

Mastergradsoppgave

Therese J. T. Berggren

Letal effekt av plasma og hudslim
fra atlantehavslaks (*Salmo salar*)
og brunørret (*Salmo trutta*) på
ektoparasitten *Gyrodactylus salaris*

Er det en sammenheng mellom letal effekt
og aktivering av komplement?



Høgskolen i Telemark

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Masteroppgave i Natur Helse og Miljøfag

Therese J. T. Berggren

Letal effekt av plasma og hudslim fra
atlanterhavslaks (*Salmo salar*) og brunørret
(*Salmo trutta*) på ektoparasitten *Gyrodactylus*
salaris.

Er det en sammenheng mellom letal effekt og aktivering av
komplement?

2012

Høgskolen i Telemark
Avdeling for allmennvitenskapelige fag
Institutt for natur-, helse- og miljøfag
Hallvard Eikas plass
3800 Bø i Telemark

<http://www.hit.no>

© 2012 Therese J. T. Berggren

Sammendrag

Parasitten *Gyrodactylus salaris* har flere arter laksefisk som verter. Blant disse er laks (*Salmo salar*) og brunørret (*Salmo trutta*) som viser helt ulik mottakelighet. Ørret klarer å bekjempe parasitten etter relativt kort tid, mens atlantehavslaks mer mottakelig. Dette desimerer laksepopulasjonen i det området parasitten befinner seg. Det er enda ikke funnet klare svar på hvorfor det er så stor forskjell i mottakelighet mellom de to nært beslektede artene.

Denne masteroppgaven tar sikte på å finne immunologiske forskjeller i resistens mot *G. salaris* hos laks og ørret. Forskjellene ble undersøkt *in vitro* ved utførelse av et overlevelsesforsøk hvor parasitten ble utsatt for plasma og mukus fra de to fiskeartene. Undersøkelser ble utført for å kartlegge om forskjell i mottakelighet kunne skyldes alternativ komplementaktivering i plasma og mukus. Resultatene ble korrelert mot målinger av alternativ komplementaktivering i et klassisk ACH50 assay på alikvoter av de samme prøvene.

Plasma og mukus fra laks og ørret virker letalt på *G. salaris in vitro*. Det er ingen forskjell mellom artene i deres letale effekt på parasitten. Letaliteten i plasma og mukus kan fjernes ved varmebehandling, forbrukes ved tilsetning av zymosan og blokkeres ved tilsetning av EDTA.

Det var ikke forskjell mellom lakseplasma og ørretplasma i graden av alternativ komplementaktivering. Mukus fra ørret gav en ACH50-verdi, mens mukus fra laks falt under deteksjonsgrensen for metoden. Det er ennå uklart om det er en sammenheng mellom parasittletalitet og alternativ komplementaktivering. Det ble ikke funnet en klar korrelasjon mellom disse parameterne.

Abstract

The parasite *Gyrodactylus salaris* has, among others, two hosts *Salmo trutta* and *Salmo salar* showing completely different susceptibility. Trout can combat this parasite after a relatively short time. While *G. salaris* kills young salmon, and this decimate the salmon population in the area parasite or infected salmon are. It is not yet found clear answer as to why there is so much difference in susceptibility between the two closely related species.

Differences were tested *in vitro* by performing a survival experiment. The parasite was exposed to the plasma and mucus from the two species. This thesis aims to find immunological differences in resistance to *G. salaris* in salmon and trout. Studies were conducted to determine whether differences in susceptibility could be due alternative complement activation in plasma and mucus. The results were correlated to measurements of alternative complement activation in a classic ACH50 assay of aliquots of the same samples.

Plasma and mucus from salmon and trout is lethal to *G. salaris in vitro*. There is no difference between species in the ability to kill the parasite. Case-fatality in plasma and mucus can be removed by heat treatment, consumed by the addition of zymosan and blocked by addition of EDTA. There was no difference between salmon and trout plasma in the degree of alternative complement activation. Mucus from trout gave an ACH50 value, while mucus from salmon returned no ACH50 value. It is still unclear whether there is a correlation between parasite lethality and alternative complement activation. There was not a clear correlation found.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
Abstract	4
1 Innledning	7
1.1 Fiskehud	7
1.2 <i>Gyrodactylus salaris</i>	8
1.3 Immunforsvaret	10
1.4 Komplementsystemet hos teleoster.....	11
1.5 Samspill mellom verter og <i>G. salaris</i>	16
2 Problemstilling	19
3 Metoder	20
3.1 Plasma og mukus fra <i>Salmo salar</i> og <i>Salmo trutta</i>	20
3.2 Etterbehandling av plasma og mukus for å lage kontrollprøver.	20
3.3 Produksjon av levende parasitter til overlevelsesforsøk.....	21
3.4 <i>In vitro</i> overlevelsesforsøk av <i>Gyrodactylus salaris</i>	21
3.5 <i>In vitro</i> overlevelsesforsøk av <i>Gyrodactylus salaris</i> i individuelle prøver.	23
3.6 Assay for alternativ komplementaktivering.....	23
3.6.1 Røde blodceller fra kanin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), innhenting og bearbeiding.....	24
3.6.2 Buffere.....	24
3.6.3 Oppsettet	25
3.7 Statistisk behandling	26
4 Resultater	28
4.1 Overlevelse av <i>Gyrodactylus salaris</i>	28
4.2 Overlevelse av <i>Gyrodactylus salaris</i> i individuelle prøver.	31
4.3 Aktiveringsgraden av alternativ komplement.	33
4.4 Sammenlikning av overlevelsesforsøk og ACH50assay.	36
5 Diskusjon	38
5.1 Overlevelse av <i>Gyrodactylus salaris</i> i kontakt med plasma og mukus.	38
5.2 Sammenlikning av overlevelsesforsøk og ACH50 assay.	41
5.3 Diskusjon av metoden.	44
6 Konklusjon	46
7 Referanser	47
8 Oversikt over tabeller og figurer	53

Forord

Oppgaven er skrevet for å oppnå master i «natur-, helse- og miljøvern» ved Høgskolen i Telemark avdeling Bø. Det praktiske arbeidet er blitt utført ved Veterinærinstituttet i Oslo og ved Institutt for naturvitenskapelige fag på Universitetet i Agder i Kristiansand.

Jeg vil gjerne takke for muligheten til å skrive min avsluttende masteroppgave ved UiA og for veiledning av førsteamanuensis Yngvar A. Olsen. Jeg vil takke professor Espen Lydersen som har vært min veileder ved HiT. Seksjonsleder Tor Atle Mo ved Avdeling for parasittologi på Veterinærinstituttet, skal ha en stor takk for lån av fasilitetene der og for hjelp med smitte av Lærdalslaksen. Jeg vil takke NINA Forskningsstasjon på Ims ved daglig leder Knut Aanestad Bergesen for lov til å benytte flere eksemplarer av atlantehavslaks og brunørret, og Ljøsne klekkeri i Lærdal ved Torkjell Grimelid for levering av lakseyngel. Til slutt vil jeg takke førsteamanuensis Lars Korslund for hjelp med valg av statistisk analyse.

<Kristiansand, 2012>

<Therese J. T. Berggren>

1 Innledning

Salmo er en slekt fiskearter hvor alle blir infisert av parasitter. Parasitt og vert påvirker hverandre på flere ulike måter. Noen slike forhold er ikke dødelige og artene eksisterer sammen hele eller deler av livsløpet. For andre kan dette verts-/parasittforholdet være dødelig, slik som forholdet mellom atlantehavslaks og *Gyrodactylus salaris*. Det finnes populasjoner av laks, blant annet baltisk laks der smittede individer ikke dør av parasittinfeksjon.

1.1 Fiskehud

Fiskers hud er forskjellig fra terrestriske vertebrater ved at epidermis består av levende celler. Det muliggjør transport av aktive stoffer til overflaten. Det åpner også for reseptorer på overflaten av celler til oppdagelse og signalering av antigener. Fiskehud gir en fysisk og kjemisk barriere mot feste og penetrering av mikrober. Dersom en mikrobe skulle komme gjennom huden, vil den møte det humorale og cellulære forsvaret. Et viktig humoralt forsvarssystem er komplementsystemet. Parasitter vil trolig også påvirkes av andre vekstbegrensende faktorer i plasma, som transferrin og anti-protease. Disse stoffene er vist å ha en vekstbegrensende effekt på bakterier. Det finnes også bakteriedrepende enzymer som lysozym. Den ikke-adaptive delen av immunsystemet vil med sin tilstedeværelse gi et hurtigvirkende forsvar som er relativt temperaturuavhengig, i motsetning til det spesifikke immunsystemet (Ellis 2001).

Fiskehuden deles inn i epidermis og dermis. I epidermis finnes flere lag med plateepitel bunnet til hverandre. Under epitelet finnes mukusceller, disse åpnes igjennom små porer mellom cellene i plateepitelet. Mukuscellene har høy celletetthet (flere hundre per mm) og produserer mukus-slimet som dekker epitelet (Buchmann & Bresciani 1998; Kryvi & Totland 1997; Buchmann 1999). Nederst grenser epidermis til basalmembranen og under denne ligger dermis. I dermis finnes blodårer, kromatoforer (celler med lysreflekterende pigmenter), skjell og nerver (Kryvi & Totland 1997). Ved inflammasjon hos karpe er det funnet forskjellige leukocytter, makrofager, nøytrofile, eosinofile og andre granulocytter fordelt i epidermis (Cross & Matthews 1993).

Mukus gjør fisken sleip og består hovedsakelig av glykoproteiner (Shephard 1994; Buchmann & Bresciani 1998). Mukus finnes på hud, gjeller og i tarm. På fiskehuden hjelper mukus til å minke svømmemotstand (Breder 1926). Mukus inneholder komplement (Sakai 1992; Harris et al. 1998; Buchmann 1999), lysozymer, proteaser (Fletcher & Grant 1968; Bullock et al. 1978), antimikrobielle peptider (Buchmann & Bresciani 1998; Smith et al. 2000), antistoffer

(Fletcher & Grant 1969), lektiner (Yano 1996) og proteolytiske enzymer (Hjelmeland et al. 1983).

Det er mange ulike celler som produserer komplementproteiner. Hepatocytene i leveren produserer de fleste komplementkomponentene. Andre vev, som fiskehuden (Gonzalez et al. 2007), nyre-, skjelettmuskel- og beinvev, transkriberer undergrupper av C3 og C7. Dette er vist for regnbueørret. Videre ble det observert genuttrykk for ulike undergrupper av C3 i forskjellige vev. C3-1(mRNA) ble funnet i gjellene, huden, musklene og hjertet, mens C3-3 (mRNA) ble funnet i hjerte og i kjønnskjertlene (Løvoll et al. 2007a; 2007b).

1.2 *Gyrodactylus salaris*

Phylum – Platyhelminthes

Klasse – Monogenea (Carus 1863)

Underklasse – Monopisthocotylea (Odhner 1912)

Orden – Gyrodactylidea (Bykowsky 1937)

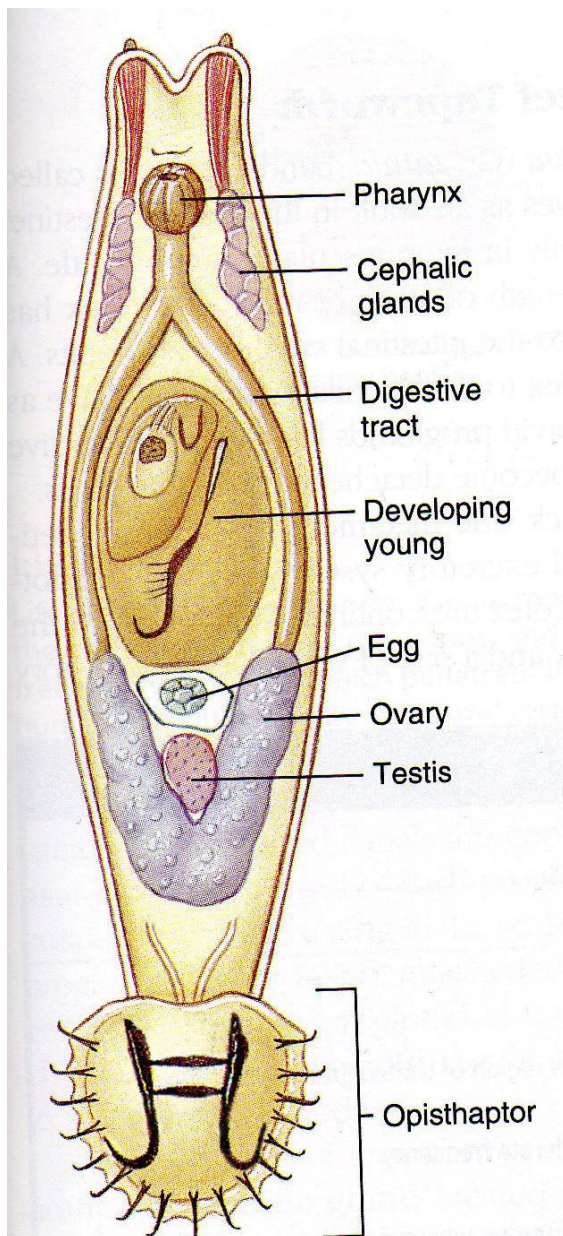
Familie – Gyrodactylidea (Van Beneden & Hesse 1863)

Slekt – *Gyrodactylus* (Von Nordman 1932)

Art – *Gyrodactylus salaris* (Malmberg 1957)

Figur 1. Taksonomi av Gyrodactylus salaris. I parentes står personen som beskrev taxonet. Klassifikasjonen er foreslått av Lebedev (1988).

Figur 1 gir en oversikt på taksonomi til *Gyrodactylus salaris*. Dette er en ektoparasitt på laks som tilhører klassen Monogenea, også kjent som haptormark. Parasitten har et krokorgan (opisthaptor) i den ene enden. Krokene gjør at parasittene kan motstå vannstrøm langsmed gjeller og fiskehud uten å falle av. Utseendet på krokene varierer mellom artene i slekten og brukes blant annet som artskjennetegn. Arter i slekten er ektoparasitter som lever på fiskegjeller og hud. Et fåtall er endoparasitter og finnes i urinblæren til frosk og skilpadder, og en av parasittene finnes i øyet hos flodhest. Haptormark er spredt og vanlig over hele verden, men gjør relativt lite skade på verten under naturlige forhold. De gjør mest skade dersom vertene står tett sammen slik som ofte er tilfelle for oppdrettsfisk. Livssyklusen til parasittene gjennomføres med kun en vert.



Figur 2. Skjematisk beskrivelse av morfologien til *Gyrodactylus* sp. Bildet er hentet fra boken «Integrated principles of zoology» (Hickman et al., 2008).

Haptormarken *Gyrodactylus salaris* er en 0,5-1 mm lang ectoparasitt som lever på fiskehud, gjeller og finner. Den er en hermafrodit og formerer seg kjønnnet og ukjønnnet. Parasitten føder levende individer som allerede bærer på nye avkom, se Figur 2. Under optimale forhold kan ett enkelt individ få svært mange avkom på kort tid. Parasitten overlever kun i ferskvann og fester seg til sin vert ved hjelp av kroker (haptorer) i kaudalenden. Den kan overleve i brakkvann over kortere tid og kan på den måten bli transportert mellom to nærliggende elver (Bakke et al. 2002).

I svelgregionen til *G. salaris* skilles det ut proteinsplattende enzymer og fordøyelsesvæsker slik at den kan ernære seg på hudvevet. Som et resultat av dette, dannes det sår i vertens

hud. I de eksponerte sårene kan det komme infeksjoner av bakterier, virus og/eller sopp. Sårene kan gi osmotiske problemer som påvirker vertens saltbalanse (Mo 1990).

Parasitten beveger og fester seg på fiskehuden ved bruk av opisthaptor, vist i figur 2 (Malmberg 1993). Når *G. salaris* fester seg til fiskehuden, bruker den opisthaptoren med to haptorer og 16 marginalkroker. Ved bevegelse, fødsel og næringsopptak brukes cephaliske lapper som sitter på toppen av dyret festet til de cephaliske kjertlene, og pharynx. Lappene skiller ut et slags slim som gir feste.

G. salaris blir patogen ved ukontrollert populasjonsvekst. Dette fører til at verten i større grad kan bli utsatt for angrep fra mikroorganismer (Scott & Robinson 1984; Bakke et al. 1992).

Det er registrert over 400 arter av *Gyrodactylus* i verden, og det finnes flere forskjellige arter her i Norge. *Gyrodactylus* familien har lav morfologisk og biologisk diversitet og mange har kun én vert (Bakke et al. 2002). *Gyrodactylus salaris* ble for første gang påvist i Norge i 1975 ved Forsøksstasjon for fisk, nå Akvaforsk, Sunndalsøra. Den ble ført til landet av laks fra Sverige og herfra spredte den seg til andre anlegg og vassdrag (Johnsen & Jensen 1991). Det har skjedd ved utsetting, rømning og vandring av infisert fisk. Det er genetiske forskjeller mellom norske *G. salaris*-bestander, og dette tilsier at det må ha vært minst 4-5 introduksjoner til Norge (Johnsen et al. 1999). I 2011 var parasitten registrert i 48 vassdrag og er per i dag fortsatt en sterk trussel mot overlevelsen av villaksstammer.

G. salaris har laks (*S. salar*) som hovedvert, men kan også finnes på andre laksefisk (se kapittel 1.6). Arten *G. derjavinoidea* har brunørret som hovedvert, men finnes også på laks. Denne parasitten finnes sammen med *G. salaris* i flere norske elver.

1.3 Immunforsvaret

Vertebrater er utrustet med adaptivt og medfødt immunforsvar. Adaptiv immunitet spiller en stor rolle når kroppen skal forsvare seg mot infeksjoner som dukker opp gjentatte ganger. Dette gjøres ved at det produseres hukommelsesceller. Disse sørger for en hurtig og spesifikk reaksjon som ofte ender med at de patogene organismene ikke klarer å overleve. Den adaptive immunresponsen er avhengig av å gjenkjenne antigenet samt tid til å produsere antigenspesifikke lymfocytter til bekjempelse av de fremmede mikrobenes. Dette medfører en tidsforsinkelse før responsen har full effekt.

Dette er ikke tilfelle for medfødt immunrespons som er et førstelinjeforsvar for verten. Det kan stoppe mange mikrobeangrep eller begrense dem, frem til adaptiv respons har utviklet seg. Det medfødte immunforsvaret har ikke spesifikke reseptorer for en bestemt patogen

organisme. Celler som makrofager har mønstergjennkjennende reseptorer som gjenkjenner overflatestrukturer i cellemembraner. Overflatestrukturene er felles for fremmede organismer som bakterier og parasitter.

1.4 Komplementsystemet hos teleoster

Komplement er en essensiell del av det medfødte immunsystemet og involverer rundt 35 proteiner som er, membranbundne eller løst i serum eller sekreter. Komplementsystemet har mange funksjoner, men er mest kjent for sin letale effekt på patogene organismer. Dette gjøres ved en lang kjede av reaksjoner. Sluttresultatet er at det dannes porer i membranen som gjør at den fremmede mikroorganismen lyserer. Komplement fører også til opsonisering av antigenet og inflammasjon. Aktiveringen av komplement kan ha en letal effekt på mikrober, parasitter, fagocytose, inflammatoriske reaksjoner, immunkompleks gjenkjenning og produksjon av antistoff.

Komplementsystemet kan hovedsakelig aktiveres på tre måter; direkte av fremmede mikroorganismer/parasitter, ved lektin-aktivering via mannose på mikroben/parasitten, eller ved et antistoff-antigen (Ag-Ig) kompleks. For den adaptive immunresponsen er aktiveringen av dette komplekset viktig for at immunresponsen skal komme i gang. Den kan skille mellom egne og fremmede celler, særlig fordi de fremmede cellene mangler reguleringsproteiner til å stoppe komplementet i å bli aktivert. Komplementets proteiner kan også markere fremmede celler (opsonisering), som til slutt vil føre til fagocytose eller lyse av cellene på grunn av dannelse av det terminale komplementkomplekset. Inflammatoriske komponenter (C3a, C5a) dannes også ved aktivering.

Hos fisk er komplementaktivering veldig lik prosessen til pattedyrene.

Komplementkomponentene hos fisk har mange likhetstrekk med komponentene hos pattedyrene. Men kunnskapen om komplementproteiner, regulatoriske proteiner, og komplementreseptorer hos fisk, er langt fra komplett. Det er uklart om alle komplementfunksjonene som finnes hos pattedyrene også finnes hos fisk. Men trolig har fisk et mer effektivt komplementsystem enn pattedyrene. Teleoster produserer mange isoformer av komplementproteinene, slik som C3 og faktor B. En hypotese er at funksjonen til alle isoformene av komplementkomponentene er å utvide repertoaret til den medfødte immunresponsen og dermed gjøre komplementaktivering mer effektiv (Holland & Lambris 2002).

Komplementfunksjonene som ofte blir beskrevet hos fisk er basert på pattedyrenes komplementsystem, men vi kan trekke flere paralleller mellom komplementsystemet hos fisk og pattedyr. Teleoster viser stor diversitet i komplementkomponenter, særlig for C3, som kan ha flere enn 5 isoformer (Sunyer et al. 1996; Sunyer et al. 1997; Nakao et al. 2000).

Diversiteten kan være utviklet for å utvide deres mulighet for gjenkjennelse hos det medfødte immunforsvaret (Sunyer & Lambris 1998).

I normalt serum er de fleste av komplementkomponentene i et inaktivt stadium, og ved aktivering fungerer de enten som enzymer eller proteiner. Disse kan binde seg til strukturer på fremmede mikroorganismer. Komplementaktivering kan forekomme ved klassisk-, alternativ-, eller lektin aktiveringsvei. Alle tre aktiveringsveiene er blitt påvist aktivert hos fisk, unntatt hos kjeveløse fisk som ser ut til å mangle klassisk komplementaktivering og det membranangripende terminale komplementkomplekset (Fujii et al. 1992; Nonaka 1994).

Fiskens komplementsystem er mer varmesensitivt enn hos pattedyr og har en lavere optimal aktiveringstemperatur. Det er varmfølsomme komponenter i komplement som blir varmeinaktivert og denaturert. Som et resultat av dette mister hele systemet muligheten til å lysere målceller. Den hemolytiske aktiviteten i serum fra regnbueørret, immunisert med røde blodceller fra gullfisk (GFRBC), forsvant etter oppvarming til temperaturer høyere enn 44°C i 20 minutter ved bruk av GFRBC som antigen. Det er blitt vist at kaldtvannsfisk har et komplement som blir inaktivert ved lavere temperaturer enn tropiske fiskers komplement. Disse funnene kan indikere at fiskeartens temperaturløseområde påvirker temperaturen som vil gi varmeinaktivering av komplement (Sakai 1992).

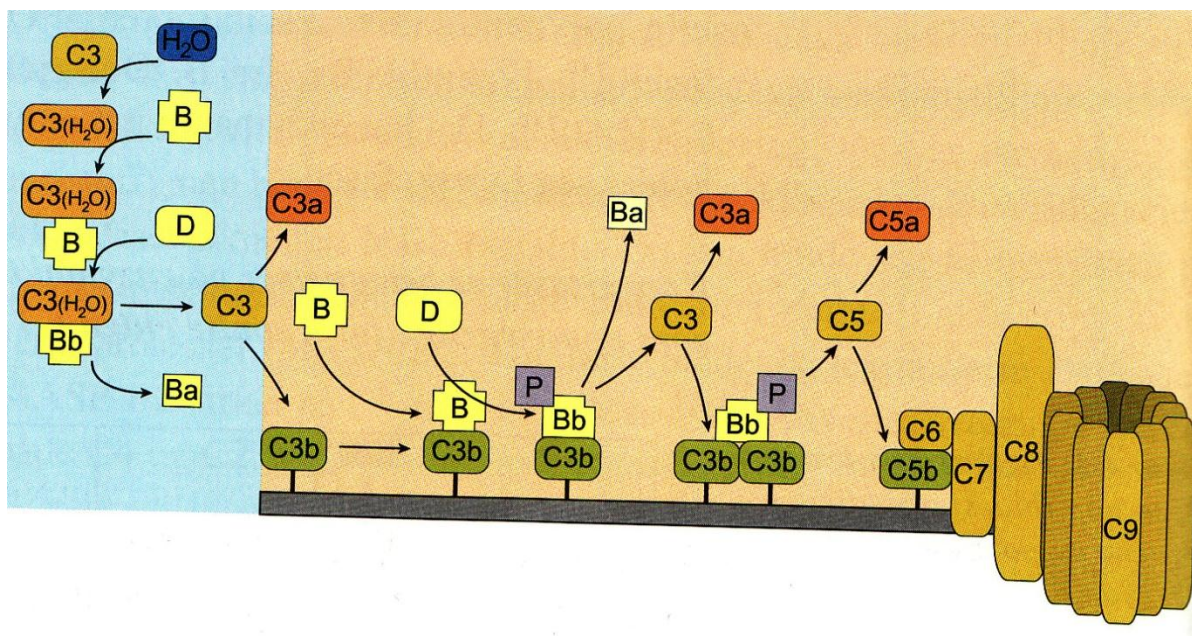
Generelt viser komplementsystemet hos fisk størst aktivitet ved 15-25°C og opprettholder aktiviteten helt nede i 0-4°C (Day et al. 1970; Gigli & Austen 1971; Rijkers 1982; Koppenheffer 1987; Lobb & Hayman 1989). Hos vekselvarme terrestriske virveldyr som reptiler og amfibier, er det blitt observert at disse kan opprettholde sin komplementaktivitet ved varierende temperaturer (Koppenheffer 1987). Hos kaldtvannsfisker inaktiveres komplementsystemet dersom serumet blir holdt ved en temperatur på 40-45°C i 20 minutter (Legler et al. 1967; Dorson et al. 1979; Giclas et al. 1981; Sakai 1981; Røed et al. 1990, 1992).

Fiskens komplement er mer vanskelig å bevare frem til og under forsøk, enn det er for komplement fra pattedyr. Ved lagring av serum ved 15°C i 24 timer forbrukes rundt 50 % av den hemolytiske aktiviteten til regnbueørrets komplement og under lagring ved -20°C ble all

komplementaktivitet forbrukt etter fem timer. I -80°C vil komplement bli bevart og nedbrytningen stoppe opp (Sakai 1992).

Ved alternativ komplementaktivering blir C3 aktivert direkte av ulike mikrober og parasitter når faktorene B og D er til stede. Alternativ komplement aktiveres uten foregående antigen-antistoffbinding. Alternativ komplement aktiveres av strukturer på celleoverflaten til Gram-negative bakterier, insulin og erythrocytter fra mange arter, også kanin. Cobra venom faktoren (CVF) brukes til å aktivere alternativ komplement (Matsuyama et al. 1988). CVF finnes i kobragiften. Det er C3b fra kobra som binder seg til humant Bb og forårsaker aktivering av den alternative komplementkaskaden, slik at komplement komponenter forbrukes. Dette er en metode som har vært brukt eksperimentelt til å fjerne komplement. Zymosan fra gjærceller utløser også komplementkaskaden slik at komplementaktiviteten forbrukes.

Aktivering skjer gjennom komplementfaktorene C3 og C5 til C9, som spaltes og går sammen i ulike prosesser, se Figur 3. Det starter med at C3b, generert fra delingen av C3, binder seg til hydroxyl eller aminogrupeer av karbohydrater eller proteiner på en fremmed celleoverflate. Faktor B binder seg til C3b og blir aktivert og delt i Bb og Ba av faktor D. Resultatet er C3bBb komplekset som fungerer som C3 konvertase. C3 konvertasen forårsaker en forsterkning av aktiveringen ved at den deler flere C3 til C3a og C3b. Samlet danner de en C5 konvertase når et ytterligere C3b blir bundet til komplekset (C3bBbC3b). C5 konvertasen splitter C5 og starter sammensetningen av det terminale komplementkomplekset som til slutt vil gjøre at cellen lyserer.



Figur 3. De ulike trinnene i alternativ komplementaktivering. Det starter med at C3 hydrolyseres og binder faktor B, og sammen binder de faktor D. Etter å ha spaltet av Ba, dannes komplekset C3 konvertase. Den spalter et C3 molekyl. C3b bindes til komplekset og det dannes en C5 konvertase. Denne spalter C5 komponentene og starter dannelsen av det terminale komplementkomplekset, som består av C5b, C6, C7, C8 og C9 (Lea 2006).

Aktiviteten til det alternative komplementet måles i en standard testmetode ved måleenheten ACH50 – alternativ komplementaktivitet ved 50 % hemolyse av kaninerytocytt. Det er vanlig å bruke kaninerytocytt siden disse lett lyseres av komplement. Verdiene av ACH50 hos beinfisk har vist seg å være høyere enn verdier målt hos pattedyr under optimale forhold (Yano et al. 1988; Yano 1992). Dette kan indikere at rollen til alternativt komplement er viktigere hos fisk enn hos pattedyr. Yano (1992) definerte en enhet av ACH50 for fisk til å være den mengden av ubehandlet serum som lyserer 50 % av 4×10^7 kaninerytocytt ved 20°C , i en gelatin veronal buffer som inneholder 10 mM EGTA og 10 mM Mg^{2+} i et totalt volum på 0,7 ml. Han viste også at den optimale pH verdien og inkuberingstiden er forskjellig mellom ulike fiskearter.

I emnet 4319 «retteia oppgave» testet undertegnede hvilken inkuberingstemperatur, inkuberingstid, pH- og Mg^{2+} -betingelser, som ville være optimale for test av ACH50 i plasma eller mukus hos atlantehavslaks og brunørret. De fire parameterne gav følgende optimale betingelser: temperatur $17,5^\circ\text{C}$, pH 7,5, Mg^{2+} 0,010 M, og en inkuberingstid på 120 minutter. Klassisk komplement trigges ved binding av antistoff til en celleoverflate (Ag-Ig kompleks). Det starter med at immunkomplekser binder C1rC1sC1q. Dette komplekset kalles C1. C1 blir

aktivert av et antigen-antistoff kompleks. Dette komplementet er avhengig av både Ca^{2+} og Mg^{2+} for å bli aktivert. C1rC1sC1q splitter C4 og C2. På denne måten dannes C3/C5-konvertasen som igjen spalter C3 og C5. Spaltningsproduktet C5b er starten på dannelsen av det terminale komplementkomplekset som induserer at målcellen lyserer.

Lektin komplementaktivering aktiveres ved binding av et proteinkompleks som inneholder mannose-bindende lektin (MBL) og serin-protease (Agrawl et al. 2001). Mannose-bindende lektin blir assosiert med serin-protetaser 1 og 2 (MASP-1 og MASP-2) som reagerer med bakteriell celleoverflate. Dens aktivering er altså uavhengig av antistoff. MBL/MASP komplekset virker som C1 ved at det splitter både C4 og C2, og leder frem til dannelse av C3 konvertase. Etter splittingen av C4 og C2 er aktiveringsveien lik aktivering av klassisk komplement. Hos regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*) er tre homologe mannose-bindende lektiner (MBL) identifisert og karakterisert (Kania et al. 2010).

På overflaten av målcellen vil komplementaktiveringen til slutt danne det terminale komplementkomplekset som består av C5b, C6, C7, C8 og 15-16 C9-molekyler. Dette komplekset lager hull i cellemembranen, og cellen vil miste osmotisk likevekt som fører til at den sprekker på grunn av vannet som strømmer inn. Dette er årsaken til hemolyse av erytrocytter, cytolyse av vevsceller og bakteriolyse (Sakai 1992).

Røde blodceller fra kanin (RaRBC) brukes som komplementaktivator og målceller. Disse er sensitive for alternativ komplementaktivering. Graden av alternativ komplementaktivering avhenger av komponenter som allerede befinner seg i serum. Biosyntese av nye komplementkomponenter går sakte. Aktivering av komplement vil derfor bli fulgt av en reduksjon av komplementnivå i serum (Sakai 1992).

Zymosan fra gjærsopp blir brukt som en aktivator av alternativ komplement og som et mål for fagocytose av polymorfnukleære leukocytter, makrofager og andre fagocytterende celler. Det brukes eksperimentelt til å forbruke komplement og generere alle komplementaktiveringskomponentene (C3a, C5a, Ba, Bb, osv). Zymosan aktiverer alle tre former for komplementaktivering hos menneske. Normalt menneskeserum inneholder naturlig antistoff mot sopp som aktiverer klassisk komplement. Zymosan består hovedsakelig av en polymer av mannose, som resulterer i aktivering av lektin aktiveringsveien via mannosebindende lektin, og alternativ komplement aktiveres spontant og aggressivt på zymosan (Huber & Weiss 1989).

EDTA (ethylene diamine-tetraacetic acid) brukes for å binde Ca^{2+} og Mg^{2+} ioner. For at den klassiske veien skal aktiveres må både Ca^{2+} og Mg^{2+} være til stede, først da kan et antigen-

antistoff-kompleks dannes. Ca^{2+} stabiliserer C1-komplekset, og Mg^{2+} stabiliserer C2. Alternativ aktiveringsvei trenger kun Mg^{2+} for å fungere. Lektin aktiveringsveien starter med MBL eller ficoliner. Disse er Ca^{2+} avhengige. Ved å tilsette EDTA vil disse komplementveiene blokkeres for aktivering.

De tre komplementveiene har forskjellige krav for kationer. Det gjør det mulig å se på graden av alternativ komplementaktivering alene. Dette kan utføres ved å tilsette EGTA (ethyleneglycol-tetraacetic acid), som binder Ca^{2+} og ikke Mg^{2+} (Yano 1992).

1.5 Samspill mellom verter og *G. salaris*.

Flere arter i slekten *Salmo* kan være verter for *G. salaris*, med ulik grad av resistens. Brunørret begrenser omfanget av hvorvidt parasitten får festet og reprodusert seg. Infeksjonen blir eliminert etter kort tid. På individer av *Salmo salar* fra den russiske elva Neva fester *G. salaris* seg jevnlig, men blir ikke værende og reproduksjonen er begrenset (Bakke 1991). Infeksjoner blir eliminert. Parasitten klarer å feste seg på bekkerøye og kan her, i en moderat grad, reprodusere seg. Bekkerøye klarer ikke å eliminere parasittinfeksjonen i alle tilfeller. Hos regnbueørret og arktisk røye fester parasitten seg og graden av reproduksjon går fra moderat til høy. Infeksjonen blir ikke eliminert i alle tilfeller. Arten i slekten *Salmo* med lavest resistens mot parasitten er norsk atlantehavslaks. Her er parasitmottakeligheten høy, reproduksjonen høy, og det er ikke blitt observert eliminering av parasitten (Bakke 1991). Det er variasjon mellom individer i resistens mot parasitter, og noen stammer virker mer resistente, for eksempel stammen i Batnfjordselva. Krysninger av atlantehavslaks og brunørret vil i snitt ha en større resistens enn atlantehavslaks, og noen hybrider vil være helt resistente (Bakke et al. 1999).

Det er lakseunger som blir skadet av en *G. salaris*-smitte, mens de voksne individene er mindre følsomme. Resultatet av ulike infeksjoner sammen med en defekt saltbalanse, gjør at lakseungene dør etter kort tid.

Det er enda ikke klart hva forskjellen i vertenes forsvar er som kan muliggjøre bekjempelse av parasitten. En mulighet for bekjempelse kan ligge i det medfødte immunforsvaret. Dette immunforsvaret består av komplementsystemet, lysozym og andre forsvarsmolekyler som produseres av celler i huden. Slike aktive komponenter finnes i mukus hos fisk (Yano 1996). I hvilken grad *G. salaris* er følsom for disse immunkomponentene er enda ikke studert grundig. Komplementsystemet finnes i vertens mukus blant annet i hudslim (Sakai 1992; Harris et al. 1998; Buchmann 1999), men har lavere aktivitet her enn i plasma. Graden av aktivering hos

komplementsystemet, eller eventuelt andre aktive stoffer, kan være nøkkelen for bekjempelse av *G. salaris*.

Dersom *G. salaris* kommer i kontakt med høye konsentrasjoner av plasma fra atlantehavslaks, vil det bare ta noen minutter før halvparten av parasittindividene er eliminert. Ved en serumfortynning på 1:200 tar det en time før halvparten er eliminert (Harris et al. 1998). Direkte kontakt med plasma forutsetter at parasitten beiter seg gjennom epidermis til dermis, siden det ikke er blodårer i epidermis.

Det er vist *in vitro* at fortynnet plasma fra både laks og brunørret har en letal effekt på parasitten. Det samme gjør mukus fra huden, men mukus har ikke like høy aktiveringsgrad som plasma. Undersøkelser tyder på at resistensfaktorer i mukus og plasma utgjør separate systemer. En viktig resistensfaktor er aktivering av det alternative komplementsystemet (Harris et al. 1998), som trolig fører til perforasjon av parasittens integument. Komplement finnes både i plasma og i mukus (Sakai 1992; Harris et al. 1998; Buchmann 1999), uten at det trenger å være korrelasjon mellom nivåene av komplement i de to væskene.

Det er blitt gjort overlevelsesforsøk av flatormlarver (*Discocotyle sagittata*) utsatt for plasma. Det ble utført *in vitro* med plasma fra regnbueørret og brunørret. Resultatet viste dødelighet hos *D. sagittata*. Ved forbehandling av serum/plasma, oppvarming til 45°C i 30 min, ble resultatet at dødeligheten avtok. Dødeligheten avtok også da det ble tilsatt EDTA. Ved å tilsette EGTA med ekstra Mg^{2+} økte dødelighetsraten, som indikerte at parasitten døde ved aktivering av alternativkomplement. Dette er resultater som kan forventes dersom en skal kunne si at alternativ komplementaktivering er med på å øke dødelighetsraten hos parasitten. Bilder fra skanning elektromikroskopi viste varierende grader av hudskader hos larver eksponert for fiskeplasma, mens kontrollen viste ingen skader. Skadene på huden var større hos larvene som ble utsatt for plasma fra brunørret enn fra regnbueørret, som tyder på ulik aktiveringsgrad hos de to vertene (Rubio-Godoy et al. 2003).

Atlantehavslaks tillot populasjonen av *G. salaris* å vokse til 3000 individer per fisk innenfor 6 uker. Mens laks fra Østersjøen, kalt baltisk laks, tillot 122 parasitter per vert i samme periode. I en immunhistokjemisk undersøkelse ble det vist at laksen med høy mottakelighet økte sitt uttrykk av interleukin-1 β , interferon- γ , interleukin-10. det var også økt infiltrasjon av CD3-positive celler i epidermis på finner med parasitter. Mindre mottakelige laks viste ingen innledende respons i finnene, men 3-6 uker etter infeksjonsutbrudd ble andre grener oppregulert. Ingen spredning av epitelceller ble sett i huden, og interleukin-10 kan spille en

rolle her. På grunnlag av disse funnene ble det foreslått at baltisk laks sulter parasitten og på den måten hindrer dens populasjonsvekst (Kania et al. 2009).

Buchmann & Bresciani viste i 1998 at komplementproteinet C3 hos regnbueørret bandt seg til cephaliske lappene hos *Gyrodactylus derjavini* og svakt til integumentet, huden.

Anatomiske forskjeller i huden mellom laksefiskartene kan også ha betydning for hvor lett parasitten kan feste seg, uten at dette er vist. Det kan også tenkes at andre sider ved immunforsvaret kan ha betydning, for eksempel antistoffer eller hvite blodceller. Det er påvist at slimcellene (begercellene) i huden har en sammenheng med graden av *G. salaris* infeksjon. Sterud et al. (1998) viste redusert slimcelletetthet og tynnere epidermis 14 dager etter *G. salaris* infeksjon hos atlantehavslaks. En mulig mekanisme er at god slimproduksjon virker beskyttende mot infeksjon.

Denne masteroppgaven tar sikte på å finne immunologiske forskjeller i resistens mot *G. salaris* hos atlantehavslaks og brunørret. Forskjellene undersøkes *in vitro* i plasma og mukus. Resultatene korreleres mot måling av alternativ komplementaktivering i et ACH50 assay på alikvoter av de samme prøvene.

2 Problemstilling

Det er kjent fra eksperimentelle undersøkelser og fra undersøkelser under naturlige betingelser i elv at laks (*Salmo salar*) er mer mottakelig for infeksjon og ofte ikke klarer å bekjempe *Gyrodactylus salaris*. Dette fører til ukontrollert populasjonsvekst og verten dør. Brunørret (*Salmo trutta*) klarer som regel å eliminere *G. salaris* smitte uten at dette fører til dødelighet hos verten.

Dette faktum fører til oppgavens hovedproblemstilling:

- Er det forskjell mellom plasma fra laks kontra brunørret når det gjelder den letale effekten på parasitten *in vitro*?
- Er det en tilsvarende forskjell når det gjelder hudslim (mucus)?

Delproblemstillinger

- Skyldes forskjellen i immunitet mellom de to laksefiskene ulik aktivitet av alternativ komplementaktivering, målt som hemolyse av kaninerytrocytter?
- Er det korrelasjon mellom dødelighet av parasitten ved eksponering for plasma eller mucus og aktiviteten av alternativ komplementaktivering?
- Kan dødeligheten i plasma eller mucus fjernes eller blokkeres med kjente aktivatorer eller inhibitorer av komplement?

Min hypotese, basert på tidligere undersøkelser av Harris et al. (1998), Yano (1992), Sakai (1992) og Buchmann (1998; 1999), er at komplementsystemet i plasma og mucus vil være dødelig for parasitten. Siden EDTA blokkerer alle aktiveringsveier for komplement vil tilsetning av EDTA til plasma og mucus hindre dødelig effekt. Zymosan vil forbruke komplement og varmebehandlingen vil ødelegge komplementproteinene og da hindre aktivering. Det betyr at plasma og mucus ikke vil ha noen dødelig effekt på parasitten. Tilsetning av EGTA + Mg^{2+} vil kun tillate alternativ komplement aktivering. Dersom plasma og mucus viser letal effekt etter tilsetning av EGTA+ Mg^{2+} kan det indikere at alternativ komplement er med på å drepe parasitten.

Min hypotese er videre at brunørret har et mer effektivt komplementsystem via alternativ aktiveringsvei enn laks. Det er også å forvente at det er en korrelasjon mellom letal effekt av plasma og ACH50-verdien målt hemolytisk.

3 Metoder

3.1 Plasma og mukus fra *Salmo salar* og *Salmo trutta*.

Plasma og mukus fra atlantehavslaks (*Salmo salar*) og brunørret (*Salmo trutta*) av sjøgående stammer (Alta), ble hentet fra NINA forskningsstasjon for fisk, Ims i Rogaland. Laksen hadde en gjennomsnittsvekt på 370,5 g, og brunørreten 202,8 g.

Fisken ble avlivet med et slag i hodet, og vasket med ionebyttet vann. Individene ble lagt på en isoporplate dekket av plastfolie. Ved bruk av en gummispatel ble mukus skrapet av fiskens kroppssider og samlet på plastfolien. Derfra ble mukus trukket opp i ei engangssprøyte, ført over i et mikrosentrifugerør og sentrifugert ved $9000 \times g$ i 6 minutter (Eppendorf sentrifuge 5410). Supernatanten ble overført i merkede cryorør. Noen rør til kontrollprøver ble etterbehandlet (se avsnitt 3.2). Alle ble overført til flytende nitrogen.

Blod ble samlet inn ved å sette en kanyle, $0,8 \times 25$ mm, bak gattfinnen inn til kaudalarterien. Blodet fra hvert individ ble samlet i hepariniserte vakuumbører (Venosafe VF-053SP, Terumo). Rørene ble sentrifugert ved $800 \times g$ i 10 minutter (Hettich EBA 85), plasma ble tatt ut med pasteurpipette og overført til merkede cryorør. Ubehandlet sammenslått plasma og mukus (se assay 3.4), ubehandlet individuelt plasma og mukus (se avsnitt 3.5 og 3.6) ble frosset direkte etter sentrifugering. Noen prøver ble etterbehandlet før frysning (se avsnitt 3.2). Prøvene ble frosset i flytende nitrogen før og under transporten og senere lagret ved -80°C .

3.2 Etterbehandling av plasma og mukus for å lage kontrollprøver.

Kontrollprøvene hadde til hensikt å fjerne eller hemme komplementaktivitet i plasma og mukus. Det ble laget fire typer plasma- og mukuskontroller til overlevelsesforsøket: Zymosanbehandlet, EDTA-behandlet, EGTA + Mg^{2+} -behandlet, og varmebehandlet. Etterbehandling ble utført rett etter at prøvene var tatt. Kontrollplasma ble fra fem individer slått sammen og alikvotert i 200 μl , frosset og lagret som tidligere nevnt (se avsnitt 3.1). Det sammen ble gjort med mukusprøvene.

Zymosanbehandlet plasma og mukus: 1 mg zymosan (Sigma, vare nr. 101111034) ble veid inn i et mikrosentrifugerør og tilsatt 1 ml sammenslått plasma eller mukus. Blandingen ble ristet godt og inkubert i 2 timer ved 16°C . Den ble også ristet under inkuberingen. Blandingen

ble sentrifugert ved $9000 \times g$ i 15 minutter og supernatanten frosset i flytende nitrogen (se avsnitt 3.1).

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 0,1 M (VWR, molecular biology grade, vare nr. 443882G) og ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA; Sigma-Aldrich, vare nr. 1001075306) + Mg^{2+} (magnesiumklorid, $MgCl_2 \times 6 H_2O$; Merck, p.a., vare nr. 5833), begge 0,1 M, ble blandet ut i buffer og tilsatt plasma brukt i overlevelsesforsøket (se avsnitt 3.4). Samme type kontrollprøver ble også laget for mukus. Varmebehandling av kontrollplasma og mukus ble utført i 30 minutter ved $45^\circ C$ (Varmeblokk Grant QBD2).

3.3 Produksjon av levende parasitter til overlevelsesforsøk.

Gyrodactylus salaris ble hentet fra Lærdalselva på el-fiskede laksunger i 2010. Disse ble brukt som smittekilde i kohabitantsmitte med frisk fisk. I desember 2011 ble 40 friske laksunger (Lærdalselvstamme 0+ fra Ljøsne klekkeri) transportert til Fellesakvariet ved NVH/VI. De ble satt i et kar med gjennomstrømmende vann i et smitte-rom. Infeksjonen fikk utvikle seg i ca 30 dager ved en vanntemperatur på $10^\circ C$. Fisken ble avlivet ved slag i hodet. Levende parasitter ble plukket av død laks med insektspinnsett et par minutter etter at den var avlivet og brukt i *in vitro* overlevelsesforsøk, se avsnitt 3.4 og 3.5. Forsøksdyrutvalget ved NVH/VI har gitt tillatelse til utførelse av forsøket.

3.4 *In vitro* overlevelsesforsøk av *Gyrodactylus salaris*.

I *in vitro* overlevelsesforsøket ble levende *Gyrodactylus salaris* eksponert for en fortyningsserie av plasma og mukus fra laks og ørret. Assayet ble utført i 96-brønners mikrotiterplater med flat bunn. Stereolupe (Leica zoom 2000) ble brukt for å se parasitten. 5-10 parasitter plukket av smittede laksunger med insektspinnsetter og lagt i enkeltbrønner med 50 μl akvarievann ved $4^\circ C$. Mikrotiterplatene ble plassert under stereolupen, deretter ble antallet levende parasitter notert fra hver enkelt brønn.

Kriteriene som ble brukt for å bestemme hvorvidt en parasitt var levende, var følgende to: 1. Parasitten var festet i substratet og viste respons på vibrasjoner og/eller hadde søkende bevegelser med framenden. 2. Dersom den ikke var festet i substratet, men hadde regelmessige sammentrekningsbevegelser. Døde parasitter ble gjenkjent ved at de var ubevegelige, ugjennomsiktige og oppsvulmete.

Mikrotiterplaten ble lagret i en time ved 4°C, og antall levende parasitter i hver brønn ble notert. Dette var en levedyktighetstest for at kun uskadde parasitter skulle telles med i selve forsøket. Brønner hvor det var under 5 eller over 10 levende parasitter ble ikke brukt videre i forsøket.

Fortynningsplaten for plasma ble satt opp ved å lage en 1:5 fortynning som bestod av, 24 µl plasma og 96 µl akvarievann. Det ble laget en seriell fortynningsrekke ved å overføre 60 µl fra denne brønnen til neste brønn. Her var allerede tilført 60 µl akvarievann. Prosedyren ble gjentatt slik at resultatet var en rekke med fortynninger på 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 og 1:160. Hver av fortynningene hadde nå et totalvolum på 60 µl. 50 µl fra hver fortynning ble overført en brønn på brettet med *G. salaris*. Dette gav et totalt volum på 100 µl i alle brønner med parasitter og den endelige fortynningsrekken. Samme metode ble utført for fortynning av mukus, men med lavere fortynninger. På fortynningsbrettet ble det startet med ufortynnet mukus, og endte med en 1:16 fortynning.

Det ble tilført 50 µl plasma fra brettet med på forhånd laget fortynningsserie til brønnene med parasitter. Dette plasmaet var laget ved å blande plasma slått sammen fra fem individer av laks eller ørret. På denne måten ble det nok plasma til å lage alle fortynningene. De endelige fortynningene av sammenslått plasma ble 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Mukus ble slått sammen og blandet på samme måte som for plasma. For mukus ble fortynningene 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 og 1:32 brukt. Volumet av væske i brønnen var 100 µl. I slutten av rekken ble det satt opp en kontroll, 100 µl akvarievann.

Telling av levende parasitter skjedde etter 5, 15, 30, 60 og 120 minutter, fra lavest til høyest fortynning. Telling startet i 1:10 brønnen, og så etter tur nedover fortynningsrekken til og med kontrollen. Tiden ble notert da telling var ferdig. Platen ble holdt ved 4°C mellom og under telling.

Stamløsninger av 0,1 M EDTA og 0,1 M EGTA-Mg²⁺ (Yano 1992) ble hver for seg blandet ut med fosfatbufret saltvann til konsentrasjonen 0,01 M. pH ble justert til 7,4. 96 µl av blandingen ble tilsatt fortynningsbrettet, sammen med 24 µl plasma. Deretter ble 50 µl overført til brettet med *G. salaris* slik som tidligere nevnt.

Ved test av mukus tilsatt EGTA+Mg²⁺, ble parasitter overført til 50 µl akvarievann og utsatt for en levedyktighetstest (som tidligere nevnt), deretter ble 25 µl av akvarievannet erstattet med 25 µl 0,01 M EGTA+Mg²⁺. 50 µl mukus ble så tilført brettet med parasitter. Kontrollene varmebehandlet plasma eller 1 mg/ml zymosanbehandlet plasma ble fortynnet 1:10 som nevnt i forklaringen av plasmafortynningsrekken. Den samme prosedyren ble brukt på kontrollene

for behandlet mukus, fortynnet 1:2. Endelig konsentrasjon av de ulike reagensene i plasma ble: 0,1 mg/ml zymosan, 4 mM EDTA og EGTA+Mg²⁺. Den endelige konsentrasjonen av EDTA og EGTA+Mg²⁺ i mukus var 2,5 mM. Tellingen av levende parasitter skjedde etter 120 minutter for alle fire kontrollprøvene.

3.5 *In vitro* overlevelsesforsøk av *Gyrodactylus salaris* i individuelle prøver.

Assayet ble utført på samme måte som beskrevet i punkt 3.4, men med kun en fortynning av plasma eller mukus fra et individ, og et tidsintervall. Ved å gjøre forsøket med individuelle prøver kan det være mulig å oppdage forskjeller mellom plasma eller mukus, fra de to fiskeartene. Basert på resultatene fra testen beskrevet i avsnitt 3.4, ble plasma fortynnet i akvarievann til 1:80 og mukus 1:2, og parasittene ble eksponert i 30 minutter. Disse parameterne ble valgt fordi fortynningene eller tidsintervallene over og under i verdi viste enten for høy eller lav dødelighet hos parasitten. De valgte verdiene så for plasma ut til å gi omkring 50 % overlevelse. For mukus ble en lavere fortynning valgt. Parasittoverlevelsen i mukus var mye høyere enn for plasma.

3.6 Assay for alternativ komplementaktivering.

Metoden som ble benyttet var et hemolytisk assay. Det bestemmer aktiviteten til alternativ komplement ved å lage ulike fortynninger av fiskeplasma og deretter tilsette erythrocytter fra kanin (RaRBC; Yano 1992). Alternativ komplement i plasma vil reagere på RaRBC som fremmede celler og hemolysere cellene. Erythrocyttene vil lysere for den mengde plasma de blir utsatt for. Immunkomponentene i plasma er begrensede. Det vil si at ved høye fortynninger av plasma vil det være en overflod av erythrocytter som ikke blir hemolysert. Verdien for hemolyse ble målt som absorbans av lys med bølglengde 414 nm. Absorbansverdien forteller hvor høy aktiviteten til komplementet er ved de aktuelle plasmafourtynninger. På denne måten kan plasmafourtynningen som gir 50 % hemolyse av RaRBC og ACH50-verdien regnes ut.

RaRBC ble innkjøpt fra Seksjon for eksperimentell biomedisin ved Norges veterinærhøgskole. Disse biologiske prøvene og bufferen EGTA-Mg-GVB ble laget før starten av selve assayet.

3.6.1 Røde blodceller fra kanin (*Oryctolagus cuniculus*), innhenting og bearbeiding.

Det er blitt vist ved tidligere studier at det er erythrocytter hos kanin (RaRBC) som er best egnet når man skal undersøke alternativ komplementaktivering fordi de gir høyere hemolyse enn erythrocytter fra andre arter. Disse cellene ble brukt både som aktivatorer og målceller. (Matsuyama et al. 1988)

Til tappingen av RaRBC ble det brukt vakuumbør av typen Vacuette CPDA 6 ml (G456057). Disse rørene inneholder næringsstoffer for de røde blodcellene slik at de overlever lenger. CPDA står for Citrate Phosphate Dextrose Adenin. Citrat binder kalsium og blokker koaguleringskaskaden. Røret må vendes forsiktig ned og opp åtte ganger umiddelbart etter at det er fylt, slik at antikoagulant og blod blandes godt. Blod tappet i CPDA rør er holdbart i 35 dager ved 1-6°C. Røret består av 1 del CPDA og 6 deler blod. Blodet ble sendt på is og lagret ved 4°C.

RaRBC ble vasket i bufferen EGTA-Mg-GVB (se avsnitt 3.6.2) etter sentrifugering (Hettich EBA 8S, 2001) ved $600 \times g$ i 6 minutter. Den klare væsken ble fjernet og erstattet med EGTA-Mg-GVB ved bruk av Pasteur pipetter. Vaskingen ble utført tre ganger. Cellekonsentrasjonen ble justert ved å hemolysere RaRBC med destillert vann. Dette ble gjort ved å ta 4 μl vasket-RaRBC og 96 μl EGTA-Mg-GVB, sammen med 3400 μl destillert vann. Dette gav en absorbans på 0,750 ved 414 nm, som skal tilsvare en cellekonsentrasjon på $2 \times 10^8/\text{ml}$ (Yano 1992). Dette ble etterprøvd ved å telle antallet erythrocytter i et Bürker-tellekammer, for så å finne gjennomsnittlig cellekonsentrasjon.

3.6.2 Buffere

Bufferen som ble brukt inneholder EGTA, som fjerner Ca^{2+} , og er tilsatt Mg^{2+} . Alternativ aktiveringsvei vil da alene reagere mot de fremmede RaRBC..

Veronal buffer stamløsning ble laget ved å blande 4,15 g natriumklorid (VWR, molecular biology grade, vare nr. 443824T), 0,51 g natriumbarbiturat (Aldrich, kjemi, vare nr. 100906883) og 0,875 ml 2 M HCl (blandet fra konsentrat). Dette ble løst til 100ml destillert vann og varmet opp til 75-80°C. Stoffene ble rørt inn i løsningen under oppvarmingen. Etter avkjøling til romtemperatur ble pH justert til 7,3-7,4.

0,1 M EGTA- Mg^{2+} stamløsning ble laget ved å blande 3,8 g EGTA, 2,03 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a., vare nr. 5833) og 0,7 g NaOH (blandet fra konsentrat). Dette ble løst til 100 ml destillert vann under røring. pH ble justert til 7,5 med 1 M NaOH.

For å lage 0,01 M EGTA-Mg-GVB ble 10 ml 0,1 M EGTA-Mg stamløsning blandet med 20 ml veronal buffer stamløsning. Det ble så tilsatt 0,1 g gelatin (Sigma type A, vare nr. 2325546) som ble løst ved mild oppvarming. Totalvolumet ble justert til 100 ml ved å tilføre destillert vann, og pH ble justert til 7,5. Bufferen ble lagret ved 4°C og er anbefalt brukt innen en uke (Yano, 1992).

3.6.3 Oppsettet

Individuelle plasmaprøver fra *Salmo salar* og *Salmo trutta* ble tatt opp tilfeldig og hver for seg fortynnet 1:10 med EGTA-Mg-GVB. Det ble satt opp en fortynningsrekke for hver av artene, med fortynningene 1:10 til 1:320, og prøvene ble satt opp i duplikat. Det ble satt opp en «celleblank»-kontroll og en «100 % hemolyse»-kontroll, sammen med en fortynningsrekke av en plasmaprøve bestående av sammenslått plasma fra flere individer, og disse var med i alle oppsett. Kontrollen «celleblank» besto av buffer og RaRBC etter justert cellekonsentrasjon. «100 % hemolyse»-kontrollen besto av destillert vann og RaRBC etter justert cellekonsentrasjon. I tabell 1 er mengdene av plasma, EGTA-Mg-GVB, destillert vann, og RaRBC 2×10^8 celler/ml oppgitt. Denne prosedyren ble utført på is for å unngå at komplementaktiviteten skulle starte før inkuberingen.

Tabell 1. Oversikt over volumet av plasma, EGTA-Mg-GVB, destillert vann, og RaRBC 2×10^8 celler/ml alle i μl , som var i de ulike prøvene i fortynningsrekken, samt i kontrollene, for hver enkel test. Betegnelsene CB står for kontrollen «celleblank» og 100 % står for kontrollen «100 % hemolyse».

Fortynning	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	CB	100 %
EGTA-Mg-GVB	225	237,5	243,7	246,8	248,4	249,2	250	0
Plasma	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0	0
Destillert vann	0	0	0	0	0	0	0	3400
RaRBC 2×10^8 /ml	100	100	100	100	100	100	100	100

Fortynningsrekken ble praktisk satt opp ved å merke 6 prøverør (Kartell, vare nr. 88307) med sine respektive fortynninger. I røret merket 1:10 ble 50 µl plasma og 450 µl EGTA-Mg-GVB tilsatt. I de neste fem rørene ble det fylt på 250 µl EGTA-Mg-GVB og 250 µl fra forrige fortynning og blandet tre ganger. Etter blandingen av 1:320 fortynningen ble det tatt ut og kastet 250 µl. Totalvolumet av hver fortynning var 250 µl.

Prøvene ble inkubert i 120 minutter ved 17,5°C (Varmeblokk Grant QBD2). Etter inkuberingen ble det tilsatt 3,15 ml fysiologisk saltvann til hvert av rørene, unntatt røret med «100 % hemolyse»-kontroll. Rørene ble så sentrifugert ved 1600 × g i 5 minutter. Væsken ble overført til kyvetter og satt i et spektrofotometer (Hitachi U-2000). Absorbansen ble lest av ved 414 nm og «celleblank»-kontrollen ble trukket fra automatisk.

Prosedyren ovenfor ble også brukt for oppsettet av mukusprøver. Fortynningsrekken for mukus så slik ut, 1:2, 1:4, 1:8, 1:32, og 1:64.

Alle absorbansverdier (A_{414}) fra fortynningsrekker ble dividert på gjennomsnittlig absorbansverdi for «100 % hemolyse»-kontroll. Dette forholdstallet gav andelen av celler som hemolyserte (y). Bare verdier mellom 0,1 og 0,9 ble tatt med i videre beregninger (Yano 1992). For å finne K verdien ble det laget et punktdiagram. Verdiene fra $y/(1-y)$, som er en utregning av absorbans til prøvene, ble plottet mot fortynningsverdiene på x-aksen. Gjennom kurven ble det lagt en trendlinje (utført i Microsoft Excel, utgave 2010), med en tilhørende formel som angir trendlinjas stigning. Begge aksene i dette diagrammet ble gjort logaritmiske. Ved 50 % hemolyse vil $y = 0,5$ og $y/(1-y)$ være 1. dersom denne verdien settes inn i formelen for kurven vil x være lik K . K ble satt inn i likningen som gir ACH50-verdien, se Figur 4.

$$\text{ACH50-verdien} = (1 / K) \times \text{laveste fortynning} \times 1/2^*$$

*Figur 4. Likningen for utregning av ACH50. * Dette assayet ble utført i 1/2 skala av original metode, som benytter et totalvolum på 0,7 ml (Mayer 1967; Matsuyama et al. 1988; Yano 1992).*

3.7 Statistisk behandling

Plasma- og mukusprøvene er innen hver art testet i tilfeldig rekkefølge. Det ble testet for et likt antall prøver fra begge artene under forsøkene. Pearson kji-kvadrat-test ble kjørt på dataene fra overlevelsesforsøket. Denne testen forteller om det er signifikant forskjell mellom: antallet overlevende og døde, kontroll og individprøvene, og parasittdødelighet hos laks og ørret. Den er laget for data med binomialt utfallsrom, der bare et av to utfall er mulig.

Pearson kji-kvadrat test er hypotesetesting ved å beregne sannsynligheten for at det observerte avviket kan skyldes tilfeldigheter.

Nullhypotesen er definert her som at det ikke er noe forskjell mellom plasma eller mukus fra laks og ørret på overlevelse av *G. salaris*. Mens alternativ hypotese (H1) sier at det er forskjell mellom artenes plasma eller mukus og at denne ikke er tilfeldig (Thoresen 2008).

For å vurdere resultatet av en hypotesetest brukes p-verdien som er sannsynligheten for at resultatene inntreffer, hvis nullhypotesen er sann (Thoresen 2008).

På ACH50-verdiene ble det utført en T-test. I dette tilfellet er nullhypotesen at det er ingen forskjell på plasma fra laks og ørret med hensyn til å hemolysere erytrocytter fra kanin.

Alternativhypotesen er at det er en forskjell mellom fiskeartene i plasmas evne til å hemolysere RaRBC. T-testen sjekker om det er sannsynlig at to datasett (utvalg) er fra samme populasjon, eller om de er signifikant forskjellige. Grenseverdien for å avvise nullhypotesen kalles testens signifikansnivå. I denne masteroppgaven brukes p lik 0,05.

Testen forutsetter at det er tilnærmet normalfordelte data.

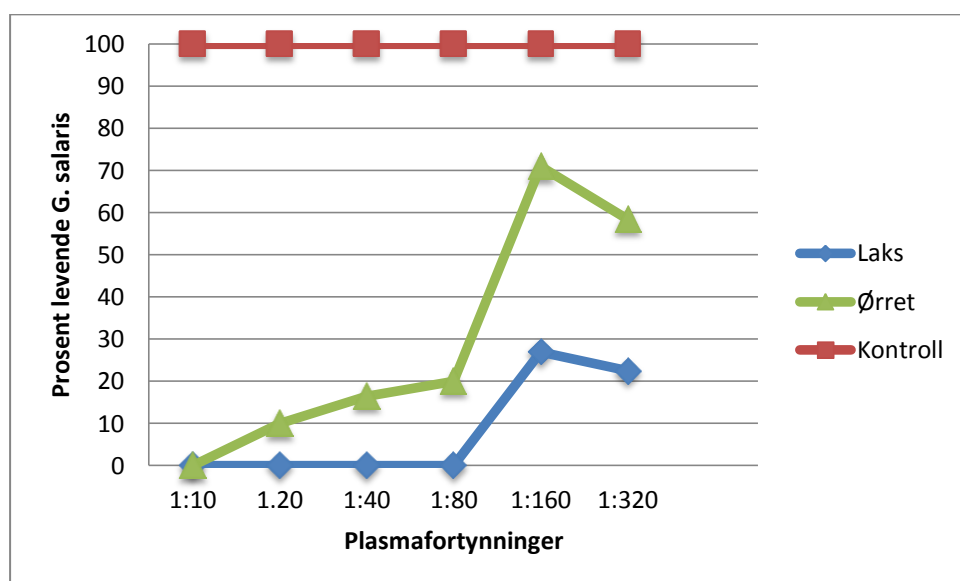
Pearsons korrelasjonsanalyse er blitt brukt for å se om ACH50-verdien har en sammenheng med parasittoverlevelsen i plasma eller mukus fra samme individ. Analysen gir en r-verdi som forteller hvor nær en korrelasjon de to valgte parameterne er. R lik 1 forteller at det er god korrelasjon, og r lik 0 forteller at det ikke er noen korrelasjon mellom ACH50-verdien og parasittoverlevelsen i plasma eller mukus fra samme individ.

Alle statistiske tester er utført med Analyse it (versjon 2,25 Excel12+).

4 Resultater

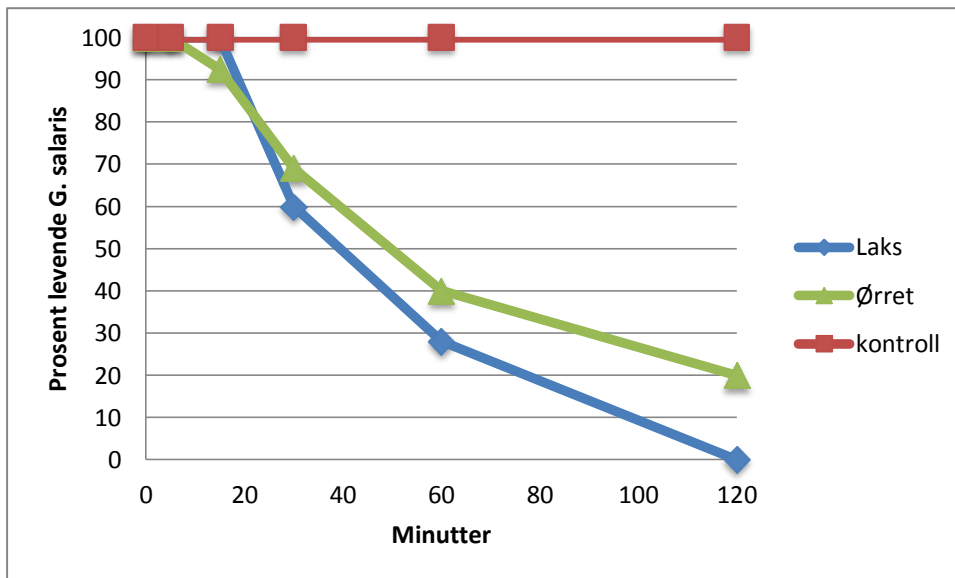
4.1 Overlevelse av *Gyrodactylus salaris*.

Fortynningsrekker ble satt opp med sammenslått plasma fra fem individer av laks og ørret. Disse en lav overlevelsesprosent i de laveste plasmafortynningene. Overlevelsesprosenten ser ut til å øke etter hvert som fortynningene øker. Men selv ved de høyeste fortynningene var overlevelsen lavere enn for akvarievannkontrollen, som gav 100 % parasittoverlevelse. I Figur 5, som er et plot av prosent overlevende parasitter mot plasmafortynninger fra laks og ørret, ligger 1:80 fortynningen midt i mellom høyere og lavere dødelighetsrate. 1:80 fortynning av plasma ble valgt ut og ble brukt i overlevelsesforsøket med individuelle plasmaprøver (se avsnitt 3.5).



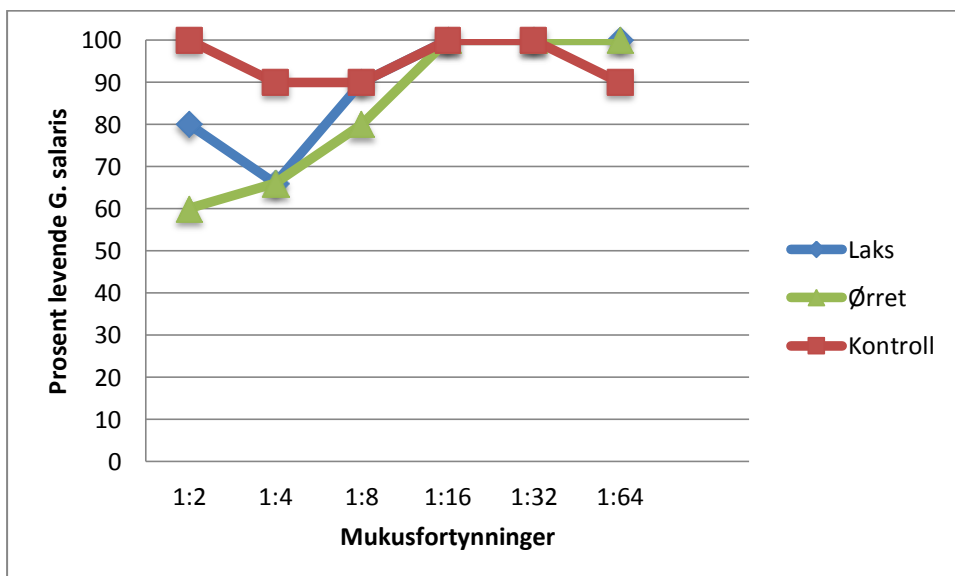
Figur 5. Parasittoverlevelse etter kontakt med fortynnet plasma. Plottet viser effekten fortynnet plasma har på overlevelse for parasitten. Dette er et linjediagram hvor x-aksen viser fortynninger av plasma og y-aksen viser prosent overlevende parasitter etter 120 minutter. Kontroll viser hvordan parasittoverlevelsen fordeler seg i akvarievannkontrollen.

Figur 6 viser hvordan eksponeringstid påvirker overlevelsen hos *G. salaris* i kontakt med plasma (1:80). Tendensen er at flest parasitter dør etter relativt kort tid. I 15 minutter overlever så å si alle parasitter, deretter faller overlevelsesprosenten raskt i 45 minutter. Til slutt går reduksjonen av prosent overlevende noe saktere. Overlevelsesprosenten er null for laks og 20 for ørret etter 120 minutter. Ut i fra dette resultatet ble det satt en inkuberingstid på 30 minutter for de individuelle prøvene av plasma.



Figur 6. Overlevelse av parasitter i kontakt med plasma (1:80) som funksjon av tid. Linjediagram hvor x-aksen viser antall minutter G. salaris har vært i kontakt med sammenslått plasma. Y-aksen viser prosent overlevende parasitter. Kontroll viser hvordan parasittoverlevelsen fordeler seg i akvarievannkontrollen.

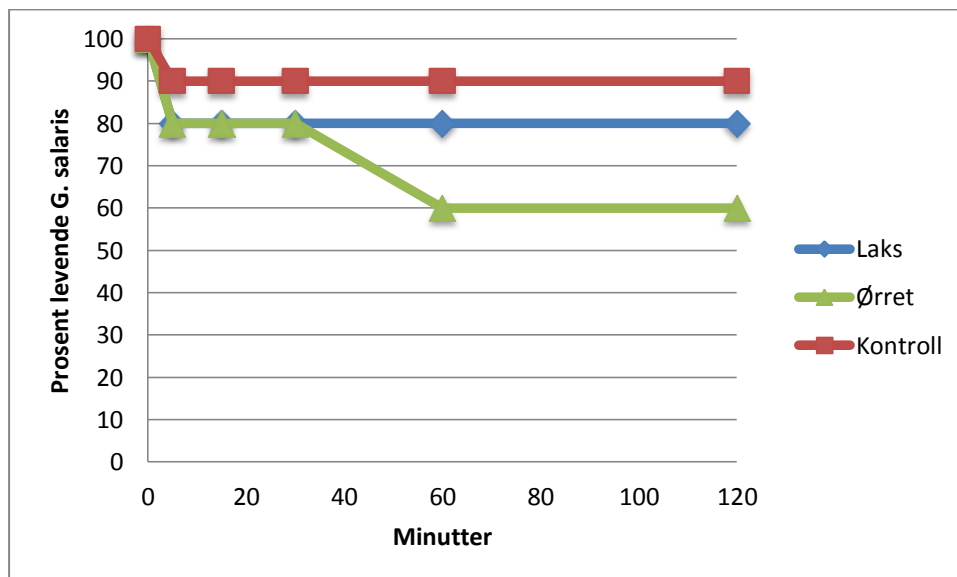
Fortynningsrekkene med mukus viste ved lave fortynninger at det var nedsatt overlevelse hos begge fiskeartene, se Figur 7. Den nedsatte overlevelsen av parasitter var lavere enn for akvarievannkontrollen, som hadde mellom 90-100 % parasittoverlevelse. Ved å øke fortynningene av mukus, gav det 100 % parasittoverlevelse både hos laks og ørret. Det ble valgt å bruke den laveste fortynningen, 1:2, videre for test av parasittoverlevelse i individuelt mukus.



Figur 7. Effekt av fortynning vist ved overlevelse av parasitter i kontakt med fortynnet mukus sammenslått fra fem individer. Et linjediagram hvor x-aksen viser fortynning av mukus og y-

aksen viser prosent overlevende parasitter etter 120 minutter. Kontroll viser hvordan parasittoverlevelsen fordeler seg i akvarievannkontrollen.

En parasitt i kontakt med mukus fra laks, også fra ørret, døde etter 5 minutter (se Figur 8). Deretter overlevde alle resterende parasitter i kontakt med mukus fra laks. I mukus fra ørret døde enda en parasitt etter en time. Det ble satt en inkuberingstid på 30 minutter for de individuelle prøvene av plasma og mukus.



Figur 8. Effekt av tid vises ved overlevelse av parasitter i kontakt med mukus (1:2).

Linjediagram hvor x-aksen viser antall minutter *G. salaris* har vært i kontakt med mukus. Y-aksen viser prosent overlevende. Kontroll viser hvordan parasittoverlevelsen fordeler seg i akvarievannkontrollen.

I varme- og zymosanbehandlet plasma var det lav parasittdødelighet, se tabell 2. Dette resultatet fremkommer også fra mukusprøvene. En Pearson kji-kvadrat-test ble brukt i alle de statistiske testene (her: test) nedenfor. Ved test av varme- og zymosanbehandlet plasma fra *S. salar* og *S. trutta* var det ingen signifikant forskjell på parasittdødeligheten mellom artene. Det samme var tilfellet for mukus. P-verdiene lå mellom 0,12 og 1. Det var ikke signifikant forskjell mellom de ovenfor nevnte kontrollprøvene og akvarievannkontrollen. Det vil si at det er sannsynlig å få like lav parasittdødelighet i varmebehandlet og zymosanbehandlet plasma eller mukus som i akvarievannet. P-verdiene lå mellom 0,26 og 1.

Tabell 2. Overlevelse av parasitter i kontakt med behandlet plasma eller mukus, ved ulike fortyngninger og etter ulike tidspunkt. Parasittoverlevelsen er angitt i prosent. VB står for varmebehandlet prøve. ZB står for prøve behandlet med zymosan. EGTA står for EGTA- Mg^{2+} -behandlet prøve og EDTA står for EDTA behandlet prøve. «Plasma 1:10 120 min»

betyr at det er en plasmaprøve fortennet 1:10 som parasittene har vært i kontakt med i 120 minutter. M står for mukus. AK står for prosent gjennomsnittlig overlevelse i akvarievannkontrollene. Symbolet * viser at det er signifikant forskjell fra akvarievannkontrollen.

	VB Ørret	VB Laks	ZB Ørret	ZB Laks	EGTA Ørret	EGTA Laks	ED- TA Ørret	ED- TA Laks	AK
P 1:10 120 min	100 %	87 %	100 %	100 %	0 %*	0 %*	60 %	84 %	100 %
M 1:2 120 min	100 %	100 %	100 %	71 %	60 %*	20 %*	100 %	100 %	88 %

EDTA behandlet plasma viste noe parasittdødelighet hos begge fiskeartene, mens ingen i mukus. Test gjort av disse resultatene viste at det ikke var signifikant forskjell mellom artene. Det var ingen signifikant forskjell mellom EDTA behandlet plasma og akvarievannkontrollen. Dette gjelder også for mukusprøvene. P-verdiene var mellom 0,39 og 0,91.

I brønner med EGTA-Mg²⁺ behandlet plasma (1:10) var det ingen levende parasitter etter 120 minutter. Mens i mukus (1:2) behandlet på samme måte var overlevelsesprosenten mellom 20 og 60 %. Det ble ikke påvist signifikant forskjell i parasittdødelighet for plasma mellom laks og ørret. Det samme resultatet gjelder også for mukus. P-verdiene var 0,55 for plasma og 0,19 for mukus.

EGTA-Mg²⁺ behandlet plasma fra ørret og laks viste signifikant forskjell i letal effekt på parasitten fra akvarievannkontrollprøven. P-verdiene var mellom 0,00 og 0,03. Mukus fra begge artene viste ikke signifikant forskjell fra akvarievannkontrollprøven. P-verdiene var mellom 0,11 og 0,09.

4.2 Overlevelse av *Gyrodactylus salaris* i individuelle prøver.

For utprøving av effekten individuelt fiskeplasma har på *G. salaris*, ble det brukt 177 (n) levende parasitter, se tabell 3. 15 individuelle plasmaprøver fra laks hadde en letal effekt på 76 av 93 parasitter. Mens 15 individuelle plasmaprøver fra ørret hadde en letal effekt på 70 av 84 parasitter. Det ble brukt Pearson kji-kvadrat-test for å finne eventuelle signifikante

forskjeller fra resultatene. Det var ikke signifikant forskjell mellom de to fiskeartene i overlevelse av parasitter ved 1:80 fortyning i 30 minutter. Testen indikerer at forskjellen mellom dem er tilfeldig (p-verdi 0,77).

*Tabell 3. Presentasjon av antall levende og døde G. salaris i 1:80 plasma- fortyning, med 30 minutter eksponeringstid. Plasma fra 15 laks sammenliknet med plasma fra 15 ørret. Symbolet * viser at det er signifikant forskjell fra akvarievannkontrollen.*

Art	Levende <i>G. salaris</i>	Døde <i>G. salaris</i>	Total
<i>S. salar</i>	17 (18 %)	76 (82 %)*	93
<i>S. trutta</i>	14 (17 %)	70 (83 %)*	84
Total	31	146	177

Det ble brukt 170 parasitter for å se effekten mukus hadde på parasitten, se tabell 4. Mukus fra 15 laks hadde en letal effekt på 14 av 85 mulige parasitter. Mukus fra 15 ørret hadde en letal effekt på 22 av 85 mulige parasitter. Ved å sette fiskeartene opp mot hverandre ble det ikke funnet signifikant forskjell av letal effekt på parasitten, ved 1:2 fortyning i 30 min. Testen indikerer at forskjellen mellom dem er tilfeldig (p-verdi 0,13).

*Tabell 4. Presentasjon av antall levende og døde G. salaris i 1:2 mukus-fortynning, med 30 minutter eksponeringstid. Mukus fra 15 laks sammenliknet med mukus fra 15 ørret. Symbolet * viser at det er signifikant forskjell fra akvarievannkontrollen.*

Art	Levende <i>G. salaris</i>	Døde <i>G. salaris</i>	Total
<i>S. salar</i>	71 (83 %)	14 (17 %)*	85
<i>S. trutta</i>	63 (74 %)	22 (26 %)*	85
Total	134	36	170

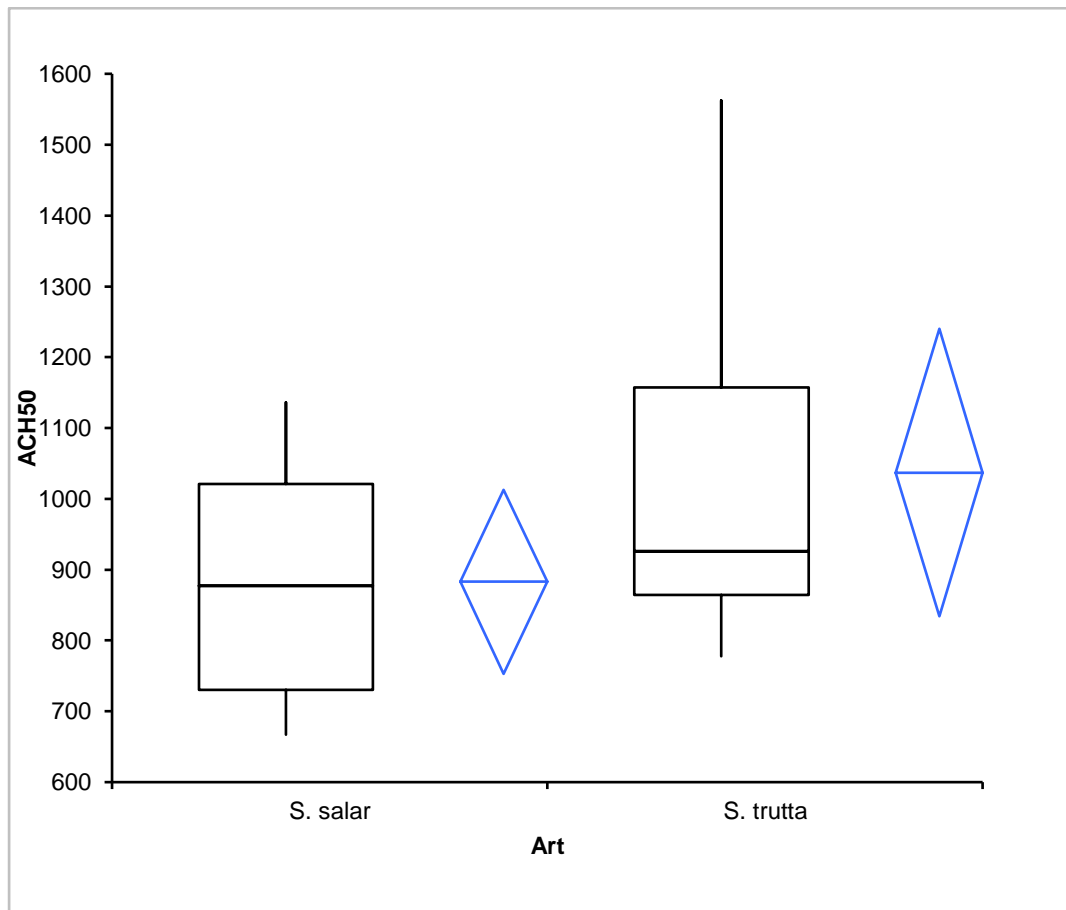
Parasitter i akvarievann ble brukt som kontroll for plasma og mukus. Det ble satt opp en akvarievannkontroll for hver individuelle prøve, altså 30 stykker. Disse hadde en gjennomsnittlig overlevelse på 95 %. Her skulle vi forvente liten eller ingen dødelighet av parasitter. Det var signifikant forskjell i overlevelse mellom akvarievannkontrollprøvene og de individuelle plasma- og mukusprøvene. Forskjellen mellom dem var ikke tilfeldig.

Alternativhypotese gjelder og nullhypotesen kan forkastes. P-verdien for både plasma og mukus fra laks og ørret var $<0,0001$.

4.3 Aktiveringsgraden av alternativ komplement.

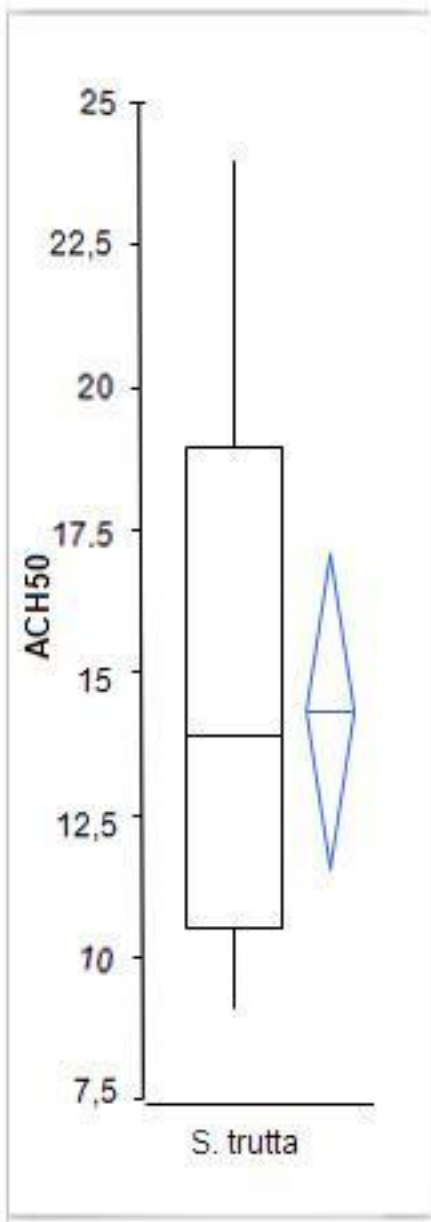
Alikvoter av de samme plasma og mukus prøvene fra overlevelsesforsøket ble brukt for å se på aktiveringsgraden av alternativ komplement hos *S. salar* og *S. trutta*. Ørretplasma gav høyest alternativ komplementaktivitet, og spredningen av ACH50-verdiene var størst (se figur 9). Medianen for laks og ørret ligger nærmere hverandre enn deres gjennomsnitt. Det er et par høye ACH50-verdier fra ørretplasma som trekker opp gjennomsnittet. Laksens gjennomsnitt og median er ganske nærme hverandre. De fleste verdiene ligger rundt midten. Dataene er funnet å være tilnærmet normalfordelt.

Gjennomsnittlig ACH50-verdi for lakseplasma ble målt til 882 med standardavvik 168. Ørretplasma hadde en gjennomsnittlig ACH50-verdi 1037 med standardavvik 264. Medianen for plasma hos laks og ørret var henholdsvis 877 og 925. ACH50 verdiene fra hver art viste en tilnærmet normalfordeling. T-testen viste ingen signifikant forskjell i ACH50-verdi mellom de to fiskeartene (p-verdi 0,15).



Figur 9. Oversikt over ACH50-verdier fra laks (*S. salar*) og ørret (*S. trutta*). Dette er et boksplot med ACH50-verdiene i plasma på y-aksen og fiskeartene på x-aksen. De vertikale linjene i diagrammet strekker seg fra laveste til høyeste ACH50-verdi. Boksene er strukket fra 25-prosentilen til 75-prosentilen, og streken inni er medianen (eller 50-prosentilen). «Diamantene» viser standardavviket og streken inni er gjennomsnittet.

Prøvene av mukus fra laks hadde for lav hemolysegrad til å bli tatt med videre i analysen (Yano 1992). Det ble derfor ikke funnet noen ACH50-verdi for mukus fra laks. Figur 10 illustrerer fordelingen av ACH50-verdier i mukus fra ørret, som er lavere enn i plasma. Gjennomsnittsverdi for ACH50-verdi var 14, med standardavvik 5, og medianen 13.

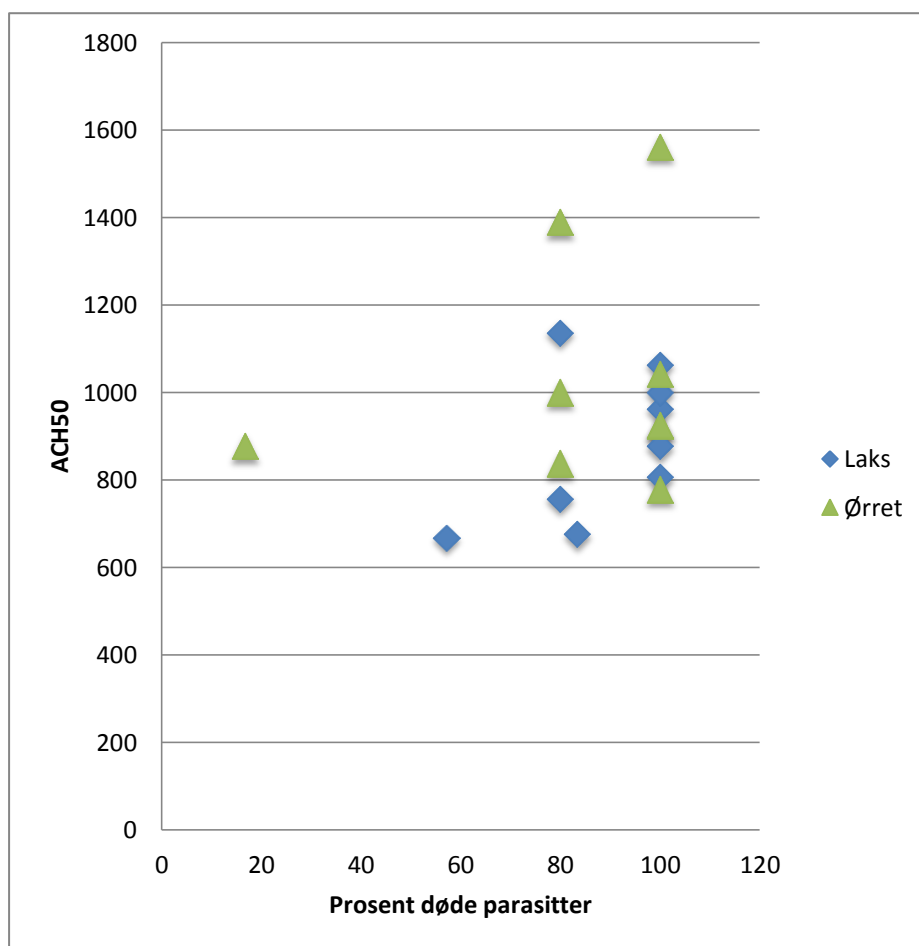


Figur 10. Oversikt over ACH50-verdier fra ørret (S. trutta). For forklaring av boksplottet se figur 9.

4.4 Sammenlikning av overlevelsesforsøk og ACH50assay.

Resultatet fra overlevelsesforsøket og ACH50-verdiene ble satt opp i et punktdiagram, se figur 11. Diagrammet viser sammenhengen mellom antall døde parasitter og ACH50-verdi i plasma tilhørende samme individ. Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom prosent døde parasitter i kontakt med plasma og ACH50-verdiene fra samme plasmaprøve.

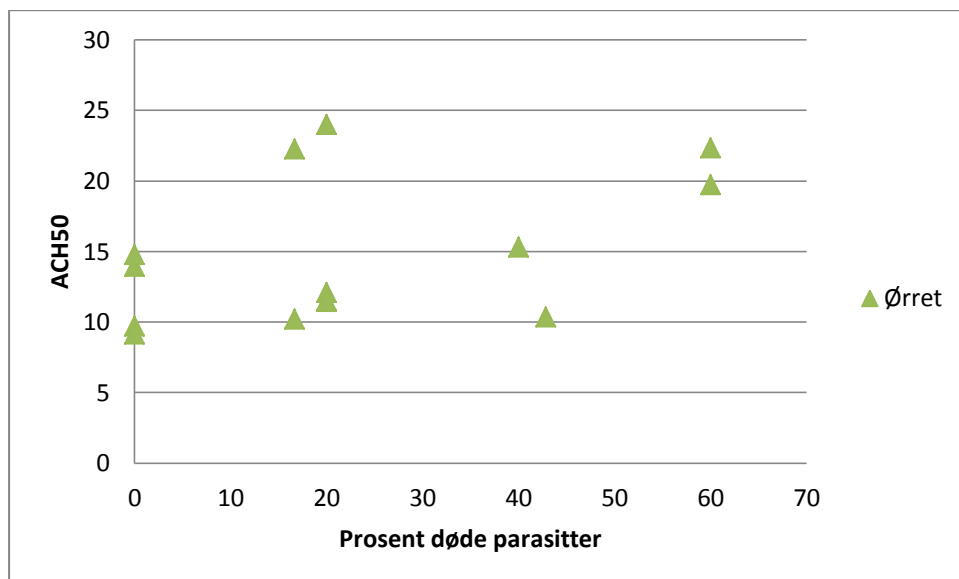
Korrelasjonsverdien r var 0,19 for laks og 0,5 for ørret. Dersom r var lik 1, hadde det vist at det var en sammenheng mellom parasittdødelighet og alternativ komplement aktivering i plasma fra samme individ. Det er en klar opphoping av dødelighet rundt 80 og 100 %, noe som er uheldig med tanke på å se en eventuell korrelasjon.



Figur 11. Sammenheng mellom prosent dødelighet av parasitter ved eksponering for plasma og ACH50-verdiene i de samme plasmaprøvene målt som hemolyse av kaninerytrocytter. Punktdiagrammet viser x-aksen med prosent døde parasitter og y-aksen med ACH50-verdier.

I figur 11 er det vist 2 individer som skiller seg ut fra gruppene med 80 og 100 % parasittdødelighet. Disse to, en fra hver art, har lavere dødelighet og nær gjennomsnittlig ACH50-verdi.

Det er ikke funnet noen korrelasjon mellom prosent døde parasitter i mukus og ACH50-verdiene fra samme mukusprøve. I Pearsons korrelasjonsanalyse er r lik 0,45. I figur 12 vises sammenhengen mellom prosent døde parasitter og ACH50-verdier i mukus hos ørret. Punktene er spredt i diagrammet uten noen tydelig fordeling.



Figur 12. Sammenhengen mellom prosent dødelighet av parasitter ved eksponering for mukus og ACH50-verdiene i fra samme mukusprøve. For forklaring av diagrammet se figur 11.

5 Diskusjon

Den første barrieren som de fleste ektoparasitter møter, er laget med mukus utenpå huden til fisken. I mukus finnes immunkomponenter som kan være med på å forhindre at parasitten fester seg på huden. Mukus blir hele tiden slitt av, og dette kan også være med på å hindre at parasitter fester seg. Parasitter må lage hull i denne barrieren for å skaffe mat og for å nå målvevet hos verten. Innenfor slimlaget møter parasitter mange flere faktorer, disse har som mål å bekjempe angrep på verten. Det kan være lysozym, komplement, lektiner, og immunglobuliner. Disse stoffene finnes også i slimlaget, men de finnes i høyere konsentrasjon i ekstracellulærvæsken. Stoffene vil enten merke eller lysere parasitter (Alexander & Ingram 1992). Forsvarmekanismene er avhengig av å kunne kjenne igjen parasitter eller strukturerer på parasitter for å kunne angripe, og forskjellige verter har ulike egenskaper for å gjøre det. Ulik grad av forsvar og ulike egenskaper er med på å bestemme hvordan parasittinfeksjoner utvikler seg.

Komplementfaktor C3 har flere viktige oppgaver ved invasjon av parasitter. Den starter kaskaden mot det terminale komplementkomplekset. Deler av C3 kan binde seg til ulike typer reseptorer og aktiverer flere celle typer (Lambiris 1988). C3 fra regnbueørret som er bundet til målceller fremmer makrofag fagocytose (Nonaka et al. 1984). I denne masteroppgaven har det vært en letal effekt på *G. salaris in vitro* i brønner uten celler og inneholder nok bare kaskaden mot det terminale komplementkomplekset.

5.1 Overlevelse av *Gyrodactylus salaris* i kontakt med plasma og mukus.

To faktorer som var viktige for dødeligheten til parasitten var fortynningen av plasma og eksponeringstiden. Fortynningsrekkene med plasma viste at parasittdødeligheten avtok ved økende fortynning. Dette var tilfelle både for laks og ørret. I brønnene med størst mengde plasma døde nesten alle eller alle parasittene etter 120 minutter. I brønnene med høy plasma fortynning var det færre parasitter som døde. Det så ut som 1:80 fortynningen var et kritisk punkt for begge artene. Harris et al. (1998) viste at ved lave fortynninger av plasma fra laks øker dødeligheten av *G. salaris* i forhold til høye fortynninger. Han viste at det var hyppigst dødelighet rett etter kontakt med plasma, og at den etter en time flatet ut. Dette viser at det er en eller flere faktorer i plasma som tar livet av parasitten.

Den letale effekten på parasitten over tid, ved å eksponering for plasma 1:80, så ut til å nå et kritisk punkt rundt 30 minutter. Den letale effekten på parasitten var økende og det var

variasjon mellom tidsintervallene. Denne tendensen ble funnet hos begge fiskearter. Et kritisk punkt kan vise variasjoner, som igjen kan avsløre eventuelle forskjeller i letal effekt mellom artene. Etter 120 minutter var alle parasittene i brønnen døde. Dersom det individuelle overlevelsesforsøket hadde blitt satt opp med 120 minutter eksponeringstid ville det vært liten mulighet for å se forskjeller. Ved denne tiden vises ikke et sensitivt punkt for parasittdødelighet, ettersom variasjonen mellom hvert tidsintervall er lav. Den dødelige effekten av plasma avtar eller forbrukes med tiden. Det kan være fordi det ikke tilføres nytt plasma med nye immunfaktorer som kan bekjempe parasitten.

Harris et al. (1998) fant høy letal effekt på *G. salaris* ved plasmafortynninger fra 1:10 til 1:50. Videre ble det vist noe redusert parasittdødelighet ved 1:100 og 1:200 plasmafortynning. Det ble også vist at plasma har størst letal effekt på parasitten under den første eksponeringstiden. Dette gjelder fra 0 minutt eller starten av forsøket, til 45 minutter etter parasittene er blitt eksponert for plasma (1:100). Dette samsvarer med funnene gjort i denne masteroppgaven.

Eksponering av parasittene for mukus forårsaket generelt en høyere parasittoverlevelse enn for plasma, også over tid. Kun ved de laveste fortynningene var det letal effekt på parasitten. Mukus fra laks hadde ingen letal effekt på parasitter etter 30 minutter eksponeringstid. Mukus fra ørret hadde ingen letal effekt på parasitter etter 60 minutter eksponeringstid. Dette tyder på at faktorene som tar livet av parasitten er oppbrukt raskere i mukus enn i plasma. Dette kan igjen hentyde til at faktorene er tilstede ved lavere konsentrasjoner i mukus, enn i plasma.

Fortynningsrekker av plasma og mukus med parasitter ble satt opp for å finne de mest kritiske fortynningene og tiden, som ville være gunstig for å teste de individuelle prøvene.

Fortynningene som ble valgt var 1:2 for mukus og 1:80 for plasma. Det ble satt en eksponerings tid på 30 minutter. Disse verdiene lå i tilnærmede kritiske punkt for begge arter. Kombinasjonen av fortynning og eksponeringstid ble valgt for å redusere totalantallet av prøver, samtidig som en eventuell forskjell i letal effekt på *G. salaris* mellom laks og ørret kunne oppdages.

Komplementkomponenter som finnes i plasma hos fisk er mer sensitive for varme enn for høyerestående vertebrater. Karpeplasma ble inkubert ved 40°C i en time og all alternativ komplementaktivitet opphørte (Matsuyama et al. 1988). Det samme skjedde da serum fra regnbueørret ble varmet opp til 44°C i 20 minutter (Sakai 1983), trolig på grunn av denaturering av komplementkomponentene som er proteiner. Zymosan er tidligere blitt tilsatt i serum fra regnbueørret, med formål å forbruke komplementaktiviteten i prøvene. Resultatet

var at zymosan virket hemmende på komplementaktiviteten helt ned til en konsentrasjon på 0,1 mg/ml (Sakai 1983).

Konsentrasjonen av zymosan som ble brukt i denne masteroppgaven var 0,1 mg/ml.

Parasittoverlevelsen var 100 %, det vil si at alt komplement som var tilstede ble forbrukt.

Varmebehandlet plasma fra laks og ørret viste ingen forskjell i letal effekt, heller ikke mot akvarievannkontrollen. Det samme resultatet ble funnet for zymosanbehandlet plasma. Det vil si at det var liknende parasittoverlevelse i de nevnte kontrollene. Resultatene fra varme- og zymosanbehandlet plasma gjelder også for mukus. Dette kan vise at komplement ble forbrukt eller ødelagt i både plasma og mukus, slik som forventet. Dette bekrefter resultatene fra Sakai (1983) og Matsuyama et al. (1988)

Alternativ-, klassisk- og lektin aktiveringsvei har spesifikke kation-krav, og disse er nevnt i innledningen (1.4). EDTA binder Ca^{2+} og Mg^{2+} . Dette blokkerer alle aktiveringsveiene for komplement. Konsentrasjonen av EDTA tilsatt i plasma og mukus var noe lavere enn originalt planlagt (10 mM). Etter å ha tilsatt EDTA i plasma var det parasittdødelighet, men ikke signifikant forskjellig fra akvarievannkontrollen. Det var få parasitter som døde da EDTA ble tilsatt i mukus. Resultatene, nevnt ovenfor, gjelder for både laks og ørret. Dette viser at aktiveringsveiene sannsynligvis er blitt blokkert ved å tilsette EDTA, selv om konsentrasjonen av stoffet var lavere enn planlagt. Harris et al. (1998) viste at 5mM EDTA behandlet lakseplasma (1:10) hadde en sterkt redusert letal effekt på *G. salaris*, i forhold til ubehandlet lakseplasma (1:10). Dette bekrefter resultatene fra denne masteroppgaven.

Alternativ komplementaktivering krever Mg^{2+} for å aktiveres. EGTA binder kun Ca^{2+} og blokkerer dermed klassisk og lektin aktiveringsvei. Det ble tilsatt en lavere konsentrasjon EGTA+ Mg^{2+} enn planlagt (10mM). I brønnene tilsatt plasma og EGTA- Mg^{2+} døde alle parasittene. Plasma fra laks og ørret var signifikant forskjellig fra akvarievannkontrollen. Ved å teste plasma fra artene mot hverandre var det ikke en signifikant forskjell. Harris et al. viste at 5 mM EGTA- Mg^{2+} (1 mM magnesiumklorid) behandlet lakseplasma hadde en letal effekt på parasitten, men denne effekten var noe svakere enn for ubehandlet plasma alene. Det er usikkert om forskjellen som Harris et. al (1998) har funnet mellom EGTA- Mg^{2+} behandlet plasma (1:10) og ubehandlet plasma (1:10), er signifikant forskjellig fra funnene gjort i denne masteroppgaven. 1:10 fortynnet sammensatt plasma tilsatt 4 mM EGTA+ Mg^{2+} har en letal effekt på parasitten.

Det ble funnet parasittdødelighet i mukus behandlet med EGTA- Mg^{2+} . Ørretmukus viste større letal effekt enn mukus fra laks. Den ulike letale effekten mellom artene var ikke

signifikant forskjellig. Forsøket er utført med 5 til 10 parasitter i hver brønn. Et dødsfall gir et stort utslag på Pearson kji-kvadrat-testen. Ettersom det er forskjell i parasittdødeligheten hos de to artene og en lav p-verdi, indikerer dette at forsøket skulle vært utført med flere parasitter og repetert flere ganger. Først da vil resultatet fortelle om det sikkert er signifikant forskjell mellom mukus fra laks og ørret.

Buchmann (1998) undersøkte en beslektet haptormark for dødelighet i kontakt med plasma fra regnbueørret. *G. derjavini* eksponert for ubehandlet plasma fra både smittet og ikke smittet regnbueørret døde etter en time, også ved tilsetning av EGTA. Ved eksponering av varmebehandlet plasma, var overlevelsen hos parasitten høy. Parasitter som døde i plasma var komplementkomponent C3 bundet til åpninger i hodekjertler, flere strukturer på kroppen og primær enden av opisthaptoren. Få C3 molekyler festet seg på parasitter i varmebehandlet plasma. Dette indikerer at alternativ komplementaktivering kunne være ansvarlig for den observerte parasittdødeligheten. Resultatene fra denne masteroppgaven støtter opp under Buchmanns (1998) funn.

5.2 Sammenlikning av overlevelsesforsøk og ACH50 assay.

Målet med overlevelsesforsøket var å se på parasittdødeligheten i kontakt med plasma eller mukus fra forskjellige individ. Plasma fra laks hadde en større letal effekt på *G. salaris*, enn plasma fra ørret. En Pearson kji-kvadrat-test viste ingen signifikant forskjell for dødelighet av parasitter i kontakt med plasma, mellom laks og ørret. Forskjellen som resultatet viste, ser ut til å være tilfeldig. P-verdien var høy og forteller at det er sannsynlig å få disse resultatene hvis nullhypotesen er sann.

Parasitten viste større overlevelse i mukus enn i plasma. Det ble brukt samme metode i for plasma og mukus forsøket. En større overlevelse av parasitter i mukus, kan tyde på at det som gir den letale effekten av parasitten i plasma, finnes i mindre mengder i mukus. Mukus fra ørret hadde en større letal effekt på parasitter enn mukus fra laks. Laks- og ørretmukus viste ikke signifikant forskjell i parasittoverlevelse. Det betyr at nullhypotesen ikke kan utelukkes og at forskjellene kan være tilfeldige.

Akvarievannkontrollene gav ytterst få døde parasitter. Resultatet fra akvarievannkontrollen ble satt mot resultatene fra plasma i en Pearson kji-kvadrat-test og gav signifikant forskjell både mot lakseplasma og ørretplasma. Forskjellen mellom plasma fra fiskeartene og akvarievannkontrollen er ikke tilfeldig. Det samme resultatet gjelder for mukus fra laks og

ørret mot akvariekontrollen. P-verdien for både plasma og mukus fra laks og ørret var $<0,0001$, og betyr at det er lav sannsynlighet for å få disse resultatene dersom nullhypotesen er sann. Her kan nullhypotesen forkastes og alternativhypotese kan aksepteres. Dette viser at det er noe i plasma og i mukus som har letal effekt på parasitten, som ikke finnes i akvarievannet.

Det er kjent at brunørret infiseres av parasitten i 3 uker før fisken klarer å eliminere infeksjonen. Harris *et al.* (1998) viste at mukus tatt fra atlantehavslaks og brunørret hadde en letal effekt på *G. salaris*, og at det tok lengere tid enn ved forsøk med plasma fra samme arter. Han foreslo at ved å overvåke aktivitetsnivået, til alternativt komplement i mukus etter infeksjon, kunne det gitt flere svar på ulik resistens.

I ACH50 assayet ble alikvoter av de individuelle plasma- og mukusprøvene fra laks og ørret testet for grad av alternativ komplementaktivitet. Gjennomsnittlig ACH50-verdi fra lakseplasma var lavere enn gjennomsnittlig ACH50-verdi fra ørretplasma. T- testen kjørt på resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom de to fiskeartene. Dette betyr at forskjellen mellom fiskeartene er tilfeldig og at de har trolig samme alternative komplementaktivitet i plasma (målt hemolytisk). Dette resultatet kan vise bildet av det nære slektskapet mellom de to artene.

ACH50-verdiene fra plasma hos atlantehavslaks og brunørret er svært høye sammenlignet med verdier fra mennesker: 18,4, sau: 15,4 og rotte: 4,5. Teleoster har vist seg å ha høyere ACH50-verdier enn pattedyr, for eksempel er regnbueørret målt til 345 med et standardavvik på 108, tilapia 574 med et standardavvik på 250, og flyndre 612 med et standardavvik på 120. Fiskers høyere ACH50-verdi kan tyde på at rollen til alternativt komplement for dem er viktigere for bekjempelse av infeksjoner enn hos pattedyr (Yano 1992; Sakai 1992; Harris *et al.* 1998).

Mukus fra laks ble satt opp i samme oppsett som ørret og etter samme utførelse. Alle prøver fra laks gav for lave absorpsjonsverdier til å kunne finne en ACH50-verdi, men de gav absorpsjonsverdier. Dette kan tyde på at noen få røde blodceller ble hemolysert av alternativt komplement. Gjennomsnittlig ACH50-verdi i mukus fra ørret ble målt til 14, med standardavvik på 5, og median på 13,9. Det var noen få individer av brunørret som ikke hadde høy nok absorpsjonsverdi til å gi en ACH50-verdi. Det er umulig å teste statistisk om det er forskjell mellom alternativ komplementaktivitet hos laks- og ørretmukus ettersom det ikke ble målt noen ACH50-verdier på laks. Alternativt komplement finnes i mukus hos laks og

ørret, men om forskjellen i aktiveringsgrad er signifikant forskjellig gjenstår å se. Resultatene her indikerer at alternativ komplementaktivitet i laks- og ørretmucus bør undersøkes nærmere. Individuer med høy alternativ komplementaktivering i plasma har ikke noen klar sammenheng med høy dødelighet av parasitter i kontakt med det samme plasmaet. Det er flest plasmaprøver fra individer ved 80-100 % parasittdødelighet og med liknende ACH50-verdier. Den høye dødeligheten av parasitter kan være forårsaket av for lav plasmafortynning, som kan skjule en eventuell korrelasjon mellom de to parameterne. Dersom dødeligheten hadde vist større spredning ville en korrelasjon være lettere å oppdage. ACH50-verdiene sammenliknet med plasmas letale effekt ved en høyere fortykning kunne gitt en klarere korrelasjon.

Mucusceller og enkle granulære epitelceller fra slimhinner hos pattedyr er kjent for å delta i bekjempelse av tarm nematoder (rundormer; Castro & Harari 1982). Herfra er det blitt foreslått at mucusceller hos fisk også er med på å bekjempe ektoparasittinfeksjoner (Pickering 1974; Buchmann & Bresciani 1998).

I ørretmucus er det her funnet lavere verdi og spredning av ACH50. Det er funnet større spredning i prosent døde parasitter. Det var ingen korrelasjon mellom ACH50-verdiene og dødeligheten til parasitten. På grunn av den gode spredningen i dødelighet av parasitten burde det vært mulig å oppdage en korrelasjon her hvis det var noen. Dette resultatet kan tyde på at det også er andre faktorer i mucus som påvirker dødeligheten av parasitten.

Det er vist at komplement finnes i fiskers epitel og mucus (Buchmann & Bresciani 1998) og dermed at *G. salaris* lever i kontakt med komplement. Smittet parr av atlantehavslaks viste reduksjon i tykkelsen til det ytterste hudlaget og reduksjon i slimcelletetthet, i den tidlige fasen av infeksjon. Sterud et al. (1998) foreslo på grunnlag av dette at *G. salaris* kan indusere merkbare endringer i den epidermale strukturen hos laks. Dette kunne igjen være med på å beskrive den påfølgende patologi av infeksjonen. Bakke & Mackenzie (1993) gjorde et forsøk hvor laks ble smittet av *G. salaris* og viste da en rask en økning i parasitt-populasjonen, som varte i 4-6 uker. Til slutt døde fisken. Bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) viste ingen epidermal endring ved infeksjon av *G. salaris* og etter 50 dager hadde den bekjempet parasitten. I denne masteroppgaven ble det målt svært lave nivåer av alternativt komplement fra laksemucus, og sammen med funnene fra Sterud et al. (1998) kan dette være med på å beskrive hvorfor laks ikke overlever en *G. salaris* infeksjon. Komplement forbrukes, og når tettheten på slimceller blir redusert kan mengden av nye komplementkomponenter reduseres. Det blir lavere konsentrasjon av komplementkomponenter til stede i mucus til å bekjempe

parasittinfeksjonen. Ettersom alternativ komplement aktivering hos ørret var målbar ved ACH50, kunne det vært interessant å se om denne fiskearten har epidermale forandringer under en *G. salaris* infeksjon og om dette kan indikere svaret på resistensen mot parasitten. Dersom den ikke har epidermale endringer, vil slimcellene produsere normale mengder med alternative komplementkomponenter som tar livet av parasitten.

5.3 Diskusjon av metoden.

Fiskene ble avlivet med et slag i hodet i stedet for å bruke et bedøvningsmiddel.

Bedøvningsmiddel blir oppløst i vannet som fisken går i, og det kunne ha påvirket mukus.

Dette er ugunstig når det er aktiveringskomponenter i mukus som skulle undersøkes.

Metoden for innsamling av mukus gav ulike volum fra hvert individ. Fra større fisk ble det skrapet av mer mukus enn fra mindre fisk. Størrelsen på de fleste fiskene lå rundt gjennomsnittet. Det var få fisker som avvek mye i størrelse.

Sammenslåingen av ulike plasma- og mukusprøver ble gjort rett etter prøvetaking og sentrifugering, før frysingen. Dette var en rask og effektiv metode, og prøvene var klare til bruk etter opptining. Dersom sammenslåingen hadde blitt gjort etter opptining, ville verdifull tid gått tapt og komplement blitt oppbrukt. Ettersom komplement blir gradvis nedbrutt allerede ved minus 20°C (Sakai 1992). Målet er at komplement skal forbrukes minst mulig før forsøket starter.

Levende *G. salaris* ble eksponert for en fortyningsserie av plasma og mukus fra laks og ørret. Parasittene ble plukket av laks, og var ikke enkle å løsne. Skader som ble påført parasitten ved overflytningen fra fisk til brønn, kunne gi falske resultater. Under forsøket ble det brukt en insektspinsett. Ved å teste parasittens levedyktighet i en time, slik det ble gjort i forsøket, vil påvirkningen av skadene på resultatet begrenses. Det var svært få parasitter som døde under testen for levedyktighet, dette kan vise at det ikke var betydelig negativ effekt fra pinsetten og flyttingen av parasitten.

Det var generelt ikke vanskelig å skille levende fra døde parasitter. Noen få parasitter som var i bevegelse var også hvite, noe som kunne tyde på at parasittene var døende.

Under testingen av kontroller og fortynningsrekker i overlevelsesforsøket ble det brukt sammenslått plasma og mukus fra 5 individer. Dette ble gjort for å gi et generelt bilde av hvordan ulike fortyninger av plasma ville påvirke dødeligheten hos parasitten. Tendensen

kan fastslås fordi det er brukt serum fra én gruppe og ikke et individ. Dersom det hadde vært serum fra et individ, testet en gang, ville det vært en individuell verdi.

Fortynningsrekken brukt for sammenslått plasma og for sammenslått mukus ble valgt på grunn av at det er en enkel fortynningsrekke å sette opp. Den er satt opp med de samme fortynningene brukt i ACH50 assayet, og dette kan gjøre det enklere å sammenlikne resultatene.

Kontrollprøvene for zymosan, EDTA og EGTA fikk en lavere konsentrasjon enn tenkt i utgangspunktet, men konsentrasjonen var trolig likevel høy nok til å få effekt (Sakai 1983; Yano 1992).

I overlevelsesforsøket var det 15 individuelle plasmaprøver fra hver fiskeart som parasittene ble eksponert for. Ved korrekt utført metode skulle det være nok individer til å trekke en konklusjon. Test av færre individuelle plasma- og mukusprøver ville gjøre det vanskeligere å si noe om dødeligheten denne artens plasma hadde på parasitten generelt. Test av mange individer er dyrt, tids- og plasskrevende.

I denne masteroppgaven er det vist at plasma har en letal effekt på *G. salaris*. Dette viste også Harris et al. (1998). Ved naturlige forhold det er ikke vist at parasitten kommer i direkte kontakt med plasma. Det vil derfor være interessant å se nærmere på huden der hvor parasitten fester seg, om det skjer noen epidermale forandringer. Det hadde vært interessant å se hvordan produksjonen av mukus, og stoffsammensetningen i mukus, endret seg under en parasittinfeksjon. Større forsøk med mukus tilsatt EGTA-Mg²⁺ kan vise at alternativ komplementaktivering er med på eller er hovedaktøren for parasittdødeligheten.

Undersøkelser rundt hvor mukus får immunkomponentene fra kan gi viktig informasjon, blir de blir transportert fra plasma og ut i mukus gjennom slimcellene, kan det være slimceller eller andre celler i huden som produserer egne immunkomponenter og endres aktiviteten ved parasittinfeksjon. Det kan være forskjeller av denne typen, hos laks og ørret, som kan forklare ulik grad av mottakelighet.

6 Konklusjon

Plasma og mukus fra *Salmo salar* og *Salmo trutta* virker letalt på *G. salaris in vitro*. Det er ingen forskjell mellom artene i plasmaets letale effekt på parasitten. Dette gjelder også for mukus fra de samme artene. Den letale effekten på parasitten avtar med økende plasma og mukus fortyndinger. Letaliteten i plasma og mukus kan fjernes ved varmebehandling av plasma, og tilsetning av zymosan eller EDTA.

Det var ikke signifikant forskjell i plasma mellom laks og ørret ved aktivering av alternativ komplement. Det er ennå uklart om det er en sammenheng mellom parasitt-letalitet og alternativ komplementaktivering, det er ikke blitt funnet en klar korrelasjon.

7 Referanser

- Agrawl, A., Sherive, A. K., Greenhough, T. J. & Volanakis, J. E. (2001). Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Journal of Immunology* **166**, 3998-4004.
- Alexander, J. B. & Ingram, G. A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 249-279.
- Bakke, T. A. (1991). A review of the inter- and intraspecific variability in salmoid hosts to laboratory infections with *Gyrodactylus salaris* Malmberg. *Aquaculture* **98**, 303-310.
- Bakke, T. A., Harris, P. D., Jansen, P. A. & Hansen, L. P. (1992). Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Mono-genea). *Diseases of Aquatic Organisms* **13**, 63-74.
- Bakke, T. A. & Mackenzie K. (1993). Comparative susceptibility of native Scottish and Norwegian stocks of Atlantic salmon *Salmo salar* L., to *Gyrodactylus salaris* Malmberg: laboratory experiments. *Fishery Research* **17**, 69-85.
- Bakke, T. A., Soleng, A., & Harris, P.D. (1999). The susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) x brown trout (*Salmo trutta* L.) hybrids to *Gyrodactylus salaris* Malmberg and *Gyrodactylus derjavini* Mikailov. *Parasitology* **119**, 467-481.
- Bakke, T. A., Harris P. D., & Cable J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology* **32**, 281-308.
- Breder, C.M. (1926). The locomotion of fishes. *Zoologica* **4**, 159-256.
- Buchmann, K., & Bresciani, J. (1998). Mikroenviorment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitology Research* **84**, 17-84.
- Buchmann, K. (1998) Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 195-200.
- Buchmann, K. (1999). Immune mecanisms in fish skin against monogeneans – a model. *Folia Parasitologica* **46**, 1-9.
- Bullock, A.M., Marks, R., & Roberts, R.J. (1978). The cell kinetics of teleost fish epidermis: epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Zoology* **185**, 197-204.

- Castro, G. A., & Harari, Y. (1982). Intestinal epithelial membrane changes in rates immune to *Trichinella spiralis*. *Molecular Biochemistry Parasitology* **6**, 191-204.
- Cross, M. L., & Matthews, R. A. (1993). Localized leucocyte response to *Ichthyophthirius multifiliis* establishment in immune carp *Cyprinus carpo* L. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **38**, 341-358.
- Day, N. K. B., Good, R. A., Finstad, J., Johannesen, R., Pickering, R., & Gewurz, J. H., (1970). Interactions between endotoxic lipopolysaccharides and the complement system in the sera of lower vertebrates. *Process of Social Experiential Medicinal Biology* **133**, 1397-1401.
- Dorson, M., Torchy, C., & Michel, C. (1979). Rainbow trout complement fixation used for titration and antibodies against several pathogens. *Annual of Veterinary Research* **10**, 529-534.
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **25** (8-9), 827-839.
- Fletcher, T. C., & Grant P. T. (1968). Glycoproteins in the external mucus secretions of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.). *Biochemical Journal* **106** (2), P12.
- Fletcher, T. C., & Grant, P.T. (1969). Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.). *Biochemical Journal* **115** (5), P65.
- Fujii, T., Nakamura, T., Sekiawa, A., & Tomonagam S. (1992). Isolation and characterization a protein from hagfish serum that is homo-logous to the third component of the mammalian complement system. *Journal of Immunology* **148**, 117-123
- Gigli, I., & Austen, K. F. (1971). Phylogeny and function of the complement system. *Annual Review of Microbiology* **25**, 309-332.
- Giclas, P. C., Morrison, D. C., Curry, B. J., Laurs, R. M., & Ulevitch, R. J. (1981). The complement system of the albacore tuna, *Thunnus alalunga*. *Developmental and Comparative Immunology* **5**, 437-447.
- Gonzalez, S. F., Buchmann K. & Nielsen, M. E. (2007) Complement expression in common carp (*Cyprinus carpo* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Developmental & Comparative Immunology* **31**, 576-586.
- Harris, P. D., Soleng, A., & Bakke, T. A. (1998). Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology* **117**, 137-143.

- Hickman Jr. C. P., Roberts L.S., Keen S. L., Larson A., I'Anson H. & Eisenhour, D.J. (2008). Integrated principles of zoology, Fourteenth edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. P303.
- Hjelmeland, K., Christie, M., & Raa, J. (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* **23**,13-22.
- Holland, M. C., & Lambris, J. D. (2002) The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 399-420.
- Huber, A.R., & Weiss, S.J. (1989). Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an *in vitro* construct of a blood vessel wall. *The Journal of Clinical Investigation* **83**, 1122–1136.
- Johnsen, B.O., & Jensen, A. J. (1991). The *Gyrodactylus* story in Norway. *Aquaculture* **98**, 289-302.
- Johnsen, B. O., Ieshko, E. P., Karasev, A., Jensen, A.J., & Schurov, I. (1999). Report on the joint research on *Gyrodactylus salaris* in the northern region of Norway and Russia. *NINA-NIKU Project Report* **9**, 1-20
- Kania, P. W., Evensen, O., Larsen, T. B., & Buchmann, K. (2009). Molecular and immunohistochemical studies on epidermal responses in Atlantic salmon *Salmo salar* L. induced by *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957. *Journal of Helminthology* (2010) **84**, 166-172.
- Kania, P. W., Sorensen, R. R., Koch, C., Brandt J., Kliem, A., Vitved L., & Skjodt, K. (2010). Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: Identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 910-920.
- Koppenheffer, T. L. (1987). Serum complement systems of ectothermic vertebrates. *Developmental of and Comparative Immunology* **11**, 279-286.
- Kryvi, H. & Totland, G. K. (1997). Kap 3. Huden. I: Fiskeanatomi. Høyskoleforlaget AS – Norwegian Academic Press, Kristiansand. pp. 37-50.
- Lambris, J. D. (1988). The multifactorial role of C3, the third component of complement. *Immunology Today* **9**, 387-392.

- Lea, T. (2006). Kap. 4. Løselige molekyler og naturlig immunitet. I: Lea, T. Immunologi og immunologiske teknikker, 3 utg. Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS. Bergen. pp. 37-49.
- Lebedev B. I. (1988). Monogenea in the light of new evidence and their position among platyhelminths. *Angewandte Parasitologie* **29**, 149-172.
- Legler, D. W., Evans, E. E., & Dupree, H. K. (1967). Comparative immunology: Serum complement of fresh-water fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* **96**, 237-242.
- Lobb, C. J., & Hayman, J. R. (1989). Activation of complement by different immunoglobulin heavy chain isotypes of the channel fish (*Ictalurus punctatus*). *Molecular Immunology* **26**, 457-465.
- Løvoll, M., Dalmo, R. A. & Bøgwald, J. (2007a). Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 1-11.
- Løvoll, M., Fisher, U., Mathisen, G. S., Bøgwald, J., Ototake, M. & Dalmo, R. A. (2007b). The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1-12.
- Malmberg, G. (1993). Gyrodactylidae and Gyrodactylosis of Salmonidae. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*. 5-46.
- Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M. & Yano, T. (1988). Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Developmental of and Comparative Immunology* **12**, 403-408.
- Mayer M. M. (1967). Complement and Complement Fixation. I: Kabat, E. A., & Mayer M. M. Experimental Immunochemistry, 2nd ed. Charles C. Thomas, Springfield. pp 133-154.
- Mo, T. A. (1990). Flercellede parasitter. I: Fiskehelse – sykdommer, behandling, forebygging. Red Trygve T. Poppe, Jon Grieg Forlag. pp 83-93.
- Nakao, M., Matsumoto, M., Nakazawa, M., Fujiki, K. & Yano, T. (2000). Diversity of the complement factor B/C2 in the common carp. *Developmental and Comparative Immunology* **24**, E6 (utdrag)
- Nonaka M., Iwaki M., Nakai C., Nozaki M., Kaidoh T., Nonaka M., Natsuume-Sakai S., & Takahashi M. (1984) Purification of a major serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) homologous to the third component of mammalian complement. *Journal of Biology Chemistry* **259**, 6327-6333.

- Nonaka, M. (1994). Molecular analysis of the lamprey complement system. *Fish & Shellfish Immunology* **4**, 437-446.
- Pickering, A. D. (1974). The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology* **6**, 111-118.
- Rijkers, G. T. (1982). Non-lymphoid defense mechanisms in fish. *Developmental of and Comparative Immunology* **6**, 1-13.
- Røed, K. H., Brun, E., Larsen, H. J., & Refstie, T. (1990). The genetic influence on serum hemolytic activity in rainbow trout. *Aquaculture* **85**, 109-117.
- Røed, K. H., Fjalestad, K., Larsen, H. J., & Midthjel, L. (1992). Genetic variation in hemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Biology* **40**, 739-750.
- Rubio-Godoy, M., Sigh, J., Buchmann, K., & Tinsley, R.C. (2003). Antibodies against *Discocotyle sagittata* (Monogenea) in farmed trout. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 181-184.
- Sakai, D. K. (1981). Heat inactivation of complements and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish, and tilapia. *Bulletin of the Japan Society of Scientific Fisheries* **47**, 565-671.
- Sakai, D. K. (1983). The Activation of Alternative Pathway by Pronase, LPS and Zymosan in the Complement System of Rainbow Trout Serum. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **49**(3), 347-351.
- Sakai, D. K. (1992). Repertoire of complement in immunological mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 223-247.
- Scott, M. E., & Robinson, M. A. (1984). Challenge infections of *Gyrodactylus bullarudis* (monogenea) on guppies (*Poecilia reticulata*) following treatment. *Journal of Fish Biology* **24**, 581-586.
- Shephard, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 401-429.
- Smith, V.J., Fernandes, J. M. O., Jones, S. J., Kemp, G. D., & Tatner M. F. (2000). Antibacterial proteins in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology* **10**, 243-260.
- Sterud E., Harris P. D., & Bakke T. A. (1998) The influence of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on the epidermis of Atlantic salmon *Salmo salar* L., and brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill): experimental studies. *Journal of Fish Diseases* **21**, 257-263.

- Sunyer, J. O., Zarkadis I. K., Sahu, A., & Lambris, J.D. (1996). Multiple forms of complement C3 in trout, that differ in bringing to complement activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **93**, 8546-8551.
- Sunyer, J. O., Tort, L., & Lambris, J. D. (1997). Structural C3 diversity in fish- characterization of five isoforms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Journal of Immunology* **158**, 2813-2821.
- Sunyer, J. O., & Lambris, J. D. (1998). Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews* **166**, 39-57.
- Thoresen, T.S. (2008). Kap. 6. Hypotesetesting. I: Statistikk for laboratoriet. Eureka Forlag, Høgskolen i Tromsø, Tromsø, pp. 92-97.
- Yano, T., Hatayama, Y., Matsuyama, H., & Nakao, M. (1988). Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**, 1049 – 1054.
- Yano, T. (1992). Assays of hemolytic complement activity. In: *Techniques in Fish Immunology*. J.S. Stolen, ed. SOS Publications, Fair Haven, N.J., U.S.A, pp. 131-141.
- Yano, T. (1996). The non-specific immune system: humoral defence. I: *The Fish Immune System*, ed. Iwama, G. og Nakanishi, T., Academic press, New York. pp. 106-159.

8 Oversikt over tabeller og figurer

Figur 1. Taksonomi av *Gyrodactylus salaris*. I parentes står personen som beskrev taxonet. Klassifikasjonen er foreslått av Lebedev (1988).

Figur 2. Skjematisk beskrivelse av morfologien til *Gyrodactylus* sp. Bildet er hentet fra boken «Integrated principles of zoology» (Hickman et al., 2008).

Figur 3. De ulike trinnene i alternativ komplementaktivering. Det starter med at C3 hydrolyseres og binder faktor B, og sammen binder de faktor D. Etter å ha spaltet av Ba, dannes komplekset C3 konvertase. Den spalter et C3 molekyl. C3b bindes til komplekset og det dannes en C5 konvertase. Denne spalter C5 komponentene og starter dannelsen av det terminale komplementkomplekset, som består av C5b, C6, C7, C8 og C9 (Lea 2006).

Figur 4. Likningen for utregning av ACH50. * Dette assayet ble utført i ½ skala av original metode, som benytter et totalvolum på 0,7 ml (Mayer 1967; Matsuyama et al. 1988; Yano 1992).

Figur 5. Parasittoverlevelse etter kontakt med fortynnet plasma. Plottet viser effekten fortynnet plasma har på overlevelse for parasitten. Dette er et linjediagram hvor x-aksen viser fortynninger av plasma og y-aksen viser prosent overlevende parasitter etter 120 minutter.

Figur 6. Overlevelse av parasitter i kontakt med plasma (1:80) som funksjon av tid. Linjediagram hvor x-aksen viser antall minutter *G. salaris* har vært i kontakt med sammenslått plasma. Y-aksen viser prosent overlevende parasitter.

Figur 7. Effekt av fortynning vist ved overlevelse av parasitter i kontakt med fortynnet mukus sammenslått fra fem individer. Et linjediagram hvor x-aksen viser fortynning av mukus og y-aksen viser prosent overlevende parasitter etter 120 minutter.

Figur 8. Effekt av tid vises ved overlevelse av parasitter i kontakt med mukus (1:2). Linjediagram hvor x-aksen viser antall minutter *G. salaris* har vært i kontakt med mukus. Y-aksen viser prosent overlevende.

Figur 9. Oversikt over ACH50-verdier fra laks (*S. salar*) og ørret (*S. trutta*). Dette er et boksplot med ACH50-verdiene i plasma på y-aksen og fiskeartene på x-aksen. De vertikale linjene i diagrammet strekker seg fra laveste til høyeste ACH50-verdi. Boksene er strukket fra 25-prosentilen til 75-prosentilen, og streken inni er medianen (eller 50-prosentilen). «Diamantene» viser standardavviket og streken inni er gjennomsnittet.

Figur 10. Oversikt over ACH50-verdier fra ørret (*S. trutta*). For forklaring av boksplottet se figur 9.

Figur 11. Sammenheng mellom prosent dødelighet av parasitter ved eksponering for plasma og ACH50-verdiene i de samme plasmaprøvene målt som hemolyse av kaninerytrocytter. Punktdiagrammet viser x-aksen med prosent døde parasitter og y-aksen med ACH50-verdier.

Figur 12. Sammenhengen mellom prosent dødelighet av parasitter ved eksponering for mukus og ACH50-verdiene i fra samme mukusprøve. For forklaring av diagrammet se figur 11.

Tabell 1. Oversikt over volumet av plasma, EGTA-Mg-GVB, destillert vann, og RaRBC 2×10^8 celler/ml alle i μl , som var i de ulike prøvene i fortynningsrekken, samt i kontrollene, for hver enkel test. Betegnelsene CB står for kontrollen «celleblank» og 100 % står for kontrollen «100 % hemolyse».

Tabell 2. Overlevelse av parasitter i kontakt med behandlet plasma eller mukus, ved ulike fortynninger og etter ulike tidspunkt. Parasittoverlevelsen er angitt i prosent. VB står for varmebehandlet prøve. ZB står for prøve behandlet med zymosan. EGTA står for EGTA-Mg²⁺-behandlet prøve og EDTA står for EDTA behandlet prøve. «Plasma 1:10 120 min» betyr at det er en plasmaprøve fortynnet 1:10 som parasittene har vært i kontakt med i 120 minutter. M står for mukus.

Tabell 3. Presentasjon av antall levende og døde *G. salaris* i 1:80 plasma- fortynning, med 30 minutter eksponeringstid. Plasma fra 15 laks sammenliknet med plasma fra 15 ørret.

Tabell 4. Presentasjon av antall levende og døde *G. salaris* i 1:2 mukus- fortynning, med 30 minutter eksponeringstid. Mukus fra 15 laks sammenliknet med mukus fra 15 ørret.