

FAGLIG SLUTTRAPPORT

FHF 901462

Etablering av multiplex immunassays for måling av biomarkører
for helse og velferd hos Atlantisk laks (Salm-plex)

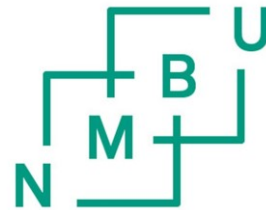
Hege Lund

Baojian Sun

Faggruppe for Immunologi

Veterinærhøgskolen NMBU

Rapport levert 1 februar 2022



Prosjektet er finansiert av Fiskeri -og
havbruksnæringens forskningsfinansiering

1. SAMMENDRAG

De største utfordringene i oppdrettsnæringen er knyttet til infeksjonssykdommer og fiskevelferd, og det er et stort behov for utvikling av verktøy som kan dokumentere laksens helsetilstand.

Akutfaseproteiner og andre biomarkører for inflammasjon er viktige diagnostiske indikatorer for tidlig sykdomspåvisning i human- og veterinærmedisin. Hos fisk er disse mindre studert og det mangler verktøy for å måle forekomsten av biologiske parametere i blodet. Målsetningen med FHF prosjektet «Etablering av multiplex immunassays for måling av biomarkører for helse og velferd hos Atlantisk laks (Salm-Plex) (FHF 901462)» har vært å identifisere akutfaseproteiner og biomarkører for inflammasjon, sykdom og stress i blod fra fisk og etablere ny teknologi for måling av disse.

For å identifisere relevante biomarkører for inflammasjon, har vi utført plasma proteomikk på materiale fra en tidsstudie av fisk smittet med en akutt bakteriell infeksjon og på usmittet kontrollfisk. I tillegg til proteiner som var differensielt uttrykt mellom smittet fisk og kontroller, fant vi unikt utrykte plasmaproteiner hos smittet fisk inkludert nye og lovende blod biomarkører for inflammasjon; cathelicidiner, L-plastin og løselig toll-like reseptor (TLR)5. Resultatene fra dette studiet har tilført verdifull informasjon om laksens plasma proteom.

Utviklingen av verktøy for overvåking av oppdrettslaksens helse krever en tverrfaglig tilnærming, spesielt i grensesnittet mellom laksens fysiologi og immunrespons. Salm-Plex prosjektet har derfor opprettet samarbeid med flere relevante FHF prosjekter som ser på laksens fysiologi i sammenheng med sykdomsutvikling og robusthet. Gjennom samarbeid med prosjektet «Karakterisering, prediksjon og reduksjon av kardiomyopatisyndrom (CMS) hos atlantisk laks (FHF 901672)» har vi undersøkt om biomarkør kandidater identifisert ved plasma proteomikk kunne brukes i sammenheng med hjerteinflammasjon ved CMS. CMS er en alvorlig infeksjonssykdom hos Atlantisk laks som fører til akutt dødelighet, store velferdsutfordringer og økonomisk tap, og det finnes ingen behandling eller effektive forebyggende verktøy. Våre resultater viste en korrelasjon mellom dødelighet under CMS og nivåer av biomarkøren L-plastin i blod og hjerte. Dødelighet var assosiert med alvorlige lesjoner i spongjøst myokard med infiltrasjon av inflammatoriske mononukleære celler. Til sammen indikerer disse resultatene at L-plastin kan komme fra infiltrerende immunceller i hjerte hos individer med alvorlig CMS-relatert hjerteinflammasjon. Videre arbeid vil undersøke om vi kan bruke L-plastin som en biomarkør for prediksjon av CMS-relatert dødelighet.

Stoffskiftehormonene T3 og T4 har en avgjørende rolle under initieringen av laksen smoltifisering. Gjennom et samarbeid med FHF prosjektet «Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning (FHF 901590)» har vi validert et kule-basert multipleks immunassay for samtidig måling av stoffskiftehormonene T3 og T4 samt stresshormonet kortisol i blod fra laks. Metoden ble validert på prøver fra et kommersielt gjennomstrømningsanlegg, og resultatene viser at metoden fungerer veldig godt til måling av T3 og T4 og kortisol samtidig i serum fra laks der konvensjonell ELISA har hatt for lav sensitivitet. Våre resultater fra denne kohorten viste en markant økning av plasma T3 4 uker etter oppstart av vintersignal, før denne faller igjen mot slutten av ferskvannperioden. I motsetning er nivåer av T4 høyest i plasma rett før utsett i sjø. Mengden plasma T3 øker igjen markant rundt 8 uker etter utsett. På dette tidspunktet ligger T3 nivåer hos taperfisk fra samme kohort betydelig lavere. Foreløpige resultater indikerer at plasma kortisol nivåer er høyest i parr og etter 8 uker i sjø. Det var ingen signifikante forskjeller i kortisol nivåer mellom taperfisk og vanlige kontroller i samme kohort ved 8 uker etter utsett.

Verktøy for måling av biologiske parametere som akutfaseproteiner, biomarkører for inflammasjon, stoffskiftehormoner og stresshormonet kortisol vil kunne ha høy fremtidig bruksverdi for akvakulturnæringen. Etter videre validering vil biomarkører identifisert gjennom Salm-plex prosjektet kunne brukes i fremtidig overvåking av helse og velferd hos oppdrettslaks, og kunne komplementere og

understøtte andre verktøy som video –/ kameraovervåkning og bidra inn i beslutningsgrunnlaget for produksjons -og smittevernmessige tiltak for oppdrettsnæringen.

SUMMARY

The greatest challenges in Atlantic salmon aquaculture are related to infectious diseases and welfare, and there is an urgent need for development of tools for documentation of health of farmed fish. Acute-phase proteins and other inflammatory biomarkers are important early diagnostic indicators of disease in human - and veterinary medicine. These are however less studied in fish, where there is a general lack of tools for measurement of biological parameters in blood. The aim of the FHF-funded project «Development of tools for measurement of biomarkers of health and welfare in Atlantic salmon (Salm-Plex) (FHF 901462)» was to identify relevant acute-phase proteins and biomarkers of inflammation, disease and stress in blood from fish and to develop new technology for their assessment.

For this purpose, a plasma proteomic approach was applied to identify biomarkers of inflammation in a time-course study of fish challenged by an acute bacterial infection and non-infected controls.

In addition to proteins differentially expressed in infected fish and controls, a panel of plasma proteins were uniquely identified in infected fish. These included promising biomarkers of inflammation, such as cathelicidins, L-plastin and soluble toll-like receptor (TLR)5. The results from this study provide valuable protein-level evidence for the unreviewed salmon proteome.

Development of tools for surveillance of health in farmed salmon requires an interdisciplinary approach especially at the interface between salmon physiology and immune response. The Salm-Plex project has established collaboration with several relevant FHF projects focusing on salmon physiology in relation to disease development and robustness. Trough collaboration with the project «SALMOCARD:

Characterizing, predicting and mitigating cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon (FHF 901672) » we have examined whether biomarkers of inflammation identified by plasma proteomics can be applied as biomarkers of cardiac inflammation in relation with CMS. CMS is a severe infectious cardiac disease affecting Atlantic salmon that leads to sudden death and poses serious economical and fish welfare challenges, and currently there are no treatment or effective preventive tools available. Our results showed an association between CMS-related mortality and the levels of L-plastin in blood and heart. Mortality was correlated with severe lesions on the spongy myocardium and inflammatory mononuclear cell infiltration. Together these results indicate that L-plastin may originate from immune cells infiltrating the heart of individuals with severe cardiac inflammation. Future work will examine whether L-plastin may serve as a predictive biomarker of CMS-related mortality

The thyroid hormones T3 and T4 play crucial roles in the initiation of salmonid smoltification.

Trough collaboration with the project «Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning (FHF 901590)» we have validated a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous measurement of T3 and T4 and the stress hormone Cortisol. The method was validated on samples from a commercial flow-through facility, and our results show that the assay functions well for simultaneous measurement of plasma T3, T4 and cortisol, where previous ELISA have shown sensitivity.

In the examined cohort, there was a marked increase of plasma T3 at 4 weeks after the onset of the winter-signal, before the T3 levels again showed a drop towards the end of the freshwater period. In contrast, plasma T4 levels were highest just prior to seawater transfer (SWT). T3 levels show a marked increase at 8 weeks post SWT. At that timepoint, T3 levels in loser fish from the same cohort were significantly lower. The results further showed a peak in plasma cortisol levels in parr and in growers after 8 weeks in sea. There were no significant differences in plasma cortisol between loser fish and normal controls at 8 weeks post SWT.

Tools for measurement of biological parameters such as acute-phase proteins, biomarkers of inflammation, metabolic hormones and stress hormones will be of a high future value for the aquaculture industry. Following additional validation, biomarkers identified during the Salm-plex project can be utilized in future monitoring of health and welfare of farmed salmonids and complement and support other tools such as video -/camera surveillance and together form a basis for decisions making during production – and infection control measures.

2. INNLEDNING

1. Bakgrunn for prosjektet

Akuttfaseresponsen er en tidlig medfødt immunrespons initiert av inflammatoriske signaler som fører til frigjøring av akuttfaseproteiner og inflammatoriske mediatorer til blodet. Akuttfaseproteiner er viktige diagnostiske indikatorer for tidlig sykdomspåvisning i human- og veterinærmedisin fordi serumnivåer øker raskt ved akutte betennelser, infeksjoner og vevsskader. Akuttfaseresponsen hos pattedyr er godt beskrevet og den kliniske nytten av akuttfaseproteiner og andre biomarkører for inflammasjon, som for eksempel C-reaktivt protein (CRP), er velkjent. Akuttfaseresponsen hos fisk er derimot mindre studert, forskningsfokus så langt har vært på regulering av akuttfasegener i vev eller cellekultur (Jørgensen et al., 2000; Lee et al., 2017) og verktøy for å måle forekomsten av akuttfaseproteiner i blodet ved sykdom mangler. I tillegg er ikke alltid den virkelige funksjonen til disse akuttfasemarkør homologene i fisk kjent eller har samme funksjon som i pattedyr. Funksjonelt etablerte biomarkører for inflammasjon hos pattedyr kan derfor ha en helt annen rolle hos fisk.

I tillegg til immunaktivering i form av en akuttfaserespons aktiveres også stressresponser ved infeksjon og sykdom hos fisk, blant annet ved økt kortisol produksjon. Kortisol er hos fisk, som hos mennesker, det viktigste stress-hormonet og nivåene av dette hormonet brukes derfor som en stress – og velferdsindikator (Ellis et al., 2012). Kortisol kan måles ved hjelp av for eksempel radioimmunassay (RIA) eller enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RIA regnes gjerne som gullstandarden for kortisolmålinger, men fordi denne metoden er forbundet med høye kostnader og risiko, har kommersielle kompetitive ELISA blitt utviklet for humant bruk. Dessverre er ELISA-metoden mindre sensitiv enn RIA (Sink et al., 2008) og utvikling av nye og mer tilgjengelige metoder enn RIA og ELISA er derfor nødvendig.

Multipleks-teknologi muliggjør påvisning av flere titalls analytter på samme tid og i samme prøvevolum, slik at også små blodprøver på levende fisk vil gi stor nytteverdi. Våre tidligere resultater viser at metoden har en bred dynamisk rekkevidde og en høyere sensitivitet enn mer tradisjonelle metoder som ELISA (Bakke et al., 2021; Lund et al., 2019). Dette gjør det mulig å skille mellom høy- og lav-respondere innenfor samme plasmafortynning, som er *spesielt viktig* dersom man skal analysere små blodprøver fra levende fisk. Stor dynamisk rekkevidde i en metode er en betydelig fordel ved malinger av en laksepopulasjon, der man ofte ser store individuelle variasjoner i respons. Ved å ta i bruk metoden for akuttfaseproteiner, inflammasjonsmarkører og stresshormoner, vil sykdom, inflammasjon, vevsskade og stress kunne påvises før manifestasjon av kliniske symptomer hos fisken, og før eventuell sykdomstilstand blir et betydelig problem for oppdretter.

II. Prosjektets omfang og organisering

Start tidspunkt: 2018.08.01

Slutt tidspunkt: 2022.02.01

Total økonomisk ramme: 7.996 mill NOK

Prosjektleder

Hege Lund, Veterinærhøgskolen NMBU

Prosjektgruppe

Baojian Sun	Forsker, Veterinærhøgskolen NMBU
Preben Boysen,	Førsteamanuensis, Veterinærhøgskolen NMBU
Ida Beitnes Johansen	Førsteamanuensis, Veterinærhøgskolen NMBU
Marco Vindas	Forsker, Veterinærhøgskolen NMBU
Ingrid Mo	Ingeniør, Veterinærhøgskolen NMBU

Anne Storset og Øyvind Øverli har ikke deltatt i prosjektet siden høsten 2018, da de gikk inn i nye roller på Veterinærhøgskolen.

Styringsgruppe

Marianne Kraugerud	PHARMAQ Analytiq AS - Veterinær, patolog
Paul Midtlyng	Aquamedic AS - Daglig leder
Stian Nylund	PHARMAQ Analytiq AS - FoU-sjef
Magnus Devold	PatoGen Analyse AS - Forskningsssjef

Magnus Devold har ilar prosjektet blitt erstattet av Jostein Grip og av Morten Lund.

Eksterne samarbeidspartnere

Hanne Haslene-Hox, SINTEF Trondheim

3. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

De største utfordringene i oppdrettsnæringen er knyttet til infeksjonssykdommer og fiskevelferd, og det er et stort behov for utvikling av verktøy som kan dokumentere laksens helsetilstand. Målsetningen med Salm-Plex prosjektet var å identifisere akutfaseproteiner og biomarkører for inflammasjon, sykdom og stress i blod fra fisk og etablere ny teknologi for måling av disse. Relevante biomarkører vil kunne inkluderes i kule-baserte multipleks immunassays, som muliggjør påvisning av flere titalls analytter samtidig i en prøve. Verktøy for dokumentasjon av laksens helsetilstand i blod vil kunne komplementere/understøtte andre verktøy som visuell observasjon og kameraovervåkning og bidra inn i beslutningsgrunnlaget for produksjonsmessige og smittevernmessige tiltak.

I og med at mange aspekter ved akutfaseresponsen hos laks er ukjent, vil prosjektet samtidig bidra til å generere ny kunnskap om tidlig sykdomsutvikling hos laks, noe som vil være av betydning for videre forskning innenfor dette området.

For prosjektets resultatmål (leveranser) se punkt 8. *Leveranser*.

4. PROSJEKTGJENNOMFØRING

Arbeidspakke 1. Seleksjon og produksjon av reagenser

Formålet med arbeidspakke 1 var å identifisere biomarkører og produsere reagenser for anvendelse i arbeidspakke 2.

AP 1.1 Screening av biomarkører.

Målet med dette studiet var å undersøke laksens plasma proteom ved den tidlige immunresponsen etter en infeksjon dvs. immunmediatorer involvert i inflammasjon (akutfaserespons) for å identifisere relevante biomarkører. Til dette formål ble et smitteforsøk utført ved VESO Viken, der smolt ble smittet ble *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* intraperitonalt eller ved badesmitte (n=90), og blod og organer (milt, hodenyre og lever) ble høstet ved 0 timer (t), 12t, 24t, 48t, 96t and 7 dager etter smitte. Kontroll usmittet fisk (n=70) i en separat tank var inkludert i studien. Endringer i laksens plasma proteom ble undersøkt ved shotgun proteomikk analyse ved bruk av Q-Exactive HF masse spektrometer (Orbitrap), i samarbeid med SINTEF i Trondheim. Databearbeidingen inkluderte analyse av proteiner som viste signifikant forskjellig ekspresjon i plasma hos smittet fisk sammenlignet med kontroller og proteiner som kun ble detektert i plasma hos smittet fisk. I tillegg ble det utført RT-qPCR for å studere transkripsjonskinetikken til potensielle biomarkører i milt og lever. Parallelt produserte prosjektet rekombinante proteiner og polyklonale antistoffer av relevante biomarkører, blant annet basert på funn fra pilot studien. Disse ble validert ved western blotting av plasma.

AP 1.2 Utprøving av eksisterende reagenser.

MILLIPLEX® MAP Multi-Species Hormone Magnetic Bead Panel, for samtidig måling av stresshormonet kortisol og stoffskiftehormonene har blitt testet på materiale fra FHF prosjekt 901590 (detaljer under Arbeidspakke 2).

MILLIPLEX® MAP Human Circadian/Stress Panel 2-plex kit, for samtidig måling av kortisol og melatonin har blitt testet på laks utsatt for akutt stress samt ustresset kontrollfisk (detaljer under Arbeidspakke 2).

Humant L-plastin polyklonalt antistoff ble testet på materiale fra smitteforsøk fra AP1.1 og på materiale fra FHF prosjekt 901672 (SALMOCARD) (detaljer under Arbeidspakke 2).

Humane antistoffer mot cardiac Troponin-I og Troponin-T var ikke kryssreaktive i laks. Arbeid med sekvensering av laksens cardiac Troponin og produksjon av rekombinante proteiner og antistoffer videreføres i SALMOCARD prosjektet (se under *Anvendelse*).

AP 1.3 Produksjon av rekombinante proteiner.

Alle kandidat biomarkører i prosjektet, med unntak av serum amyloid A (SAA) og ISG15-1, ble klonet inn i PQE80-L-Kan vektorer. SAA and ISG15-1 ble klonet inn i PET32c vektorer med noen mindre modifikasjoner. Plasmidene ble videre transformert inn i *E.coli* TOP10 og positive kloner ble selektert ved PCR. Plasmider fra positive kloner ble videre transformert inn i *E.coli* BL21 for protein produksjon.

AP 1.4 Produksjon av antistoffer

Polyklonale antistoffer mot laks cathelicidin 1 og 2 og SAA ble produsert ved immunisering av kaniner ved seksjon for eksperimentell biomedisin ved Veterinærhøgskolen NMBU. Polyklonale antistoffer mot laks ISG15, L-plastin, CXCL10-1 og sTLR5, og monoklonale antistoffer mot laks Cathelicidin-2 og L-plastin har blitt produsert ved Genscript Biotech.

Tabell 1 under Resultater gir en oversikt over produserte og/eller kommersielt tilgjengelige antistoffer fra prosjektet ved prosjektslutt.

Arbeidspakke 2. Etablering og validering av multiplex immunassays

Formålet med arbeidspakke 2 var å bruke reagenser produsert i AP1 til validering og etablering av immunassays. Disse ble validert på prøvemateriale fra AP1 og på tidligere innsamlet prøvemateriale og relevant feltmateriale. Kandidat biomarkører har vært testet ut ved bruk av egenproduserte og kommersielle antistoffer og kit, og primært ved western blotting. Arbeidet har også inkludert standardisering av metoder for forbehandling av prøvemateriale. Det vil videre være aktuelt å etablere funksjonelle ELISA alene eller parallelt med kule-basert assays.

AP 2.1 Validering på prøvemateriale fra AP1

Produserte antistoffer ble validert ved western blotting på materiale fra smitteforsøk gjennomført i AP1.1.

AP 2.2 Validering på tidligere innsamlet prøvemateriale og representativt feltmateriale

a. Validering på materiale fra FHF prosjekt 901672 (SALMOCARD)

Materiale fra FHF prosjektet «Karakterisering, prediksjon og reduksjon av kardiomyopatisyndrom (CMS) hos atlantisk laks» ble anvendt til utprøving av antistoffer utviklet i AP1. Prøvematerialet besto av plasma og hjerteprovver fra død-fisk (n=8) og overlevende (n=8) etter en mekanisk avlusing ved en lokalitet med bekreftet CMS (Kråkholmen, 64°36'09.2"N 10°51'14.6"E). Død-fisk ble samlet inn under avlusingen og overlevende fra merdene ble avlivet med et slag mot hodet. Alle prøver ble tatt innen 30 min etter døden hadde intruffet. Plasma ble analysert ved western blotting med antistoffer mot cathelicidin 1 og

2 og L-plastin. Immunhistokjemi på fikserte hjerter ble utført med anti-humant L-plastin polyklonalt antistoff, DAPI og wheat germ agglutinin (WGA) farginger. I tillegg ble det utført histopatologisk undersøkelse og scoring av hjertene.

b. Validering på materiale fra FHF prosjekt 901590

Materiale fra FHF prosjektet «Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning» (prosjektnr: 901590) ble anvendt til etablering av en metode for samtidig måling av de to stoffskiftehormonene T4 og T3 samt stresshormonet kortisol i plasma fra laks. Prøvematerialet besto av plasma fra laks fra et kommersielt gjennomstrømningsanlegg, der laksen hadde fått 5 uker vintersignal. Prøvene ble tatt ved ulike tidspunkter gjennom smoltifiseringen og frem til 8 uker etter usett i sjø. Prøver fra vill laksesmolt (n=10) ble brukt for å etablere referanseområder for de analyserte hormonene. Etableringen inkluderte en protokoll for forbehandling av plasma/serum fra laks for måling av steroide hormoner. For analyse av analytter i blodet med lav forekomst og lav molekylær vekt slik som T3 og T4, anbefales det å initialt utføre en prøve ekstraksjon og raffinering før analysing. Vi har utført dette ved acetonnitril-presipitering for å separere proteiner med lav og høy molekylær vekt, etterfulgt av vakumsentrifugering.

Materiale fra et akutt stress forsøk ble anvendt til utprøving av et kommersielt humant kule-basert immunassay for samtidig måling av kortisol og melatonin. Kontroll «ustresset» fisk (n=10) ble tatt fra en tank på minst mulig invaderende måte, ved å fange fisk som kom opp for å spise pellets og få disse raskt over i en bedøvelsestank. Akutt stresset fisk (n=10) ble fanget samtidig i en hov og holdt i hoven i luft i 2 minutter før de ble samlet i en 20 L bønne/kar med kun 15 L vann, der de ble holdt i 30 min.

Arbeidspakke 3. Etablering av kandidat multiplex immunassays for analyser av feltprøver

Formålet med arbeidspakke 3 var å etablere immunassays for analyser av prøver fra felt. Dette arbeidet vil videreføres etter prosjektslutt av Salm-Plex i andre pågående FHF prosjekter og et internt VET NMBU prosjekt.

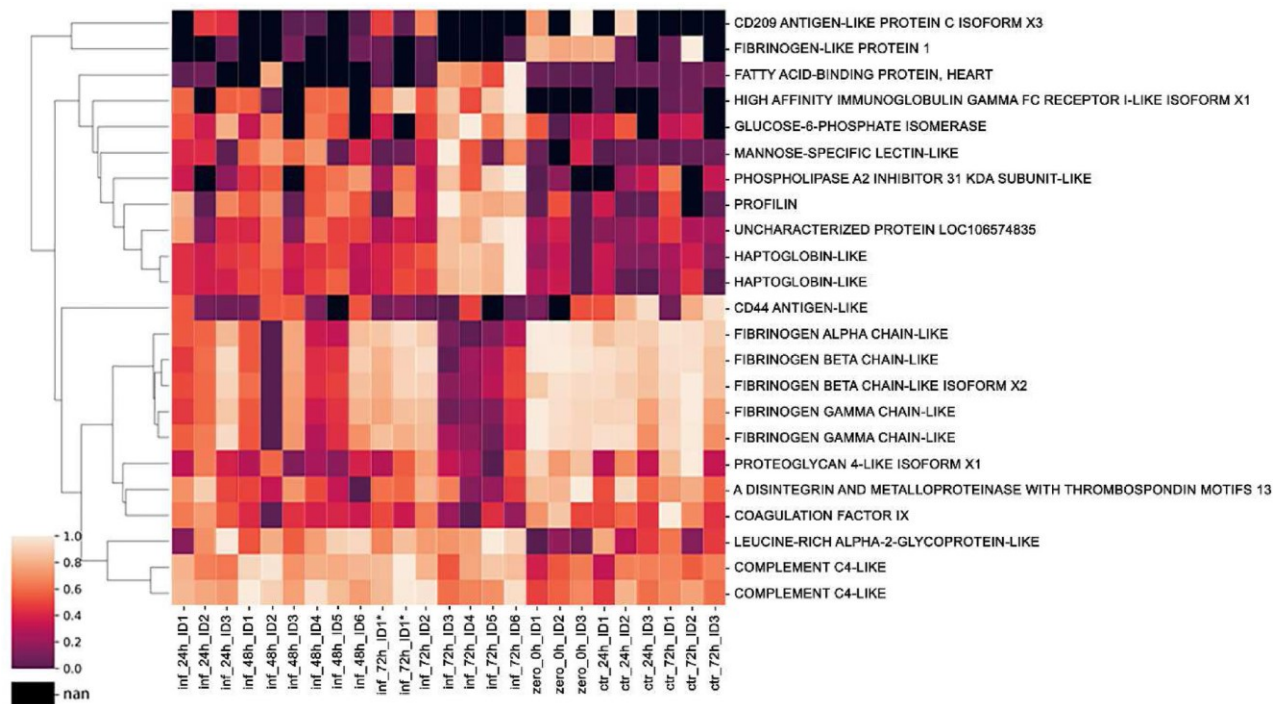
Metodikk og verktøy utviklet i prosjektet skal etter planen utprøves på materiale fra felt i AP3. Prosjektleder er arbeidspakkeansvarlig på et prosjekt finansiert av NMBU, som skal se på helse og velferd hos laks ved oppdrett i eksponerte lokaliteter (Blue Revolution Centre, BRC). Denne typen oppdrett vil kreve ny bevisstgjøring rundt oppdrettsfiskens respons på tøffere miljø, noe som i langt sterkere grad vil utfordre fiskevelferd. BRC vil anvende en tverrfaglig tilnærming (teknologi, biologi og operasjon) for storskala forskning, og er et samarbeid mellom NMBU, SINTEF og Mowi. Analysing av feltmateriale fra BRC var opprinnelig diskutert med Marine Harvest (nå Mowi) ved Øyvind Oaland ved etablering av Salm-Plex prosjektet. Gjennom BRC lokalitetene vil Salm-Plex ha unik tilgang til feltmateriale for utprøving og etablering av ulike immunassays, og har derfor etter avtale med Sven Martin Jørgensen videreført driftsmidler inn i dette prosjektet ut prosjektperioden til Salm-Plex. Tilgjengelige verktøy for analysing av dette feltmaterialet er antistoffer mot L-plastin, cathelicidin1 og 2, CXCL10-1 og sTLR5, et kulebasert multipleks immunassay for samtidig måling av T3, T4 og kortisol og evt også progesteron og testosteron. Prosjektet vil også kjøre multiplex qPCR analyser (Fluidigm Biomark HD) på interessant feltmateriale. Prosjektet vil innhente så mye produksjonsdata som mulig fra anleggene, samt resultater fra eventuelt utførte analyser (PCR, histopatologi). Dette arbeidet videreføres gjennom FHF prosjekt 901590 i samarbeid med Kjetil Hodne og i arbeidet til en intern KD-

finansiert stipendiat (se *Anvendelse*). Delmål 3.3 *Implementering av metoden i feltlaboratorium* og 3.4 *Utprøvning av fullblodsprøver (pilot)* er ikke aktuelt ved prosjektslutt.

5. RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON

1. Identifisering av biomarkører for inflammasjon hos Atlantisk laks

Utvikling av nye verktøy for overvåking av oppdrettslaksens helsetilstand forutsetter en identifikasjon av relevante biomarkører. Til dette formålet har vi utført et shot-gun plasma proteomikk studie på materiale fra fisk smittet med en akutt bakteriell infeksjon, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, og usmittede kontroller. Totalt 23 proteiner var signifikant ($p < 0.01$) differensielt uttrykt i smittet fisk sammenlignet med kontroll fisk og 0-prøver (**Figur 1 og Tabell 1**). Blant disse fant vi 5 immun-relaterte proteiner av interesse som var økt i smittet fisk: haptoglobin-lignende molekyl, høy-affinitet immunoglobulin Fc gamma reseptor I -lignende molekyl (FcγR1, CD64), leucin-rik alfa 2 glykoprotein (LRG1), komplement C4 og fosfolipase A2 inhibitor 31 kDa subunit-lignende protein. Det var en overraskende reduksjon av ulike fibrinogen komponenter (inkludert alfa, beta, gamma kjeder) i plasma hos smittet fisk. Fibrinogen er regnet som et positivt akutfaseprotein hos pattedyr, dvs det øker i konsentrasjonen i blod ved systemisk inflammasjon.

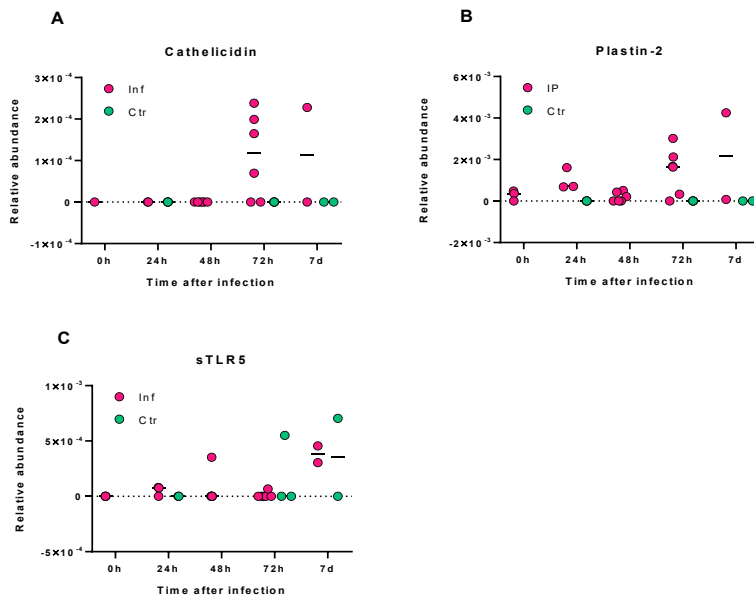


Figur 1. Heat map av skalerte data for proteiner der DEP $p < 0.01$. Rader representerer ekspresjonen av individuelle proteiner, kolonner representerer et biologisk replikat (fisk). Spektrale data for hvert protein har blitt normalisert for hver prøve, og resultatene transformert til en skala fra 0 til 1, der 1.0 viser høyeste forekomst (hvit) og 0.0 viser lavest forekomst (lilla). Manglende verdier er representert ved svart (nan – Not a number).

Accession numbers	Fold change (log2)	P-value	FDR	Description
AOA1S3SLR1	-1.58	0.0015	0.0000	CD209 antigen-like protein C isoform X3
AOA1S3SVF8	-1.41	0.0018	0.0833	Fibrinogen-like protein 1
B5X5M2	1.00	0.0092	0.1471	Fatty acid-binding protein, heart
AOA1S3NRI3	1.35	0.0009	0.0000	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor-like isoform X1 (CD64)
COH9M4	1.01	0.0075	0.1429	Glucose-6-phosphate isomerase
AOA1S3QW80	1.07	0.0072	0.1429	Mannose-specific lectin like
AOA1S3MUZ7	1.01	0.0088	0.1429	Phospholipase A2 inhibitor 31 kDa subunit like
B5X5I8	1.20	0.0098	0.1471	Profilin
AOA1S3MTC5	0.81	0.0046	0.1250	Uncharacterized protein LOC106574835
AOA1S3PTD3	1.12	0.0007	0.0000	Haptoglobin-like
AOA1S3NVC7	1.11	0.0009	0.0000	Haptoglobin-like
AOA1S3KPF0	-0.96	0.0070	0.1429	CD44 antigen-like
AOA1S3N9Y0	-0.78	0.0017	0.0833	Fibrinogen alpha chain-like
AOA1S3NAJ7	-1.23	0.0013	0.0000	Fibrinogen beta chain-like
AOA1S3T3K1	-1.20	0.0014	0.0000	Fibrinogen beta chain-like isoform X2
AOA1S3RF10	-1.06	0.0010	0.0000	Fibrinogen gamma chain-like
AOA1S3SJC9	-1.13	0.0012	0.0000	Fibrinogen gamma chain-like
AOA1S3PA95	-0.34	0.0045	0.1250	Proteoglycan 4-like isoform X1
AOA1S3NJZ7	-0.92	0.0063	0.1250	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13
AOA1S3RIB5	-0.34	0.0084	0.1429	Coagulation factor IX
AOA1S3M844	0.57	0.0018	0.0833	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-like
AOA1S3QML7	0.46	0.0014	0.0000	Complement C4-like
AOA1S3RYT8	0.37	0.0046	0.1250	Complement C4-like

Tabell 1. Liste over differensielt utrykte proteiner (DEP) i smittet fisk ved 24h, 48h, 72h eller 7 dager etter smitte sammenlignet med usmittede kontroll og fisk fra 0 tidspunktet (0h) ($p < 0.01$). Accession number i *Salmo salar* databasen med gitt protein navn, Log2 verdier for fold økning, P-verdi og FDR (%) er gitt.

Totalt 61 proteiner ble unikt identifisert i smittet fisk. Disse inkluderte cathelicidin (Q2NNC4_SALSA), L-plastin (Plastin-2) (AOA1S3NZ03) og sTLR5 (Q5 UT54) (**Figur 2**).

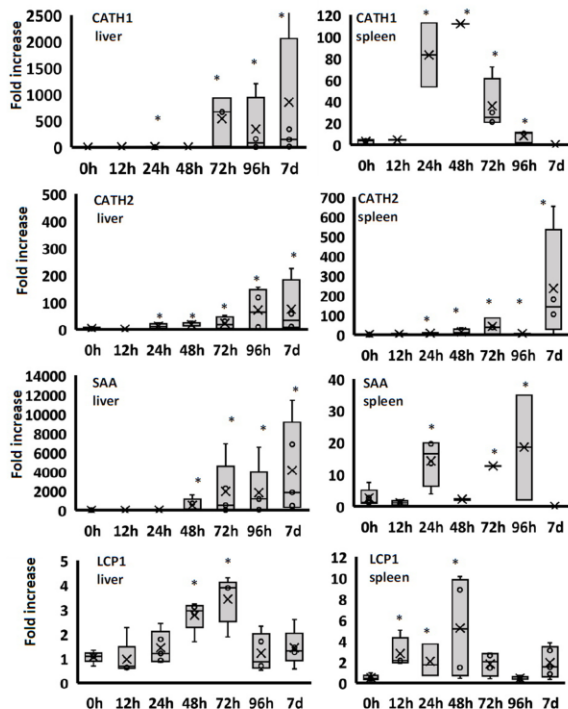


Figur 2. Proteiner unikt utrykt i smittet fisk. Relativ forekomst av identifiserte proteomikk spektr for cathelicidin (**A**), Plastin-2 (L-plastin) (**B**) og TLR5 (**C**) i forhold til total mengde identifiserte spektr i individuelle fisk. Sirkler representerer individuelle prøver (smittet og kontroll) og prikket linje representerer gjennomsnittet av alle individene.

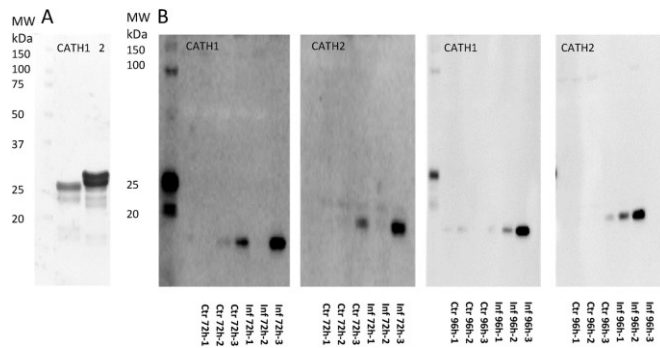
For å studere transkripsjon av utvalgte kandidat biomarkører ble det utført RT-qPCR på lever og milt prøver fra kontroller og smittet fisk fra alle tidspunkter. Transkripsjon av cathelicidin 1 og 2 økte signifikant i lever fra 24 t etter smitte, og denne økningen fortsatte ut prøvetakingsperioden (**Figur 3**). I samsvar med proteomikk og PCR resultater fant vi cathelicidiner i blod fra smittet fisk ved 72 t og 96t etter smitte (**Figur 4**). Resultatene indikerer at cathelicidin 2 er en bedre inflammasjonsmarkør enn cathelicidin 1 i laks, fordi cathelicidin 2 ikke kan detekteres i blod hos kontrollfisk samtidig som den er sterkt induert i smittet fisk.

Akutfaseproteinet Serum Amyloid A (SAA, *serum amyloid A-5 gen*), har dokumentert betydning hos laks. Våre analyser indikerer at SAA som en akutfasemarkør hos laks kun fungerer på transkripsjonsnivå. Resultatene viser en signifikant økning av SAA (1000x – 9000x fold) i *A.salmonicida* smittet fisk sammenlignet med kontroller (**Figur 3**). Vi har kjørt flere western blot analyser på ulikt prøvemateriale og på protein nivå er SAA ekspresjonen variabel og SAA kan også detekteres i plasma hos kontrollfisk (ikke vist).

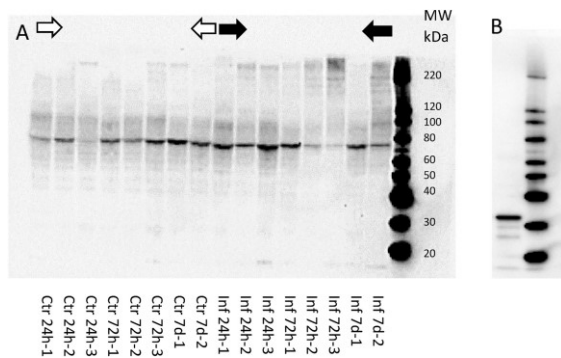
Transkripsjonen av LCP-1, genet som koder for L-plastin, viste en liten men signifikant økning i lever hos smittet fisk (**Figur 3**). Western blot analysen viste forekomst av et protein med en molekylærvækt (MW) på 70 kDA som tilsvarer størrelsen til monomerisk L-plastin i plasma fra både smittet og kontrollfisk (**Figur 5**). I plasma fra smittet fisk fant vi i tillegg en økning av signal for proteinkomplekser med høy MW, som indikerer L-plastin i kompleks med andre plasma proteiner som for eksempel aktin-filamenter.



Figur 3. Transkripsjon av utvalgte gener i lever og milt ved ulike tidspunkter etter smitte. Gen transkripsjonen ble målt ved RT-qPCR og er presentert som fold økning i ekspresjon (median med interquartile range) i smittet fisk sammenlignet med kontroller. Statistisk signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom smittet og kontroll fisk er indikert med en asterisk.



Figur 4. SDS-PAGE av rekombinant laks CATH1 og CATH2. **B.** Representative western blot av CATH1 og CATH2 i blod fra kontroll (Ctr) og smittet (Inf) fisk. Tidspunkt etter infeksjon og ID er gitt.



Figur 5. **A.** Representative western blot av L-plastin i blod fra kontroll (ctr) og smittet (Inf) fisk **B:** WB av rekombinant laks L-plastin aktin-bindende domene. Tidspunkt etter infeksjon og ID er gitt.

Resultatene fra dette studiet tilfører verdifull informasjon om laksens plasma proteom. I tillegg til proteiner som var differensielt uttrykt i smittet fisk og kontroller, fant vi unikt uttrykte proteiner i blod hos smittet fisk. Interessante biomarkør kandidater fra proteomikk studiet ble videre validert i western blot ved bruk av polyklonale antistoffer. Resultatene har avdekket nye og lovende biomarkører for akutfaserespons og inflammasjon hos Atlantisk laks. Videre arbeid i prosjektet har inkludert utprøving av utvalgte markører på relevant materiale fra felt (se resultater III).

Resultatene ble publisert I DCI i 2022.

*“Identification of novel biomarkers of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a plasma proteomic approach”*

Baojian Sun, Dino van Dissel, Ingrid Mo, Preben Boysen, Hanne Haslene-Hox, Hege Lund
Developmental & Comparative Immunology, Volume 127, 2022

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104268>

II. Validering av antistoffer

Tabell 2 viser en oversikt over rekombinante og/eller syntetiske peptider/proteiner og antistoffer produsert i prosjektet. Flere av kandidat biomarkørene er validerte ved western blot av plasma fra eksperimentelt materiale og feltmateriale. Informasjon om de ulike markørene med relevante resultater er gitt under. Det er videre aktuelt å etablere funksjonelle ELISA alene eller parallelt med kule-baserte multipleksede immunassays.

Biomarkør	Rekombinant protein	Antigen for antistoff produksjon	Antistoff	Funksjon	Anvendelse
Cathelicidin-1	Løselig	Protein	Polyklonalt	Inflammasjon, bakteriell infeksjon	Analyser av blod
Cathelicidin-2	Løselig	Protein	Polyklonalt	Inflammasjon, bakteriell infeksjon	Analyser av blod
		Syntetisk peptid	Monoklonalt		Avventer (Feb 2022)
ISG15	Løselig	Protein	Polyklonalt	Virus infeksjon	Under testing
SAA	Løselig	Protein	Polyklonalt	Inflammasjon, akuttfaserespons	Fungerer ikke som markør i blod
L-plastin			Kommersielt humant polyklonalt	Inflammasjon	Analyser av blod, immunhistokjemi
	Løselig	Protein	Polyklonalt		Avventer (Feb 2022)
	Løselig	Protein	Monoklonalt		Avventer (Feb 2022)
CXCL10-1	Løselig	Peptid	Polyklonalt	Virus infeksjon	Lovende
CXCL10-2	Løselig	Peptid		Virus infeksjon	
sTLR-5	Ikke løselig	Syntetisk peptid	Polyklonalt	Inflammasjon, bakteriell infeksjon	Under testing

Tabell 2. Immunologisk verktøykasse for Salm-Plex prosjektet. Oversikt over produserte proteiner og antistoffer.

Cathelicidiner

Cathelicidiner er antimikrobielle proteiner produsert av mange typer immunceller og epitel celler. To typer cathelicidiner har blitt identifisert i laksefisk (Chang et al., 2006; Scocchi et al., 2009). Vi fant cathelicidiner unikt uttrykt i smittet laks fra AP 1.1 ved shotgun plasma proteomikk analyser, og resultatene har blitt verifisert i WB ved bruk av polyklonale antistoffer (Sun et al., 2022). I tillegg viste RT-qPCR analyser en markant økning av cathelicidiner i både milt og lever hos smittet fisk. Resultatene indikerer at cathelicidin 2 er en bedre inflammasjonsmarkør enn cathelicidin 1 i laks, fordi Cath2 ikke kan

detekteres i blod hos kontrollfisk samtidig som den er sterkt induert i smittet fisk. Se *Resultater I*. Vi produserer nå et monoklonalt antistoff mot laks cathelicidin 2.

ISG15

ISG15 er en av de mest oppregulerte genene under virale infeksjoner ved type 1 IFN aktivering. ISG15 kan konjugere til og modifisere proteiner (ISGylering), og i pattedyr detekteres også fritt ISG15 i blod og urin (Zhang and Zhang, 2011). Vi fant en økt grad av ISG15 konjugert til plasma proteiner i fisk 21 dager etter SAV3 smitte (ikke vist). Det ble parallellt kjørt RT-qPCR med primere for interessante biomarkører på milt fra samme materiale. Resultatene viste en signifikant økning i genekspresjon av ISG15-1 og ISG15-2 etter SAV3 smitte. Antistoff mot laks ISG15 vil testes ut videre på materiale fra virus infisert fisk.

Serum amyloid A (SAA)

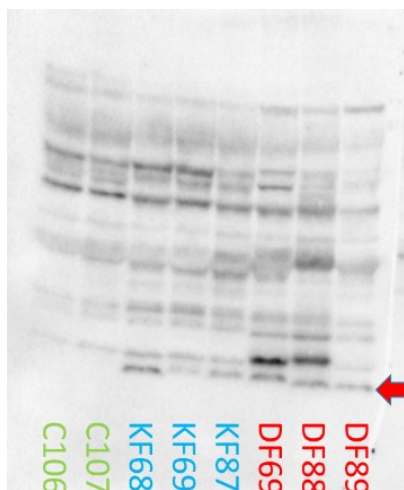
Akutfaseproteinet Serum Amyloid A (SAA, *serum amyloid A-5 gen*) har dokumentert betydning hos laks (Jensen et al., 1997; Lee et al., 2017). Våre analyser indikerer at SAA kun fungerer på transkripsjonsnivå som en akutfasemarkør hos laks. Resultatene viser en signifikant økning (1000x – 9000x fold) i lever hos *A.salmonicida* smittet fisk sammenlignet med kontroller (Sun et al., 2022). På protein nivå er SAA ekspresjonen variabel og SAA kan også detekteres i plasma hos kontrollfisk (ikke vist).

L-plastin

L-plastin er predominant uttrykt i hematopoetiske celler (Delanote et al., 2005) og er sentral i T celle motilitet og aktivering. L-plastin kryssbinder aktin filamenter og bidrar til å øke stabiliteten til aktin-baserte strukturer involvert i migrasjon av immunceller. En ekstracellulær funksjon av L-plastin er ikke beskrevet, men nylig ble L-plastin påvist ved sekvensering av slim fra hud fra karpefisk (Jiang et al., 2019). Våre proteomikk resultater viste at L-plastin var unikt uttrykt i plasma fra *A.salmonicida* smittet laks, med et høyt antall validerte spektre og dette ble validert i western blot ved bruk av et polyklonalt kryssreaktivt anti-humant antistoff (Sun et al., 2022). Vi produserer et polyklonalt og et monoklonalt anti-laks L-plastin antistoff, og utprøvingen av disse vil bli videreført i SALMOCARD prosjektet (se Resultater III).

CXCL10

Kjemokinet CXCL10 er produsert av flere typer immunceller i respons til IFN- γ , og er en sensitiv indikator for virus infeksjoner (Sun et al., 2011). Vi har utført initielle screeninger med et polyklonalt anti-laks CXCL10 antistoff på materiale fra et feltutbrudd av CMS, og resultatene viser et positivt bånd som matcher størrelsen på CXCL10 i virus smittet fisk men ikke i kontroll usmittet fisk (**Figur 6**). Det er også en tilstedeværelse av flere positive bånd med høyere MW i smittet fisk. Arbeidet vil videreføres inn i SALMOCARD prosjektet.



Figur 6. Representative western blot av CXXL10-1 blod fra kontroll usmittet fisk (C) og fisk smittet med PMCV fra et feltutbrudd med CMS (K og D). Rød pil viser et positivt bånd som matcher størrelsen på CXCL10 i virus smittet fisk.

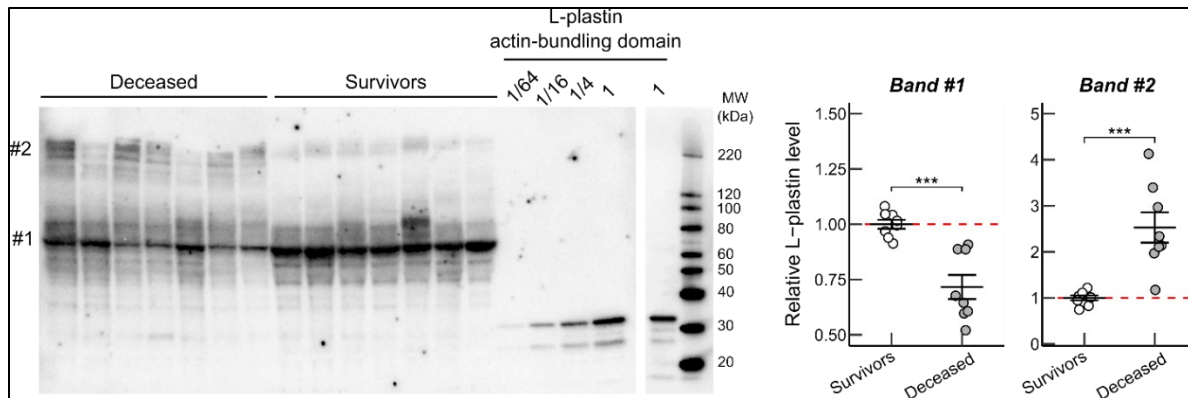
Løselig toll-like reseptor 5 (sTLR5)

Membranbundet TLR5 gjenkjenner bakterielt flagellin, som videre stimulerer til produksjon av pro-inflammatoriske cytokiner. TLR5 forekommer også som et utskilt molekyl i plasma (sTLR5). Genet av den utskilte varianten har blitt identifisert hos flere arter av benfisk, men tilstedeværelsen av sTLR5 har aldri blitt vist i plasma. Våre proteomikk resultater viser at sTLR5 uttrykkes unikt i plasma fra smittet fisk (Sun et al., 2022).

III. Vurdering av L-plastin som biomarkør for hjerteinflamasjon og CMS-relatert dødelighet

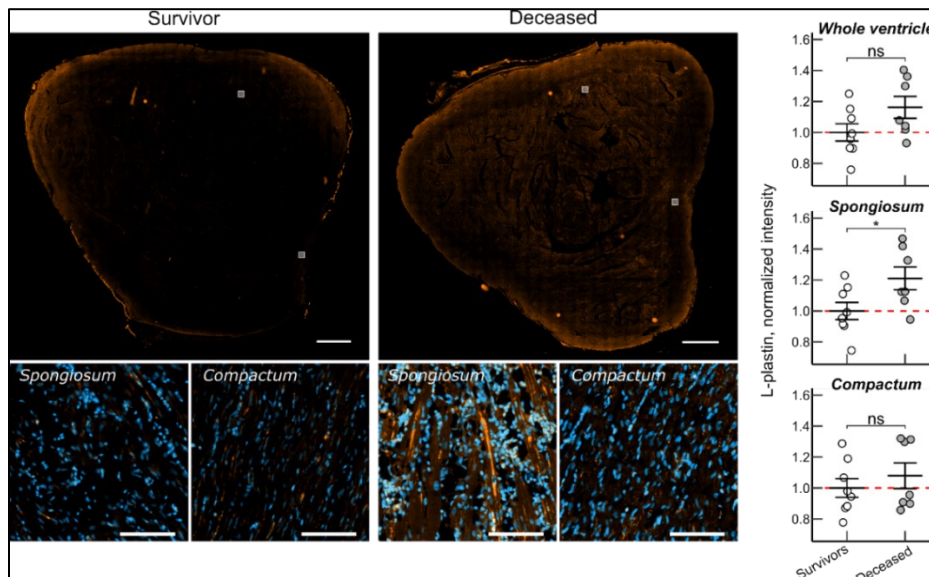
Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en alvorlig infeksjonssykdom hos Atlantisk laks som fører til akutt dødelighet, store velferdsutfordringer og økonomisk tap. Per nå er diagnostiske verktøy begrenset til obduksjon og histopatologi i kombinasjon med PCR deteksjon av piscint myokarditt virus (PMCV). Det finnes ingen behandling mot CMS eller effektive forebyggende verktøy, og det er derfor et stort behov for utvikling av dette. Gjennom samarbeid med SALMOCARD prosjektet (FHF 901672) har vi undersøkt om verktøy utviklet i AP1 kan brukes for å identifisere inflammatoriske biomarkører assosiert med CMS. Kan vi bruke biomarkører for å kunne predikere CMS-relatert dødelighet ved stressende intervensjoner i lokaliteter med bekreftet CMS?

Våre resultater viste en tydelig forskjell i nivåer av L-plastin i plasma hos død-fisk og overlevende etter en mekanisk avlusing ved en lokalitet med bekreftet CMS (**Figur 7**). Western blot analysen viste to bånd; fritt monomerisk L-plastin (Bånd #1) og et eller flere bånd med høy molekylær vekt (MW) (Bånd #2). Det var signifikante forskjeller i styrken på disse båndene mellom CMS overlevende og død-fisk. Død-fisk viste reduserte nivåer av fritt L-plastin samtidig med økte nivåer av L-plastin med høy MW. Bånd av høy MW indikerer modifisert L-plastin og/eller L-plastin i kompleks med andre plasma molekyler.



Figur 7. L-plastin nivå i plasma hos død-fisk og overlevende. Representative western blot av blod plasma prøver fra overlevende og død-fisk etter en mekanisk avlusing ved en lokalitet med bekreftet CMS. Rekombinant protein av det første aktin-bindende domenet av laks L-plastin ble brukt som kontroll (serie fortynt). Kvantifisering av L-plastin band #1 og #2 er vist til høyre ($n_{\text{overlevende}} = 8$, $n_{\text{død-fisk}} = 8$). Squared Pearson's correlation coefficient (r^2) og p-verdi er utregnet for alle individene. Det er gitt tillatelse til bruk av figuren av S. Kavaliauskiene.

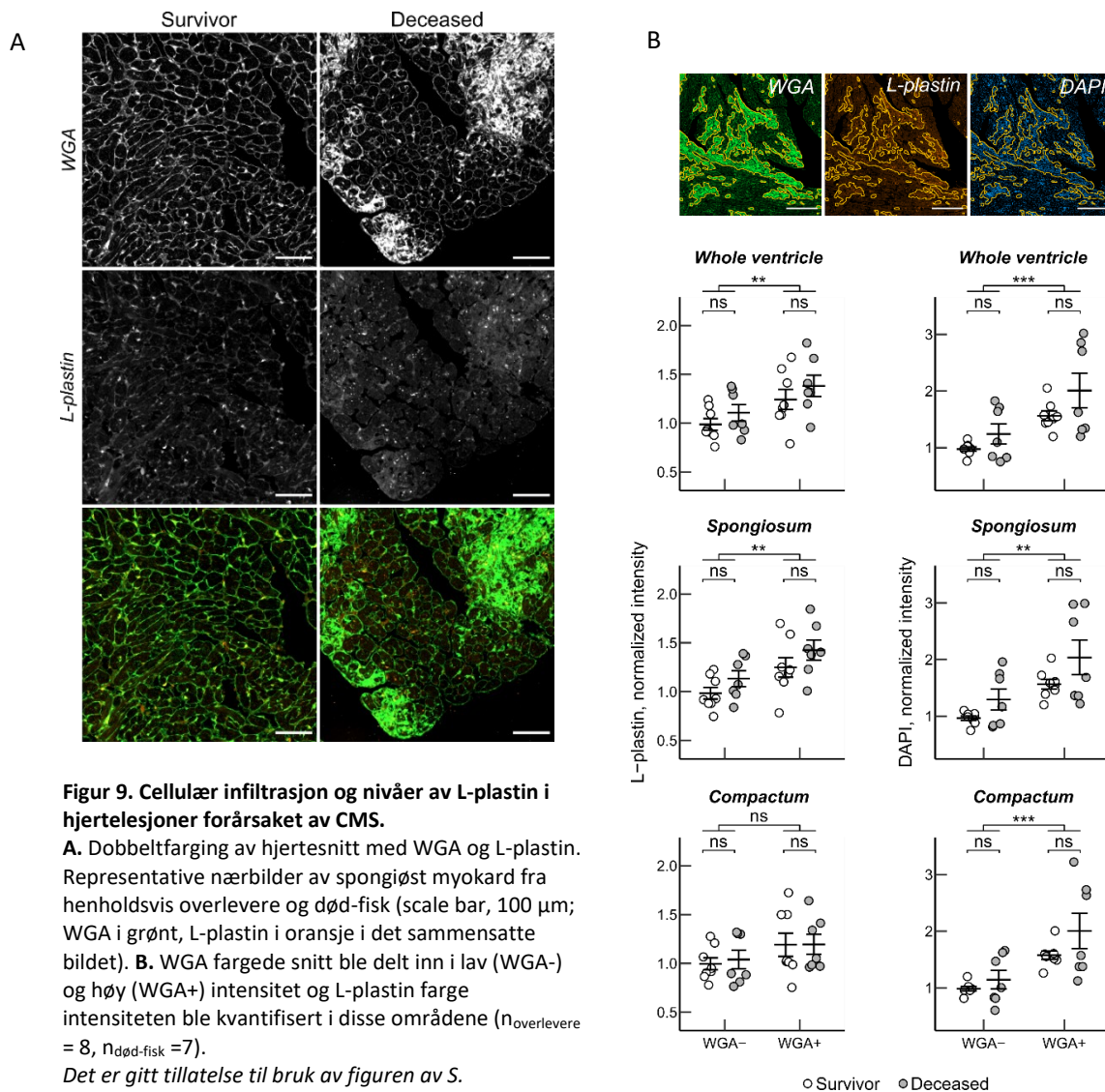
For å undersøke om de økte nivåene av L-plastin komplekser i plasma hos død-fisk kunne assosieres med økte nivåer av L-plastin i infiltrerende immunceller i områder med inflammasjon i hjerte ble det utført immunhistokjemi (IHC) på hjertevev fra de samme individene. Dette ble utført i samarbeid med Michael Frisk og hans forskningsgruppe ved Institutt for eksperimentell medisinsk forskning (IEMR) ved UiO, som også deltar i SALMOCARD prosjektet. Farging av hjerter med anti-L-plastin antistoff viste økt forekomst av L-plastin i hjerter til død-fisk (**Figur 8**). Intensiteten var signifikant høyere i spongjøst myokard hos død-fisk enn hos overlevende. Det var også en økt intensitet i DAPI farging av hjertevevet, som samlokaliserte seg med L-plastin fargingen og indikerer tilstedeværelsen av L-plastin i infiltrerende inflammatoriske celler.



Figur 8. Økte nivåer av L-plastin i spongjøst myokard hos død-fisk. Eksempler på L-plastin farging av hjerteventrikel hos overlevende og død-fisk etter en mekanisk avlusing ved en lokalitet med bekreftet CMS. Nærbilder av spongjøst og kompakt myokard (scale bar, 100 μm ; L-plastin i oransje, DAPI i blå). Gjennomsnittlig L-plastin nivå var økt i hele hjertet pga økte nivåer i spongjøst myokard ($n_{\text{overlevende}} = 8$, $n_{\text{død-fisk}} = 7$).

Det er gitt tillatelse til bruk av figuren av S. Kavaliauskiene

Videre analyser viste en markant økning i intensiteten til vevsfarging med wheat germ agglutinin (WGA), som brukes som en markør for fibrose, i hjertet til død-fisk som hadde alvorlig grad av lesjoner. For å undersøke om L-plastin var assosiert med de observerte hjerte lesjonene, ble derfor snitt av hjerteventrikkel dobbelfarget med antistoffer mot L-plastin og WGA. Resultatene viste en økt fargeintensitet for begge markørene i død-fisk hjerter sammenlignet med overlevende (**Figur 9A**), som var positivt korrelert i hele hjerteventrikkelen (*ikke vist*). Selv om disse resultatene peker mot en assosiasjon av L-plastin og hjertelesjoner, gir det ikke et svar på samlokalisering fordi WGA binder til cellemembranen og L-plastin finnes i cytosolen hos hematopoetiske celler. Vi har derfor sett på intensiteten til L-plastin fargingen i områder med lav (WGA-) og høy (WGA+) WGA intensitet (**Figur 9B**). L-plastin var signifikant høyere uttrykt i WGA+ områder hos både overlevende og død-fisk, som indikerer at leukocytter med innhold av L-plastin akkumulerer i områder med hjertelesjoner. I tillegg viste histopatologiske undersøkelser infiltrasjon av mononukleære celler i de samme områdene (*ikke vist*).



Figur 9. Cellulær infiltrasjon og nivåer av L-plastin i hjertelesjoner forårsaket av CMS.

A. Dobbelstfarging av hjertesnitt med WGA og L-plastin. Representative nærbilder av spongjøst myokard fra henholdsvis overlevende og død-fisk (scale bar, 100 μ m; WGA i grønt, L-plastin i oransje i det sammensatte bildet). **B.** WGA fargede snitt ble delt inn i lav (WGA-) og høy (WGA+) intensitet og L-plastin farge intensiteten ble kvantifisert i disse områdene ($n_{\text{overlevende}} = 8$, $n_{\text{død-fisk}} = 7$).

Det er gitt tillatelse til bruk av figuren av S. Kavaliauskiene

Resultatene fra dette studiet viser en assosiasjon mellom dødelighet under CMS og L-plastin i blod og hjerte. CMS dødeligheten er assosiert med alvorlige lesjoner i spongiøst myokard og infiltrasjon av inflammatoriske mononukleære celler som inneholder L-plastin og trolig frigjør L-plastin til sirkulasjonen. Til sammen indikerer disse resultatene at L-plastin i kompleks kan komme fra infiltrerende immunceller i hjerte hos individer med alvorlig CMS-relatert hjerteinflammasjon. Videre arbeid vil undersøke om vi kan bruke L-plastin som en biomarkør for prediksjon av CMS-relatert dødelighet.

Resultatene er sendt inn til *Aquaculture* (6. januar 2022) i manuskriptet med tittelen:

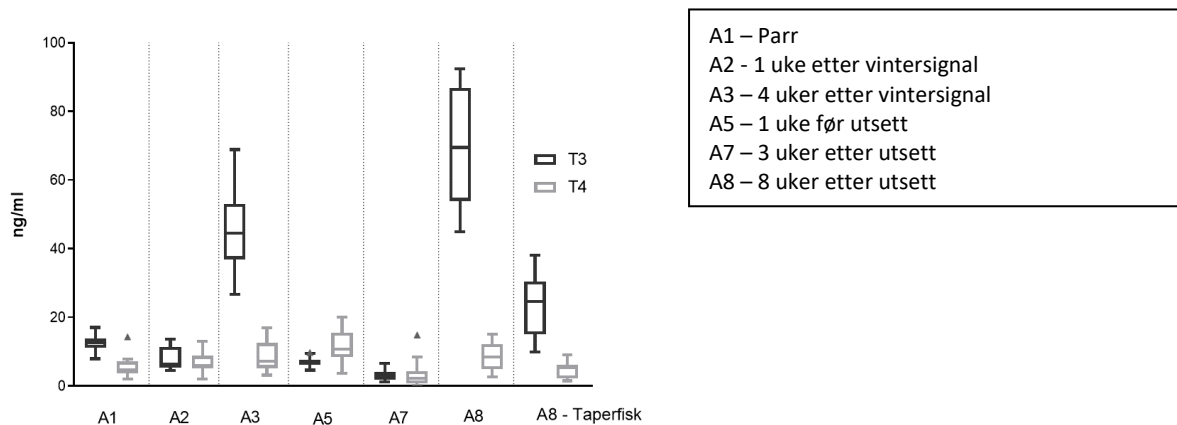
*“L-plastin levels are associated with mortality during cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) (case study)”*

Simona Kavaliauskiene, Victoria Becker, Baojian Sun, Alf S. Dalum, Marco Vindas, Hege Lund, Ida B. Johansen, Michael Frisk

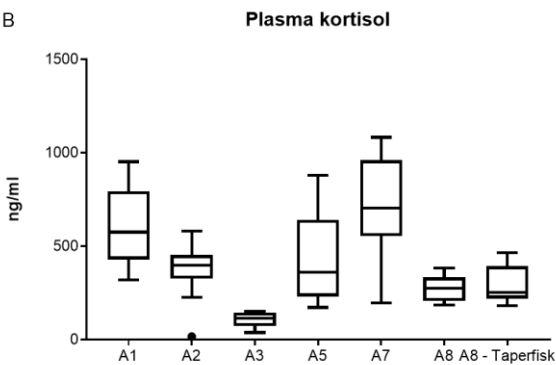
IV. Validering av kule-basert multiplex immunassay metode for samtidig måling av stoffskiftehormonene T4 og T3 og stresshormonet kortisol

Utviklingen av verktøy for overvåkning av oppdrettslaksens helse forutsetter en tverrfaglig tilnærming, spesielt i grensesnittet mellom laksens fysiologi og immunrespons. Gjennom et samarbeid med FHF prosjektet «Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning» (prosjektnr: 901590) har vi etablert en metode for samtidig måling av de to stoffskiftehormonene T4 og T3 samt stresshormonet kortisol i plasma fra laks. Bruk av denne metoden for måling av stoffskiftehormoner har ikke blitt publisert på fisk. Vi har validert metoden på plasmaprøver innsamlet fra et kommersielt gjennomstrømningsanlegg, der laksen har fått 5 uker vintersignal. Prøvene er tatt ved ulike tidspunkter gjennom smoltifiseringen og frem til 8 uker etter utsett i sjø (**Figur 10A**). Våre resultater fra denne kohorten viste en markant økning av plasma T3 4 uker etter oppstart vintersignal, før denne faller igjen mot slutten av ferskvannsperioden. I motsetning er nivåer av T4 høyest i plasma rett før utsett. Mengden plasma T3 øker igjen markant rundt 8 uker etter utsett. Til sammenligning ligger plasma T3 nivåer hos taperfisk fra samme kohort betydelig lavere. Foreløpige resultater indikerer at plasma kortisol nivåer er høyest i parr og etter 8 uker i sjø, mens det er store individuelle variasjoner i plasma kortisol mengde rett før utsett og i ukene etter (**Figur 10B**). Det var ingen signifikant forskjell i plasma kortisol nivåer mellom taperfisk og vanlige kontroller i samme kohort ved 8 uker etter utsett.

A

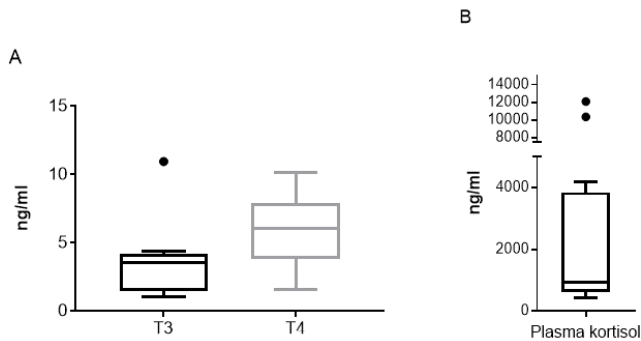


B



Figur 10. Validering av et multipleks immunassay for måling av stoffskiftehormonene T3 og T4 (A) og stresshormonet kortisol (B) på plasmaprøver fra et kommersielt gjennomstrømningsanlegg. Prøvene er tatt ved ulike tidspunkter gjennom smoltifiseringen og frem til 8 uker etter utsett i sjø (n=15 ved hvert tidspunkt).

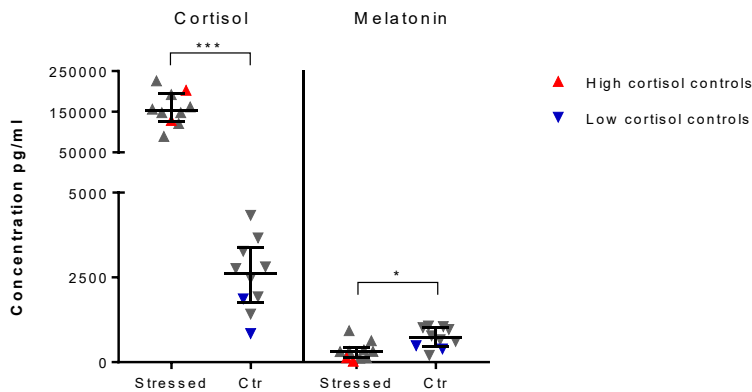
Prøver fra vill laksesmolt ble brukt for å etablere referanseområder for de analyserte hormonene (**Figur 11**). Nivåer av disse hormonene hos villaks lå innenfor lineariteten til assayets standardkurve. Som hos oppdrettslaksen var det stor individuell variasjon i plasma kortisol nivåer (**Figur 11B**). Våre resultater viser at multiplex assayet fungerer veldig bra til måling av T3 og T4 og kortisol samtidig i blod fra laks, der ELISA testet så langt har hatt for lav sensitivitet.



Figur 11. Validering av et multipleks immunassay for måling av stoffskiftehormonene T3 og T4 (A) og stresshormonet kortisol (B) på plasmaprøver fra vill laksesmolt (n=10).

Parallelt har relevante gener i hypofysen blitt analysert ved qPCR. Dette inkluderer *Tsh β a* og *Tsh β b*, som er viktige under smoltifiseringen (ikke vist). Videre arbeid i dette samarbeidet inkluderer analyse av immun – og stress gener i milt og gjeller ved bruk av et nylig etablert assay for vurdering av laksens immunkompetanse ved bruk av en multipleks qPCR på Fluidigm Biomark plattformen, samt enkeltcelle transkriptomikk for å identifisere unike celler i hypofysen som påvirker laksen vekst og utvikling. Vi vil også analysere prøver fra samme tidspunkter fra et RAS-anlegg. Det planlegges en felles publisering som inkluderer dette arbeidet i løpet av 2022.

Vi har også testet ut et kommersielt humant kule-basert multiplex for samtidig måling av kortisol og melatonin. Kitet ble testet ut på prøver fra et akutt-stress eksperiment, med stressede og ustressede kontroll fisk (n=10 per gruppe). Resultater viste at humant Milliplex MAP human circadian/stress assay (Merck) er kryssreaktivt og kan brukes for samtidig måling av kortisol og melatonin hos laks (**Figur 12**). Potensiell videre bruk av assayet i samarbeid med Kjetil Hodne (FHF prosjektnummer 901590) vil vurderes i løpet av 2022.



Figur 12.

Anvendelse av resultater fra prosjektet

➤ Etablering av en immunologisk verktøykasse for analyse av blod biomarkører hos laks.

Relevante biomarkører for akuttfaserespons og inflammasjon hos laksefisk inkluderer Cathelicidin-2, L-plastin, ISG15, CXCL10-1 og sTLR5. Disse vil anvendes videre i ulike prosjekter.

➤ L-plastin er en lovende biomarkør for CMS-relatert dødelighet hos laks.

Arbeidet med L-plastin som predikativ biomarkør for dødelighet i sammenheng med CMS videreføres i FHF prosjekt 901672 «Karakterisering, prediksjon og reduksjon av kardiomyopatisyndrom (CMS) hos atlantisk laks (SALMOCARD)», der Lund er leder av AP3 og Baojian Sun er ansatt som forsker. **Våre resultater så langt viser at L-plastin er en lovende biomarkør for CMS-relatert dødelighet hos laks.** Videre arbeid i SALMOCARD vil undersøke om denne biomarkøren også kan brukes for å predikere hjerteinflammasjon og mulig dødelighet før stressende intervensjoner igangsettes, ved analyser av blodplasma ved bruk av monoklonale antistoffer mot laks L-plastin (i produksjon) på eksperimentelt materiale og materiale fra felt. Denne markøren vil også testes på blod og hjertevev fra fisk diagnostisert med andre tilstander av virus-indusert hjertepatologi (HSMB, PD).

➤ Multiplex assay formåling av T3, T4 og kortisol har en høy fremtidig bruksverdi.

Stoffskiftehormonene T4 og T3 har en avgjørende rolle under initieringen av laksen smoltifisering. Faggruppe immunologi vil i videre samarbeid med FHF-prosjektet «Identifisering av miljømessige signaler som regulerer smoltifisering og modning hos oppdrettslaks: Et funksjonelt grunnlag for å redusere taperfisk og tidlig kjønnsmodning» (FHF 901590) se på interaksjonen mellom T4/T3, vekst, stress og immunsystem. En kule-basert multiplex immunassay metode for samtidig måling av stoffskiftehormonene T4 og T3 og plasma kortisol hos laks er allerede validert på relevant materiale, og i videre arbeid vil vi også vurdere muligheten for analyser av kjønnshormonene testosteron og progesteron i samme assay. Metoden vil brukes på materiale fra overnevnte FHF prosjekt, samt på feltmateriale fra BRC (NMBU KD-finansiert intern stipendiat). Det har vært stor interesse for bruk av dette assayet fra prosjekter på NMBU og Veterinærinstituttet, og det skal blant annet anvendes i andre FHF prosjekter i nærmeste fremtid.

6. HOVEDFUNN

- Nye og relevante biomarkører for inflammasjon hos Atlantisk laks ble identifisert ved plasma proteomikk. Disse inkluderer cathelicidin-2, L-plastin og sTLR5.
- L-plastin i kompleks i blodet kan komme fra infiltrerende immunceller i hjerte hos individer med alvorlig CMS-relatert hjerteinflammasjon.
- L-plastin er en lovende biomarkør for CMS-relatert dødelighet hos laks.
- Et kule-basert multiplex immunassay kan anvendes for samtidig måling av stoffskiftehormonene T3, T4 og stresshormonet kortisol i blod hos laks.

7. REFERANSER

- Bakke, A.F., Rebl, A., Frost, P., Afanasyev, S., Røyset, K.A., Sjøteland, T., Lund, H., Boysen, P., Krasnov, A., 2021. Effect of two constant light regimens on antibody profiles and immune gene expression in Atlantic salmon following vaccination and experimental challenge with salmonid alphavirus. *Fish Shellfish Immunol* 118, 188-196.
- Chang, C.I., Zhang, Y.A., Zou, J., Nie, P., Secombes, C.J., 2006. Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob Agents Chemother* 50, 185-195.
- Delanote, V., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., 2005. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol Sin* 26, 769-779.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C.I., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem* 38, 163-188.
- Jensen, L.E., Hiney, M.P., Shields, D.C., Uhlar, C.M., Lindsay, A.J., Whitehead, A.S., 1997. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *J Immunol* 158, 384-392.
- Jiang, Y., Zhou, S., Chu, W., 2019. The effects of dietary *Bacillus cereus* QSI-1 on skin mucus proteins profile and immune response in Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shellfish Immunol* 89, 319-325.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H., Jensen, L., Whitehead, A.S., Robertsen, B., 2000. Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha or bacterial lipopolysaccharide. *Dev Comp Immunol* 24, 553-563.
- Lee, P.T., Bird, S., Zou, J., Martin, S.A.M., 2017. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish. *Fish Shellfish Immunol* 65, 42-51.
- Lund, H., Bakke, A.F., Sommerset, I., Afanasyev, S., Schriwer, G., Thorisdottir, A., Boysen, P., Krasnov, A., 2019. A time-course study of gene expression and antibody repertoire at early time post vaccination of Atlantic salmon. *Mol Immunol* 106, 99-107.
- Scocchi, M., Pallavicini, A., Salgaro, R., Bociek, K., Gennaro, R., 2009. The salmonid cathelicidins: a gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 152, 376-381.
- Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiol Biochem* 34, 95-101.
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, J., Robertsen, B., 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *J Virol* 85, 9188-9198.
- Sun, B., van Dissel, D., Mo, I., Boysen, P., Haslene-Hox, H., Lund, H., 2022. Identification of novel biomarkers of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a plasma proteomic approach. *Dev Comp Immunol* 127, 104268.
- Zhang, D., Zhang, D.E., 2011. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J Interferon Cytokine Res* 31, 119-130.

8. LEVERANSER

Dato	Leveranse
01.10.2018	Referat fra oppstartsmøte med styringsgruppen
21.12.2018	Statusrapport FHF 2018 (1)
01.04.2019	Referat fra møte med styringsgruppen
30.06.2019	Statusrapport FHF 2019 (1)
01.10.2019	Referat fra møte med styringsgruppen
20.12.2019	Statusrapport FHF 2019 (2)
01.04.2020	Referat fra møte med styringsgruppen
10.06.2020	Presentasjon på programkonferansen HAVBRUK 2020
30.06.2020	Statusrapport 2020(1)
01.10.2020	Referat fra møte med styringsgruppen
28.12.2020	Statusrapport 2020(2)
31.08.2021	Presentasjon på EVIW 2021 (Invited speaker)
23.09.2021	Presentasjon på EAFP 2021
September 2021	Vitenskapelig artikkel akseptert
06.01.2022	Vitenskapelig artikkel submittert
14.01.2022	Avslutningsmøte med Styringsgruppe Salm-Plex
01.02.2022	Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer
01.02.2022	Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer
04.02.2022	Populærvitenskapelig sammendrag

Tabell 3. Detaljert oversikt over leveranser i prosjektet