCAACCCC CCGGGCCCCGCGGGCCCATGGCAGAGACCATACTG	EU418015.1
T-bet forward T-bet reverse	TCAGATCTCGAGATGGGCGGCATAGGTGGCAATCTTT CCGGGCCCCGCGGGTGGGAATAAAAGCCGTAGTAG	GU979861.1
Eomes forward Eomes reverse	TCAGATCTCGAGATGCAGCTGGAGAATATTCTTCC CGTCGACTGCAGGGGGCTTGCCTAAAAGGCATAG	EU418014.1
pTAG-RFP-N forward pTAG-RFP-N reverse	ACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAT CCGCCCTCGACCACCTTGATTCTCATG	Cat.# FP142

PCRmix med genene Eomes, T-bet, GATA-3, og pTagRFP inneholdene bufferløsning og restriksjonsenzymene XhoI og PstI (Promega Inc.), ble tillaget i hvert sitt rør og inkubert i «PCR-cyklern» (se appendiks). PCR-produktet ble deretter separert med gel elektroforese og rensset. Genene ble klonet inn/ligert i pTagRFP (pTagRFP-N vektor; Evrogen) med ligeringsenzymet (T4 ligase enzym) (New England Biolabs), inkubasjonstid 30 min.

Plasmidene ble overført til kompetente «ONESHOT TOPO 10 Chemically Competent *E. coli*» celler (Invitrogen), i henhold til vedlagt protokoll. To mikroliter fra ligeringsreaksjonen ble tilsatt til 50 µl bakterier. Cellene ble inkubert på is i 30 min før de ble overført til et vannbad på 42°C i 30 sek og deretter plassert tilbake på is. SOC medium (= super optimal broth + glukose) (250 µl) ble pipettert til røret før cellene ble inkubert 1 t ved 37°C. LB agar plater ble

Material og Metoder

laget til inneholdende kanamycin (50 µg/ml) og 200 µl fra bakterie mediet ble platet ut. LB agar platene ble inkuberte over natten ved 37°C.

Det ble plukket ut seks enkeltkolonier fra LB agar platene, på disse bakteriekoloniene ble det utført PCR for å detektere at riktig plasmid var klonet inn - ved å sammenligne teoretisk molekylvekt mot «ladder». Etter å ha undersøkt resultatene fra gel elektroforesen ble det valgt ut to kolonier fra LB agarplaten som ble satt til risting med 10 ml LB-medium med 10 µl kanamycin (50 mg/µl) i 2 reagensrør. Et reagensrør til kloning og et reagensrør for lagring.

Plasmid DNA ble rensset fra bakteriene med «QiA prep spin Mini Kit» (QIAGEN, INC), hvor vedlagt protokoll ble fulgt. Konsentrasjonen av plasmider ble målt i Nanodrop og sendt til sekvensering. Bakteriene som skulle lagres ble oppkonsentrert ved å benytte en sentrifuge slik at en pellet ble dannet. Pelleten ble resuspendert i glyserol og fryst ned ved -80°C.

2.4.4 Tillaging av plasmider til vaksinstudiet

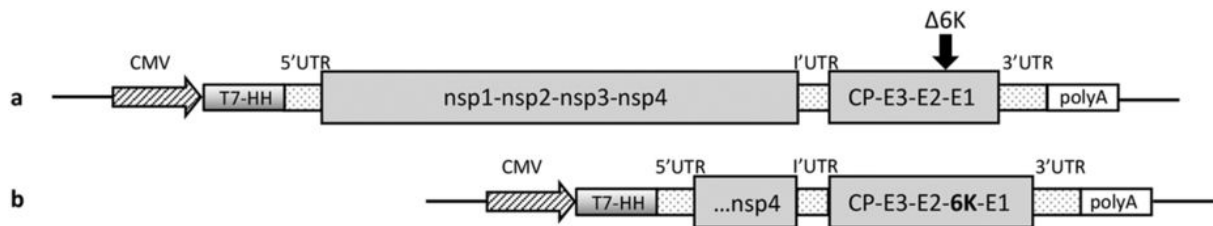
Bakteriesuspensjonen (200 µl) ble hentet fra fryser og tilsatt 5 ml LB og 5 µl kanamycin (50 µg/ml). Rørene ble satt til risting (250 rpm) i 24 timer ved 37°C. Bakteriesuspensjonen med vekstmedium (Tabell 3) ble satt til risting (150 rpm) i 24 timer ved 37°C. For å rense plasmid til smitteforsøket ble det benyttet Qiagen Plasmid MEGA-kit. Konsentrasjon av plasmid i eluatene ble undersøkt ved hjelp av Nanodrop og konsentrasjonen ble justert til 0.1 mg ml⁻¹.

Tabell 3: Komponenter i vekstmedium (kanamycin konsentrasjon 50µg/ml)

Komponenter	MEGA
Kanamycin	2 ml
Startmedium	5 ml
LB medium	1,5 l

2.4.5 DNA-Vaksine

DNA-vaksinen var allerede testet og brukt i et tidligere studie (Pettersen et al., 2016), hvor opptak og uttrykkelse av plasmidet *in vitro* og *in vivo* var dokumentert. Plasmid DNA-et kodet for sekvensene presentert i figur 5. Ryggradsplasmidet benyttet var pTurboFP635-N (Evrogen) - dette plasmidet inneholdt øvrige DNA sekvenser som ble benyttet ved tillaging av transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes. Eneste forskjell var markøren «TurboFP635-N».



Figur 5: SAV-3 sekvenser i plasmidet. Hele 6K genet var hentet fra SAV-3 og representerte et fullt genom fra viruset. b) Hjelper cDNA plasmidet: 100 nsp4 C-terminal sammen med 26S subgenom inneholdende 6K genet ble inkludert i hjelper plasmidet (Pettersen et al., 2016).

2.4.6 Anti-SAV3 IgY

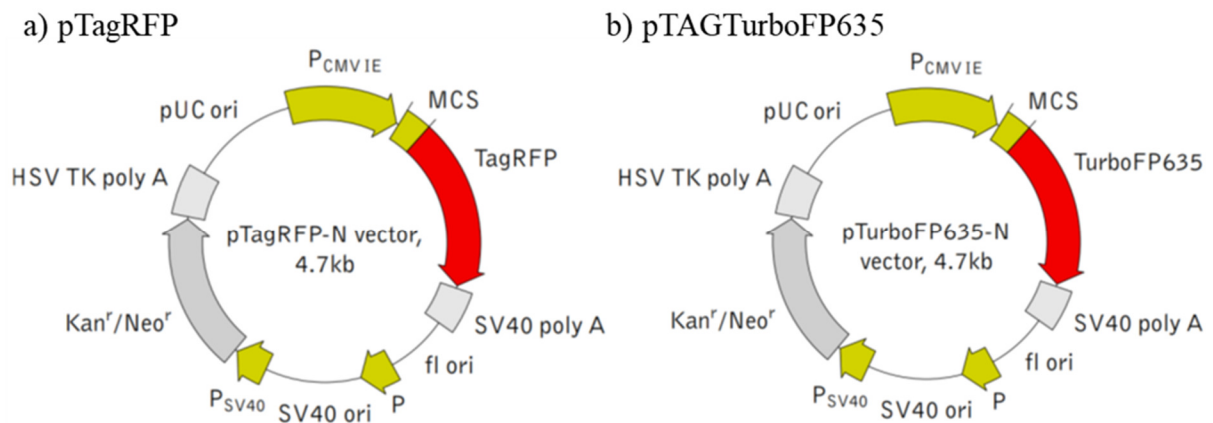
Immunglobulinet ble produsert ved å immunisere høns med SAV-3 virus. Immunglobulin Y overføres fra mor til eggehviten og skal gi fostret beskyttelse. I dette tilfellet ble immunglobulinet isolert fra eggehviten til høns og løst i oljeadjuvans [Montanide ISA763 A VG (Seppic)].

2.4.7 Kommersielle vaksiner

Kommersielle vaksiner med inaktivert virus ble kjøpt fra «MSD Animal Health AS» som var Norwax Compact - PD og «Pharmaq AS» ALPHA JECT-Micro PD1, vaksinerne ble administrert etter produsentenes veiledninger. Plasmid kodende for interferon C ble bestilt fra Vietnam, og er lik plasmid DNA benyttet før i annet studie (Chang et al., 2016).

2.4.8 Tomt Plasmid (pTagRFP og pTagTurboFP635)

Tillagede plasmidvaksiner benyttet «ryggradplasmidene» pTagRFP (T-bet, GATA-3 og Eomes) og pTagTurboFP635 (DNA-Vaksine). Da studier har vist at Toll-lignende reseptor 9 (TLR9) kan binde CpG motiver som fins i prokaryot DNA og indusere immunrespons (Rutz et al., 2004), var det viktig at ryggradsplasmidet var likt for de ulike vaksinene. Fisk behandlet med «tomt plasmid» fikk også injisert 1 µg plasmid per g⁻¹ fisk, (Fig. 6) pTagRFP (pTagRFP-N vector, «Evrogen»). Dette plasmidet ble også valgt med hensyn til DNA-vaksinen som benyttet ryggradsplasmidet (pTagTurboFP635, «Evrogen») som inneholdt de samme sekvensene bortsett fra markør. Det ble også benyttet de samme restriksjon og ligerings-enzymmer slik at alle «gener av interesse» befant seg på samme sted i plasmidene.



Figur 6: Plasmidsekvenser for pTagRFP og pTagTurboFP635.

2.5 Dyrking og transfeksjon av cellekultur

For å undersøke at plasmidene kodende for GATA-3, T-bet og Eomes ble uttrykt i celler ble det foretatt transfeksjon av plasmidene i CHSE-214 celler.

2.5.1 Transfeksjon av cellelinjen

Vekstmediet ble fjernet fra Nuncflasken, og cellene ble vasket to ganger med PBS. For at cellene skulle løsne fra bunnen ble 1,5 ml 5x trypsin tilsatt Nuncflasken og cellene ble inkubert i trypsin i 2 min ved romtemperatur. Cellene ble deretter resuspendert i 10 ml vekstmedium og pipettert ut av Nuncflasken. For videre bruk/vekst ble 2 ml av cellekulturen pipettert tilbake i Nuncflasken og resuspendert i 25 ml vekstmedium. Antall celler ble telt ved å bruke «NucleoCounter YC-100». Deretter ble $0,25-1 \times 10^6$ celler tilsatt per brønn i et 6-brønns brett. Ved å følge protokollen til «Lipofectamine 2000 Reagent» ble optimal plasmidkonsentrasjon per funnet. Plasmidene kodende for GATA-3, T-bet, Eomes og pTag RFP (kontroll) ble inkluderte i dette studiet, 2 brønner per plasmid. Cellene ble inkubert i 3 dager ved 15°C.

2.5.2 Cellefiksering og DAPI farging

Vekstmediet i brønnen ble pipettert ut og cellene ble vasket med 200 µl PBS. Cellene ble fikserte ved å tilsette 200 µl formaldehyd (16%) (Thermo Scientific) i 30 min. Cellene ble vasket 3 ganger med PBS. Ifølge produsentens (DAPI Protocol for Fluorescence Imaging «ThermoFisher») protokoll ble det tilsatt 50 µl DAPI (1 mg ml^{-1}) (ThermoFisher) i hver brønn, og cellene ble så inkubert med DAPI i 3 minutter. Deretter ble hver brønn vasket 2 ganger med PBS. Cellene ble mikroskoperte og fotograferte i mikroskop (Axiovert 40 CFL (Zeiss)) ved bruk av filtrene DAPI-365nm og Texas Red 530-585nm filtre.

2.6 *In Vivo* -Immunisering og smitteforsøk

2.7 Immunisering (Vaksinering)

Fisken var sultet i et døgn før vaksinasjon. Under immunisering ble fisk fordelt på 12 vaksinegrupper med 80 fisk, og vaksinert etter Tabell 4. Fisken ble bedøvd med Benzokain (0,02 % /L), vekt, lengde og pitTag ble registrert. Vaksinene med oljeadjuvans ble injisert intraperitonalt, mens pDNA ble injisert intramuskulært med enten vaksinepistol eller engangsprøyter (1ml) med kanylestørrelse (0,30 x 3,5 mm). For plasmidvaksiner og plasmid-adjuvanser var dosen 1µg plasmid DNA per gram fisk.

Tabell 4: Oversikt over vaksiner og dose administrert i gruppene.

Gruppe	Vaksine	Type	Dose
1	Kontroll- Uvaksinert	-----	-----
2	Inaktivert Virus – Lav dose	Oljeadjuvans	10 ⁹ TCID ₅₀
3	Inaktivert Virus – Høy dose	Oljeadjuvans	10 ¹⁰ TCID ₅₀
4	Pharmaq – ALPHA JECT-Micro PD1	Oljeadjuvans	100 µl
5	MSD – Norwax Compact - PD	Oljeadjuvans	100 µl
6	Inaktivert Virus – Lav dose + T-bet	Oljeadjuvans + pDNA	10 ⁹ TCID ₅₀ + 1 µg g ⁻¹ fisk
7	Inaktivert Virus – Lav dose + GATA-3	Oljeadjuvans + pDNA	10 ⁹ TCID ₅₀ + 1 µg g ⁻¹ fisk
8	Inaktivert Virus – Lav dose + Eomes	Oljeadjuvans + pDNA	10 ⁹ TCID ₅₀ + 1 µg g ⁻¹ fisk
9	ImunoglobulinY (SAV-3)	Oljeadjuvans + pDNA	100 µl + 100 µl
10	DNA-Vaksine (NBMU)	pDNA	1 µg g ⁻¹ fisk
11	Interferon C	pDNA	1 µg g ⁻¹ fisk
12	P-TagRFP (Tomt plasmid)	pDNA	1 µg g ⁻¹ fisk

2.8 Smitte med SAV3

Salmonid alphavirus av subtypen SAV-3 ble oppdyrket i CHH-1 celler. Viruset ble fortynt i PBS til en titer på 1.0×10^9 TCID₅₀. Tolv uker etter immunisering ble til sammen 720 fisk bedøvet med 0,02% L⁻¹ - benzokain, og fisk fra alle grupper ble injisert intraperitonalt med 100µl 1.0×10^9 TCID₅₀ SAV-3, det vil si at hver fisk ble smittet med en virustiter på 1.0×10^8 TCID₅₀. I smitteforsøk i tidligere forsøk har virusdosen vært blant annet 200µl 1.0×10^3 TCID₅₀ (Graham et al., 2011), i dette studiet forårsaket SAV-3 histopatologiske endringer i hjerte i 20-80% av fisken 3-8 uker etter smitte. I et annet studie hvor det ble undersøkt muligheter for smitte med SAV-3 mellom infisert laks og ikke infisert laks, ble det brukt en titer på 1.0×10^5 TCID₅₀, dette gav infeksjon samt histopatologiske endringer (Braceland et al., 2013). Det var derfor også forventet at en titer på 1.0×10^8 TCID₅₀ ville gi infeksjon i samtlige fisk.

2.9 Analyser

Gruppene IHV-LD (2), IHV-HD (3), T-bet (6), GATA-3 (7), Eomes (8), DNA-Vaksine (10) og tomt plasmid (12) ble valgt ut til videre undersøkelser da fokus var molekylære adjuvanter og effekter av disse. Disse gruppene ble også ansett som de mest relevante til å reflektere oppgavens problemstilling. Vekt og lengde til fisk i samtlige grupper er oppgitt i Appendiks 2.

2.9.1 Vekstutvikling

Fisk smittet med pankreas sykdom har ofte vist redusert tilvekst, dette kommer av at syk, stresset eller skadet fisk spiser mindre sammenlignet med friske individer, i tillegg angriper viruset eksokrin pankreas noe som fører til redusert tilvekst (Huntingford et al., 2006; Jansen et al., 2017). I dette forsøket var samtlige fisk markert med PitTag. Ved blant annet immuniseringstidspunktet og tidspunktet for smitte ble all fisk registrert med vekt og lengde. SGR («*specific growth rate*» - spesifikk vekstrate) ble beregnet for å undersøke eventuelle forskjeller i tilvekst mellom gruppene, og der endringer i vekt og lengde kunne individspores og beregnes. Spesifikk vekstrate er et uttrykk for prosentvis daglig vekst mellom to måletidpunkter, og kan beregnes ut fra følgende formel:

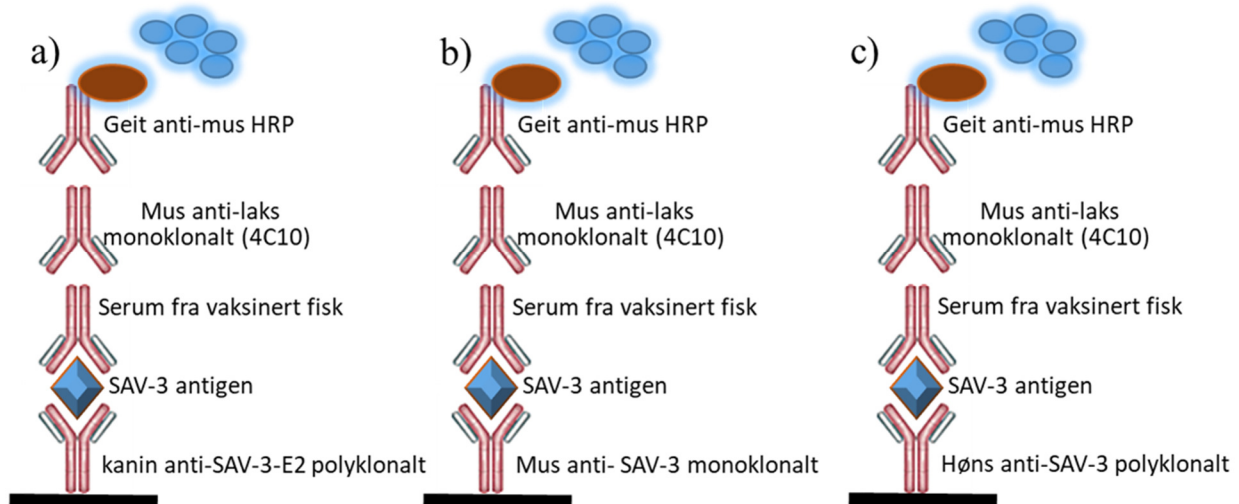
$$\text{SGR} = 100 \times (\ln W2 - \ln W1)/T$$

Ln W1 og Ln W2 står for logaritmen til fiskens gjennomsnittsvekst ved henholdsvis første og andre måletidspunkt. T er tiden (antall dager) mellom disse. (*Temperaturen var konstant gjennom hele forsøket*)

2.9.2 Utvikling av ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ble utført for å måle spesifikk antistoffrespons i fisken. Denne metoden er en kvantitativ analysemetode som utnytter affinitet mellom et gitt antigen og dets spesifikke antistoff. Ved å tilsette et sekundærantistoff koblet med enzymer, vil dette medfølge en fargeendring ved tilsetning av substrat (Fig. 7). Fargeendringen kan måles som optisk tetthet i et spektrofotometer, som samsvarer med mengden primærantistoffer tilstede. ELISA mht. antistoff respons mot SAV-3 har i liten grad blitt utført i tidligere forsøk, derfor ble det testet tre ulike immunglobuliner for å binde antigen (SAV-3). Dette var mus anti-SAV-3 monoklonalt antistoff, kanin anti-SAV-3-E2 polyklonalt antistoff som binder seg til E2 proteinet i viruset, og høns anti-SAV-3 polyklonalt antistoff som er det samme antistoffet brukt i vaksinen IgY (gruppe 9).

For utviklingen av ELISA for SAV-3 ble det undersøkt tre forskjellige oppsett for binding av antigen og immunglobuliner.



Figur 7: Ulike antistoff oppsett, der formålet var å undersøke hvilken primærantistoff som hadde affinitet ovenfor antigenet (SAV-3)

Da ingen av primærantistoffene var benyttet under tidligere analyser, ble det foretatt en krysstitering av primærantistoff og sekundærantistoff for finne optimal konsentrasjon til ELISA. Seks nittiseks-brønner mikro-titer plater (Nunc MaxiSorp Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ble forberedt. Coatingbuffer og primærantistoff ble mikset og titrert i fortynningsrekke (fra brønn 1-12) slik at oppsettet på ELISA platen var som vist i tabell 5. Dette var for å undersøke hvilken konsentrasjon av primærantistoff som var optimal. Platene ble inkubert overnatt ved 4°C. Påfølgende dag ble det tilsatt 2,5% blokkeringsbuffer som hvorpå

Material og Metoder

brettet ble inkubert i ytterligere 2 timer ved romtemperatur. SAV-3 virus dyrket i CHH-1- celler med en titer på 1×10^3 TCID₅₀ ble satt til i hver brønn (samme virusstamme som ble brukt i smitteforsøket). Virussuspensjonen ble fortynnet 1:2 i 1% blokkingsbuffer (totalt 100 µl per brønn) og brettet ble i 2 timer ved romtemperatur. Serum fra fisk i gruppen IHV-HD (70 dager post immunisering) ble benyttet da det var forventet at denne gruppen viste god antistoff respons. Serumprøvene ble fortynnet i 1% blokkeringsbuffer (fra brønn a-h) på to plater per primærantistoff med fortynningene presentert i tabell 5, 100 µl fortynnet serum ble tilsatt i hver brønn og brettet ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble mus anti-laks (4C10) fortynnet til 1:50 i 1% blokkeringsbuffer og tilsatt 100 µl per brønn og inkubert 1t ved romtemperatur. Det sekundære antistoffet, geit anti-mus HRP fortynnet 1:5000 i 1% blokkeringsbuffer, ble så tilsatt og brettet ble inkubert 1 time ved romtemperatur. Substratet o-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich), som har god absorbans ved 492 nm ble løst i 0,05 M citrat buffer (pH 5,0) til å gi 1 mg ml⁻¹. Femti mikroliter av substratløsningen ble tilsatt per brønn, og brettet ble inkubert fra 20–30. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 0,05 M HCL (20µl).

Platene ble vasket tre ganger med 250 µl vaskebuffer [1xPBS + Tween 20 (Sigma-Aldrich)] etter hver inkubering.

Krysstitreringen viste at platen dekket med polyklonalt kanin antistoff mot SAV-3 E2 (Fig. 7a) viste best affinitet mellom primærantistoff og antigen som også førte til videre binding av sekundærantistoffer. Dette antistoffet ble derfor valgt som primærantistoff for videre analyser av samtlige grupper. Tabell 5 markert med farger illustrerer fargeendringene målt i «Tecan™ GENios XFLUOR4» ved 492 nm absorbans i brønnene dekket med kanin anti-SAV-3-E2, der sterk farge illustrerer høy grad av binding av primært antistoff til SAV-3 med påfølgende binding av sekundært antistoff. Fortynningen av primærantistoffet (coating) ble, basert på resultatene, valgt til 1:100, og fortynningsrekken med lakseserum ble startet på 1:20.

Material og Metoder

Tabell 5: Oppsett krysstitrering, verdien øverst i ruten viser fortynning for primærantistoff og andre verdi viser fortynning av serum. Rad 11 og 12 var kontroller. Farge illustrerer hvor det primære antistoffet kanin anti-SAV-3 E2, samt det sekundære samt substrat gav opphav til fargeendring.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	1:100 1:10	1:200 1:10	1:400 1:10	1:800 1:10	1:1600 1:10	1:3200 1:10	1:6400 1:10	1:12800 1:10	1:25600 1:10	1:25600 1:10	-	-
b	1:100 1:20	1:200 1:20	1:400 1:20	1:800 1:20	1:1600 1:20	1:3200 1:20	1:6400 1:20	1:12800 1:20	1:25600 1:20	1:25600 1:20	-	-
c	1:100 1:40	1:200 1:40	1:400 1:40	1:800 1:40	1:1600 1:40	1:3200 1:40	1:6400 1:40	1:12800 1:40	1:25600 1:40	1:25600 1:40	-	-
d	1:100 1:80	1:200 1:80	1:400 1:80	1:800 1:80	1:1600 1:80	1:3200 1:80	1:6400 1:80	1:12800 1:80	1:25600 1:80	1:25600 1:80	-	-
e	1:100 1:160	1:200 1:160	1:400 1:160	1:800 1:160	1:1600 1:160	1:3200 1:160	1:6400 1:160	1:12800 1:160	1:25600 1:160	1:25600 1:160	-	-
f	1:100 1:320	1:200 1:320	1:400 1:320	1:800 1:320	1:1600 1:320	1:3200 1:320	1:6400 1:320	1:12800 1:320	1:25600 1:320	1:25600 1:320	-	-
g	1:100 1:640	1:200 1:640	1:400 1:640	1:800 1:640	1:1600 1:640	1:3200 1:640	1:6400 1:640	1:12800 1:640	1:25600 1:640	1:25600 1:640	-	-
h	1:100 1:1280	1:200 1:1280	1:400 1:1280	1:800 1:1280	1:1600 1:1280	1:3200 1:1280	1:6400 1:1280	1:12800 1:1280	1:25600 1:1280	1:25600 1:1280	-	-

Fjorten nittiseks-brønner mikro-titer plater (Nunc MaxiSorp Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ble forberedt med 100µl primærantistoff og coatingbuffer (fortynning 1:100) hvor brettene ble inkubert over natt ved 4°C. Øvrige steg, doser og konsentrasjoner som beskrevet under krysstitreringen ble også utført på samme måte i denne analysen, bortsett fra tilsetting av serum fra vaksinert og kontroll fisk. Fortynningsrekken ble startet med 1:20 fortynning av fiskeserum og sluttet ved 1:160. Serumprøvene ble fortynnet med 1 % blokkeringsbuffer. ELISA-en ble gjort i duplikat med hensyn til statistiske undersøkelser (Tabell 6). Platene ble analysert i «Tecan™ GENios XFLUOR4» ved 492 nm absorbanse.

Material og Metoder

Tabell 6: Viser duplikat oppsett på mikro-titer platene. Serumprøve fra Fisk 1 blir for eksempel fortynnet fra brønn 1a og 2a til 1d og 2d, og fisk 6 fra brønn 1e og 2e til 1h og 2h.

	Fisk 1/Fisk 6		Fisk 2/Fisk 7		Fisk 3/Fisk 8		Fisk 4/ Fisk 9		Fisk 5/Fisk 10		Kontroll	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20		
b	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40		
c	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80		
d	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160		
e	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20		
f	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40		
g	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80		
h	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160		

2.9.3 Utvikling av virus nøytraliserings analyse

Fiskeserumets egenskap til å nøytralisere fremmede patogener kan måles i en analysemetode som heter «nøytraliserings analyse», denne metoden utføres *in vitro*, og gir en indikasjon på om og i hvilken grad vertens serum immunglobuliner kan hindre virusinfeksjon i cellelinje. Analysen foretas ved å dyrke en cellelinje som er mottakelig for patogenet som skal undersøkes. Serumet fra verten titreres i en fortynningsrekke og blandes med en konstant konsentrasjon av patogenet. Ved å benytte serum i ulike fortynninger kan det bestemmes hvilken fortynning/konsentrasjon av serum som er eller ikke er effektiv i å nøytralisere virus som igjen kan hindre infeksjon av celler.

CHH-1 celler ble splittet og dyrket i tjue nittiseks-brønners mikro-titer plater (Nunc MaxiSorp Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Disse brettene ble inkubert i en uke slik at celler dekket alle brønnene i mikro-titer platene.

Det var ønskelig å finne laveste virus konsentrasjon som fortsatt lyserte CHH-1 cellene i brønnene uten påvirkning fra serum. Til fire plater ble det tilsatt 50 µl SAV-3 (alle brønner),

Material og Metoder

der det ble valgt ut en virustiter per plate på hhv. 1×10^3 TCID₅₀, 1×10^4 TCID₅₀, 1×10^5 TCID₅₀ og 1×10^6 TCID₅₀. Platene ble mikroskopert etter 1 ukes inkubasjon. Titeren 1×10^5 TCID₅₀ var laveste konsentrasjon som viste lysing i alle brønnene og ble valgt ut til videre analyser.

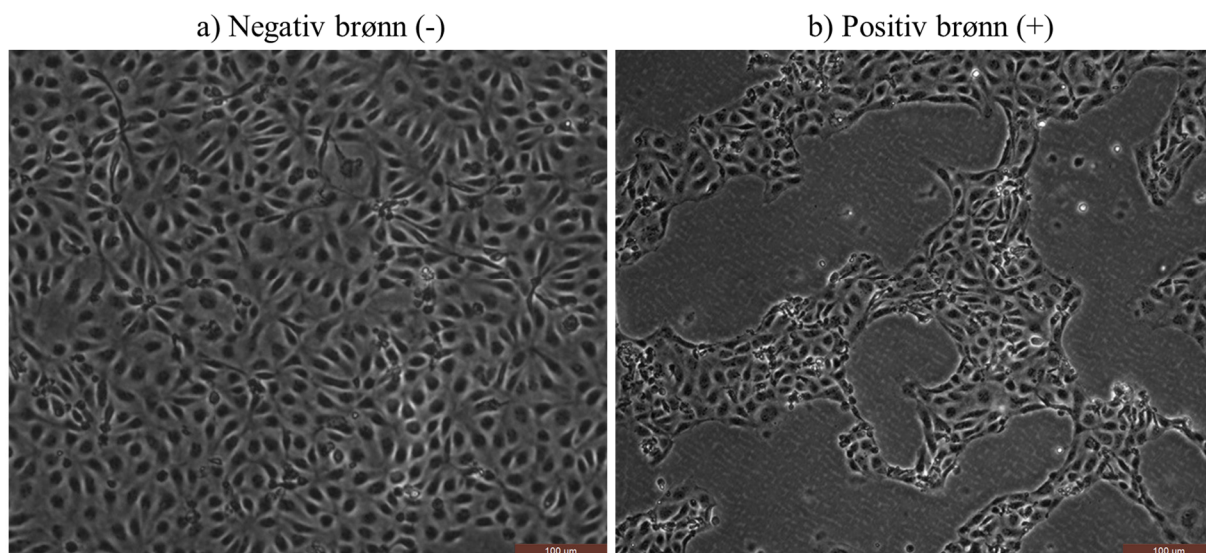
Fjorten nittiseks-brønners mikro-titer plater ble benyttet, hvor samtlige brønner var dekket med CHH-1 celler. Serum (n=10) fra gruppene 2, 3, 6, 7, 8, 10 og 12 ble løst i fortynningsrekke med LB-15 medium i nittiseks-brønners mikro-titer plater med avrundet bunn (ThermoFisher) med serumfortynning 1:10 til 1:1280. Deretter ble 50 µl med SAV-3 virus 1×10^5 TCID₅₀ tilsatt i alle brønnene på titreringsbrettet og blandet med serum, brettene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Brønnene i platene med CHH-1-celler ble tømt for vekstmedium og 100 µl med serum blandet med virus ble overført fra titreringsbrettet med avrundet bunn til mikro-titer platene med CHH-1-cellene etter Tabell 7, brettene ble inkubert i 7 dager ved 15°C.

Tabell 7: Oppsett nøytraliserings analyse. Det ble brukt en rad per fisk, fortynningsserien ble startet i brønn a og avsluttet i brønn h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	-	-
b	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	-	-
c	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	-	-
d	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	-	-
e	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	-	-
f	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	-	-
g	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	1:640	-	-
h	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	-	-

Material og Metoder

Ved mikroskopering av platene ble brønnene gradert enten positiv eller negativ. Brønner markert negativt i Fig. 8 var det ingen morfologiske endringer i cellene (lysring), brønner markert positivt viste lysring av cellene. Ved markering av positiv brønn ble denne fortyningen notert og celler ble registrert som infisert.



Figur 8: Viser CHH-1 celler ikke infisert med SAV-3 (a) og med SAV-3 (b). Bildene er tatt med 40x forstørrelse. Målestokk: 100 µm. Mikroskopert i Axiovert 40 CFL (Zeiss).

2.9.4 Histologi

Histologiske undersøkelser ble gjennomført med hensikt å påvise patologiske endringer i pankreas, hjerte og muskelvev (histopatologi) grunnet infeksjon, med SAV3. Ulike grader av degenerasjon og inflammasjon i vevet ble benyttet som indikator (histoscore) for vaksinens eventuelt beskyttende effekt. Ved prøveuttak ble det tatt ut pankreas, hjerte, muskel ved laterallinje og muskel ved injeksjonssted, som resulterte i fire vevsbiter. Fiksert vev ble kuttet til og lagret i kassetter på 70% etanol.

Dehydrering

Kassetter med vevsprøver (fra lagring på 70% etanol) ble satt til dehydrering i en Citadel 2000 vevs-prosessor (Thermo Fisher Scientific inc., USA) programmert (program A1) i henhold til Tabell 8. Dagen etter ble vevsbitene tatt ut og støpt inn i blokker av parafinvoks (Histowax, Histolab Productus AB, Sverige) ved å benytte en innstøpningsmaskin Leica EG 1150H (Leica Biosystems, Tyskland). Blokkene ble lagret ved romtemperatur.

Tabell 8: Dehydreringstrinn program A1 i Citadel 2000

Kar nr.	Innhold	Tid
1	96 % etanol	2 t
2	96 % etanol	2 t
3	100 % etanol	2 t
4	100 % etanol	2 t
5	100 % etanol og HistoClear (1:1)	1 t
6	HistoClear	1 t
7	HistoClear	1 t
8	HistoClear	1 t
9	HistoClear	1 t
10	Parafinvoks	3 t

Snitting

Snittingen ble utført ved å benytte Leica RM2235 mikrotom (Leica Biosystems GmbH, Tyskland). Blokkene ble snittet med en tykkelse på 5 µm, snittene ble overført til vannbad (42°C) og så til objektglass. Objektglassene ble deretter tørket i romtemperatur i 24 timer. Det ble preparert 10 snitt fra 10 fisk per gruppe (Grp. 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12) ved tidspunktene 28 dps og 42 dps og 70 dps som inneholdt hjerte og pankreas. For kontroll og normalhistologi ble det tillaget 10 snitt fra gruppen Kon-U. Det totale antallet ble da på 250 snitt.

Material og Metoder

Farging

Snittene ble inkubert i 2 timer ved 60 grader før farging slik at voksen smeltet. Hematoxylin og eosin farging (HE farging) ble utført [Hematoxylin (Shandon Island) og Eosin (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)]. De forskjellige reagensene ble forberedt i henhold til produsentens instruksjoner. For å fjerne overflødig parafinvoks, som fører til ufullstendig farging av vev, ble snittene først vasket 4 minutter i «HistoClear» (National Diagnostics Inc., UK). Deretter ble objektglassene med snitt overført til en Leica ST4020 Small Linear Stainer (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) for videre deparafinisering, og farging etter (Tabell 9) Etter farging, ble dekkglass montert ved å benytte Eukitt (Sigma-Aldrich Co., USA), før lagring ved RT i påvente av videre analyser.

Tabell 9: Farging og deparafinisering i Leica ST4020 (90 sekunder i hvert kar (trinn), begynner i kar 1 og avslutter i kar 15)

(Trinn)	Innhold
1	HistoClear
2	100 % etanol
3	96 % etanol
4	96 % etanol
5	Vann
6	Hematoxylin
7	Hematoxylin
8	Vann
9	Vann
10	Eosin
11	96 % etanol
12	96 % etanol
13	100 % etanol
14	100 % etanol
15	HistoClear

Mikroskopering

Histologiske snitt ble mikroskopert og analysert via et Leica CTR6000 lysmikroskop. Bilder ble tatt via et montert Moticam 5.Mp kamera.

2.9.5 Uttrykk av T-bet, GATA-3 og Eomes i muskel

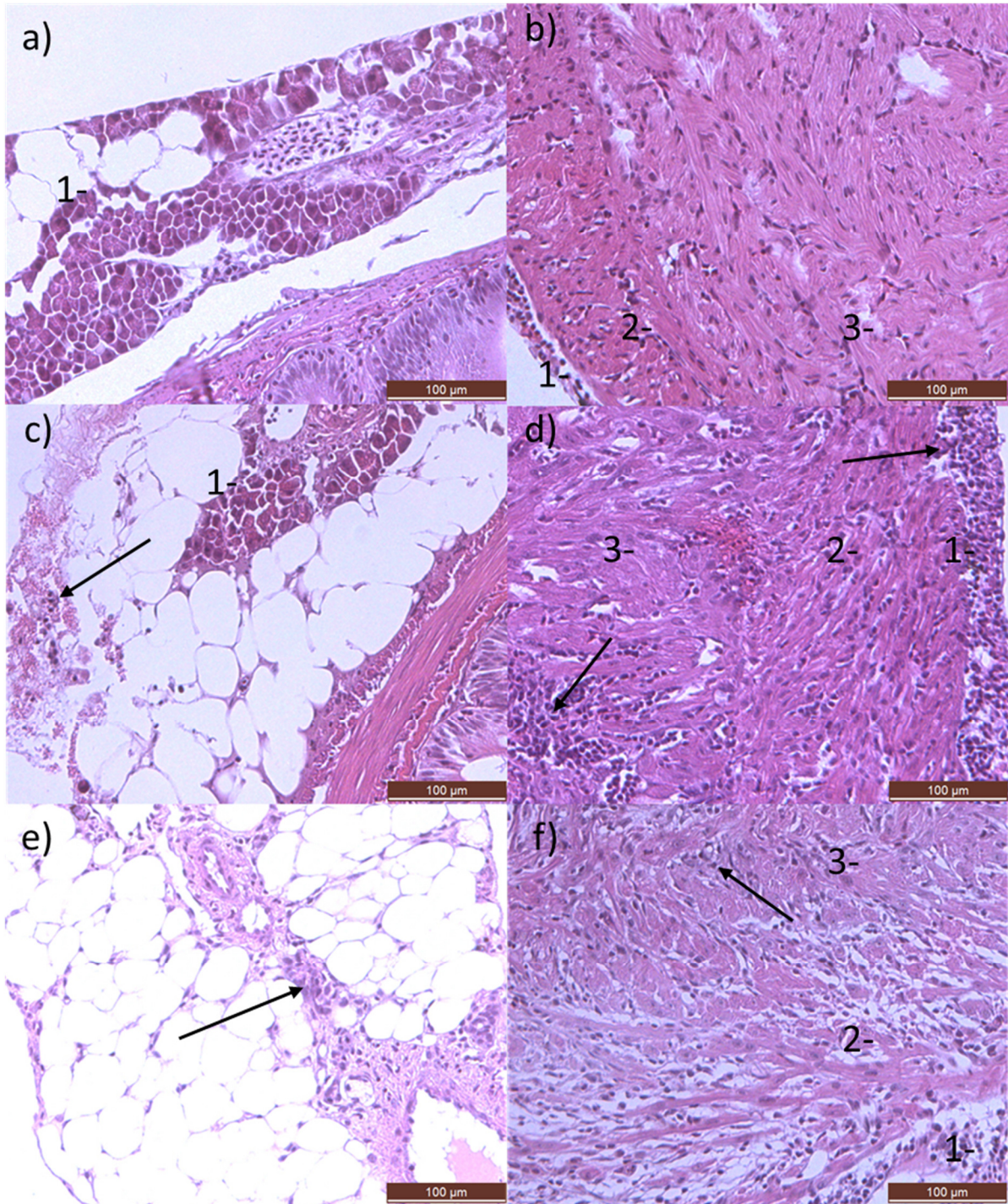
For å undersøke at plasmidene kodende for GATA-3, T-bet og Eomes ble uttrykt i muskelceller *in vivo* ble det forberedt histologiske snitt fra disse gruppene og kontrollgruppen (Kon-U). Tre fisk fra hver gruppe ble valgt ut, og muskel fra injeksjonsted 42 dager post immunisering (42 dpi) ble fiksert, dehydrert og snittet i serie, til sammen 10 objektglass per fisk, disse ble laget til uten farging. Snittene ble mikroskopert og fotograferte i mikroskop (Axiovert 40 CFL (Zeiss)) ved bruk av filtret Texas Red 530-585nm filtre.

2.9.6 Histoscore

Lesjoner, inflammasjon og degenerasjoner ble gradert etter et semi-kvantitativt lesjons scoringssystem utviklet av Veterinærinstituttet i Trondheim Tabell 10, benyttet i et tidligere studie (Chang et al., 2016), som er modifisert fra (McLoughlin et al., 2006). Histopatologiske endringer i pankreas, hjerte og skjelettmuskel fra 10 fisk (n=10) fra hver gruppe ble gradert etter Tabell 10 i en 100% blindtest. Resultatene ble senere bekreftet av person med høy kompetanse innenfor fagfeltet. Lesjons scoren fra hjerte og pankreas vev er illustrert i Fig. 9. Det var vanskelig å bestemme lesjoner i muskelsnittene, derfor ble resultatene ikke bearbeidet og tatt med i oppgaven.

Tabell 10: Semi-kvantitativ gradering/scorings system brukt ved histopatologiske endringer i atlantisk laks som er smittet av pankreas sykdom.

Grad	Pankreas	Hjerte	Skjelettmuskel
0	Normal struktur	Normal struktur	Normal struktur
1 (Mild)	Fokale nekroser og/eller < 30 % tap av eksokrint vev	Fokal/multifokal myokarditt nekroser og/eller inflammasjon (<15 % av fibrene påvirket)	Fokal myofibrillær degenerasjon og/eller inflammasjon
2 (Moderat)	Multifokale nekroser og/eller 30-80 % tap av eksokrint vev	Multifokal myokarditt nekroser og/eller (15-50 % av fibre påvirket)	Multifokal myofibrillær degenerasjon, inflammasjon, og fibriose
3 (Omfattende)	Diffuse nekroser eller > 80 % tap av eksokrint vev	Omfattende myokarditt og/eller (>50 % av fibre påvirket)	Omfattende diffuse myofibrillær degenerasjon, inflammasjon og fibriose



Figur 9: Inflammasjon, nekroser og degenerasjon av ulik grad. Bilde a) og b) viser normalhistologi av pankreas og hjerte. Bilde c) og d) viser milde til moderate histopatologiske endringer i vevet, hvor inflammasjon er markert med piler. Bilde e) og f) illustrerer omfattende degenerasjoner i pankreas og hjerte, eksokrine celler i pankreas er fullstendig degenerert. Tallene i bilde a) og c) markerer eksokrin pankreas. Tallene i bilde b), d) og f) markerer 1= Epikard, 2= Kompakt hjertemuskel og 3= Spongiøs hjertemuskel. Bildene er tatt med 10x forstørrelse. Målestokk: 100 µm.

2.9.7 Statistiske analyser og grafiske fremstillinger

Data ble behandlet med Excel 2013 for Windows «Microsoft co., USA», og statistiske undersøkelser og grafiske fremstillinger ble gjort ved hjelp av GraphPad Prism 7.

All måleresultatene/enkeltberegningene presentert i oppgaven forventes å være normalfordelt, eller tilnærmet normalfordelt. Det ble testet for statistiske gruppeforskjeller, der det ble benyttet uparet T-test med Welch's korrigerings. Hvor det ble satt opp hypoteser, og disse ble testet for signifikans. Forskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$).

Alle figurer i resultatdelen blir presentert med konfidensintervallet (0,95) istedenfor standard avvik. Dette kommer av at forsøket baserer seg på å sammenligne individer fra samme art og opphav og skal teoretisk presentere hele populasjonen. Da samtlige fisk inngår under samme premisser som lys, vann, fôr og smitte gir dette et representativt utvalg. Ved å da benytte konfidensintervallet 0,95 skal disse individene ubehandlet prestere innenfor dette intervallet og vil bli anslått som normalverdier. Når gruppene behandles med ulike antigenleveringer, og ved effekt fra disse vil man kunne se en forskyvning i konfidensintervallene som indikerer at noe har skjedd, men dette trenger fremdeles ikke å være signifikant. Grupper som presterer utenfor konfidensintervallet altså 5 % (0,05) vil implisere at disse verdiene kan defineres som anormale, og kan bli presentert som signifikante forskjeller (Drummond & Vowler, 2011).

Ved presentasjon av resultater i grafer og figurer, ble statistiske gruppeforskjeller markert ved hjelp av symbolene (*) eller (§). Symbolet (*) ble brukt ved signifikante forskjeller målt mot kontrollgruppen ved samme tidspunkt. Antallet stjerner viser forskjell i p-verdi (Tabell 11). Symbolet (§) (Tabell 11) ble brukt ved signifikante forskjeller målt i samme gruppe, men ved to forskjellige tidspunkt. Dette ble markert med bokstav / figur.nr for videre henvisning.

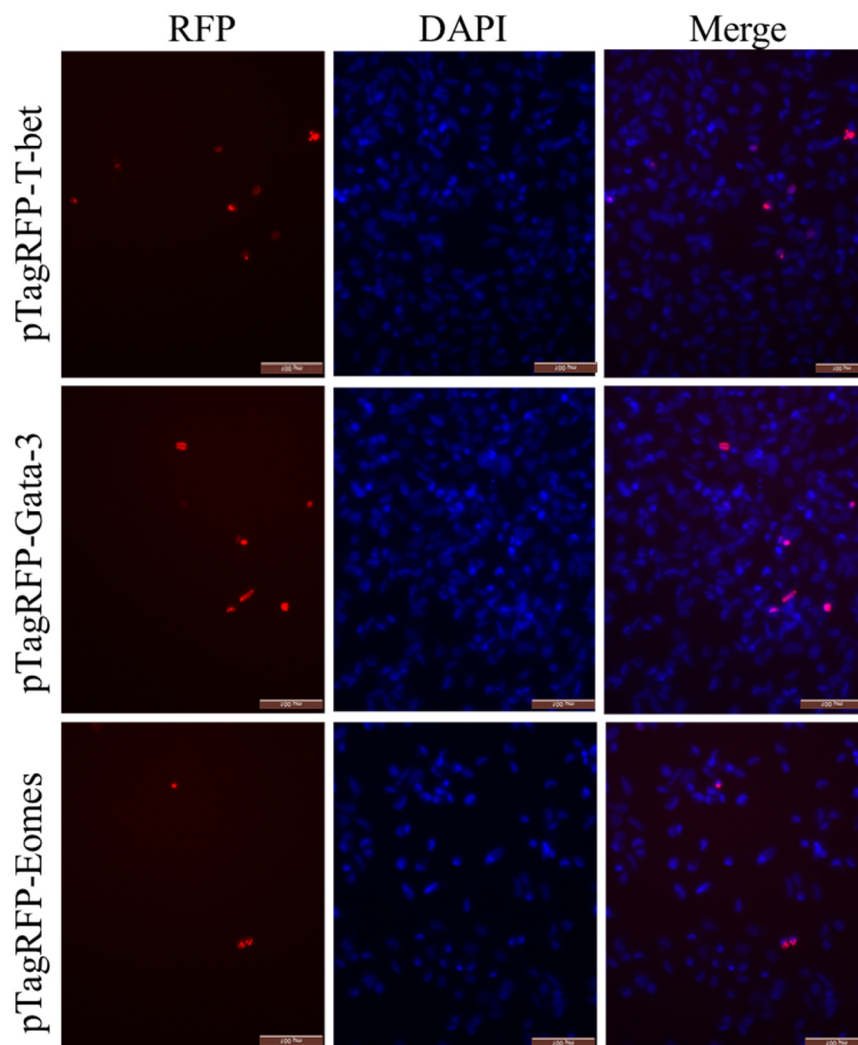
Tabell 11: Symboler brukt til å presentere signifikans og P-verdier.

Symbol	P-verdi
*/§	$P < 0,05$
**/§§	$P < 0,01$
***/§§§	$P < 0,001$
****/§§§§	$P < 0,0001$

3 Resultater

3.1 Transfeksjon av CHSE-celler (*in vitro*)

Fluorescensmikroskopisk analyse ble utført på CHSE-214 celler transfektert med plasmid DNA (pTag-RFP) kodende for hhv. Eomes, GATA-3 og T-bet. RFP er forkortelse for «red fluorescent protein». Dette ble utført for å undersøke om RFP (og kodende gen) ble uttrykt. DAPI ble brukt som kjernefarging. Analysene viste at GATA-3 og T-bet var samlokalisert med DAPI fargede cellekjerener, mens Eomes ble uttrykt i cytoplasma og cellekjerne (Fig. 10). Det ble ikke utført kvantitativ måling på andel celler som uttrykte transgenet.

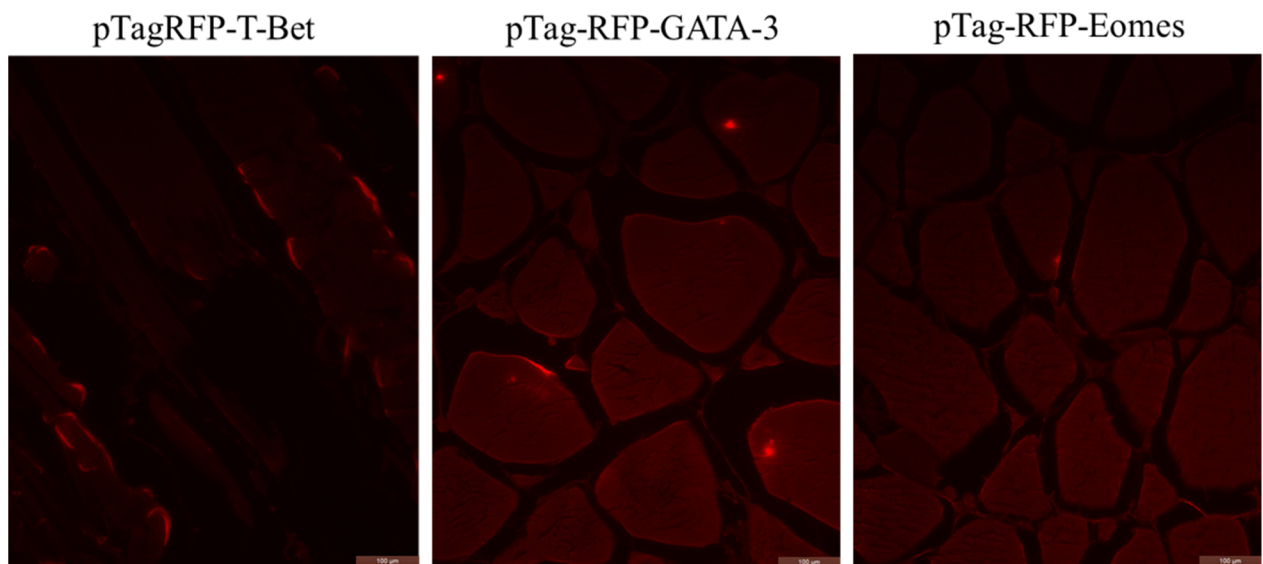


Figur 10: Fluorescensmikroskopisk analyse av CHSE-214 celler 48 timer etter transfeksjon. Bildene i venstre kolonne: Utrykk av RFP (Rød farge) i celler transfektert med plasmid som også kodet for T-bet GATA-3 og Eomes. Bildene i midten: Kjernefarging av cellekultur med DAPI. Bildene i høyre kolonne: Sammensatte bilder med kjernefargede celler og celler som uttrykte transgenene. Forstørrelse 10x målestokk 100 μ m.

Resultater

3.1.1 Utrykk av plasmid i muskel (*In vivo*)

Det ble gjort histologiske undersøkelser av vev 42 dager post immunisering (42 dpi). Muskelsnitt fra injeksjonssted ble forberedt uten HE-farge, fra gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes, samt kontroll. Dette var for å påvise uttrykk av RFP-proteinet fra plasmidet (pTagRFP) sammen med genet av interesse. RFP (protein) uttrykkes i cellen - som gir en fluoriserende farge ved bruk av Texas Red 530-585nm filter. Fluorescensmikroskopisk analyse av snittene viste godt uttrykk av RFP-proteinet. Gruppen T-bet og GATA-3 viste relativt høyt uttrykk av RFP proteinet (Fig. 11), mens plasmidet kodende for RFP og Eomes ble uttrykt i mindre grad. Det ble ikke utført kvantitativ måling på andel celler som uttrykte transgenet. Det ble foretatt histologiske undersøkelser på snitt fra fisk uten plasmidinjeksjon, disse viste ikke RFP uttrykk (ikke vist).



Figur 11: Fluorescensmikroskopering av histologiske snitt av muskelprøver ved injeksjonssted 42 dager etter immunisering. Cellene viste uttrykk av RFP (lys rødfarge) i cytoplasma og i cellekjerner hos muskelceller og indikerte uttrykk av T-bet, GATA-3 og Eomes. Bildene er tatt med 10x forstørrelse. Målestokk: 100 μm.

3.2 Vekt etter immunisering

Totalt 960 fisk ble immunisert og fordelt på 12 ulike behandlinger (Grupper). Fokus i dette forsøket var prestasjonen til gruppene Kon-U (1), IHV-LD (2), IHV-HD (3), T-bet (6), GATA-3 (7), Eomes (8), DNA-Vaksine (10) og Tomt plasmid (12). Siden det er rapportert at vaksinasjon kan påvirke vekst ønsket vi å undersøke om våre vaksiner påvirket vekst, sammenlignet med kontroller. Vekt og lengde ble registrert ved immunisering (0 dpi), og ved samtlige prøveuttak fra 0 dpi til 70 dpi. Vekt- og lengdemålingene, ved immuniseringstidspunktet (0 dpi), viste at det ikke var signifikante forskjeller mellom kontrollfisk og immunisert fisk, uavhengig av vaksinegruppe (Appendiks 2, Figur 22).

3.2.1 Vektøkning etter immunisering

Figur 12 viser gjennomsnittsvekt, ved ulike tidspunkt, for fisk i immuniseringsgruppene 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 og 12. Pga. uforutsette forsinkelser ble vaksinerings foretatt ved to ulike tidspunkter: Gruppe (1, 2, 3, 6, 7, 8) ble vaksinert 3 uker før gruppe 10 og 12. Det ble benyttet to kontrollgrupper for å kompensere for tidsforskyvingen, hvor gruppe 1 (Kon-U) kan sammenlignes mot gruppe 2, 3, 6, 7, og 8, mens gruppe 12 (tomt plasmid) kan sammenlignes mot gruppe 10 (DNA-vaksine). For å avgjøre om vaksinerings bidro til endret vekst for de ulike behandlingsgruppene, ble vektmålingene analysert statistisk. Nullhypotesen ble forkastet dersom gruppeforskjellene viste signifikante forskjeller hvor p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$).

1) *Vekst hos vaksinerte grupper mot uvaksinerte kontrollgrupper*

Hypotese₀ - Vaksinen forårsaker ikke redusert vekt – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Vaksinen forårsaker redusert vekt – $u_0 \neq u_1$

[$u_0 =$ Vaksinert gruppe, $u_1 =$ Uvaksinert gruppe(kontroll)]

Resultater

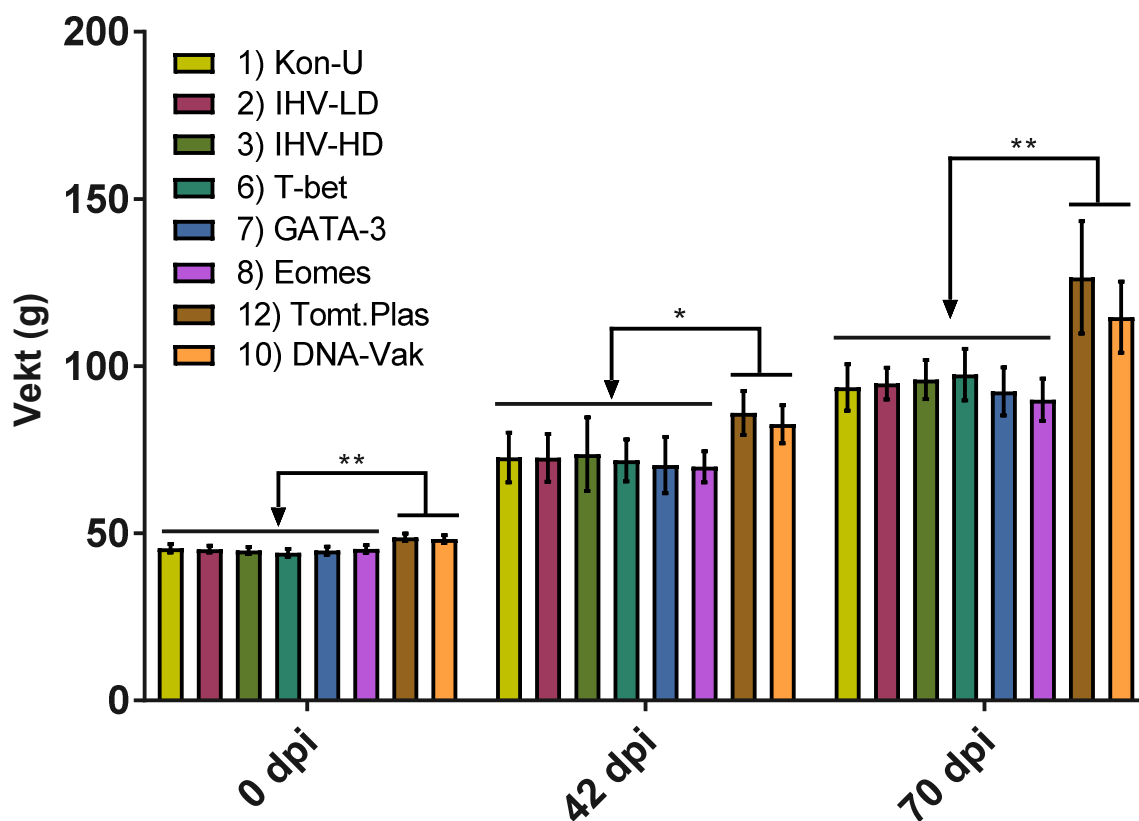
Studerer gjennomsnittsvekten og konfidensintervallene (0,95), mellom gruppene fremkommer det at fisk i gruppene DNA-vaksine og tomt plasmid har gjennomsnittsvekt og konfidensintervallet er høyere enn gruppene 1-8, dette indikerte statistisk signifikans, og det ble derfor testet statistisk om tidspunkt for vaksinerings også kunne påvirke vekten. Null hypotesen ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$), og disse forskjellene ble regnet som signifikante.

2) Ulik vekst ved tidspunkt a (gr. 1,2,3,6,7, og 8) mot tidspunkt b (gr. 10 og 12)

Hypotese₀ - Tidspunkt for vaksinerings forårsaker ikke vektendringer – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Tidspunkt for vaksinerings forårsaker vektendringer – $u_0 \neq u_1$

($u_0 = \text{DNA-vaksine og Tomt plasmid}$, $u_1 = \text{Gruppe 1, 2, 3, 6, 7, og 8}$)



Figur 12: Vektøkning etter immunisering (Vaksinerings). Gjennomsnittsvekt og konfidensintervall (0,95) ved forsøkstart (0 dpi) ($n=80$), samt ved prøveuttak 42 dpi ($n=10$) og 70 dpi ($n=10$). Signifikante forskjeller illustreres som (*) og piler. (*)= $p < 0,05$, (**) illustrerer en p-verdi $< 0,01$.

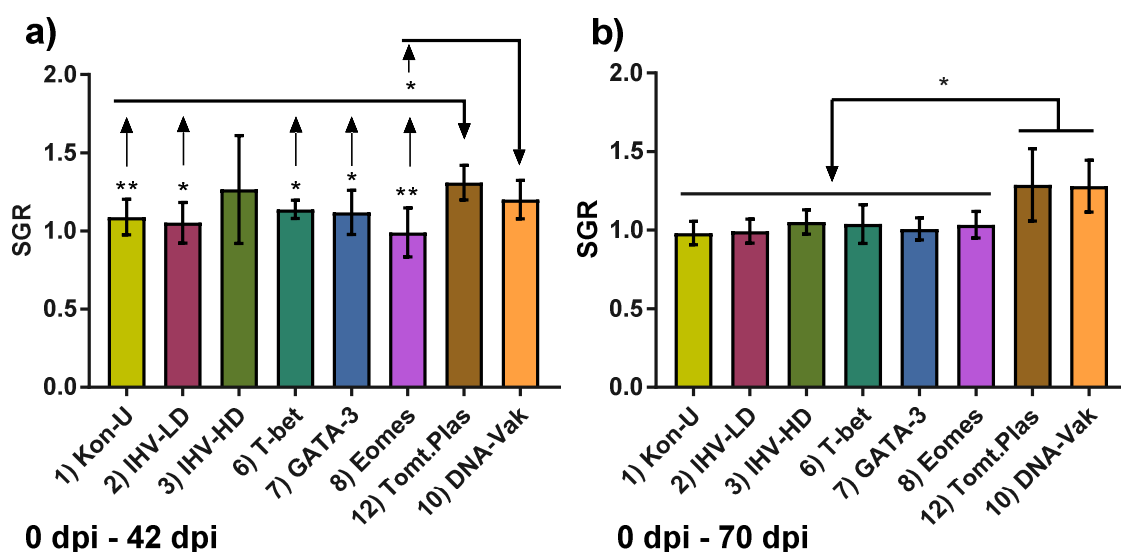
Resultater

Resultatene viste at tidspunktet fisken ble vaksinert påvirket også veksten, det vil si vektøkningen. Fisk i gruppene 10 og 12 vaksinert tre uker etter de øvrige i gruppe 1, 2, 3, 6, 7 og 8 viste signifikante vektforskjeller mellom de to tidspunktene, nullhypotese pkt.2 ble derfor forkastet for samtlige grupper.

Om man sammenligner vekt av fisk i gruppe 2, 3, 6, 7 og 8 og konfidensintervallet mot gruppe 1 (Kon-U), var vekten tilnærmet lik og konfidensintervallene var overlappende, dette indikerte i første omgang ingen signifikante forskjeller. Vektøkningen hos gruppe 7 og 8 (GATA-3 og Eomes) syntes å være svakere sammenlignet med uvaksinert kontroll. Ved statistiske undersøkelser og hypotesetesting framkom det derimot ingen signifikante forskjeller, og null hypotesen pkt.1 ble beholdt. Fisk i gruppe 10 (DNA vaksine) sammenlignet mot kontrollgruppen 12 (tomt plasmid) viste tilnærmet lik vekst. Ved tidspunktet 70 dpi var det en indikasjon at fisk i kontrollgruppen hadde høyere vekt enn fisk vaksinert med DNA-vaksinen, hhv. 126,5 og 114,69 gram, det vil si en differanse på 11,8 gram. Statistiske analyser viste derimot ingen signifikante gruppeforskjeller, og nullhypotesen pkt.1 ble opprettholdt.

3.2.2 Spesifikk vekst rate (SGR) etter immunisering

SGR-verdiene for de samme gruppene (jfr. Fig. 13a/b), ble beregnet (n=10) fra vekstperiodene 0 dpi til 42 dpi og fra 0 dpi til 70 dpi. SGR-verdiene ble beregnet fra individuell vektendring i samtlige grupper. Statistiske undersøkelser ble testet med de samme hypotesene brukt i «3.2.2 vektøkning etter immunisering», for å undersøke om daglig forandring i vekst ble påvirket, ved vaksinerings og/eller ved tidspunktet for vaksinerings. Nullhypotesene ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$), og disse forskjellene ble regnet som signifikante.



Figur 13: Gjennomsnittlige SGR-verdier (daglig tilvekst) og konfidensintervall (0,95) gjennom immuniseringsforsøket, beregnet fra tidspunktene a= 0 dpi – 42 dpi (n=10) og b=0 dpi- 70 dpi (n=10). (*) viser signifikante forskjeller. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

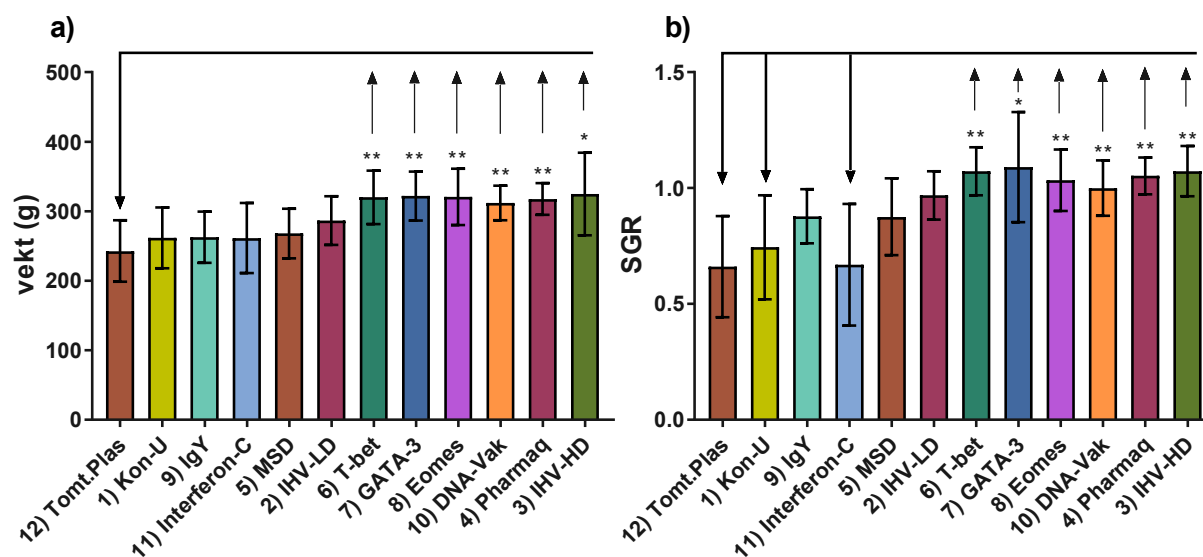
Fra 0-42 dpi (Figur 13a) viste immunisert fisk i ulike vaksinegrupper varierende tilvekst (spesifikk vekstrate). Spesifikk vekstrate hos fisk i gruppe 2, 3, 6, 7 og 8 sammenlignet mot fisk i gruppe 1 (Kon-U), antydte at fisk i gruppen IHV-HD (2) viste sterkere tilvekst (SGR= 1,264), mens SGR hos fisk i resterende vaksinegrupper var ganske lik uvaksinert kontrollgruppe (Kon-U). Statistiske beregninger viste ingen signifikante gruppeforskjeller. Fisk i kontrollgruppen 12 (tomt plasmid) viste derimot høyere SGR-verdier enn fisk i gruppe 10 (DNA-vaksine) (hhv. 1,307 mot 1,200). Statistiske undersøkelser viste derimot ingen signifikante forskjeller, nullhypotesen ble beholdt som vil si at vaksinasjon hadde ingen innvirkning på spesifikk vekstrate. Dette gjaldt også ved tidsperioden 0- 70 dpi (Figur 13b), her viste vaksinerte grupper og kontrollgrupper tilnærmet lik spesifikk tilvekst, statistisk fremkom det ingen gruppeforskjeller, nullhypotese pkt.1 beholdes for samtlige grupper.

Resultater

Resultatene viste at tidspunktet for vaksinerings påvirket vekstraten. Ved tidspunktet 0 dpi til 42 dpi viste kontrollgruppen (tomt plasmid) bedre tilvekst enn gruppene Kon-U ($p=0,0157$) IHV-LD ($p=0,035$), T-bet ($p=0,0085$), GATA-3 ($p=0,0299$) og Eomes ($p=0,0019$). Fisk som ble DNA-vaksinert (DNA-vaksine) viste signifikant bedre vekst enn gruppen Eomes ($p=0,03$). Fra 0-70 dpi var vekstraten jevnere, hvor fisk i gruppe 1-8 viste tilnærmet lik veksthastighet, dette ble også observert i gruppe 10 og 12. Statistiske undersøkelser viste ingen signifikante gruppeforskjeller. Sammenlignes kun tidspunkt for vaksinerings viste gruppe 10 og 12 signifikant høyere vekstrate enn gruppe 1, 2, 3, 6, 7, og 8, hvor p-verdien ble beregnet til $<0,05$. Dette gjaldt også kontrollgruppene Kon-U (SGR=0,981) sammenlignet mot fisk i tomt plasmid gruppen (1,287), statistiske undersøkelser viste signifikante verdier med en p-verdi på 0,0157, nullhypotesen pkt.2 ble dermed forkastet.

3.3 Smitteforsøk

Det ble målt vekt og lengde på fisk i alle vaksinegruppene også etter smitte (Fig. 14a/b), hvor gjennomsnittsverken og SGR til gruppene ved avsluttet smitteforsøk (70 dps) ble beregnet. Ved avsluttet smitteforsøk (70 dps) (Fig. 14 a/b) var vekten og SGR til fisk i gruppen IHV-HD høyest av alle gruppene. Gruppene med fisk som fikk injisert «molekylære adjuvanter» altså T-bet, GATA-3 og Eomes presterte også meget godt, samtidig viste fisk i DNA-vaksine gruppen og fisk som fikk Pharmaq sin SAV vaksine god vekst. Vaksinerte fisk i gruppen IgY, Interferon-C, MSD, IHV-LD presterte dårligst mht. vekt ved avsluttet smitteforsøk. Statistiske undersøkelser viste at fisk som fikk plasmid vaksiner kodende for T-bet, GATA-3 og Eomes (pluss lav dose SAV-3), DNA-vaksine, Pharmaq sin inaktiverte SAV-3 vaksine og IHV-HD hadde høyere vekt og signifikante verdier mot kontrollgruppen (tomt plasmid). Sammenlignes disse mot kontrollgruppen (Kon-U) derimot, var det ingen signifikante forskjeller. SGR-beregningene viste større forskjeller; fisk i gruppene T-bet, GATA-3, Eomes, DNA-vaksine, Pharmaq og IHV-HD viste signifikant bedre tilvekst gjennom hele smitteforsøket enn fisk i kontrollgruppen tomt plasmid og Kon-U.



Figur 14: Vekt (g) og SGR fra samtlige grupper ved avsluttet smitteforsøk (70 dps) (n=10). 13a=Vekt i gram ved 70 dps og 13b= SGR fra 0 dps-70 dps, samt konfidensintervall (0,95). Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) er merket som (*). $*=p < 0,05$, $**=p < 0,01$, $***=p < 0,001$, $****=p < 0,0001$

3.3.1 Vektøkning etter smitte

Det ble spesielt fokusert på vaksinegruppene som fikk plasmid baserte vaksiner + IHV, samt IHV – siden oppgavens fokus var på molekylære adjuvanser og deres potensielle effekter. Smitteforsøket ble startet 14 uker post immunisering for gruppene 1-8, og 11 uker post immunisering for gruppe 10 og 12. Selv om det var en tidsforskyving mellom gruppene i immuniseringsforsøket var vekten ved forsøkstart (smitteforsøk – 0 dps) mellom gruppene tilnærmet lik, og statistiske undersøkelser (n=60) viste ingen signifikante vektforskjeller. Med hensyn til de ulike behandlingene og antigenlevering ble det benyttet to kontroller for sammenligninger og statistiske undersøkelser i vekstforsøket. Ubehandlet kontroll - gruppe 1 (Kon-U) var kontroll for inaktiverte helvirusvaksiner, gruppe 2 (IHV-LD) og gruppe 3 (IHV-HD). Grupper behandlet med pTagRFP plasmid – gruppe 12 (Tomt plasmid) var kontroll for gruppe 6 (T-bet), 7 (GATA-3), 8 (Eomes) og 10 DNA-vaksine. Vekt og lengde ble registrert ved prøveuttakene: 7, 28, 42 og 70 dager post smitte med 1×10^8 TCID₅₀ SAV-3. Statistiske undersøkelser ble anslått signifikant og nullhypotesen ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$).

1) – *Vaksinerte grupper mot uvaksinert gruppe*

Hypotese₀ - Vaksinen forårsaker ikke bedre vekst – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Vaksinen forårsaker bedre vekst – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *Vaksinert gruppe*, $u_1 =$ *Uvaksinert gruppe*)

Det ble også testet for om molekylære adjuvanser induserer bedre vekst sammenlignet med gruppen IHV-LD:

2) – *Molekylære adjuvanser mot IHV-LD*

Hypotese₀ – Molekylære adjuvanser forårsaker ikke bedre vekst – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Molekylære adjuvanser forårsaker bedre vekst – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *T-bet, GATA-3 og Eomes*, $u_1 =$ *IHV-LD*)

Resultater

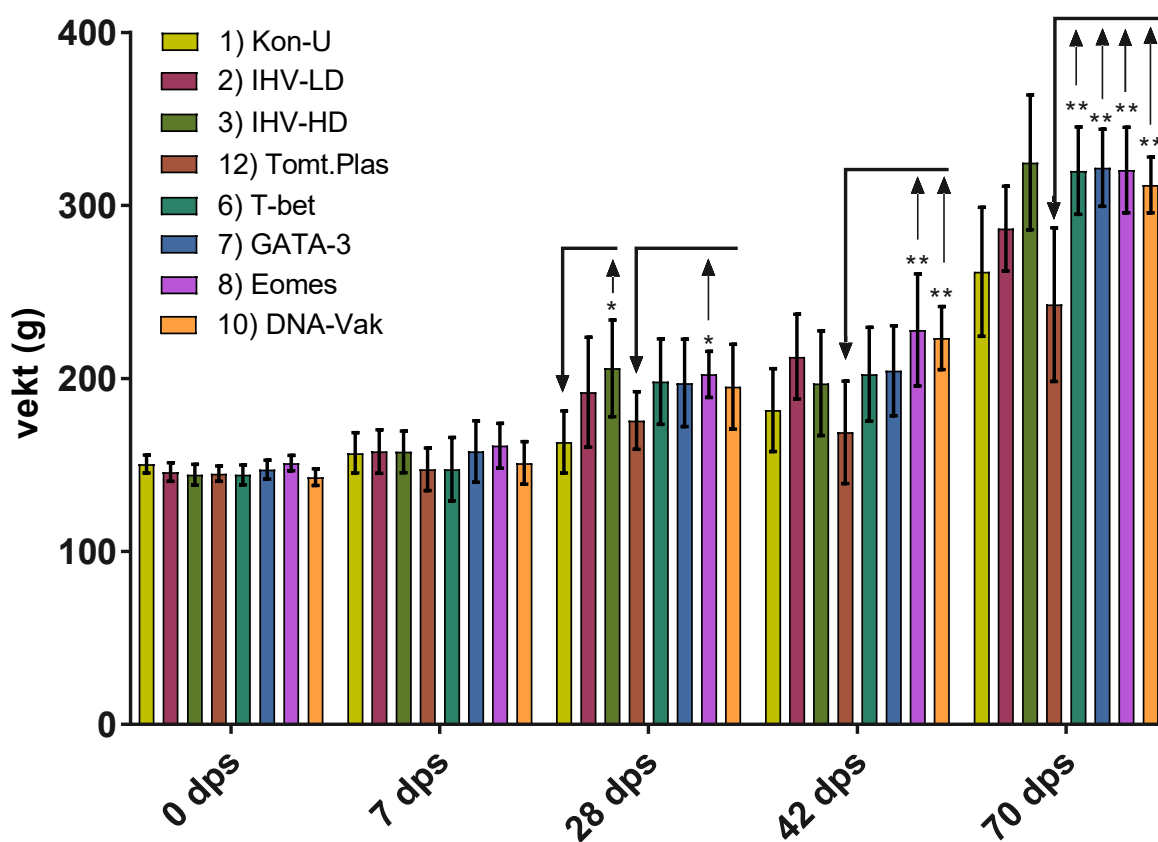
For å undersøke om det var signifikante ulikheter mellom vaksinerte grupper (IHV-LD, IHV-HD, T-bet, GATA-3, Eomes og DNA-vaksine) og om noen av vaksinegruppene viste forholdsvis bedre vekst ble det gjort en-veis variansanalyse (ANOVA). Ved eventuelle signifikante forskjeller påvist, ble det gjort videre undersøkelser med hypotesetesting og uparet T-test for å påvise gruppeforskjellene.

3) ANOVA- Signifikante forskjeller mellom vaksinene

Hypotese₀ – Vaksinerte grupper gir lik vekst – $u_x = u_{alle}$

Hypotese₁ – Ikke alle vaksiner gir lik vekst – $u_x \neq u_{alle}$

(u_x – ukjent vaksine, u_{alle} alle vaksinene)



Figur 15: Vektøkning etter smitteforsøk. Gjennomsnittsvekt og konfidensinterval (0,95) ved forsøksstart (0 dps) ($n=60$) og 7 dps ($n=10$), 28 dps ($n=10$), 42 dps ($n=10$) og 70 dps ($n=10$) etter smitte. Signifikante forskjeller illustreres som (*) og med piler. $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$, $****=p<0,0001$

Resultatene (Figur 15) viste få forandringer ved 7 dps og tilnærmet lik vekst. Ved 28 dps var det få forandringer mellom vaksinerte grupper og vekten til fiskene i disse gruppene fremstod tilnærmet lik, dette kom også frem ved sammenligning av konfidensintervallene som antydte ingen signifikante forskjeller. Fisk i begge kontrollgruppene, Tomt plasmid og Kon-U, viste

Resultater

derimot redusert vekst i forhold til vaksinerte grupper. For fisk i vaksinegruppene som fikk vaksiner basert på inaktivert helvirus fremstod fisk i gruppen IHV-HD med signifikant høyere vekt enn fisk i kontrollgruppen (Kon-U) hhv. 205,9 g og 163,3 g (differanse på 42,6 g), ($p=0,011$). For fisk i gruppene injisert med pDNA, viste fisk som fikk plasmid kodende for Eomes signifikante vektforskjell i forhold til kontrollgruppen Tomt plasmid, hhv 202,4 g og 175,7 g, (differanse på 26,7g) ($p=0,015$), og nullhypotesen (pkt. 1) ble dermed forkastet for gruppene IHV-HD og IHV-LD. Hypotesene 2 og 3 ble testet med uparet t-test og ANOVA, men det fremkom ingen signifikante forskjeller, null hypotesene (pkt. 2 og 3) ble beholdt. Vekten til resterende vaksinerte grupper var IHV-LD (192,1g), T-bet (198,2g), GATA-3 (197,4g), DNA-vaksine (195,2g).

Ved 42 dager post smitte (42 dps) viste fisk i kontrollgruppen (tomt plasmid) vekttap i perioden fra 28 dps til 42 dps (hhv. 175,68 g til 168,86 g), en differanse på -6.82g, fisk i ubehandlet kontrollgruppe (Kon-U) viste mindre endringer fra 28 dps til 42 dps og vekten økte fra 163,2g til 181,8g. Dette var imidlertid ikke signifikante ulikheter. Sammenlignes inaktiverte helvirus vaksiner mot kontrollgruppen Kon-U, viste fisk i gruppene IHV-LD og IHV-HD en vekt på hhv. 212,2 g og 197,2 g, som tilsvarer en differanse på hhv. 30,4 g og 15,4 g, statistiske undersøkelser viste her heller ingen signifikante forskjeller og nullhypotesen (pkt.1) ble beholdt for disse gruppene. For fisk i gruppene behandlet med pDNA viste fisk injisert med plasmid kodende for Eomes (228,1 g) og DNA-vaksinen (223,4 g) god vekst sammenlignet mot vekten hos fisk i kontrollgruppen (Tomt plasmid) (168,9 g). Vektforskjellene viste seg signifikante og det ble målt en differanse på hhv. 43,3 g ($p=0,0194$), 59,24g ($p=0.0069$) og 54,54g ($p=0.0032$) som vil si at nullhypotesen (pkt. 1) ble forkastet for disse gruppene. Resterende fisk i de øvrige grupper viste indikativ bedre vekst enn fisk i kontrollgruppene (tomt plasmid og Kon-U), men forskjellene var ikke statistisk signifikante, noe som vil si at nullhypotesen (pkt. 1) ble beholdt for disse gruppene (T-bet: 202,5 g, GATA-3: 204,4 g, IHV-LD: 212,6 g og IHV-HD: 197,2 g). Hypotese pkt.2 og pkt.3 ble testet med uparet T-test og ANOVA, men det var ingen signifikante forskjeller, og nevnte nullhypoteser ble beholdt.

Ved avsluttet forsøk (70 dps) økte fisk i kontrollgruppen Tomt plasmid (242,8 g) og Kon-U (261,6 g) vekten sin fra 42 dps. Fisk i vaksinegruppene IHV-LD og IHV-HD viste høyere vekt enn kontrollgruppen (Kon-U), hhv. 286,6 g og 324,9 g (differansen ble målt til hhv. 63,3 g og 25 g) Statistiske undersøkelser viste ingen signifikante vektforskjeller mellom fisk i vaksinegruppene og kontrollgruppen Nullhypotesen (pkt. 1) ble beholdt. Fisk i gruppene

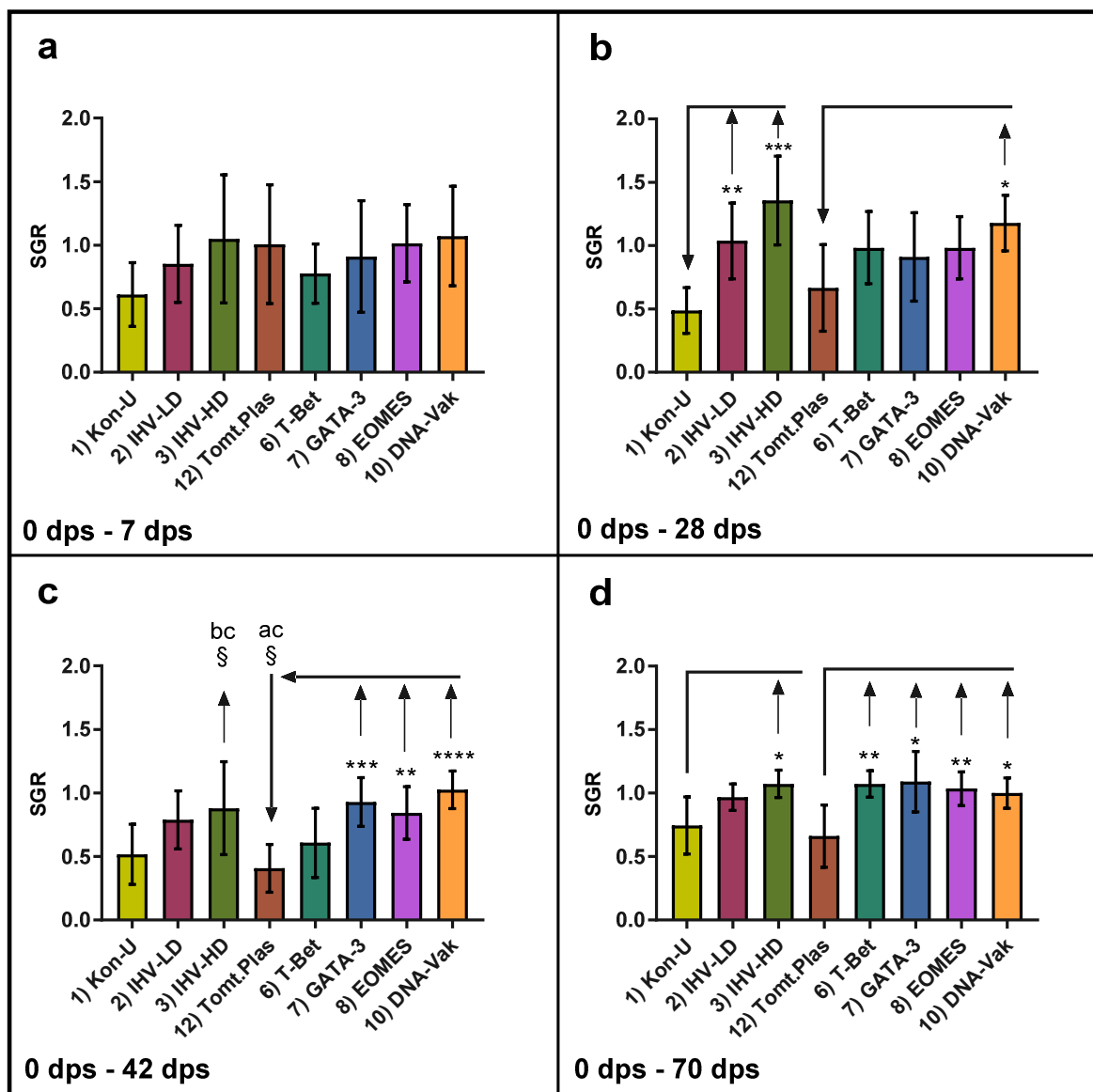
Resultater

vaksinert med pDNA kodende for T-bet, GATA-3, Eomes, samt DNA-vaksinen viste signifikant bedre vekst enn kontrollgruppen (Kon-U) og endte i forsøket med en vekt på hhv. 320 gram ($p=0,0083$), 321,9 g ($p=0,0053$), 320,59 g ($p=0,0089$) og 311,9 g ($p=0,0082$). Nullhypotesen pkt.1 ble forkastet for disse vaksinegruppene. Undersøkelser gjort i henhold til hypotese (pkt. 2) viste fisk i gruppen IHV-LD en vekt på 286,6 gram, sammenlignes dette med gruppene 6, 7 og 8 viste disse gruppene høyere vekt - hhv. T-bet (320,1 g), GATA-3 (321,9g) og Eomes (320,6g). Statistiske undersøkelser viste derimot ingen signifikante gruppeforskjeller som betydde at nullhypotesen (pkt.2) for molekylære adjuvanser ble beholdt. Hypotese (pkt. 3) ble undersøkt med ANOVA analyse, men det fremkom ingen signifikante forskjeller, nullhypotese (pkt. 3) ble beholdt.

3.3.2 Spesifikk vekst rate (SGR) etter smitte

SGR verdiene ble beregnet med hensyn til individets vektforandringer målt ved prøveuttak (7, 28, 42 og 70 dager post smitte) sammenlignet mot vekt målt ved tidspunktet for SAV-3 smitte (0 dps). Figur 16a/b/c/d illustrerer dermed daglig tilvekst fra smitte til prøveuttak. Ti fisk per gruppe ($n=10$) ved samtlige prøveuttak fra hver gruppe ble veid. Statistiske undersøkelser ble gjort under de samme premissene og hypoteser brukt i vekstforsøket. Statistisk signifikans var tilfelle når p-verdi var mindre enn 0,05 ($p<0,05$). En viktig tilleggsinformasjon man ønsket å fremskaffe var eventuelle forandringer i veksthastigheten under smitte i – innen en og samme gruppe ved ulike tidspunkt. Dette parameteret ble testet med uparet T-test.

Resultater



Figur 16: Gjennomsnittlige SGR-verdier ($n=10$) og konfidensintervall (0,95) fra samtlige prøveuttak etter smitte. Statistisk signifikans ved samme tidspunkt sammenlignet mot kontrollgruppen (Tomt plasmid eller Kon-U) fremstilles som (*). (§) viser signifikans i samme gruppe men mellom to ulike tidspunkt, dette henvises med bokstaver ($a=7$ dps, $b=28$ dps, $c=42$ dps og $d=70$ dps). $*/§=p<0,05$, $**/§§=p<0,01$, $***/§§§=p<0,001$, $****/§§§§=p<0,0001$

Resultatene fra SGR-beregningene viste både forandringer i SGR-verdiene mellom datapunktene (tidspunkt for prøveuttak) og mellom gruppene sammenlignet mot kontrollene tomt plasmid og Kon-U.

Sammenlignes SGR-verdiene mellom gruppene innad tidsperiodene, viste det seg at flere grupper hadde signifikant høyere tilvekst i forhold til kontrollgruppene (Kon-U og tomt plasmid).

Resultater

Den første uken etter smitte (Figur 16a; 0 dps- 7 dps) viste resultatene få forandringer i SGR-verdiene, konfidensintervallet i både kontrollgruppene (Tomt plasmid og Kon-U) samt vaksinerte grupper var relativt høyt – noe som antydte store variasjoner i enkeltindividenes vekst innad gruppene.

I tidsperioden 0-28 dps viste fisk i samtlige grupper utenom kontroller god tilvekst. Fisk som fikk kun inaktiverede virusvaksiner [IHV-LD (SGR=1,037) og IHV-HD (SGR=1,357)] viste signifikant bedre tilvekst enn fisk i kontrollgruppen Kon-U (SGR=0,489) med en differanse på hhv. 0,548 ($p=0,0030$) og 0,868 ($p=0,0002$), nullhypotese pkt.1 forkastes for gruppene. Fisk i gruppene injisert med pDNA [T-bet (SGR=0,984), GATA-3 (SGR=0,909), Eomes (SGR=0,983) og DNA-vaksine (SGR=1,177)] viste økt tilvekst sammenlignet med kontrollgruppen tomt plasmid (SGR=0,666). Statistiske undersøkelser viste kun at gruppen DNA-vaksine signifikante verdier i forhold til kontrollgruppen (tomt plasmid) med en differanse 0,51 ($p=0,0121$) (Figur 16b), nullhypotese pkt.1 ble forkastet for denne gruppen. Hypotese pkt.2 og pkt.3 ble testet men det fremkom ingen signifikante forskjeller fra disse analysene, nullhypotesene ble beholdt.

Ved tidsperioden 0-42 dps (Fig. 16c) viste kontrollgruppene (Tomt plasmid og Kon-U) lav tilvekst sammenlignet med vaksinerte grupper. Gruppene IHV-LD og IHV-HD viste god tilvekst med SGR-verdier på hhv 0,788 og 0,879. Sammenlignes tilveksten for fisk i IHV-LD og IHV-HD gruppene mot kontrollgruppen Kon-U (SGR=0,517) fremkom en differanse på hhv. 0,271 og 0,362. Statistiske undersøkelser viste ikke signifikante forskjeller, nullhypotesen (pkt. 1) ble opprettholdt. Fisk som fikk plasmid adjuvansene GATA-3 (SGR=0,928), Eomes (SGR=0,843), samt DNA-Vaksinen (SGR=1,025), viste alle god tilvekst i forhold til fisk i kontrollgruppen tomt plasmid (0,407). Fisk i gruppen T-bet viste derimot lavere tilvekst i denne tidsperioden (SGR=0,608). Statistiske undersøkelser ble gjort med hensyn til hypotese 1. Gruppene Eomes ($p=0,0024$), ($p=0,0117$) og GATA-3 ($p=0,0004$) og DNA-vaksinen ($p=0,0121$) viste signifikante forskjeller sammenlignet med kontrollgruppen (tomt plasmid) hypotesen (pkt. 1) forkastes for nevnte grupper. Vekst hypotese pkt.2 og pkt.3 ble testet ved statistiske undersøkelser hvor resultatet ble at nullhypotese (pkt. 2) ble beholdt – dvs. ingen forskjeller mellom gruppene molekylære adjuvanser og gruppen IHV-LD. Undersøkelser med ANOVA viste derimot signifikante verdier, videre ved undersøkelser med uparet T-test ble det oppdaget at fisk fått DNA-vaksinen og fisk i gruppen GATA-3 viste signifikant bedre tilvekst en fisk i gruppen T-bet med en differanse på hhv. SGR=0,417 og SGR=0,32. P-verdiene ble

Resultater

beregnet til hhv. 0,0088 og 0,0451 for DNA-vaksine og GATA-3 mot T-bet, nullhypotese pkt.3 forkastes.

Figur 16d viser tilveksten gjennom hele smitteforsøket fra 0 dps til 70 dps. Kontrollgruppene Kon-U og Tomt plasmid viste forbedrede SGR-verdier hhv. 0,517 og 0,661 sammenlignet mot tidsperioden 0 dps-42 dps, målte forskjellene var imidlertid ikke signifikante. Av vaksinerte grupper viste fisk i gruppen GATA-3 høyest SGR-verdier (1,09) - som vil si at fisken har vist god daglig tilvekst gjennom hele smitteforsøket. Gruppene T-bet, Eomes og IHV-HD viste tilnærmet like SGR-verdier på hhv. 1,072, 1,034 og 1,07. Fisk som fikk DNA vaksinen og IHV-LD viste svakere vekst med SGR-verdier beregnet til hhv. 0,999 og 0,968. Sammenlignes SGR-verdiene til gruppene IHV-LD og IHV-HD mot kontrollgruppen (Kon-U; SGR=0,745) viste gruppen IHV-HD signifikante verdier mht. vekstøkning med en p-verdi på 0,0109. Samtlige grupper vaksinert med plasmid adjuvans viste signifikante forskjeller mot kontrollgruppen tomt plasmid, hvor gruppene T-bet, GATA-3, Eomes og DNA-Vaksinen viste en p-verdi på hhv. 0,0042, 0,00106, 0,0089 og 0,0145. Hypotesen (pkt. 1) forkastes for disse gruppene. Vekstundersøkelser av fisk gruppene behandlet med molekylære adjuvanser (T-bet, GATA-3 og Eomes) sammenlignet med IHV-LD, viste at fisk som fikk plasmid kodende for T-bet, GATA-3 og Eomes bedre daglig tilvekst (SGR-verdier) med en differanse til IHV-LD på hhv. 0,104, 0,112 og 0,066. Ved statistiske undersøkelser av gruppene ble det ingen signifikans påvist, dette betyr at nullhypotesen (pkt. 2) beholdes. Ved testing av hypotese 3 ble fremkom det heller ingen signifikante forskjeller.

Sammenlignes tidsperiodene - 0-7 dps og 0-42 dps, viser dette at endringer i tilvekst (SGR) mellom disse tidsperiodene hadde skjedd. Den daglige tilveksten for kontrollgruppen (tomt plasmid) ble redusert signifikant mellom tidsperioden - 0-7 dps og 0-42 dps, tilveksten (SGR) ble målt til hhv. 1,008 til 0,407, som vil si en differanse på 0,601 (p-verdi=0,0288). SGR verdien til gruppen IVV-HD var også signifikant redusert fra tidsperioden 0-28 dps (Figur 16b) til 0-42 dps (Figur 16c), SGR-verdien ble målt til hhv. 1,357 til 0,881, altså en differanse på 0,476 (p =0,0451).

3.3.3 Antistoff produksjon mot SAV-3

Gruppene, tomt plasmid, IHV-LD, T-bet, GATA-3, Eomes, IHV-HD og DNA-Vaksine, ble valgt ut til analyser mot antistoffresponen i serum. I denne analysen var formålet å undersøke antistoffresponen i gruppene. Det ble kun inkludert en kontroll -Tomt plasmid, da analysene også inkluderte en mekanisk kontroll (tom kontrollbrønn) som har ingen form for antistoffrespons. Tidspunktene 70 dager post immunisering (70 dpi) og 42 dager post smitte (42 dps) ble undersøkt ved to analysemetoder «ELISA», og «virus nøytralisasjons analyse». Statistiske undersøkelser ble anslått signifikant og nullhypotesen ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p < 0,05$).

Ved statistiske undersøkelser ble det testet for hypotesene:

1) – *Vaksinerte grupper mot uvaksinert gruppe*

Hypotese₀ - Vaksinen forårsaker ikke bedre antistoffrespons – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Vaksinen forårsaker bedre antistoffrespons – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *Vaksinert gruppe*, $u_1 =$ *Uvaksinert gruppe*)

Det ble også testet for om molekulære adjuvaner induerte bedre antistoffrespons sammenlignet med gruppen IHV-LD, som kan antyde ytterligere beskyttelse:

2) – *Molekulære adjuvaner mot IHV-LD*

Hypotese₀ – Molekulære adjuvaner forårsaker ikke bedre antistoffrespons – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Molekulære adjuvaner forårsaker bedre antistoffrespons – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *T-bet, GATA-3 og Eomes*, $u_1 =$ *IHV-LD*)

3) – *Utvalgt vaksine mot resterende vaksiner*

Hypotese₀ – Vaksinen forårsaker ikke bedre antistoffrespons – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Vaksinen forårsaker bedre antistoffrespons – $u_0 \neq u_1$

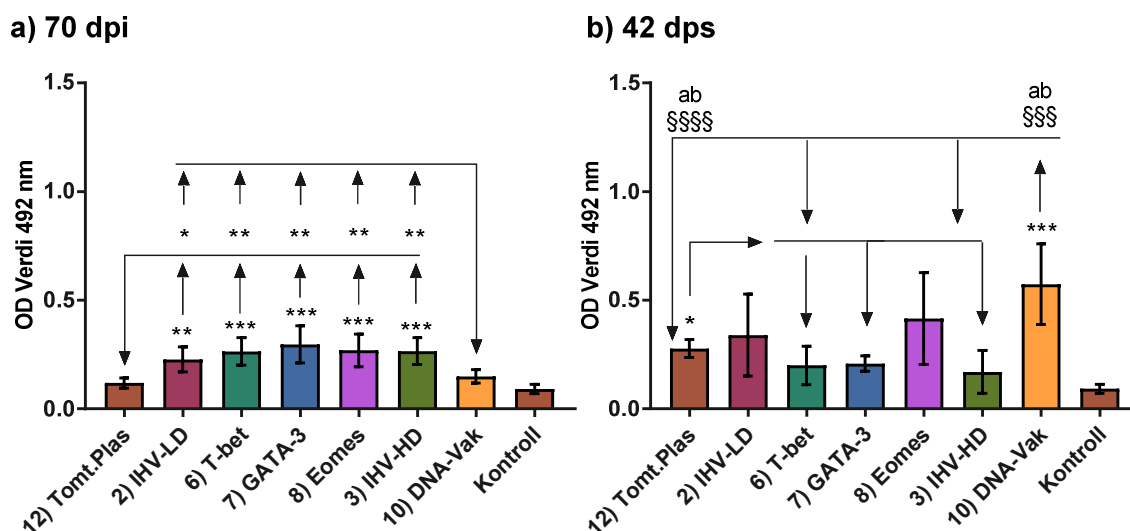
($u_0 =$ *Utvalgt vaksine-x*, $u_1 =$ *Utvalgt vaksine - y*)

Det ble også undersøkt for signifikante ulikheter mellom tidspunktene 70 dager post immunisering etter immunisering og 42 post smitte i samme gruppe.

Resultater

3.3.4 ELISA

Antigenet (SAV-3) ble bundet til brønnbunnen av platene ved å dekke de med antistoffet kanin anti-SAV-3-E2. Sera ble undersøkt i en fortynningsrekke fra 1:20 til 1:160. Det var ingen fargeforandringer (målbar antistoffbinding), i forhold til kontrollbrønner, der hvor fortyningen var 1:160, derfor ble resultatene mht. 1:160 fortykning ikke inkludert i resultatene. Figur 17a/b viser et gjennomsnitt, fra duplikat, fortynningsrekke 1:20, 1:40 og 1:80.



Figur 17: ELISA som indikerer antistoffrespons fra fisk i ved tidspunkt 70 dager post immunisering (70 dpi) og 42 dager post smitte (42 dps) (n=10). Verdiene er fremstilt som gjennomsnittlig OD (optical density) verdier (492 nm), og konfidensintervall (0,95). Statistisk signifikans er benevnt med stjerner (*) og piler mellom grupper ved samme tidspunkt. Ved signifikante forskjeller i samme gruppen, men ved ulike tidspunkt henvisning dette med fig a eller b og (§). */§=p<0,05, **/§§=p<0,01, ***/§§§=p<0,001, ****/§§§§=p<0,0001

Resultatene (Figur 17a) 70 dager post immunisering (70 dpi) viste at sera fra fisk som ble injisert med plasmid kodende for GATA-3 høyest absorpsjon (OD=0,296), som indikerte en god antistoff respons. Fisk i gruppene Eomes, IHV-HD og T-bet viste også god produksjon av antistoffer og OD-verdien ble målt til hhv. 0,269, 0,265 og 0,264. Statistiske undersøkelser viste at vaksinerte gruppene T-bet (p=0,0002), GATA-3 (p=0,0004), Eomes (p=0,0006) og IHV-HD (p=0,0001) signifikant økt antistoffrespons sammenlignet mot kontrollgruppen (tomt plasmid), nullhypotesen pkt.1 forkastes for disse gruppene. Sera fra kontrollgruppen (tomt plasmid) viste tilnærmet lik absorpsjon som kontrollbrønnene uten primært antistoff hhv. 0,119 og 0,091, en differanse på 0,028. Statistiske undersøkelser viste ingen signifikant forskjell mellom disse to. Dette indikerte at fisk i kontrollgruppen ikke produserte antistoffer mot SAV-3. Interessante funn ble gjort i gruppen DNA-vaksine hvor sera fra fisk viste relativt lav OD-

Resultater

verdi (0,149), 70 dager post immunisering. Dette indikerte en lav antistoffrespons etter vaksinerings sammenlignet med resterende vaksinerte grupper. Statistiske undersøkelser med hensyn til hypotese pkt.2 og pkt.3 viste at øvrige vaksinerte grupper hadde økt antistoffrespons i forhold til fisk som fikk injisert DNA vaksine; IHV-LD ($p=0,0186$), IHV-HD ($p=0,0016$), T-bet ($p=0,0021$), GATA-3 ($p=0,0024$) og Eomes ($p=0,0049$), null hypotesen pkt.3 forkastes for disse gruppene, nullhypotese pkt.2 beholdes for «molekylære adjuvanser».

Analyser av serum 42 dager post smitte (dps) viste resultatene at sera fra fisk i kontrollgruppen (tomt plasmid) hadde innhold av antistoff mot SAV-3, da OD-verdien var høyere enn OD verdien i kontrollbrønnene, hhv. 0,276 og 0,0917. Fisk i vaksinerte grupper sammenlignet mot kontrollgruppen viste gruppene T-bet (OD=0,199), GATA-3 (OD=0,207) og IHV-HD (OD=0,169). Ved statistiske undersøkelser viste kontrollgruppen tomt plasmid seg signifikant mot gruppene GATA-3 ($p=0,0126$) og IHV-HD ($p=0,0472$) og hadde en bedre antistoffrespons ved dette tidspunktet null hypotesen pkt.1 beholdes for disse gruppene. Av vaksinerte grupper viste fisk som fikk DNA-vaksine høyest antistoffproduksjon med en OD-verdi på 0,572, statistisk viste også serumprøver fra fisk i denne gruppen signifikant høyere antistoffinnhold sammenlignet med kontrollgruppen (tomt plasmid) med en p-verdi på 0,0060, nullhypotese pkt.1 forkastes for denne gruppen. Sammenlignes DNA-vaksinen med andre vaksinegrupper var antistoffproduksjonen i fisk fra denne gruppen statistisk signifikant høyere enn fisk som ble behandlet med plasmid kodende for T-bet ($p=0,0004$), GATA-3 ($p=0,0006$) – samt IHV-HD ($p=0,0004$), nullhypotese pkt.3 forkastes for nevnte grupper. Gruppene vaksinert med lav dose IHV-LD + Eomes-kodende plasmid og IHV-LD viste også relativt høye OD-verdier (hhv. 0,0338 og 0,4152) indikativ for en god antistoffrespons, testing av hypotese pkt.2 viste ingen signifikante forskjeller og nullhypotesen beholdes.

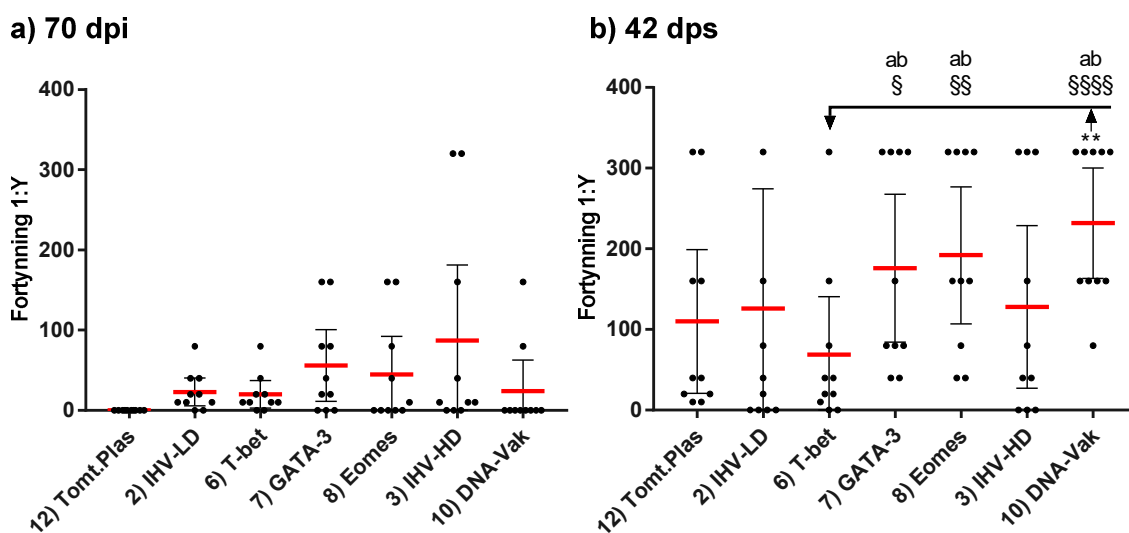
Sammenlignes antistoffresponsen mellom de to tidspunktene indikerte dette en trend der fisk i grupper med sterk immunrespons ved tidspunktet 70 dager post immunisering hadde en lavere antistoffproduksjon 42 dager post smitte. Dette gjaldt gruppene T-bet, GATA-3 og IHV-HD. Motsatt trend gjaldt for fisk i grupper som viste en lav immunrespons ved 70 dager post immunisering, der fisk viste relativt høy antistoffrespons 42 dager post smitte. Dette gjaldt fisk i gruppene tomt plasmid, IHV-LD og DNA-vaksine. Statistiske undersøkelser viste at fisk som fikk DNA-vaksine og tomt plasmid økte antistoffresponsen signifikant fra tidspunktet 70 dpi til 42 dps, Figur 17a til – Figur 17b, hvor forskjellene ble målt statistisk med en p-verdi på [DNA-

Resultater

vaksine $p=0,0001$ og tomt plasmid $p<0,0001$]. Gruppen Eomes viste god antistoffrespons ved begge tidspunkt.

3.3.5 Virus nøytraliserings Analyse

Resultatene presentert i Figur 18a/b viser serumets egenskap til å nøytralisere viruset SAV-3 – gitt ved titeren $50 \mu\text{l } 1 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$ (dose per brønn var $0,005 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$ SAV-3). Evnen til virusnøytralisering ble undersøkt i serumprøver ved tidspunktene 70 dager post immunisering (70 dpi) og 42 dager post smitte (42 dps). Verdiene viste hvilken fortykning som nøytraliserte virus og forhindret infeksjon i cellelinjen (CHH-1) - presentert som gjennomsnittsverdier. I kontrollbrønnene som ble infisert med kun virus og ikke serum, viste alle brønner med celler lysing.



Figur 18: Virus nøytraliserings analyse av serum 70 dager post immunisering (70 dpi) og 42 dager post smitte (42 dps), verdien på y-aksen viser gjennomsnittlig fortykning av serumet ($n=10$) som hadde nøytraliserende effekt. En prikk illustrerer en fisk med fortykningen som skulle til for å hindre infeksjon i celler. Rød linje viser gjennomsnittet av samtlige fortykninger, samt konfidensintervall (0,95). Statistisk signifikans er benevnt med stjerner (*) og piler mellom grupper ved samme tidspunkt. Ved signifikante forskjeller i samme gruppen, men ved ulike tidspunkt fremstilles med henvisning til figur a eller b og (§). $*/§=p<0,05$, $*/§§=p<0,01$, $*/§§§=p<0,001$, $*/§§§§=p<0,0001$

Figur 18a viser resultatene av serumets nøytraliserende effekt fra 70 dager post immunisering. Serum fra fisk i kontrollgruppen tomt plasmid hadde en fortykningsverdi på 0 som vil si at serumet hadde ingen nøytraliserende effekt mot viruset, og dermed ingen antistoffer mot SAV-3. Sammenlignes virusnøytralisasjon hos sera fra vaksinerte grupper, gav sera fra fisk i gruppen IHV-HD god beskyttelse og hadde nøytraliserende effekt inntil fortykning 1:87. Av resterende grupper, viste sera fra fisk i gruppene GATA-3 og Eomes nøytraliserende effekt frem til hhv.

Resultater

1:56 og 1:45 fortytning. Sera fra fisk i gruppene DNA-vaksine, T-bet og IHV-LD viste mindre grad av beskyttelse ovenfor CHH-1 cellene, fortytningen var hhv. 1:24, 1:20 og 1:23. Grunnet store variasjoner hos individuelle serums nøytraliserende effekt innad gruppene, førte dette til brede konfidensintervall som gjorde utslag i statistiske undersøkelser, nullhypotese pkt 1 og pkt. 2 beholdes for samtlige grupper.

Figur 18b viser serumets nøytraliserende effekt 42 dager post smitte. Fisk i kontrollgruppen tomt plasmid har satt i gang en immunrespons mot viruset og hvor sera viste nøytraliserende effekt frem til fortytningen 1:110. For vaksinerte grupper viser fiskeserum fra fisk behandlet med DNA-vaksinen høy nøytraliserende effekt ovenfor viruset, og viser beskyttelse frem til fortytning 1:232. Sera fra fisk i gruppene GATA-3 og Eomes viste god beskyttelse og hadde nøytraliserende effekt frem til fortytning hhv. 1:176 og 1:192. Sera fra fisk som fikk IHV-LD og IHV-HD viste nøytraliserende effekt frem til hhv. 1:126 og 1:128. Av samtlige grupper viste sera fra gruppen fisk i behandlingsgruppen T-bet dårligst nøytraliserende effekt (1:69). Ved statistiske undersøkelser fremkom det at DNA-vaksinen viste signifikante høyere evne til virusnøytralisasjon enn fisk i gruppen T-bet ($p=0,0016$), nullhypotese pkt.2 forkastes for denne gruppen.

Sammenlignes tidspunktene 70 dager post immunisering og 42 dager post smitte, viste vaksinert fisk og fisk i kontrollgruppen (tomt plasmid) generelt en høyere antistoffrespons 42 dager post smitte, og serumets nøytraliserende effekt syntes å være sterkere i samtlige grupper. Siden serumprøver fra uvaksinert kontrollgruppe også viste nøytraliserende effekt indikerte dette at naturlige immunresponser mot viruset hadde blitt igangsatt. Ved statistiske undersøkelser viste sera fra fisk i gruppene GATA-3 ($p=0,0195$), Eomes ($p=0,0041$) og DNA-vaksine ($p<0,0001$) signifikante forskjeller mellom tidspunktene.

3.3.6 Histopatologiske forandringer etter SAV-3 smitte

Histologiske undersøkelser ble gjennomført med hensikt å vurdere grad av inflammasjon forårsaket av SAV-3 i pankreas og hjerte, samt vurdere andre lesjoner (for eksempel nekroser) i histologiske snitt fra fisk i ulike vaksinegruppene etter system i Tabell 10, for å kunne indikere beskyttelse til de forskjellige vaksinene (gruppe 1-3, 6-8, 10 og 12). Gradering av slike parametere ble kalt histoscore i oppgaven. Histologiske preparater fra fisk (n=10) ved tidspunktene 28 dps, 42 dps og 70 dps ble valgt ut til undersøkelser. Snittene ble i første omgang analysert i lysmikroskop, med original merking, her ble det lagt fokus på å detektere nekrose, inflammasjon og degenerasjoner i vevet. Deretter ble snittene blindscoret etter veterinærinstituttets semi-kvantitative graderingssystem (Tabell 10). Blindtesten ble gjennomført for å eliminere subjektiv innflytelse ved analysering. Histoscoren ble senere bekreftet av personer med god kompetanse innenfor feltet. Histopatologiske endringer ble presentert i tre ulike formater, for å gi et større innblikk hvilke endringer som forekom i individene med hensyn til pankreas og hjerte (epikard, kompakt og spongiøs hjertemuskel) (Fig. 19), beskyttelsen til vaksinene - gruppebasert (Fig. 20), og hvordan histoscoren og tilvekst (SGR) korrelerte (Fig. 21). Rød muskel viste betydelig lite endringer og ble ikke presentert i resultatene. Ved statistiske undersøkelser ble det testet for hypotese pkt. 1, pkt. 2 og pkt. 3 (se nedenfor). Statistiske undersøkelser anslo signifikansnivået og nullhypotesen ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p \leq 0,05$).

1) – *Vaksinerte grupper mot uvaksinert gruppe*

Hypotese₀ - Vaksinen forårsaker ikke mindre histopatologiske endringer – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Vaksinen forårsaker mindre histopatologiske endringer – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *Vaksinert gruppe*, $u_1 =$ *Uvaksinert gruppe*)

Det ble også testet for om molekylære adjuvanser forårsaker mindre histopatologiske endringer sammenlignet med gruppen IHV-LD, som kan antyde ytterligere beskyttelse mot SAV-3:

2) – *Molekylære adjuvanser mot IHV-LD*

Hypotese₀ – Molekylære adjuvanser forårsaker ikke mindre histopatologiske endringer – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Molekylære adjuvanser forårsaker mindre histopatologiske endringer – $u_0 \neq u_1$

($u_0 =$ *T-bet, GATA-3 og Eomes*, $u_1 =$ *IHV-LD*)

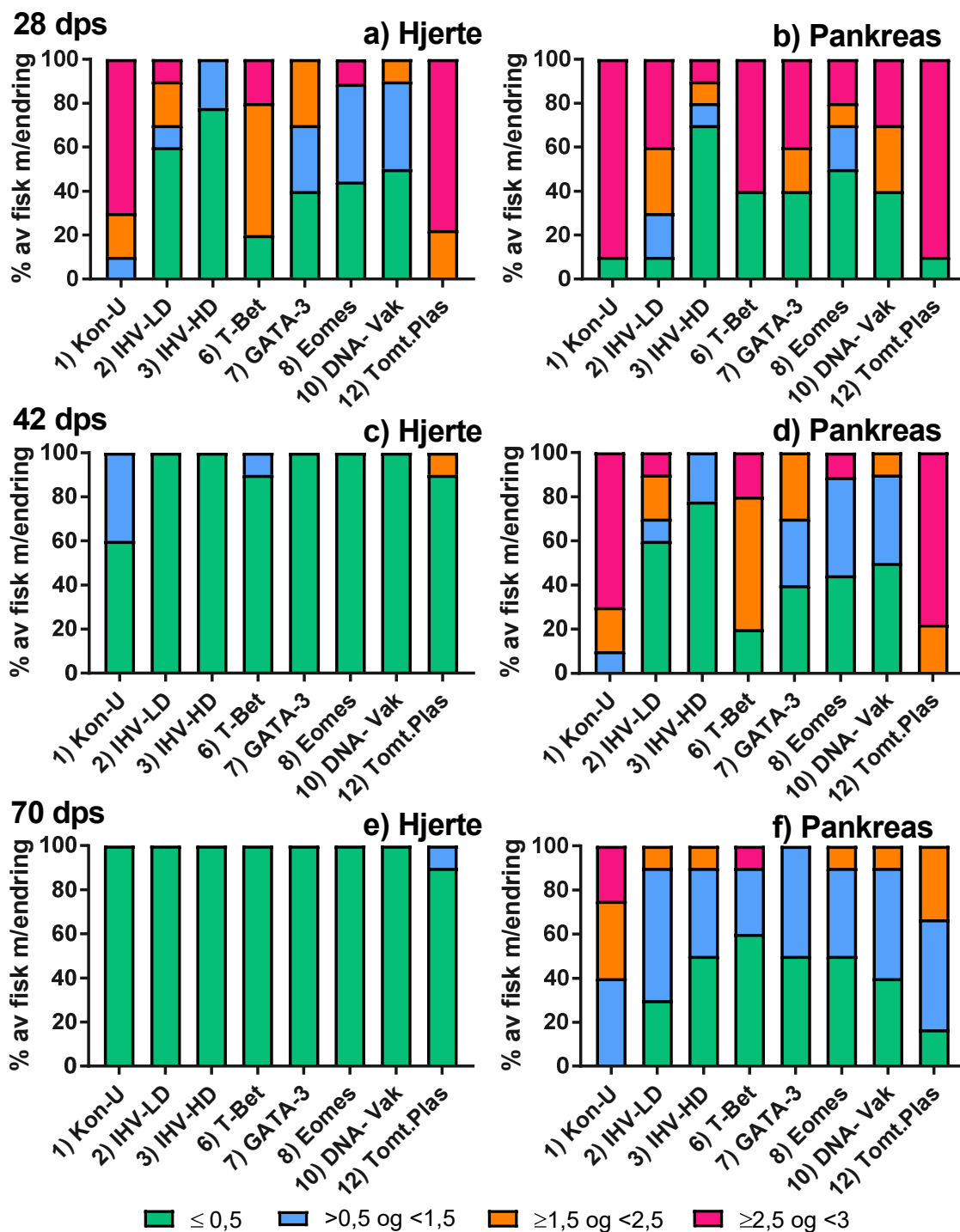
3) – *ANOVA med T-test - Signifikante forskjeller mellom vaksinene*

Hypotese₀ – Vaksinerte grupper gir like histopatologiske endringer – $u_x = u_{alle}$

Hypotese₁ – Ikke alle vaksiner gir like histopatologiske endringer – $u_x \neq u_{alle}$

(u_x – ukjent vaksine, u_{alle} alle vaksinene)

Resultater



Figur 19: Prosentvis andel av individer innad gruppene som hadde histopatologiske endringer og hvilken grad av histopatologiske endringer (histoscore) (n=10) ved 28 dps, 42 dps og 70 dps. Graderingen ble gjort etter veterinærinstituttets semi-kvantitative graderingssystem (Tabell 10).

Resultater

Resultatene (Figur 19a-f) viser prosentandelen fisk med histopatologiske endringer og hvilken grad disse ble klassifisert med. Dette ble gjort for å undersøke omfanget av individer med histopatologiske endringer i organene, samt hvilken gradering de kom ut med (histoscore). Ved 28 dps etter smitte viste flere individer i gruppene histopatologiske endringer av varierende grad. Resultatene viste at flertallet av individer i kontrollgruppene tomt plasmid og Kon-U hadde moderate til omfattende histopatologiske endringer i pankreas og hjerte. Dette gav indikasjoner på at fisken var lite motstandsdyktig mot viruset. Av vaksinerte grupper viste individene i IHV-HD mildere histopatologiske endringer både i hjerte og pankreas, dette samsvarte teoretisk med god beskyttelse. Fisk i vaksinerte gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes viste mindre histopatologiske endringer sammenlignet med gruppen IHV-LD. Dette indikerte at molekylære adjuvanser + IHV-LD kan ha induisert en bedre beskyttelse mot enn IHV-LD alene. Individene i DNA-vaksinen viste også forholdsvis god beskyttelse i form av mildere histopatologiske endringer blant individene.

Ved 42 dps og 70 dps, kom det frem at histopatologiske endringer var redusert, som gav indikasjoner på at fisken bekjempet infeksjonen, og at vevene til dels ble regenerert. Ved disse tidspunktene var histopatologiske endringer varierende, men det så ut til at vaksinene IHV-HD, GATA-3, Eomes og DNA-vaksinen forårsaket mindre histopatologiske endringer som gav indikasjoner på god beskyttelse. Fordelingen av individer med endringer viser informasjon angående smitteforløpet, istedenfor å se en jevn fordeling av histopatologiske endringer hos alle individene i gruppene, viser isteden noen individer innen samme gruppe store endringer. Da figur 19a-f ga indikasjoner på regenerative egenskaper i pankreas og hjerte hos fisk, ble dette testet statistisk (T-test). Statistiske undersøkelser anslo signifikansnivået og nullhypotesen ble forkastet hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ($p \leq 0,05$).

4) *Indikasjon på regenerative egenskaper mellom tidspunktene x, y og z (Fig. 20)*

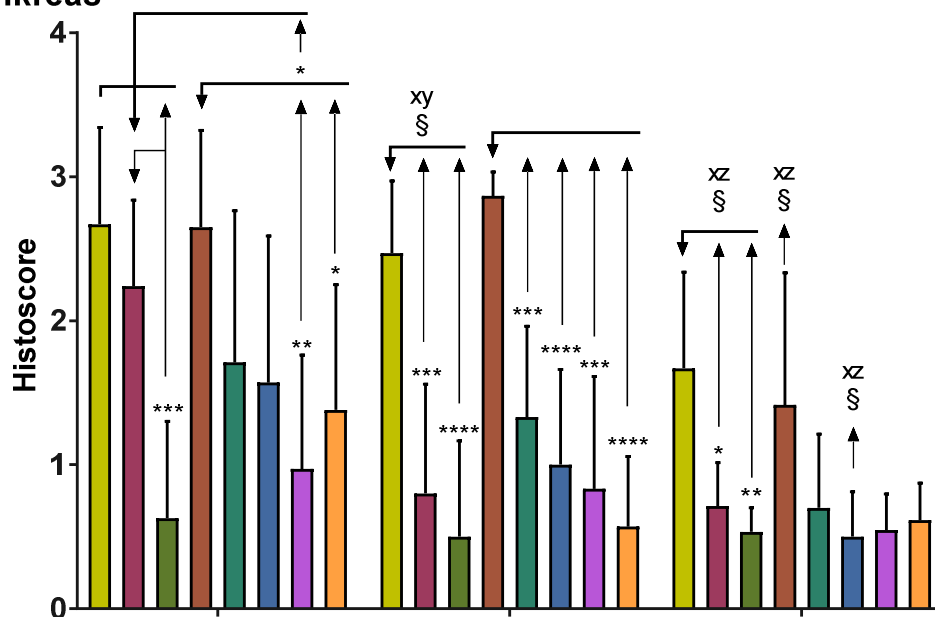
Hypotese₀ – Gruppen reduserer ikke histopatologiske endringer – $u_0 = u_1$

Hypotese₁ – Gruppen reduserer mindre histopatologiske endringer – $u_0 \neq u_1$

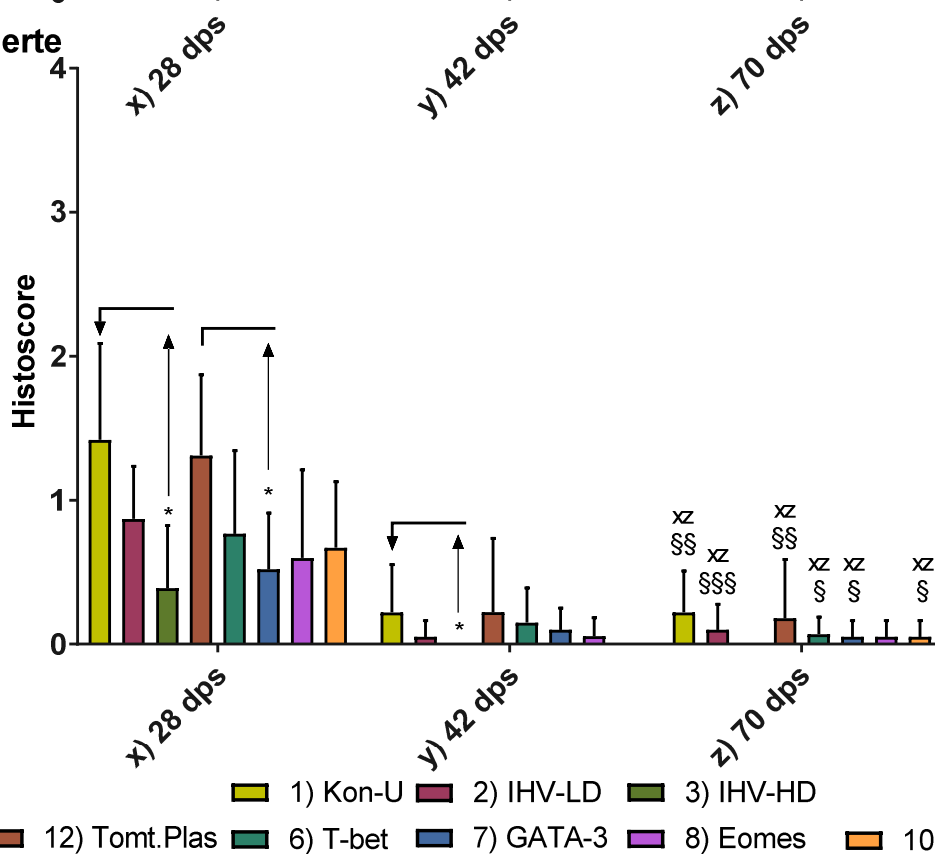
($u_0 =$ Gruppe tidspunkt (x), $u_1 =$ Gruppe tidspunkt (y,z))

Resultater

a) Pankreas



b) Hjerne



Figur 20: Gjennomsnittlig histoscore og konfidensintervall (0,95) (n=10) av pankreas og hjerte ved tidspunktene x) 28 dps, y) 42 dps og z) 70 dps (dager post smitte). Graderingsystemet ble vurdert fra 0-3, der 0 tilsvarte normalhistologi mens 3 var omfattende degenerasjoner, inflammasjon/lesjoner og diffuse nekroser i vevet. (*) indikerer signifikans ($p < 0,05$) mellom vaksinerte grupper og kontroll. (§) indikerer signifikante ($p < 0,05$) verdier i samme gruppe men ved ulike tidspunkter (x,y og z). */§= $p < 0,05$, **/§§= $p < 0,01$, ***/§§§= $p < 0,001$, ****/§§§§= $p < 0,0001$

Resultater

Ved 28, 42 og 70 dager post SAV-3 smitte, ble det observert histopatologiske endringer av varierende grad - både i pankreas og hjerte hos fisk i samtlige grupper. Pankreas og hjerte hos fisk i uvaksinerte kontrollgrupper - tomt plasmid og Kon-U (Fig. 20) viste alvorligst histoscore ved samtlige datapunkter sammenlignet med vaksinerte grupper, noe som antydte at vaksinene har induisert beskyttelse.

Pankreas

28 dager post smitte viste vaksinert gruppe IHV-HD mindre histopatologiske endringer i pankreas og dermed lavest histoscore (score 0,63) sammenlignet med alle vaksinerte grupper (Fig. 20a). Sammenlignes dette mot gruppene Kon-U (score 2,67) og IHV-LD (score 2,24) viste gruppen signifikant lavere histoscore (hhv. $p=0,0008$ og $p=0,0001$) som vil si at nullhypotesene pkt.1 og pkt.3 ble forkastet for gruppen IHV-HD. Av plasmid baserte adjuvansene og vaksinene viste pankreas i gruppene Eomes og DNA-vaksinen mindre endringer med en histoscore på hhv. 0,97 og 1,38. Sammenlignes dette mot kontrollgruppen tomt plasmid (2,65) var dette statistisk signifikant forskjell med en p-verdi for 0,0018 (Eomes) og 0,0181 (DNA-vaksine). Resterende pDNA-vaksiner viste lavere verdier for histoscore (T-bet; score 1,71 og GATA-3; score 1,57), men forskjellene var ikke signifikante. Ved testing av hypotese 2 og 3 viste gruppen Eomes signifikant forskjell mot gruppen IHV-LD med en p-verdi lik 0,01, nullhypotesen pkt.2 og pkt.3 ble dermed forkastet for denne gruppen.

42 dager post smitte (42 dps) viste resultatene mildere histopatologiske forandringer i (eksokrin) pankreas hos fisk i samtlige vaksinerte grupper, hvor gruppene IHV-HD og DNA-vaksinen skilte seg ut med minst endringer og ble graderte med en histoscore på hhv. 0,5 og score 0,57. Pankreas hos fisk i uvaksinerte kontrollgrupper (tomt plasmid og Kon-U) viste derimot omfattende degenerasjoner i eksokrin pankreas og ble gradert «dårligere» eller tilnærmet likt ved dette tidspunktet (histoscore hhv. 2,86 og 2,47). Histoscoren til resterende grupper ble beregnet til å være: IHV-LD (0,8), T-bet (1,33), GATA-3 (1,0), og Eomes (0,83). Statistiske undersøkelser i henhold til hypotese pkt.1 viste en lavere p-verdi for gruppene IHV-LD ($p=0,0008$), IHV-HD ($p<0,0001$), T-bet ($p=0,0003$), GATA-3 ($p<0,0001$), Eomes ($p=0,0003$), og DNA-vaksinen ($p<0,0001$), noe som anslo at samtlige vaksinerte grupper viste signifikante lavere histoscore sammenlignet med kontroll, nullhypotesen ble følgelig forkastet. Ved testing av hypotese pkt.2 og pkt.3 fremkom det ingen signifikante nivåer, nullhypotesene ble beholdt. Statistiske analyser gjort fra tidspunktet dag 28 til dag 42, viste pankreas hos fisk i

Resultater

gruppen IHV-LD signifikant redusert histoscore fra 1,57 til 0,8, en differanse på 0,77 ($p=0,0036$), som kan fremme forslaget om regenerative egenskaper i pankreas, nullhypotese pkt.4 ble forkastet for denne gruppen.

Vev undersøkt fra dag 70 dps, viste milde histopatologiske endringer, og kunne i noen tilfeller ligne normalhistologi. Samtlige grupper viste en reduksjon i histoscoren, dette kommer også godt frem i Figur 20a, som viser at endringene innad gruppene var milde (score 0-1,5). Kontrollgruppene Kon-U og tomt plasmid viste fortsatt dårligst histoscore i pankreas blant gruppene med en score på hhv. 1,67 og 1,41. Av vaksinerte grupper presterte GATA-3, Eomes, IHV-HD og DNA-vaksine best med tilnærmet lik score hhv. 0,5, 0,54, 0,53 og 0,61. Gruppene IHV-LD og T-bet viste litt «dårligere» score med hhv. 0,71 og 0,7. Statistiske undersøkelser mht. hypotese pkt.1 viste gruppene IHV-HD ($p=0,0038$) og IHV-LD ($p=0,0115$) signifikante forskjeller sammenlignet med sin kontrollgruppe Kon-U, nullhypotesen ble forkastet for disse gruppene. I undersøkelser gjort mht. hypotese pkt.2 og pkt.3 ble det ikke påvist signifikante forskjeller, null hypotesene ble beholdt. Statistiske undersøkelser gjort for å undersøke eventuelle regenerasjon av pankreas, viste signifikant reduserte verdier fra dag 28 til dag 70 i gruppene tomt plasmid ($p=0,232$), IHV-LD ($p=0,0002$) og GATA-3 ($p=0,048$), nullhypotese pkt.4 ble forkastet.

Hjerte

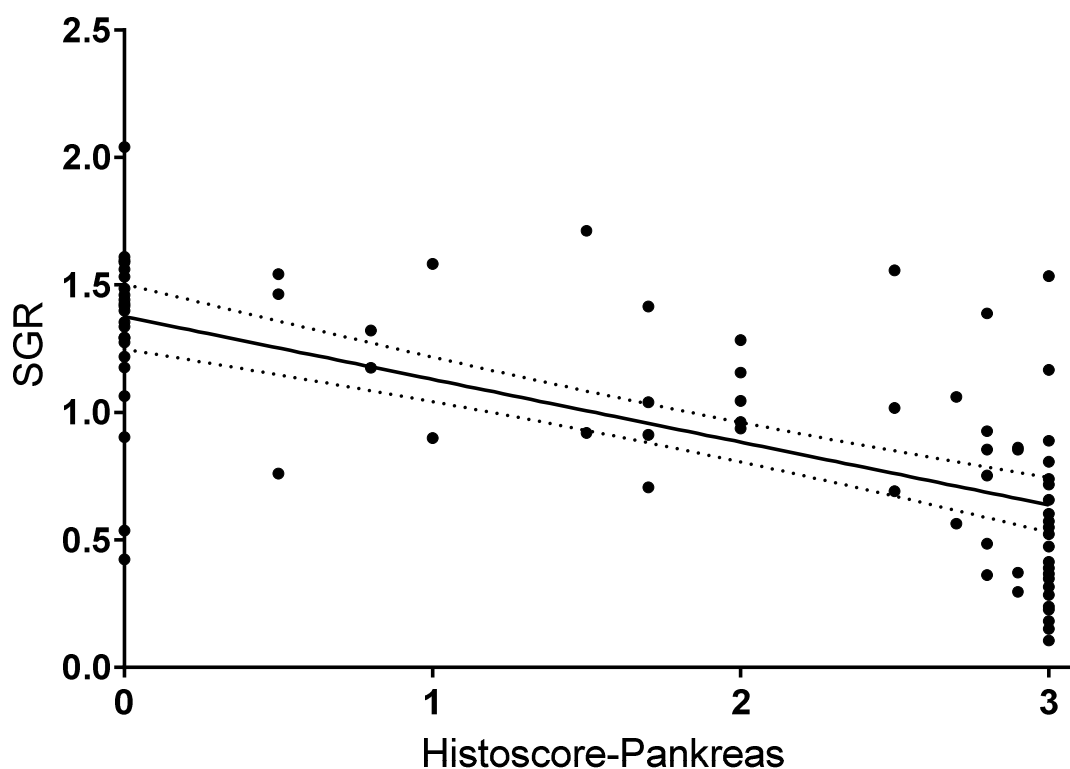
Ved 28 dps (Figur 20b) viste histoscoren mildere endringer i hjertet sammenlignet med pankreas ved samme tidspunkt hos samtlige grupper. Av inaktiverte virusvaksiner viste både IHV-LD og IHV-HD mildere endringer i forhold til Kon-U med en score på hhv. 0,87 og 0,39 mot 1,42. Ved statistiske undersøkelser viste gruppen IHV-HD signifikant forskjell mot fisk i gruppen Kon-U ($p=0,0188$), nullhypotese pkt.1 ble forkastet. I fiskegruppene behandlet med pDNA presterte GATA-3 godt med mildere histopatologiske endringer, med en histoscore på 0,52. Statistiske undersøkelser viste også at dette var signifikant nivå sammenlignet med kontrollgruppen tomt plasmid (1,31) ($p=0,0188$), nullhypotese pkt.1 ble forkastet for denne gruppen. Hjerte hos fisk i resterende grupper viste også mindre endringer; T-bet (score 0,76), Eomes (score 0,6) og DNA-vaksine (score 0,67). Statistisk ble det målt ingen gruppeforskjeller.

Ved 42 dps og 70 dps viste hjerte generelt mindre histopatologiske endringer både i epikard, kompakt og spongiøs hjertemuskel - i samtlige grupper, hvor histopatologiske endringer var blitt redusert tilnærmet lik det som fins ved normalhistologi. Beregninger gjort med hensyn til

Resultater

nullhypotesene pkt.1, 2 og 3. viste signifikante forskjeller ved 42 dps mellom gruppen IHV-HD og Kon-U ($p=0,0038$), hvor nullhypotese pkt.1 ble forkastet. Fokuset og undersøkelser gjort på regenerative egenskaper i henholdt til statistiske undersøkelser ble gjort ved tidspunktet dag 28 og dag 42, hvor det ble påvist signifikante forskjeller i gruppene; IHV-LD ($p=0,0009$), tomt plasmid ($p=0,0019$), T-bet ($p=0,024$) nullhypotese pkt.4 ble forkastet.

For å undersøke sammenhengen mellom histoscore og vekst, ble SGR-verdiene plottet mot histoscoren til pankreas og beregnet på individbasis ved hjelp av lineær regresjon (Fig. 21). Dette viste en klar sammenheng mellom vekst og histopatologiske endringer i pankreas, der individer med mindre histopatologiske endringer i pankreas også viste bedre tilvekst (SGR). I denne undersøkelsen ble det ikke tatt hensyn til gruppene, kun tilvekst og histoscore hos individene. Dette ble også gjort for histoscoren til hjertet, hvor resultatene viste antydninger til tilsvarende trend (Appendiks 4, Fig. 25).



Figur 21: SGR plottet mot histoscore i pankreas (28 dps) og beregnet med lineær regresjonsanalyse. Konfidensintervallet (0,95) er presentert som stipulert linje. $N=80$.

4 Diskusjon

Transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes har en nøkkelrolle i reguleringen og differensieringen av hhv. TH₁ og TH₂ celler samt cytoksiske T-celler. Hovedmålet i studiet var å undersøke om molekylære adjuvaner (T-bet, GATA-3 og Eomes) satt inn i plasmider i kombinasjon med antigen basert vaksine induerte ytterlig sykdomsbeskyttelse hos atlantisk laks – sammenlignbart med kommersielle vaksiner (fra Pharmaq og MSD), samt eksperimentelle vaksiner mot salmonid alphavirus subtype 3 (SAV-3). Vaksinen IHV-LD kan prinsipielt være sammenlignbar med kommersielle vaksiner fra Pharmaq og MSD. Vaksiner med høy dose av inaktivert antigen (IHV-HD) og DNA-vaksine har vist god beskyttelse i tidligere studier (Chang et al., 2017; Munang'andu et al., 2013a).

Tilvekst og antistoff respons ble benyttet for å avdekke vaksinenes effekt i et immuniseringsforsøk. Deretter ble fisken smittet med SAV-3, hvor fokus var å undersøke vaksinenes effekt mht. vekst, histopatologiske forandringer i pankreas og hjerte samt antistoffrespons etter smitte. Dette gav perspektiv på hvordan fisken håndterte infeksjonen.

4.1 *In vitro* studier

4.1.1 Uttrykk av kodende gen i CHSE-214 -celler (*in vitro*)

En forutsetning for at genene T-bet, GATA-3 og Eomes skulle indusere beskyttelse var at disse ble uttrykt i celler. Det ble derfor undersøkt hvorvidt transkripsjonsfaktorene ble uttrykt i cellelinje fra fisk. Genene for T-bet, GATA-3 og Eomes ble klonet inn i pTagRFP (RFP: reporter gen). Sekvensering av plasmidene bekreftet at gen for disse tre hadde blitt ligert i ryggradsplasmidet, og nedstrøms for reporter genet. Etter transfeksjon av plasmidene i CHSE-214 ble alle tre gen uttrykt – undersøkt ved fluorescens mikroskopi. RFP ble uttrykt både i cytoplasma og cellekjerner. Disse plasmidene ble benyttet som molekylære adjuvaner videre inn i vaksineforsøket. Tidligere studier har også bekreftet uttrykk av transgent protein *in vitro* ved bruk av ulike plasmid DNA i cellelinjer (Ojima et al., 1999; Petterson et al., 2016; Zheng et al., 2010)

4.2 Immunisering

4.2.1 Uttrykk av plasmid kodende transkripsjonsfaktorer

For å bekrefte uttrykk av T-bet, GATA-3 og Eomes *in vivo*, ble det tillaget histologiske snitt fra muskel ved injeksjonsstedet 42 dager etter injisering av plasmid (42 dpi). Analyser med fluorescens mikroskop bekreftet uttrykk av «RFP-proteinet» (Fig. 11) i fiskemuskel (mest i muskelcellekjerner) hos fisk i gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes. Andre studier har tidligere bekreftet opptak og uttrykk av ulike plasmid kodende protein i beinfisk med forskjellige vektorer og markører (Herweijer & Wolff, 2003; Hølvold et al., 2013; Hølvold et al., 2014; Tonheim et al., 2008b). Dette gjelder også etter injeksjon hvor det har blitt påvist re-distribuering av plasmidet i verten, og rekombinante genuttrykk har blitt påvist i blant annet milt og nyre (Romøren et al., 2004; Sudha et al., 2001; Tonheim et al., 2008a; Zheng et al., 2010).

4.2.2 Tilvekst

Det var et mål å dokumentere eventuelle bivirkninger fra vaksinene ved immunisering og smitte – i form av redusert vekst. Vekst er et av mange elementer som benyttes innen fiskevelferd (Huntingford et al., 2006). Fokuset på vekst var av høy prioritet siden redusert vekst kan øke økonomiske negative konsekvenser for oppdrettere samt av velferdsmessige årsaker. Det finnes flere metoder som kan illustrere vekstraten og vekstforskjeller til fisken, disse er blant annet; vekstfaktor, TGC (thermal growth coefficient) og SGR (spesifikk vekst rate) (Jobling, 2003). Det har i tidligere forsøk blitt påvist at temperatur og fôringsregime har innvirkning på vekstraten til atlantisk laks (Koskela et al., 1997). Da temperatur og fôringsregime var konstant gjennom hele forsøket, var det derfor ikke nødvendig å ta hensyn til disse parameterne ved beregning av vekstforskjeller. Fordelene med SGR er at forskjeller blir beregnet logaritmisk hvor fokuset kun er vektdifferansen mellom to tidspunkt delt på antall dager i tidsperioden. Eventuelle mindre vekstforskjeller mellom individene ved forsøkstart vil ikke ha innvirkning på beregnet SGR-verdi. Da vi benyttet pitTag som markør for fisk hvor alle individdringer kunne spores, vil SGR beregnet med hensyn til individforandringer gi et godt bilde av veksthastigheten til fisken i de ulike gruppene.

I flere forsøk har det fremkommet at stresset fisk også reduserer veksthastigheten og fôrintak. Enten det er etter behandling, sykdom eller andre faktorer som induserer en stressrespons i fisk (Huntingford et al., 2006). Siden vekst og utvikling er fysiologisk funksjonelt sammenkoblet,

vil også eventuelle stressorer ha innvirkning på modning, immunsystemet og andre viktige mekanismer *in vivo* (Pickering et al., 1991; Pottinger et al., 1994; Weyts et al., 1999). Veksthastighet kan derfor bli brukt som en indikator på robustheten til fisken. Fokuset på vekst i dette studiet, både ved immunisering og smitte blir derfor brukt som en indikator på trivsel, velferd og robusthet samt effekten/beskyttelsen til vaksinene under infeksjon.

4.2.3 Tilvekst etter immunisering

Vaksinering medfører stikksår og brudd på fiskens hudbarriere, noe som kan svekke fiskens naturlige forsvar mot infeksjoner. Derfor er det viktig å opprettholde god hygiene under vaksinering. I tillegg har det blitt observert bivirkninger etter injeksjonsvaksinering med ulike antigen leveringer – blant annet med ulike oljeadjuvanser, som kan føre til redusert velferd og vekst (Midtlyng et al., 1996; Rønsholdt & McLean, 1999; Sørum & Damsgård, 2004). Andre studier har derimot vist økt vekst etter vaksinering mot bakteriesykdommene (*Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* og *Vibrio anguillarum*) (Buchmann et al., 1997). Studier utført på røye (*Salvelinus alpinus*) har vist at vaksinering mot (*Aeromonas salmonicida*) har ingen effekt på vekst. Dette viser at det er motstridende resultater, hvor utfallet og resultatene kan stamme fra ulike håndtering og sammensetning av vaksinene. Derfor var fokus tilvekst etter immunisering, og undersøkelser om ulike antigenlevering mot pankreas sykdom kunne påvirke vekst etter administrering.

Fiskens vekt og lengde ble målt ved 0 dpi - altså ved immuniseringsstart. Det ble foretatt to immuniseringer ved to ulike tidspunkter, hvor gruppe 1-8 ble immunisert tre uker før gruppe 9-12. Derfor ble det tatt ekstra prøveuttak (gruppe 9-12) for å kompensere for tidsforskyvningen, slik at immuniseringen hadde kommet like langt i alle gruppene. Faktorer som oksygen, lys, oksygenmetning og foringsregime var konstant og uendret for alle grupper både før og etter immunisering, og skal derfor ikke være avgjørende faktorer ved forskjeller målt som vekt, samt spesifikk tilvekst (SGR). Ved immuniseringstidspunktet for fisk i gruppe 1-8 var vekt og lengde tilnærmet lik for all fisk, og det ble ikke registrert signifikante gruppeforskjeller. De samme kriteriene gjaldt under immuniseringen av gruppe 9-12 hvor det heller ikke ble målt signifikante gruppeforskjeller mht. vektforskjeller (Appendix 1, Fig 22- 0 dpi).

Med hensyn til tidsforskyvningen ble det gjort undersøkelser på om dette påvirket veksten mellom gruppene immunisert ved ulike tidspunkt, slik at eventuelle ulikheter ble tatt til betraktning ved smitte. Gjennomsnittsvekten hos fisk i gruppe 1, 2, 3, 6, 7, 8 viste derimot

Diskusjon

signifikante forskjeller mot gjennomsnittsveksten hos fisk i gruppe 10 og 12 ved tidspunktet for immunisering. Dette viste at immunisering (og håndtering) kan redusere tilvekst hos laks, sammenlignet med ubehandlet laks. Hvor eksakt lenge en slik reduksjon av tilvekst varer vet vi ikke, men ut fra våre studier var dette en vedvarende trend gjennom hele immuniseringsforsøket. Forskjellen kan selvfølgelig stamme fra at gruppe 10 og 12 hadde lengre vekstperiode (3 uker) sammenlignet med gruppe 1, 2, 3, 6, 7 og 8. Et studie gjort på atlantisk laks, hvor vaksinasjon ble foretatt på fisk av ulik størrelse, viste at større fisk ved vaksinasjonstidspunktet fikk bedre tilvekst, og mindre bivirkninger etter vaksinerings (Berg et al., 2007; Berg et al., 2006; Rønsholdt & McLean, 1999).

For å «utjevne» eventuelle vektforskjeller ved forsøksstart og tidsforskyvningen ble SGR beregnet og benyttet som en indikator for daglig vekst. Teoretisk sett skal veksten være lik i samtlige grupper, hvis behandlingen (immunisering) og tidsforskyvningen ikke har induisert noe form ekstra påvirkninger. Det var således interessant at SGR-verdiene viste signifikant høyere daglig tilvekst i gruppene 10 og 12 som kan indikere at immunisering ved et senere tidspunkt har innvirkning på vekst. Noe som avkreftet denne påstanden kom frem ved sammenligning av fisk i uvaksinert kontrollgruppe (Kon-U) med fisk i gruppen tomt plasmid, hvor gruppen Kon-U også burde ha tilsvarende tilvekst siden fisk i denne gruppen var ubehandlet. Dette indikerte at størrelse på fisken ved vaksinasjonstidspunktet kunne ha noe å si mht. vekst etter vaksinerings. En viktig faktor å ta med i vurderingen var at fisken ble gradvis tilvent sjøvann etter vaksinerings. Smoltstatus, som ble undersøkt og funnet god på et utvalg fisk (10 fisk), trengte ikke representere smoltstatus for samtlige fisk i alle gruppene. Studier har dokumentert at parr eksponert for høye saliniteter kan få redusert og/eller stagnert tilvekst (Duston, 1994; McCormick et al., 1989). Andre feilkilder som kan forårsake vekstforskjeller kan være fôringsregimet, der fisk i gruppe 10 og 12 kan ha blitt underfôret, og hvor det forekommer kompensasjonsvekst etter vaksinerings og flytting (Nikki et al., 2004). Da fôr ble distribuert automatisk og mengden ble beregnet etter antall individer og biomasse, er dette lite trolig.

Den eventuelle feilkilden påvirker ikke immuniseringsforsøket i stor grad, hvor hensikten var å undersøke om vaksinerings medfølgende ulike antigen kunne føre til redusert vekst. Dette avkreftes ved statistiske undersøkelser hvor kontrollgruppe Kon-U (1) sammenlignet med gruppene IHV-LD (2), IHV-HD (3), T-bet (6), GATA-3 (7) og Eomes (8) viste ingen signifikante vekt og/eller vekstforskjeller (SGR). Kontrollgruppen 12 (tomt plasmid) antydde

større tilvekst enn gruppe 10 (DNA-Vaksinen), men dette kan ikke støttes av statistiske undersøkelser som viste ingen signifikante forskjeller. Dette gir indikasjoner på at de ulike antigenleveringene ikke influerer tilvekst etter immunisering.

4.3 Smitteforsøk

Studier med SAV-2 og SAV-3 har vist at viruset forårsaket varierende dødelighet, oftest er dødeligheten lav (Jansen et al., 2017). Veksten hos smittet fisk påvirkes derimot i større grad og reduseres ofte betydelig. I et smitteforsøk gjort med SAV-2 og SAV-3 (100 µl 1×10^4 TCID₅₀) forårsaket virusinfeksjon dødelighet (hhv. 2,4 % og 14,7% kumulativ dødelighet), og vekten til fisk som ikke var smittet (kontroll) var etter 12 uker 151,2 g, mens gjennomsnittsvekten var 118,5 g for SAV-3 og 105,7 g for SAV-2 infisert fisk (Taksdal et al., 2015). I andre smitteforsøk hvor fisk ble vaksinert med kommersielle vaksiner basert på inaktivert SAV-3 antigen i oljeadjuvans (Norwax Compact PD, MSD) viste vaksinen positiv effekt på vekst sammenlignet mot uvaksinert kontrollgrupper, hvor det ble dokumentert høyere veksthastighet i vaksinert fisk og lavere kumulativ dødelighet (Jensen et al., 2012).

Smittemodellen (intraperitonealt injeksjon av SAV-3) ble valgt mht. å smitte samtlige individer under like premisser og samme virustiter, samt oppnå en rask systemisk infeksjon. Dette gav et godt grunnlag for å fastslå eventuelle gruppeforskjeller i henhold til vaksinsens effektivitet og beskyttelse – sammenlignet med smittemodeller basert på badesmitte eller kohabitant smitte (Munang'andu & Evensen, 2018). Tidligere studier og smittemodeller med SAV har rapportert dødelighet (Karlsen et al., 2012; Taksdal et al., 2015; Xu et al., 2012). I dette forsøket var det derfor forventet at det kunne oppstå dødelighet med smittemodellen. Smitteforsøket vårt viste nærmest ingen dødelighet blant gruppene, kun ett individ fra kontrollgruppe (kontroll uvaksinert), denne fisken ble også observert med omfattende sårskader som også kunne være dødsårsaken. Med hensyn til lav dødelighet ble det bestemt å holde et større fokus på endringer i vekt og tilvekst (SGR) i smitteforsøket. Årsaken til lav dødelighet kan være så mangt, men studier har vist at ulike virusisolater (for eksempel influensa virus) fra samme familie og subtype kan inneha varierende virulens (Nelson & Williams, 2013; Scholtissek, 1994; Webster et al., 1982).

Før smitteforsøket startet ble fisken overført fra Tromsø havbruksstasjon til fiskehelselaboratoriet, dette kunne ha inducere stress samt ført til ubehag for fisken, transportindusert stress har vært rapportert før (Iwama, 2011). For å unngå at dette hadde

Diskusjon

innvirkning på smitteforsøket ble fisken etter transporten (100m) akklimatisert i 3 dager for å redusere stress frem til smittetidspunktet.

Gjennomsnittsvekten i gruppene viste tilnærmet lik startvekt ved tidspunktet for smitte (0 dps), og vektene varierte 143 g (DNA vaksine) til 151 g (Eomes) - en differanse på 8 gram. For å fastslå eventuelle gruppeulikheter mht. vekt ble det gjort statistisk sammenligninger som viste ingen signifikante gruppeforskjeller. Vektforskjellene som fremsto i immuniseringsforsøket hadde da utlignet seg.

Andre smitteforsøk med SAV har vist at større forandringer mht. histopatologiske- og vektendringer fremkommer senere i smitteforløpet, og omfanget samsvarer med valg av smitemodell, virulensen og mengde injisert virus (Braceland et al., 2013; Graham et al., 2011; Jansen et al., 2017; Taksdal et al., 2015). I de nevnte studiene ble det observert vekstendringer og inflammasjon 2-4 uker (14-28 dager) etter smitte. Det ble diskutert at dette kan variere og gjerne blir påvirket av vanntemperatur, foringsregime og eventuelle vaksiner. Ved prøveuttaket gjort 7 dager post smitte (7 dps) var det derfor ikke forventet store vektforskjeller mellom gruppene, og resultatene viste tilnærmet lik vekt og SGR-verdier. Samtlige grupper viste generell vektøkning. Det fremkom med andre ord ikke mye informasjon med hensyn til vekt og vektendringer i vaksinerte grupper, kontrollgruppen Kon-U viste antydninger til noe redusert tilvekst (SGR). Forklaringen kan være inkubasjonstiden til virus og vertens mottakelighet (K. E. Nelson & Williams, 2013).

28, 42 og 70 dager post smitte viste begge kontrollgruppene lavere vekt og spesifikk tilvekst sammenlignet med vaksinerte grupper. Dette indikerte at samtlige vaksiner har hatt effekt og induerte en beskyttelse mot viruset. Dette ble også bekreftet ved statistiske undersøkelser hvor fisk i flere vaksinerte grupper viste signifikant høyere vekt og spesifikk tilvekst enn fisk i kontrollgruppene. Noen grupper skilte seg ut og viste god tilvekst gjennom hele smitteforsøket. Dette gjaldt spesielt fisk i gruppen IHV-HD som ble vaksinert med høy virusdose, dette indikerte god beskyttelse mot viruset. Gruppen vaksinert med lav virusdose (IHV-LD) fungerte som en referanse for flere vaksinegrupper (for eksempel MSD og Pharmaq sine vaksiner, til dels også T-bet, GATA-3 og Eomes), individene behandlet med denne vaksinen presterte generelt dårligere i vekstforsøket og viste i noen tilfeller ingen signifikant tilvekst sammenlignet med kontrollgruppen (Kon-U). Sett dette i sammenheng med vekstøkningen hos fisk i IHV-HD gav dette indikasjoner på at virusdosen (titer) også samsvarte med beskyttelse.

Diskusjon

Den samme analogien kan gjennomføres for gruppene vaksinert med lav dose antigen pluss molekylære adjuvans, gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes viste i noen tilfeller høyere vekt og tilvekst (SGR) enn gruppen vaksinert med IHV-LD, og avsluttet vekstforsøket med tilnærmet lik vekt som gruppen vaksinert med høy virusdose (IHV-HD). Tas dette til vurdering kan det hende at molekylære adjuvanser fremmer en immunrespons kraftigere enn ordinære inaktiverede virusvaksiner. Dette har også blitt foreslått i andre studier (Dalmo, 2018). Det som kan svekke denne påstanden er tidspunktet dag 28, hvor gruppen IHV-LD viste tilsvarende eller bedre vekst enn T-bet, GATA-3 og Eomes. Av gruppene vaksinert med molekylære adjuvanser presterte Eomes og GATA-3 best gjennom hele vekstforsøket etter smitte, mens fisk i gruppen T-bet viste dårlig vekst tidlig i infeksjonsfasen. Fisk i denne gruppen avsluttet fremdeles blant gruppene som viste høyst vekt. Dette antyder kanskje kompensasjonsvekst og beskyttelse. DNA vaksinen presterte godt gjennom hele forsøket sammenlignet med resterende grupper. Ved avsluttet forsøk, viste fisk i gruppen noe redusert vekst, men forskjellene var minimale sammenlignet med IHV-HD vaksinert fisk og fisk som fikk plasmid kodende for molekylære adjuvanser - som presterte i det øvre sjiktet. Da DNA-vaksinen teoretisk skal simulere en «ekte» infeksjon da plasmidet med «genene av interesse» uttrykkes intracellulært, vil dette i teorien føre til en cytotoxisk (antiviral) respons, og samtidig en antistoff respons om transgent protein blir tatt opp og presentert i APC (Dalmo, 2018). Det er derfor interessant at gruppene Eomes, GATA-3 og IHV-HD presterte tilnærmet likt og/eller bedre mht. tilvekst enn DNA-vaksinen ved noen tidspunkt. Om behandlingen ved bruk av plasmider kodende for transkripsjonsfaktorer er med på å differensiere T-celler til for eksempel effektor TH₁, TH₂ og cytotoxiske T-celler har vi ikke holdepunkter for. Det som er kjent er at injeksjon av plasmider kodende for GATA-3 og T-bet inducerer høyere uttrykk av GATA-3 og T-bet i muskel, men også nedstrøms cytokiner som IL-4/13 og IFN- γ (ikke publiserte resultater). IL-4/13 er vist seg å indusere høy antistoff respons i fisk (Zhu et al., 2012), mens IFN- γ har blant annet blitt funnet til å indusere antivirale gener (Zou et al., 2005). Videre har det blitt vist at Eomes uttrykk i milt lymfocytter etter stimulering korrelerer med økt IFN- γ og granzym A (produkt fra cytotoxiske T celler) (Kumari et al., 2013). Det er nærliggende å tro at de molekylære adjuvansene som vi benyttet bidro til økt respons/beskyttelse mot SAV-3. Transkriptomanalyser samt QPCR vil kunne gi svar om disse adjuvansene bidro til økt uttrykk av sentrale gener som styrer forsvaret mot SAV-3.

4.3.1 Antistoffrespons - ELISA og virus nøytraliserings analyse

For å avdekke antistoffresponsen i de ulike gruppene ble ELISA og virus nøytraliserings analyser gjennomført. Disse gir indikasjoner på antistoffmengden mot et gitt antigen. For å bekrefte at antistoffnivået målt ved ELISA (OD-verdien) samsvarer med en god nøytraliserende effekt ble det utført virus nøytraliserings analyse som gir ytterligere informasjon om hvorvidt en høy/lav antistoffrespons også har god nøytraliserende effekt ovenfor viruset. Tidligere har det blitt rapportert smitteforsøk med SAV-3 hvor disse analysene etter DNA-vaksinasjon og vaksinasjon med inaktiverte helvirusvaksiner er utførte (Chang et al., 2017; Xu et al., 2012). Studiene viste varierende resultater, men at antistoffresponsen korrelerte med antigenleveringen samt «genet av interesse». Derfor kan det være problematisk å stadfeste en antistoffterskel som indikerer god beskyttelse mot SAV-3. Det er heller ikke utviklet en standardanalyse for ELISA – noe som gjør det problematisk å sammenligne resultatene, da studiene har brukt forskjellige parametere som for eksempel andre antistoffer og fortynninger som vil kunne gi utslag på OD-verdien.

En utfordring ved å sammenligne de ulike vaksinene vil også være de ulike leveringsmåtene. For eksempel den rekombinante DNA-vaksinen samt plasmidene som kodet for de molekylære adjuvansene brukt i dette studiet, ble injisert med $1\mu\text{g g}^{-1}$ fisk intramuskulært, mens de inaktiverte helvirus vaksinene ble injisert intraperitonealt. Dette gir ulike parametere for induksjon av immunresponser i fisken. Hva dette fører til, i form av lokal versus systemisk immunrespons vet vi ikke.

Endringer i antistoffresponsen for gruppene undersøkt i dette studiet ble delt inn i to faser, immuniseringsforsøket og smitteforsøket. I immuniseringsfasen viste resultatene antistoffrespons i serum 70 dager etter immunisering, denne perioden med hensyn til andre studier burde være tilstrekkelig for at fisken skal kunne indusere en god antistoffrespons mot antigenene (Erdal & Reitan, 1992; Munang'andu et al., 2013a; Nakanishi & Ototake, 1997; Xu et al., 2012). Hensikten var å undersøke hvilke vaksiner som induserte en god antistoffrespons, som også kunne antyde indusert beskyttelse fra vaksinen. For inaktiverte helvirusvaksiner har det vist seg at etter immunisering vil også antistoffresponsen korrelere med vaksinens induserte beskyttelse, da antistoffresponsen teoretisk skal toppe seg ved en terskel som også representerer fisken immun reaksjon mot vaksinen (Munang'andu & Evensen, 2018). Dette ble undersøkt nærmere, hvor SGR verdiene til gruppene IHV-LD, IHV-HD og tomt plasmid fra dag 28 etter

Diskusjon

smitte ble plottet mot OD-verdiene til samme grupper 70 dager etter immunisering (Appendix 3- figur 24). Dette viste en tydelig trend, hvor det kan trekkes paralleller mellom høye OD-verdier og god tilvekst innledende i smittetesten.

I henhold til resultatene fra ELISA analysen viste serumprøver fra fisk i vaksinert gruppe GATA-3 høyest OD-verdier, etterfulgt av IHV-HD, T-bet og Eomes som også viste høye OD-verdier. Trekket paralleller mellom gruppene T-bet, GATA-3, Eomes og IHV-HD mot gruppen IHV-LD gav dette indikasjon på at både antigendosen (virustiter) i inaktiverede virusvaksiner og «molekylære adjuvansene» kan inducere en sterkere antistoffrespons mot SAV-3. Med hensyn til resultatene presentert i nøytraliseringsanalysen kan det trekkes noen paralleller mellom OD-verdien og antistofftiteren i nøytraliserings analysen. Serumprøver fra fisk i gruppene T-bet og Eomes viste høye OD-verdier (ELISA), men lav nøytraliserende effekt, som vil si at høye OD-verdier behøver ikke med dette å samsvare med god nøytraliserende effekt mot viruset. Det kan selvfølgelig være flere årsaker til dette, eksakt hva som har skjedd er usikkert, men et forslag kan være at antistoffene har ulik affinitet mot antigenet (Magor, 2015). Virus nøytraliserings analysen bekrefter derimot at høye OD-verdier samsvarer med god nøytraliserende effekt i serumprøver fra fisk i gruppene IHV-HD og GATA-3. Interessante funn i disse gruppene er at serumprøver fra fisk i GATA-3 gruppen viste høyere OD-verdier sammenlignet med gruppen IHV-HD, men i nøytraliseringsanalysen var det en motsatt tendens. Dette kan igjen kanskje forklares med at gruppen IHV-HD «bedre» immunisert, og antistoffene hadde høyere affinitet mot viruset. Av vaksinerte grupper viste fisk i gruppen DNA-vaksinen lavest antistoffrespons. Studier gjort med rekombinante DNA-vaksiner, sub-enhetsvaksiner og inaktiverede helvirus vaksiner mot SAV-3 viste tilsvarende resultater i et annet forsøk (Xu et al., 2012), OD-verdiene til rekombinante DNA-vaksiner hvor «genet av interesse» var basert på ulike subenheter (E1 og E2) fra viruset (SAV-3), resulterte i en lavere eller tilnærmet lik antistoffrespons sammenlignet med inaktiverede helvirus vaksiner og sub-enhetsvaksiner etter immuniseringen. Disse resultatene ble videre undersøkt med nøytraliserings analyse hvor det fremkom at proteinvaksiner basert på sub-enheter SAV-3-E2 og inaktiverede helvirus vaksiner viste god nøytraliserende effekt ovenfor viruset. Et annet studie gjort med rekombinante DNA-vaksiner og Norwax Compact PD (MSD) mot SAV-3 (Chang et al., 2017), ble det undersøkt ulike plasmider basert på gen sekvensen fra viruset E3-E2-6K-E1 (komplett struktur/genom til viruset) tilsvarende plasmidet i dette forsøket, samt et plasmid med sekvenser basert på sub-enheter til viruset (E2-proteinet (Brown et al., 2018)). Resultatene viste

Diskusjon

at ved 70 dager etter immunisering at DNA-vaksinen- E3-E2-6K-E1 induerte en sterkere immunrespons og viste både høyere OD-verdier og bedre nøytraliserende effekt mot SAV-3 viruset sammenlignet med kommersielle vaksiner (Norwax compact PD) (Chang et al., 2017). Dette forsøket motstrider resultatene presentert i vårt studie, hvor utfallet var omvendt og DNA-vaksinen viste en lavere antistoffrespons sammenlignet med inaktiverte helvirusvaksiner. Årsaken til dette er usikkert.

I smittefasen vil antistoffene ha en nøytraliserende effekt mot viruset i verten og binde dette *in vivo*. Det vil da være et netto forbruk av spesifikke antistoffer, og følgelig ved blodprøve taking vil serumfraksjonen inneholde mindre spesifikke antistoffer. Det vil si at fisk kan i realiteten ha en god immunrespons, men dette blir ikke registrert i antistoffanalysene. Smitteforsøk som har brukt antistoffrespons som indikator på beskyttelsen til ulike vaksiner, har vist en trend. En trend er at vaksiner inneholdende høy dose antigen, har også vist seg å induere god antistoffrespons i immunfasen (Munang'andu & Evensen, 2018). Et smitteforsøk gjort med IPNV (infeksiøs pankreas nekrose virus) har foreslått at fisk vaksinert med mindre potente vaksiner blir smittet tidligere enn fisk som har fått høy potente vaksiner. Det ble foreslått en korrelasjon mellom lav potente vaksiner og høy potente vaksiner før og etter smitte - hvor lav potente vaksiner induerer en kraftigere antistoffrespons etter smitte sammenlignet med høypotente vaksiner som gav lavere antistofftiter (Munang'andu et al., 2012). I dette studiet viste vaksinene IHV-HD og GATA-3 tilsvarende trend, med god antistoffrespons i immuniseringsfasen, men i smittefasen viste gruppene lavere antistoffrespons og nøytraliserende effekt. Anser man vekst som en indikator på beskyttelse vil SGR-verdiene støtte denne påstanden, men det kreves ytterligere analyser som kan måle virusmengden i individene for å bekrefte denne teorien.

Ved beregning av antistoff titeren og nøytraliseringseffekten ovenfor SAV-3 viruset i serumet hos fisk i gruppen DNA-vaksine viste disse lav antistoffrespons etter immuniseringen. Antistoffproduksjonen økte betydelig i smittefasen, spesielt for DNA-vaksinen. Et forslag vil være at denne vaksinene kanskje har induerte beskyttelse i form av immunologisk hukommelse (Nakanishi et al., 2015; Restifo et al., 2000; Secombes & Belmonte, 2016), og det vil i denne gruppen være viktig å ta hensyn til at antistoffproduksjonen i immuniseringsfasen ikke nødvendigvis samsvarer med virus beskyttelsen induert av vaksinen. DNA-vaksinasjon har vært en lovende strategi for å kontrollere infeksjoner forårsaket av intracellulære patogener i beinfisk (Dalmo, 2018; Restifo et al., 2000). En unik egenskap til vaksinen vil være at den

Diskusjon

teoretisk kan indusere både en cellulær og humoral immunrespons, og samme responser har blitt foreslått ved bruk av molekylære adjuvanser (Dalmo, 2018). Studier gjort med DNA-vaksiner mot SAV-3 har vist varierende utfall, og det foreslås at genuttrykket for «genet av interesse» har en sentral rolle i immuniseringen og beskyttelsen, hvor det har blitt testet ulike SAV-3 sekvenser og deres effekt (Chang et al., 2017; Xu et al., 2012).

ELISA og virus nøytraliseringstester er relativt uprøvd mot viruset SAV-3, for fremtidige undersøkelser kreves det at analysene finjusteres med antistoffer, virustiter, fortynninger og substrat som kan ha innvirkning på resultatene. Problemer som oppstod ved ELISA analysen var at antistoffene bandt antigen heller svakt. Løsningen på dette førte til at «coatingen» ble gjort med 1:100 fortynning av primærantistoffer – noe som er ganske liten fortynning. Resultatene viste fortsatt lave OD-verdier som gir rom for optimalisering og utprøving av andre primærantistoffer. I nøytraliserings analysen kan virustiteren ha vært for høy, dette førte til at antistoff innholdet i serumprøvene ikke var høyt nok til å nøytralisere viruset, dette gav store variasjoner innad gruppene - noe som resulterte i høye konfidensintervall som også førte til utfordringer statistisk.

4.3.2 Histopatologiske endringer – samt en helhetlig vurdering

Et av hovedmålene ved vaksinerer er å forhindre at patogener kan etablere seg og replikere i verten, og forårsake infeksjon. Histologiske undersøkelser ble gjennomført med hensikt å vurdere infeksjonsgraden, i form av inflammasjon, nekrose og/eller andre lesjoner, av SAV-3 i pankreas og hjerte. Studier har foreslått en reduksjon i alvorlighetsgraden av histopatologiske endringer ved vaksinasjon mot viruset, og omfanget av endringene korreler gjerne med beskyttelsen induert av vaksinene (Chang et al., 2017; Karlson et al., 2012; Xu et al., 2012). Det var derfor forventet at en god beskyttelse fra vaksinene også ville føre til mindre histopatologiske endringer. I tillegg har studier vist at omfanget av histopatologiske endringer i utvalgte organene varierer gjennom smitteforløpet, hvor eksokrin pankreas er mest utsatt og viser histopatologiske endringer tidlig i smitteforløpet, i forhold til spongiøs og kompakt hjertetmuskel som blir observert litt senere i smitteforløpet (McLoughlin & Graham, 2007). Undersøkelser gjort i et smitteforsøk med uvaksinert atlantisk laks og SAV-2/SAV-3, viste omfanget av histopatologiske endringer størst 28 dager etter smitte, både i hjerte og eksokrin pankreas, hvor vevet ble gradert med omfattende degenerasjoner. Samtidig ble det også observert en nedgående trend i histopatologiske endringer etter dag 28, som foreslår regenerative egenskaper i undersøkte vev (Taksdal et al., 2015). Dette har også blitt foreslått i andre studier hvor regenerative egenskaper i pankreas og hjerte i fisk smittet med pankreassykdom har blitt observert så tidlig som 4 uker etter smitte (McLoughlin & Graham, 2007).

Resultatene viste histopatologiske endringer både i hjerte og pankreas av varierende grad i samtlige grupper, men ikke nødvendigvis i alle individene. Dette antyder at ingen av vaksinene induerte absolutt beskyttelse mot viruset, men her er det viktig å ta hensyn til smitte modellen som var svært «kraftig» med intraperitoneal injeksjon som «bypasser» flere viktige immunologiske barrierer som gjeller, mukus og hud. Det ble undersøkt og vist at histoscoren til pankreas korrelerte med vekst (SGR) (figur 21). I dette studiet var det derfor forventet å se en korrelasjon mellom vekst (SGR) til gruppene fra vektforsøket (Figur 16a/b/c/d) og histoscoren til pankreas (Figur 20). Denne trenden ble confirmert hvor det kan trekkes en trend, gruppene med lav histoscore viste høye SGR-verdier, og det motsatte gjaldt for grupper med høy histoscore som da viste lavere SGR-verdier.

Diskusjon

Ved tidspunktet dag 28 ble histopatologiske endringer i hjertet gradert noe lavere sammenlignet med pankreas, dette stemmer med klinikken (McLoughlin & Graham, 2007), hvor det var forventet å se større endringer i hjertet senere i smitteforløpet. Prøver fra fisk i gruppene DNA-vaksine, Eomes og IHV-HD viste mindre tegn til histopatologiske endringer, som også korrelerte med høye SGR-verdier (Figur 16b) ved samme tidspunkt. Tar man antistoffresponser med i vurderingen kommer det frem interessante resultater som kunne gi indikasjoner på en cellulær respons og/eller immunologisk hukommelse. Gruppen IHV-HD viste god antistoffrespons mot viruset i immuniseringsfasen (dag 70 etter immunisering), i motsetning til gruppene DNA-vaksinen. Hvor kraftig antistoff respons som kreves at fisken er kapabel til å nøytralisere en viss mengde viruset etter intraperitoneal smitte av 1×10^8 TCID₅₀ SAV-3 virus er ikke kjent (fisken vil selvfølgelig iverksette tiltak mot viruset når infeksjon er etablert). Man kunne da tenke seg å finne en sammenheng mellom antistoffresponsen til de ulike gruppene og histoscoren til samme grupper. DNA-vaksinen induerte derimot en svært dårlig antistoffrespons etter immuniseringsfasen, men når denne gruppen samtidig viste mindre histopatologiske endringer kunne dette være resultatet av andre immunresponser, kanskje en cellulær respons. Dette gjelder også gruppene vaksinert med molekulære adjuvanser. I teorien skal gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes prestere likt som gruppen IHV-LD hvis transkripsjonsfaktorene eller plasmidet i seg selv ikke induerte effekter. Tvert imot viste gruppen Eomes antydninger til mindre histopatologiske endringer i pankreas ved 28 dps, som også ble beregnet signifikant sammenlignet med gruppen IHV-LD. Imidlertid må man ta hensyn til at gruppen IHV-LD viste god tilvekst fra smittetidspunktet 0 dps til 28 dps, men scoret dårlig ved histopatologisk undersøkelse samme tidspunkt.

Histopatologiske endringer i pankreas ble gradert lavere, men infeksjonen er fortsatt alvorlig 42 dager etter smitte. Fisk i gruppene vaksinert med IHV-HD og DNA-vaksinen skilte seg ut med mildere histopatologiske endringer i pankreas. Antistoffresponsen i samme grupper ved dag 42 viste derimot andre resultater, der serumprøver fra fisk i IHV-HD gruppen hadde et lavere innhold av spesifikt antistoff i forhold til DNA-vaksinen, årsaken til dette er mest sannsynlig at mye av antistoffene allerede var «brukt opp» *in vivo* før de ble registrert i analysemetodene *in vitro*. Gruppen vaksinert med lav virusdose (IHV-LD) fungerte som en referanse for «molekulære adjuvanser», ved dette tidspunktet viste gruppene T-bet, GATA-3 og Eomes tilsvarende eller verre histopatologiske endringer i forhold til gruppen IHV-LD. Forskjellene var ikke store, men dette endrer fortsatt bildet fra 28 dps, hvor molekulære

Diskusjon

adjuvanser presterte bedre en gruppen IHV-LD. Interessante resultater fremkom i hjertets histoscore, det var forventet i henhold til klinikken (Bruno et al., 2013), at dette skulle forverres fra 28 dps til 42 dps, hjertet var derimot tilnærmet fullstendig regenerert og viste mindre histopatologiske endringer i samtlige grupper.

70 dager post smitte (70 dps) viste vaksinerte grupper og kontrollgrupper en reduksjon i alvorlighetsgraden i histoscoren både i pankreas og hjertet, dette antydte at fisken i samtlige grupper hadde respondert effektivt og/eller har nøytralisert viruset. Mekanismen til dette er usikkert, men immunologisk sett kan dette være et tegn på god immunrespons som enten nøytraliserer infeksjonen, eller kanskje en kraftig cytotoxisk respons der CD8+ T celler og NK-celler dreper infiserte vertsceller (Mutoloki et al., 2014; Secombes & Belmonte, 2016). Sammenlignes dette med SGR-verdiene anser man gruppene vaksinert med molekylære adjuvanser (GATA-3 og Eomes), IHV-HD og DNA-vaksine til å prestere godt. Graden av histopatologiske endringer reduseres betraktelig fra tidspunktet dag 28 til dag 70, dette foreslår regenerative egenskaper både i pankreas og hjertet, hvordan denne mekanismen fungerer er ukjent, statistiske undersøkelser ble gjort som viste signifikante endringer i noen grupper, som også vil fremme dette forslaget.

En helhetlig vurdering av histopatologiske undersøkelser gjort ved dag 28, 42 og 70 post smitte indikerte at gruppene IHV-HD, GATA-3, DNA-vaksinen og Eomes antydte mindre histopatologiske endringer, som også kan samsvare med en god beskyttelse. Disse resultatene ble sammenlignet med spesifikk tilvekst som viste korrelasjoner med hensyn til de samme gruppene. Svakheter ved analysemetoden er at denne baserer seg på et semi-kvantitativt system, som blir gradert etter leserens og sensorens oppfatning av snittet, graderingen kan derfor variere fra person til person. Histoscoren og resultatene presentert i dette forsøket ble vurdert av to personer. Det var en korrelasjon mellom originale resultater, og revurderte resultater, men det ble også presentert ulik oppfatning av vevets infeksjonsgrad i noen snitt. Årsaken vil trolig stamme fra erfaring og kompetanse innenfor yrket. Hvor internsensor hadde et kurs i histopatologi, og eksternsensor stilte med 30 års histopatologisk erfaring. Resultatene vil også påvirkes av hvor det foretas histopatologiske undersøkelser; her kan det trekkes frem at resultatene kanskje varierer etter hvor snittene og organbitene ble tatt i fisken. Snittene vil i tillegg kun vise et mikroskopisk bilde av helheten og infeksjonsbilde. Derfor ble det tatt 2-3 snitt per objektglass fra 10 fisk per gruppe, som kunne styrke vurderingsgrunnlaget.

4.3.3 Effekten av molekylære adjuvanser

Immunisering/smitteforsøk gjort med IPNV ble det undersøkt genuttrykk for T-bet, GATA-3 og Eomes ved 0, 7 og 21 dager post smitte, hvor forskjellige vaksiner ble sammenlignet (inaktivert helvirus, lav og høy – dose, samt uvaksinert kontroll). I dette studiet fremkom det ved analyser av hodenyren og milt (dag 0) at GATA-3 var oppregulert i vaksinerte grupper der nivået av GATA-3 korrelerte med antigendosen i vaksinen. Dette samsvarte også med antistoffproduksjonen, der høye nivåer med GATA-3 også viste høy antistoffrespons (ELISA). Forløpet og uttrykket av transkripsjonsfaktorene T-bet og Eomes endret seg under infeksjon og økte ved dag 7 og 21 etter smitte, samtidig som transkripsjonsfaktoren GATA-3 ble nedregulert. Her var det også en korrelasjon mellom antigendose og målte nivåer til T-bet og Eomes mRNA, der gruppene vaksinert med lav antigen dose og uvaksinert kontrollgruppe viste høyere nivåer av T-bet og Eomes. Det blir i forsøket foreslått at beskyttelsen induert av vaksinerne kan måles ved uttrykk av disse transkripsjonsfaktorene, hvor dårlige og godt immuniserte fisk vil gi ulikt mønster og uttrykk av T-bet, GATA-3 og Eomes (Munang'andu et al., 2013b). Det ble ikke gjort slike undersøkelser i dette forsøket, men om tar man utgangspunkt i vertens immunrespons mot virus kan man kanskje forvente tilsvarende resultater ved SAV-3 infeksjon. I dette forsøket ble det benyttet molekylære adjuvanser i kombinasjon med inaktiverede helvirusvaksiner, i teorien skal dette indusere en forsterket immunrespons. Smitteforsøket gjort med IPNV (Munang'andu et al., 2013b), viste hvor sentrale disse transkripsjonsfaktorene var. Resultatene presentert i vekstforsøket, fra histopatologisk undersøkelse samt analyser av antistoffresponsen gav indikatorer på at molekylære adjuvanser har induert en bedre immunrespons sammenlignet med gruppen IHV-LD. Selv om vekst, histopatologi og antistoffrespons er gode indikatorer kreves det ytterligere undersøkelser som representerer transkriptomikken som også inkluderer de transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes både ved immuniseringsfasen og smittefasen før man kan fastslå eventuelle gruppeforskjeller. Forhåpentligvis kan dette bekrefte at pDNA inneholdende transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3 og Eomes i kombinasjon med antigen kan indusere en kraftigere beskyttende respons i fisk.

4.3.4 Vurdering av forsøksdesign og statistiske undersøkelser

Smitten ble utført ved intraperitoneal injeksjon av SAV-3 med en dose på 1×10^8 TCID₅₀, dette skal teoretisk gi like premisser for å forårsaket infeksjon i samtlige individer - hvor resultatene ville gi en god indikasjon på beskyttelsen til vaksinene. I dette studiet forårsaket viruset infeksjon, men ikke dødelighet. Da tidligere studier har vist dødelighet med tilsvarende virusdose kan dette være en indikasjon på at virus fra samme subtype innehar ulik virulens eller at fisk inkludert i dette forsøket er mer robust/resistent mot SAV-3 enn det som er rapportert tidligere. Et poeng med smitte modellen var at intraperitoneal injeksjon «bypasser» naturlige mukosale inngangsportaler som hud, gjeller og tarm. Det er kjent at disse organene innehar immunologisk aktivitet (Salinas, 2015), men det ble ikke undersøkt om vaksinene induerte mukosale adaptive responser – noe som kanskje hadde vært hensiktsmessig for å få et mer komplett bilde over beskyttelsesmekanismer.

Vektforsøkene ble gjort med to kontroller, Kon-U og tomt plasmid, hvor Kon-U var kontroll for gruppene IHV-LD og IHV-HD, og kontrollgruppen tomt plasmid kunne sammenlignes mot gruppene T-bet, GATA-3, Eomes og DNA-vaksinen. Studier har vist at pDNA kan induere en immunrespons ved at toll lignende reseptorer binder CpG-DNA (Ishii & Akira, 2006). Teoretisk kan ryggradsplasmidene pTagRFP og pTagTurboFP635 føre til en immunrespons mot viruset da disse plasmidene kanskje innehar CpG motiver. Det fantes ingen informasjon fra leverandøren av plasmidene om det fantes noen CpG motiver i plasmidene, den eneste informasjonen var at ryggradsplasmidet var likt for disse to plasmidene. Eneste ulikheten var reporter genen. Statistiske forskjeller vist i vekst og analyser til grupper injisert med pDNA vil dermed kunne sammenlignes med beskyttelse da plasmidene var veldig like, og ulikheter mht. responser var teoretisk forårsaket av «genet av interesse» (dvs. T-bet, GATA-3, Eomes og SAV-3 sekvenser i DNA-vaksinen) og ikke ryggradsplasmidet. Grunnet muligheter for CpG motiver kan det bli ansett ugunstig å sammenligne vaksinene IHV-LD og IHV-HD mot kontrollgruppen tomt plasmid, derfor ble gruppen Kon-U inkludert i vekstforsøket og ved histopatologiske undersøkelser. Ulemper med to kontroller var at disse kunne induere noe ulike responser, som for eksempel vekst - som igjen fører til ulike statistiske resultater, når man sammenligner vaksinerte grupper mot sin kontrollgruppe.

Ved analyser for antistoffrespons ble det kun brukt en kontrollgruppe (tomt plasmid), dette kan bli ansett som en svakhet i dette studiet da gruppene IHV-LD og IHV-HD ikke fikk injisert et

Diskusjon

kontrollplasmid. Optimalt ville statistiske analyser og eventuelle gruppeforskjeller fremstå sterkere for gruppene IHV-LD og IHV-HD ved å inkludere gruppen Kon-U i disse analysene. Årsaken til at denne gruppen ble utelukket var utelukkende tidsbegrensede faktorer, og prioritering av oppgavens fokus. Sammenlignes resultatene fremstilt i vekstforsøket og histopatologiske endringer, prestererte begge kontrollgruppene Kon-U og tomt plasmid tilnærmet likt, statistiske undersøkelser viste ingen signifikante forskjeller. Dette kunne være en indikator på at ryggradsplasmidet i seg selv ikke induerte en immunrespons. Teoretisk kan man ut fra dette forvente at kontrollgruppene Kon-U og tomt plasmid også ville prestert tilnærmet likt mht. antistoff respons.

I et «optimalt» forsøk ville man også inkludert grupper hvor man kun vaksinerte med pDNA inneholdende T-bet, GATA-3 og Eomes uten inaktiverede helvirusvaksiner, for å undersøke om pDNA-et med genet av interesse induerte en immunrespons mot SAV-3. Eller om det var kombinasjonsvaksinen som forårsaker beskyttelsen. Grunnet begrenset arbeidskraft (antall personer ved immunisering, prøvetakinger og smitte) var ikke dette gjennomførbart.

Statistiske undersøkelser ble gjort med en uparet T-test og hypotesetesting. Dette kan fremstå som en tungvint metode da det kun er mulig å sammenligne to grupper om gangen, der analyser som for eksempel en-vei varians analyse (ANOVA) er enklere og raskere, vil en T-test gi et robust grunnlag for å kunne påstå signifikante forskjeller. Ulempen med «populære» analyser som enveis variansanalyse (ANOVA) er at hypotesen kan kun bekrefte at det er signifikans mellom undersøkte grupper, men ikke i eksakt gruppe. Når man da benytter ulike statistiske sammenligningstester (For eksempel Dunnett's eller Tukey's) for å undersøke signifikante verdier fra ANOVA analysen vil man istedenfor å teste en hypotese, heller «lete» etter den signifikante forskjellen (Løvås, 2013).

4.3.5 Praktiske anvendelser av resultatene og videre forskning

Fisk vaksinert med «molekylære adjuvanser», DNA-vaksine og inaktiverte helvirusvaksiner med høy dose indikerte god beskyttelse i form av vekst og antistoff respons, sammenlignet mot kontroll tomt plasmid og Kon-U, samt gruppen IHV-LD. Kommersielt kan bruken av plasmid baserte adjuvanser/vaksiner i kombinasjon med IHV redusere økonomiske tap ved SAV infeksjon - hvis vaksinene viser seg like effektiv i feltstudier. Når man vurderer veksten av fisken ved avsluttet smitteforsøk viste dette at molekylære adjuvanser førte til bedre vekst (og indikativ beskyttelse) enn kommersielle vaksiner (Pharmaq og MSD). For fisk som fikk MSD og Pharmaq vaksinene (IHV) ville det vært interessant å gjøre histopatologiske undersøkelser samt antistoff analyser for å undersøke eventuell om disse induerte dårligere eller bedre beskyttelse (mindre histopatologiske endringer og større antistoff produksjon) sammenlignet med våre IHV-LD, samt IHV + molekylære adjuvanser.

DNA-vaksinen viste god beskyttelse gjennomgående i hele forsøket, men beskyttelsen var ikke 100 % (evaluert ut fra histoscore og antistoff analyser). Det ville vært interessant å undersøke om DNA-vaksine i kombinasjon med molekylære adjuvanser kunne inducere bedre beskyttelse enn DNA vaksinen i seg selv.

I videre forskning vil det være hensiktsmessig å fokusere på immunresponsene induert av molekylære adjuvanser og DNA-vaksinen, om disse er celle-mediert og/eller humoral. Langtidsbeskyttet fisk er også viktig for næringen, spørsmålet hvorvidt vaksiner uten oljeadjuvans kan vise en effektiv beskyttelse over lang tid - er sentralt.

5 Konklusjon

- Det ble vist uttrykk av transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3, og Eomes *in vitro* og i fiskemuskel *in vivo*.
- Parr vaksinert med inaktiverede helvirusvaksiner og/eller pDNA viste ikke redusert vekst, men utgangsstørrelsen på fisken som ble vaksinert influerte i større grad veksten.
- Fisk vaksinert med høy virusdose (IHV-HD), viste god tilvekst, god antistoffrespons og mindre histopatologiske endringer enn fisk vaksinert med lav virusdose samt kontrollfisk.
- Fisk vaksinert med molekylære adjuvanser i kombinasjon med inaktiverede helvirus vaksiner (IHV-LD), viste indikasjoner på bedre vekst og mindre histopatologiske endringer enn fisk vaksinert med kun inaktiverede helvirus (IHV-LD).
- Fisk som fikk DNA-Vaksine viste god vekst og mindre histopatologiske endringer, i forhold til kontrollgruppen Tomt plasmid.
- Vaksinering reduserer histopatologiske endringer i pankreas og hjerte forårsaket av SAV-3, i forhold til uvaksinerte kontrollgrupper. Det foreslås regenerative egenskaper i pankreas og hjerte.
- Antistoffrespons etter immunisering samsvarte ikke nødvendigvis med indikativ beskyttelse (histoscore) induert av vaksinen.

6 Referanser

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*: Elsevier Health Sciences.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787.
- Ángeles Esteban, M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 2012.
- Atreya, I., Schimanski, C. C., Becker, C., Wirtz, S., Dornhoff, H., Schnürer, E., . . . Neurath, M. F. (2007). The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut*, 56(11), 1572-1578.
- Aune, T. M., Collins, P. L., & Chang, S. (2009). Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology*, 126(3), 299-305.
- Aunsmo, A., Valle, P. S., Sandberg, M., Midtlyng, P. J., & Bruheim, T. (2010). Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive veterinary medicine*, 93(2-3), 233-241.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245.
- Berg, A., Rødseth, O. M., & Hansen, T. (2007). Fish size at vaccination influence the development of side-effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 265(1-4), 9-15.
- Berg, A., Rødseth, O. M., Tangerås, A., & Hansen, T. (2006). Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*.
- Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I., & Christie, K. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Developments in biologicals*, 121, 97-113.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 239-262.
- Braceland, M., Bickerdike, R., Tinsley, J., Cockerill, D., McLoughlin, M., Graham, D., . . . Eckersall, P. (2013). The serum proteome of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *Journal of proteomics*, 94, 423-436.
- Bromage, E. S., Kaattari, I. M., Zwollo, P., & Kaattari, S. L. (2004). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7317-7323.
- Brown, R. S., Wan, J. J., & Kielian, M. (2018). The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses*, 10(2), 89.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013). *A colour atlas of salmonid diseases* (Vol. 91): Springer Science & Business Media.
- Buchmann, K., Dalsgaard, I., Nielsen, M. E., Pedersen, K., Uldal, A., Garcia, J., & Larsen, J. (1997). Vaccination improves survival of Baltic salmon (*Salmo solar*) smolts in delayed release sea ranching (net-pen period). *Aquaculture*, 156(3-4), 335-348.
- Burch, J. B. (2005). *Regulation of GATA gene expression during vertebrate development*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T.-D., Steinman, R. M., & Bona, C. A. (1997). Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1481-1486.

- Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., Granja, A. G., Luque, A., & Tafalla, C. (2014). CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD+ IgM- B lymphocyte subset. *The Journal of Immunology*, *192*(3), 1257-1266.
- Chang, C. J., Gu, J., & Robertsen, B. (2017). Protective effect and antibody response of DNA vaccine against salmonid alphavirus 3 (SAV3) in Atlantic salmon. *Journal of fish diseases*, *40*(12), 1775-1781.
- Chang, C. J., Jenssen, I., & Robertsen, B. (2016). Protection of Atlantic salmon against salmonid alphavirus infection by type I interferons IFN α , IFN β and IFN γ . *Fish & shellfish immunology*, *57*, 35-40.
- Chattergoon, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D., & Weiner, D. B. (1998). Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, *160*(12), 5707-5718.
- Chaves-Pozo, E., Valero, Y., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Dabad, M., Alioto, T., . . . Cuesta, A. (2017). Innate cell-mediated cytotoxic activity of European sea bass leucocytes against nodavirus-infected cells: A functional and RNA-Seq study. *Scientific reports*, *7*(1), 15396.
- Dalmo, R. (2018). DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *Journal of fish diseases*, *41*(1), 1-9.
- Dee, C. T., Nagaraju, R. T., Athanasiadis, E. I., Gray, C., del Ama, L. F., Johnston, S. A., . . . Hurlstone, A. F. (2016). Cd4-transgenic zebrafish reveal tissue-resident th2-and regulatory t cell-like populations and diverse mononuclear phagocytes. *The Journal of Immunology*, *197*(9), 3520-3530.
- Drummond, G. B., & Vowler, S. L. (2011). Show the data, don't conceal them. *The Journal of physiology*, *589*(8), 1861-1863.
- Duston, J. (1994). Effect of salinity on survival and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts. *Aquaculture*, *121*(1-3), 115-124.
- Ellis, A. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, *25*(8-9), 827-839.
- Erdal, J., & Reitan, L. (1992). Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & shellfish immunology*, *2*(2), 99-108.
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O., & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, *4*, 28.
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*, *11*(1), 47.
- Foey, A., & Picchiatti, S. (2014). Immune defences of teleost fish. *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*, 14-52.
- Fringuelli, E., Rowley, H., Wilson, J., Hunter, R., Rodger, H., & Graham, D. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *Journal of fish diseases*, *31*(11), 811-823.
- Glimcher, L. H., Townsend, M. J., Sullivan, B. M., & Lord, G. M. (2004). Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology*, *4*(11), 900.
- Graham, D., Fringuelli, E., Rowley, H., Cockerill, D., Cox, D., Turnbull, T., . . . Mc Loughlin, M. (2012). Geographical distribution of salmonid alphavirus subtypes in marine farmed

- Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland and Ireland. *Journal of fish diseases*, 35(10), 755-765.
- Graham, D., Frost, P., McLaughlin, K., Rowley, H., Gabestad, I., Gordon, A., & McLoughlin, M. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *Journal of fish diseases*, 34(4), 273-286.
- Graham, D., Jewhurst, H., McLoughlin, M., Branson, E., McKenzie, K., Rowley, H., & Todd, D. (2007). Serological, virological and histopathological study of an outbreak of sleeping disease in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 74(3), 191-197.
- Gudding, R., & Van Muiswinkel, W. B. (2013). A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1683-1688.
- Guo, T.-C., Johansson, D. X., Haugland, Ø., Liljeström, P., & Evensen, Ø. (2014). A 6K-deletion variant of salmonid alphavirus is non-viable but can be rescued through RNA recombination. *PLoS one*, 9(7), e100184.
- Hansen, J. D., Landis, E. D., & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6919-6924.
- Harris, D. P., Goodrich, S., Gerth, A. J., Peng, S. L., & Lund, F. E. (2005). Regulation of IFN- γ production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN- γ receptor. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6781-6790.
- Hastefnl, T., Guo'ding, R., & Eve-risen, B. (2005). Bacterial Vaccines for Fish—an Update. *Dev Biol. Basel*, 121, 55-T54r.
- Herweijer, H., & Wolff, J. (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene therapy*, 10(6), 453.
- Hjeltnes, B., Bang-Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A., & Walde, C. S. (2018). *Fiskehelserapporten 2017*. Retrieved from <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2018/fiskehelserapporten-2017>
- Ho, I.-C., & Pai, S.-Y. (2007). GATA-3-not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol*, 4(1), 15-29.
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166-177.
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V., Kadri, S., Pottinger, T., Sandøe, P., & Turnbull, J. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of fish biology*, 68(2), 332-372.
- Hølvold, L. B., Fredriksen, B. N., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Transgene and immune gene expression following intramuscular injection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with DNA-releasing PLGA nano-and microparticles. *Fish & shellfish immunology*, 35(3), 890-899.
- Hølvold, L. B., Myhr, A. I., & Dalmo, R. A. (2014). Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary research*, 45(1), 21.
- Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., . . . Miller, J. D. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology*, 6(12), 1236.
- Ishii, K. J., & Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends in immunology*, 27(11), 525-532.
- Iwama, G. K. (2011). *Fish stress and health in aquaculture* (Vol. 62): Cambridge University Press.

- Jansen, M., Bang Jensen, B., McLoughlin, M., Rodger, H., Taksdal, T., Sindre, H., . . . Lillehaug, A. (2017). The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge. *Journal of fish diseases*, *40*(1), 141-155.
- Jensen, B. B., Kristoffersen, A. B., Myr, C., & Brun, E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Diseases of aquatic organisms*, *102*(1), 23-31.
- Jobling, M. (2003). The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture Research*, *34*(7), 581-584.
- Jørgensen, J. B. (2014). The innate immune response in fish. *Fish vaccination*, 85-103.
- Kaattari, S. L., Bromage, E., & Kaattari, I. (2005). Analysis of long-lived plasma cell production and regulation: implications for vaccine design for aquaculture. *Aquaculture*, *246*(1-4), 1-9.
- Kaattari, S. L., Zhang, H. L., Khor, W., Kaattari, I. M., & Shapiro, D. A. (2002). Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, *26*(2), 191-200.
- Karlsen, M., Tingbø, T., Solbakk, I.-T., Evensen, Ø., Furevik, A., & Aas-Eng, A. (2012). Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Vaccine*, *30*(38), 5688-5694.
- Koskela, J., Pirhonen, J., & Jobling, M. (1997). Feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic salmon exposed to different constant temperatures. *Aquaculture International*, *5*(4), 351-360.
- Kumari, J., Bogwald, J., & Dalmo, R. A. (2009). Transcription factor GATA-3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular characterization, promoter activity and expression analysis. *Molecular immunology*, *46*(15), 3099-3107.
- Kumari, J., Børgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Eomesodermin of Atlantic salmon: an important regulator of cytolytic gene and interferon gamma expression in spleen lymphocytes. *PLoS one*, *8*(2), e55893.
- Kumari, J., Zhang, Z., Swain, T., Chi, H., Niu, C., Børgwald, J., & Dalmo, R. A. (2015). Transcription Factor T-Bet in Atlantic Salmon: Characterization and Gene Expression in Mucosal Tissue during *Aeromonas salmonicida* Infection *Frontiers in Immunology*.
- LaBarre, D. D., & Lowy, R. J. (2001). Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays. *Journal of virological methods*, *96*(2), 107-126.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., & Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature immunology*, *7*(4), 338.
- Lillehaug, A., Jensen Bang, B., Sindre, H., & Brun, E. (2012). *Bekjempelsen av PD 2007- 2011 -en evaluering*. Retrieved from <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2012/bekjempelsen-av-pd-2007-2011-en-evaluering>
- Liu, M. (2003). DNA vaccines: a review. *Journal of internal medicine*, *253*(4), 402-410.
- Lyngstad, T. M., Høgåsen, H. R., Jansen, M. D., & Nilsen, A. Risk of disease transfer with wellboats in Norway—Technical report.
- Løvås, G. G. (2013). *Statistikk for universiteter og høyskoler*: Universitetsforlaget.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, *12*(4), 361-379.
- Magor, B. G. (2015). Antibody Affinity Maturation in Fishes—Our Current Understanding. *Biology*, *4*(3), 512-524.
- Marchalonis, J., & Schluter, S. (1998). A stochastic model for the rapid emergence of specific vertebrate immunity incorporating horizontal transfer of systems enabling duplication and combinatorial diversification. *Journal of theoretical biology*, *193*(3), 429-444.

- McCormick, S. D., Saunders, R. L., & MacINTYRE, A. D. (1989). The effect of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 82(1-4), 173-180.
- McLoughlin, M., & Graham, D. (2007). Alphavirus infections in salmonids—a review. *Journal of fish diseases*, 30(9), 511-531.
- McLoughlin, M., Graham, D., Norris, A., Matthews, D., Foyle, L., Rowley, H., . . . Todd, D. (2006). Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Diseases of aquatic organisms*, 72(2), 125-133.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in microbiology*, 8(10), 452-456.
- Midtlyng, P., Reitan, L., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis. *Fish & shellfish immunology*, 6(5), 335-350.
- Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2018). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & shellfish immunology*.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T.-Y., Marjara, I. S., . . . Evensen, Ø. (2012). Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*, 30(27), 4007-4016.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A., & Evensen, Ø. (2013a). Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Veterinary research*, 44(1), 7.
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Dalmo, R. A., & Evensen, Ø. (2013b). The kinetics of CD4+ and CD8+ T-cell gene expression correlate with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against infectious pancreatic necrosis. *Vaccine*, 31(15), 1956-1963.
- Munro, A., Ellis, A., McVicar, A., McLay, H. A., & Needham, E. (1984). An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37(1-4), 571-586.
- Mutoloki, S., Jørgensen, J. B., & Evensen, Ø. (2014). The adaptive immune response in fish. *Fish vaccination*, 104-115.
- Nagata, S., & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267(5203), 1449-1456.
- Naiche, L., Harrelson, Z., Kelly, R. G., & Papaioannou, V. E. (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 219-239.
- Nakanishi, T., Fischer, U., Dijkstra, J., Hasegawa, S., Somamoto, T., Okamoto, N., & Ototake, M. (2002). Cytotoxic T cell function in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 131-139.
- Nakanishi, T., & Ototake, M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Developments in biological standardization*, 90, 59-68.
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y., & Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology*, 4(4), 640-663.
- Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y., & Somamoto, T. (2011). Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1317-1323.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.
- Nelson, K. E., & Williams, C. M. (2013). *Infectious disease epidemiology*: Jones & Bartlett Publishers.

- Nelson, R., McLoughlin, M., Rowley, H., Platten, M., & McCormick, J. (1995). Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. *Diseases of aquatic organisms*, 22(1), 25-32.
- Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M., & Karjalainen, J. (2004). Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture*, 235(1-4), 285-296.
- Ojima, N., Matsubara, H., & Yamashita, M. (1999). Transfection and expression of a reporter, the green fluorescent protein gene, by electroporation in fish cells. *Fisheries science*, 65(2), 323-324.
- Parra, D., Takizawa, F., & Sunyer, J. O. (2013). Evolution of B cell immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 1(1), 65-97.
- Pearce, E. L., Mullen, A. C., Martins, G. A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V. P., . . . Mao, C.-a. (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*, 302(5647), 1041-1043.
- Petterson, E., Guo, T.-C., Evensen, Ø., & Mikalsen, A. B. (2016). Experimental piscine alphavirus RNA recombination in vivo yields both viable virus and defective viral RNA. *Scientific reports*, 6, 36317.
- Pickering, A., Pottinger, T., Sumpter, J., Carragher, J., & Le Bail, P. (1991). Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 83(1), 86-93.
- Poppe, T. T., & Bergh, Ø. (2002). *Fiskehelse og fiske sykdommer* (2 ed.): Universitetsforlaget.
- Poppe, T. T., Rimstad, E., & Hyllseth, B. (1989). Pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 9(4), 83-85.
- Pottinger, T., Knudsen, F., & Wilson, J. (1994). Stress-induced changes in the affinity and abundance of cytosolic cortisol-binding sites in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), are not accompanied by changes in measurable nuclear binding. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(6), 499-511.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of virology*, 75(21), 10118-10131.
- Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology*, 9(4), 309-318.
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J. D., Costa, G., Kataria, P., & Bromage, E. S. (2012). Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1341-1349.
- Restifo, N., Ying, H., Hwang, L., & Leitner, W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene therapy*, 7(2), 89.
- Rodger, H., & Mitchell, S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *Journal of fish diseases*, 30(3), 157-167.
- Romøren, K., Thu, B. J., & Evensen, Ø. (2004). Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration. *Fish & shellfish immunology*, 16(2), 251-264.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G. B., Wagner, H., & Bauer, S. (2004). Toll - like receptor 9 binds single - stranded CpG - DNA in a sequence - and pH - dependent manner. *European journal of immunology*, 34(9), 2541-2550.

- Rønsholdt, B., & McLean, E. (1999). The effect of vaccination and vaccine components upon short-term growth and feed conversion efficiency in rainbow trout. *Aquaculture*, 174(3-4), 213-221.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Scholtissek, C. (1994). Source for influenza pandemics. *European journal of epidemiology*, 10(4), 455-458.
- Secombes, C. J., & Belmonte, R. (2016). Overview of the fish adaptive immune system. In *Fish Vaccines* (pp. 35-52): Springer.
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 3-68): Elsevier.
- Stene, A., Viljugrein, H., Yndestad, H., Tavoranpanich, S., & Skjerve, E. (2014). Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *Journal of fish diseases*, 37(2), 123-134.
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 58(3), 491-562.
- Sudha, P. M., Low, S., Kwang, J., & Gong, Z. (2001). Multiple tissue transformation in adult zebrafish by gene gun bombardment and muscular injection of naked DNA. *Marine biotechnology*, 3(2), 119-125.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655-669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 295(5553), 338-342.
- Sørum, U., & Damsgård, B. (2004). Effects of anaesthetisation and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 232(1-4), 333-341.
- Taksdal, T., Bang Jensen, B., Böckerman, I., McLoughlin, M., Hjortaas, M., Ramstad, A., & Sindre, H. (2015). Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *Journal of fish diseases*, 38(12), 1047-1061.
- Tonheim, T. C., Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2008a). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, 25(1-2), 1-18.
- Tonheim, T. C., Dalmo, R. A., Bøggwald, J., & Seternes, T. (2008b). Specific uptake of plasmid DNA without reporter gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney after intramuscular administration. *Fish & shellfish immunology*, 24(1), 90-101.
- Webster, R., Laver, W., Air, G., & Schild, G. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*, 296(5853), 115.
- Weston, J. H., Welsh, M. D., McLoughlin, M. F., & Todd, D. (1999). Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Virology*, 256(2), 188-195.
- Weyts, F., Cohen, N., Flik, G., & Verburg-van Kemenade, B. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & shellfish immunology*, 9(1), 1-20.
- Xu, C., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2012). Superior protection conferred by inactivated whole virus vaccine over subunit and DNA vaccines against salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine*, 30(26), 3918-3928.

- Yamaguchi, T., Takizawa, F., Fischer, U., & Dijkstra, J. M. (2015). Along the axis between type 1 and type 2 immunity; principles conserved in evolution from fish to mammals. *Biology*, 4(4), 814-859.
- Ye, J., Bromage, E. S., & Kaattari, S. L. (2010). The strength of B cell interaction with antigen determines the degree of IgM polymerization. *The Journal of Immunology*, 184(2), 844-850.
- Ye, J., Kaattari, I., & Kaattari, S. (2011). Plasmablasts and plasma cells: reconsidering teleost immune system organization. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1273-1281.
- Zheng, F., Sun, X., Liu, H., Wu, X., Zhong, N., Wang, B., & Zhou, G. (2010). Distribution and expression in vitro and in vivo of DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Chinese journal of oceanology and limnology*, 28(1), 67-74.
- Zhu, L.-y., Pan, P.-p., Fang, W., Shao, J.-z., & Xiang, L.-x. (2012). Essential role of IL-4 and IL-4R α interaction in adaptive immunity of zebrafish: insight into the origin of Th2-like regulatory mechanism in ancient vertebrates. *The Journal of Immunology*, 188(11), 5571-5584.
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J. M., Yoshiura, Y., Bols, N., & Secombes, C. (2005). Identification and bioactivities of IFN- γ in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *The Journal of Immunology*, 175(4), 2484-2494.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616.

7 Appendiks

Appendiks 1: Reagenser, og PCR-mikser benyttet, samt PCR-sykluser.

Appendiks 2: Informasjon om vekst og lengde, samt gjennomsnittsvekt og lengde til samtlige grupper gjennom hele forsøket

Appendiks 3: Informasjon om antistoffrespons, og vekst.

Appendiks 4: Informasjon om histopatologiske endringer og vekst.

Appendiks 1

Reagenser	Produsent
ALPHA JECT mikro 1-PD	PHARMAQ AS
Anti- SAV-3-E2 (Kanin)	NMBU
Anti- SAV-3 (Mus)	NMBU
Anti-SAV-3 (Høns)	NMBU
Anti-Laks (Mus)	NMBU
Anti-Mouse IgG – Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich Co.
Benzoak Vet. (200 mg benzokain/ml 20%)	ACD Pharmaceuticals AS
DAPI	Thermo Fisher Scientific Inc.
Etanol (96 %, puriss)	Sigma-Aldrich Co.
Etanol ($\geq 99,8$ %, absolutt, puriss)	Sigma-Aldrich Co.
Eukitt quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich Co.
Formaldehyd-løsning ($\geq 34,5$ %)	Sigma-Aldrich Co.
Fosfatbufret saltvann (PBS) fra NFH	NFH
Histoclear	National Diagnostics Inc.
ISA763 VG (Oljeadjuvans)	SEPPIC Inc
Kanamycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gibco™ L-15	Thermo Fisher Scientific Inc.
Norwax Compact PD	MSD – Animal Health
Parafinvoks Histowax	Histolab Products AB
RNA <i>Later</i> ® Solution	Ambion
SOC 15 %	Super optimal broth + glukose
Shandon instant Hematoxylin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Shandon instant Eosin	Thermo Fisher Scientific Inc.
5x Trypsin	Sigma-Aldrich Co.
Tween 20	Sigma-Aldrich Co.
Tris-bufret saltvann (TBS) fra NFH	NFH
Tørrmelk 1% Fett (Blokeringsbuffer)	Semper
Ultra pure water	Biochrom GmbH

Appendiks

Tabell 12: Agarosegel.

Agarosegel	1,2 % agarose gel
Agarose for routine	1,2 g
TAE	100 ml
Etidium Bromide	6 μ l

Tabell 13: Restriksjonsenzymmiks

Restriksjonsenzymmiks	
H ₂ O	8 μ l
Buffer 4	2 μ l
Plasmid	8 μ l
Endoenzyme	1 μ l
1. PstI	
2. XhoI	
Totalt volum:	20 μ l

Inkubering:

37 °C / 2 t → 65 °C / 20 min → over natt 4 °C

Tabell 14: Ligeringsmiks

Ligeringsmiks	1x
H ₂ O	6,5 μ l
PCR-produkt	1,5 μ l
pTagRFP-N vektor	0,5 μ l
Buffer	1 μ l
T ₄ ligation enzym	0,5 μ l
Totalt volum	10 μ l

Inkubering 30 min RT

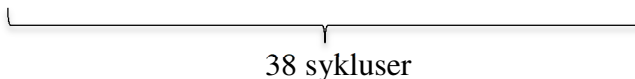
Appendiks

Tabell 15: Standard PCR miks

PCR miks	1x
H2O	7,25 µl
10x buffer for DyNAzyme EXT	1 µl
DyNAzyme EXT DNA polymerase	0,05 µl
dNTP	0,25 µl
Templat	0,5 µl
Primer A	0,5 µl
1.1 T-bet	
1.2 GATA-3	
1.3 Eomes	
Primer B (ptagRFP-N-fw)	0,5 µl
Totalt volum	10 µl

PCR syklus:

94 °C / 2 min → 94 °C / 30 sek → 55 °C / 30 sek → 72 °C / 2 min → 72 °C / 7 min → 4 °C ∞



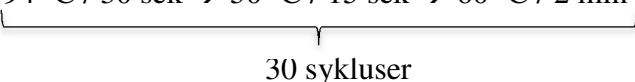
38 sykluser

Tabell 16: Sekvensieringsmiks

Sekvensieringsmiks	
H2O	13 µl
MgCl ₂ -Buffer	2 µl
BigDye	2 µl
Templat (plasmid)	1µl (200 ng/µl)
Primer FW/RV	1 µl/1 µl
Totalt volum:	20 µl

PCR syklus:

94 °C / 2 min → 94 °C / 30 sek → 50 °C / 15 sek → 60 °C / 2 min → 4 °C ∞



30 sykluser

Appendiks

Tabell 17: Ligeringsmiks

Ligeringsmiks	1x
H ₂ O	6,5 µl
PCR-produkt	1,5 µl
pTagRFP-N vektor	0,5 µl
Buffer	1 µl
T ₄ ligation enzym	0,5 µl
Totalt volum	10 µl

Inkubering 30 min RT

Appendiks

Appendiks 2

Vekt og lengde i samtlige grupper.

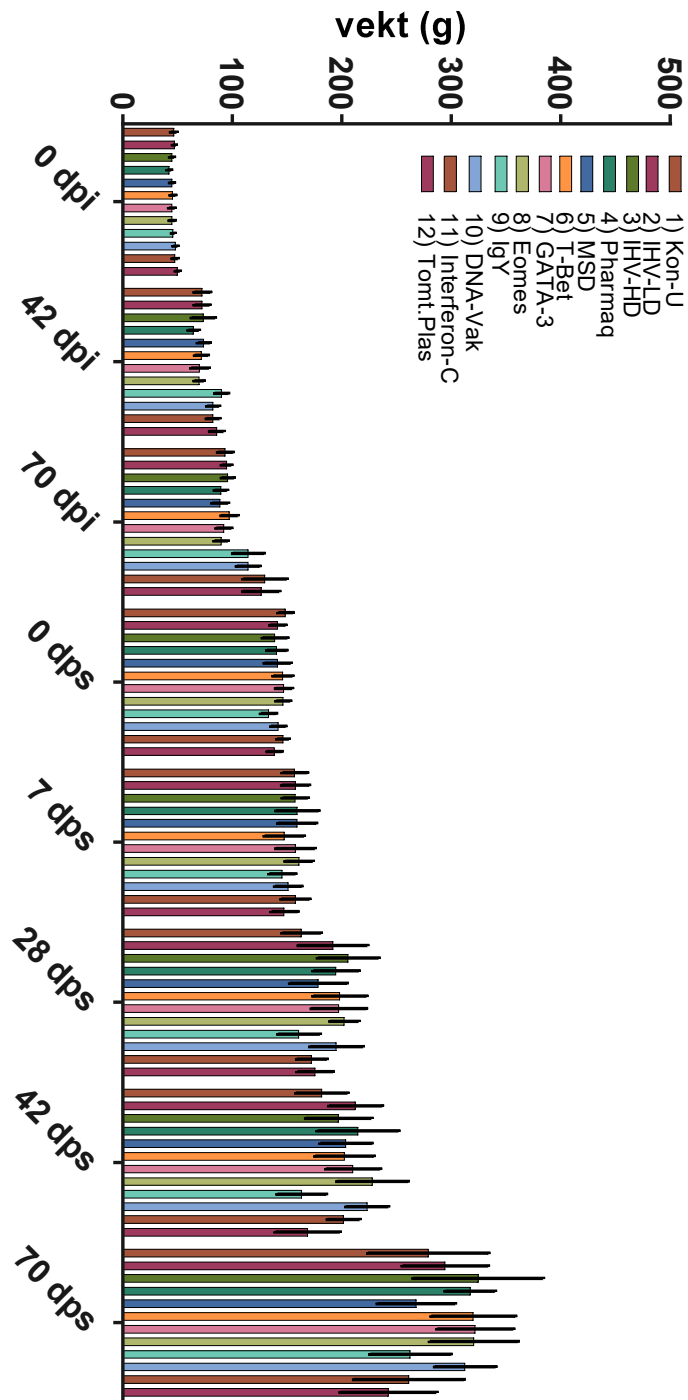
Tabell 18: Vekt oppgitt i gram for samtlige grupper ved immuniseringsforsøk og smitteforsøk.

				Smitte				
Vekt (g):	Dag 0	Dag 42	Dag 70	Dag 0	Dag 7	Dag 28	Dag 42	Dag 70
Kon-U	46.62	72.64	93.64	150.23	157.45	160.92	181.79	279.13
IHV-LD	47.15	72.67	94.82	145.91	157.78	192.13	212.60	286.59
IHV-HD	44.93	72.79	95.98	143.96	154.59	205.90	197.23	324.85
Pharmaq	42.26	64.69	89.84	144.73	159.27	194.81	214.79	317.48
MSD	44.85	74.05	88.85	145.95	159.33	178.65	203.79	268.07
T-bet	45.83	71.80	97.49	144.53	147.62	200.29	202.51	320.07
GATA-3	44.81	70.34	92.42	147.23	157.83	197.39	204.43	321.93
EOMES	44.99	69.86	89.91	151.02	161.12	202.42	228.10	320.59
IGY	46.07	90.23	114.64	134.57	145.64	160.93	163.49	265.65
DNA-vak	48.26	83.78	114.69	143.00	151.07	195.17	223.40	311.91
InterferonC	47.80	82.50	129.77	147.76	157.77	172.70	194.75	261.33
Tomt plas	50.20	85.96	126.58	143.60	147.53	175.68	168.86	242.76

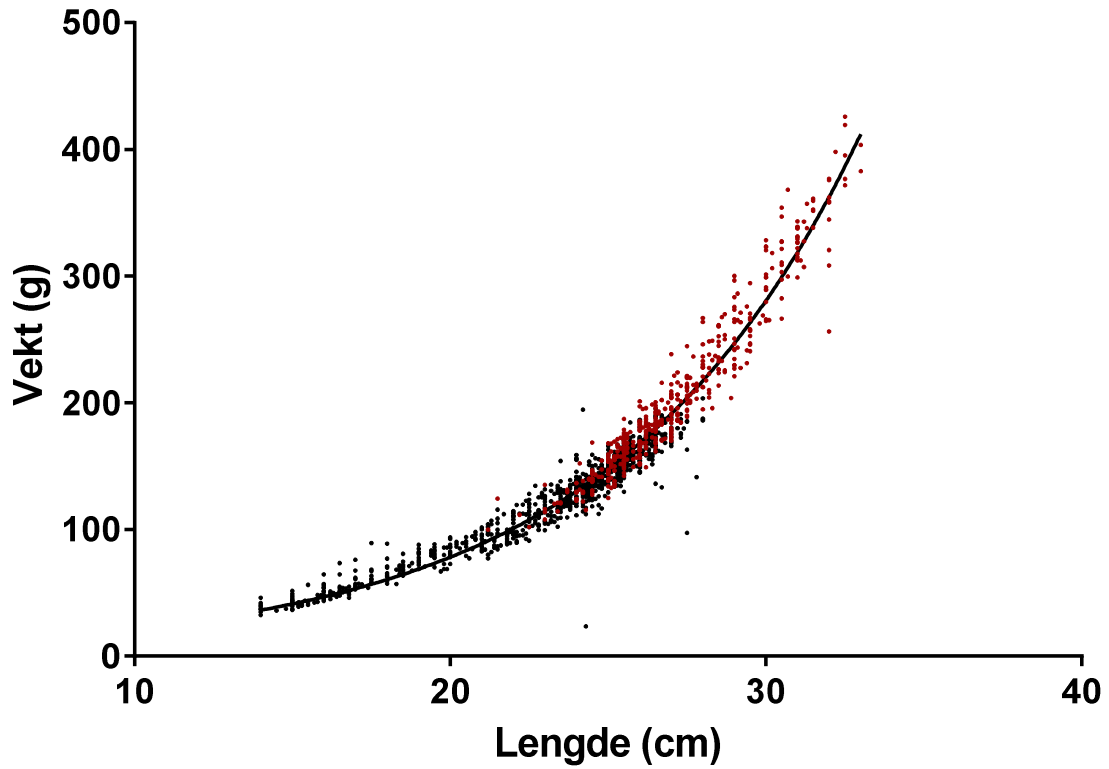
Tabell 19: Lengde målt i cm i samtlige grupper ved prøveuttak.

				Smitte				
Lengde-cm	Dag 0	Dag 42	Dag 70	Dag 0	Dag 7	Dag 28	Dag 42	Dag 70
Kon-U	15,88	18,40	20,67	25,18	25,48	25,60	26,61	29,33
IHV-LD	15,30	18,33	21,04	25,53	25,61	26,53	28,07	29,5
IHV-HD	15,06	18,25	21,54	25,03	25,14	27,12	27,20	30,23
Pharmaq	14,89	17,56	21,71	25,05	25,25	26,69	27,69	30,72
MSD	15,02	18,72	20,67	25,10	25,49	26,12	27,31	28,8
T-bet	15,15	18,40	20,80	24,78	24,80	26,88	27,60	30,42
GATA-3	15,00	18,19	21,27	25,47	25,36	26,86	27,53	30,62
EOMES	15,30	18,60	20,73	25,42	25,63	27,00	28,38	30
IGY	15,20	20,18	22,23	24,88	25,09	25,25	25,79	28,35
DNA-vak	16,30	19,86	22,21	24,46	24,77	26,46	28,00	30,82
InterferoC	16,26	19,75	22,76	25,13	25,19	26,03	27,32	28,94
Tomt plas	16,42	20,24	22,72	24,57	25,04	26,03	26,22	28,52

Appendiks

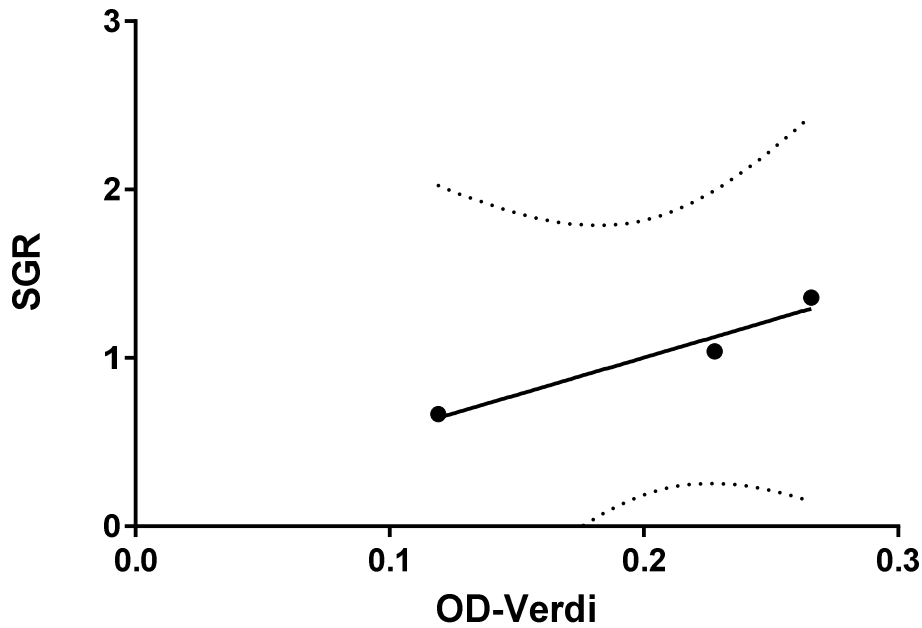


Figur 22: Gjennomsnittsvekt for fisk fra samtlige grupper, fra alle prøveuttak.



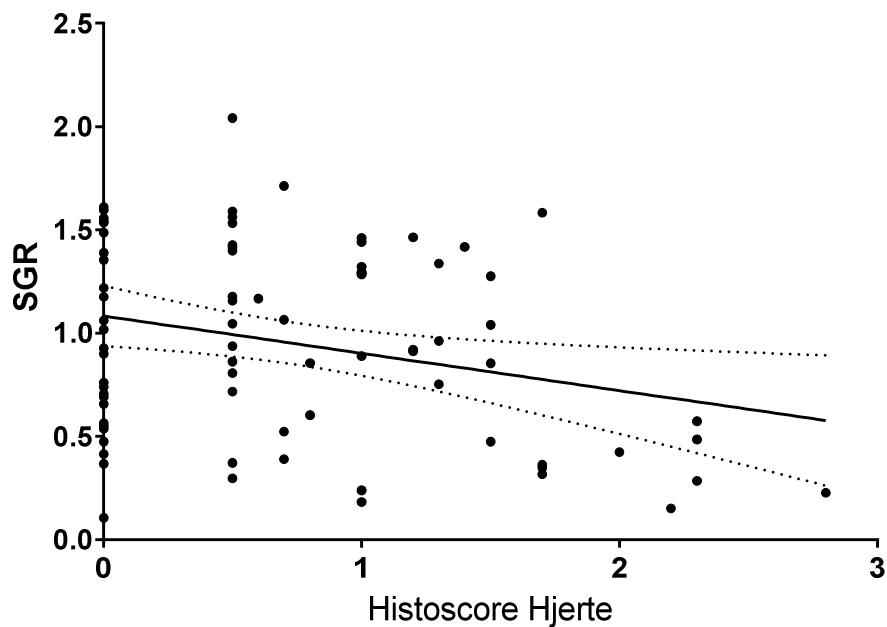
Figur 23 Korrelasjonen mellom vekt og lengde i samtlige fisk hvor hver enkelt fisk er plottet mot dens lengde. Svarte prikker er friske individer i immuniseringsforsøket, og røde prikker er fisk smittet med SAV-3.. Her kommer også «outliers» godt frem.

Appendiks 3



Figur 24: Korrelasjon mellom vekst (SGR) og inaktiverede virusvaksiner IHV-LD og IHV-HD inkludert kontroll tomt plasmid. T-bet, GATA-3, Eomes ble ikke inkludert da disse hadde ulik antigenlevering. OD-verdiene er fra dag 70 etter immunisering plottet mot dag 28 etter smitte.

Appendiks 4



Figur 25: SGR plottet mot histoscore i hjertet (28 dps) og beregnet med lineær regresjonsanalyse. Konfidensintervallet (0,95) er presentert som stipulert linje. N=80.