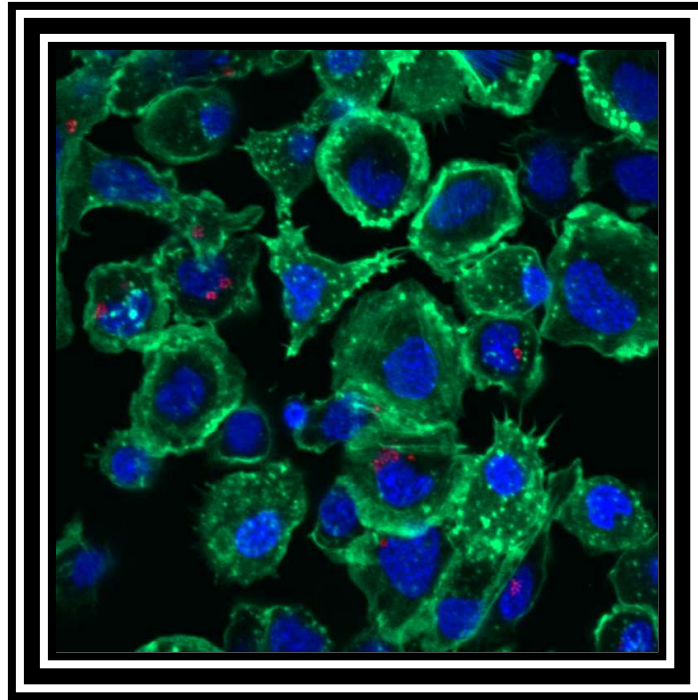


Francisella philomiragia subsp. *noatunensis* i
torskeleukocytter



Av

Anette Furevik

Master i Fiskehelse



Institutt for biologi
Universitetet i Bergen

2009

Forside: Smittede adherente leukocytter merket med phalloidin (grønt) og DAPI (blått). Bakteriene (rødt) er merket med kanin anti-Francisella og Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG.

FORORD

Masteroppgaven inngår i NFR prosjektet *Francisella* sp. infection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) – study of pathogen and host immune cells interaction, og ble utført ved Fiskeimmunologigruppen, Institutt for Biologi. Min masteroppgave i fiskehelse markerer slutten på min studenttilværelse ved Universitetet i Bergen og ikke minst starten på en spennende fremtid!

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til mine veiledere, professor Heidrun I. Wergeland og Dr. Eirin F. Pettersen, for en spennende oppgave og for svært god veiledning, inspirasjon og støtte. Dere er alltid positiv og imøtekommende!

Ingeniør Paul Løvik fortjener en stor takk for assistanse på laboratoriet. Dr. Gyri T. Haugland takkes for all hjelp, gode råd og oppmuntring under arbeidet med masteroppgaven.

Takk til det hyggelige personalet på MIC for all hjelp i forbindelse med mikroskoperingene.

Cathrine Kalgraff takkes for godt samarbeid på lab og mange hyggelige stunder. Ditt positive vesen har vært til stor oppmuntring på travle og tunge dager! Ellen S. Bergh takkes også for å ha bidratt til det gode miljøet på kontoret, og mange hyggelige lunsjpauser! Jeg vil også takke alle de andre medstudentene som gjort studietiden ekstra minnerik!

En stor takk går til min familie og alle mine venner for forståelse og tålmodighet og ikke minst støtte gjennom alle disse årene med studier. Dere betyr så mye for meg alle sammen! Sist men ikke minst vil jeg takke deg John, for all den kjærlighet, tiltro og støtte du har gitt meg gjennom studiene, og for all tålmodighet du har vist i de mest hektiske periodene.

Bergen, juni 2009.

Anette Furevik

Sammendrag

Det er velkjent at en rekke intracellulære bakterier, inkludert flere arter innen slekten *Francisella*, har evne til å oppholde seg og formere seg i immuncellene. I dette studiet ble det utført smitteforsøk *in vitro* der det ved hjelp av spesifikke antistoffer ble vist at *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* oppholder seg i fagocytiske celler av myeloid opphav i tillegg til B-lymfocytter hos Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.). Dette kan være en effektiv strategi ved at bakterien unngår vertens humorale forsvarsmekanismer. Det er også verdt å merke seg at disse vertscellene er sentrale i det medfødte immunforsvarets bekjempelse av patogener. Tilstedeværelse av bakterier i nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter indikerer at disse cellene kan infiseres av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, men forekomsten av smittede nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter var lav. Høy forekomst av intracellulære bakterier i adherente leukocytter tyder på at bakterien har preferanse for andre celletyper. Resultatene indikerte at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* formerer seg intracellulært i adherente leukocytter, men flere studier bør gjøres for å kunne stadfeste dette.

Smitteforsøkene ble utført med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* som var sent i den eksponentiell vekstfase, og en vekstkurve ble utarbeidet for å fastslå tidspunkt for bakteriens ulike vekstfaser. Prosedyre for phalloidinmerking av adherente leukocyttopulasjoner ble utprøvd, og merkingen var et godt egnet hjelpemiddel for å studere adherente leukocytters kvalitet på preparatene for å optimalisere dyrkningsforholdene i brønner. Phalloidin var også godt egnet til å merke leukocyttopulasjoner etter smitteforsøk for å påvise og lokalisere intracellulære bakterier i adherente leukocytter ved fluorescens- og konfokalmikroskopi. Antiserumet mot *Francisella* som ble brukt til å merke bakteriene i forsøkene var spesifikt og reagerte med flere komponenter av antigenet i immunoblott. Ved merking med antiserumet kanin anti-*Francisella* og fluorokrom-konjugert sekundært antistoff kunne bakterien tydelig observeres i preparatene. Påvisning av bakterien intracellulært og kartlegging av hvilke leukocytter som smittes av bakterien kan bidra til økt kunnskap av sykdomsforløpet ved francisellose i tillegg til å fremskaffe nyttig kunnskap for bekjempelse av sykdommen.

Innholdsfortegnelse

1.0 Introduksjon	1
1.1 <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	1
Francisellose	1
Bakteriekarakteristika	4
1.2 Torskens immunforsvar	5
1.3 Profesjonelle fagocytter i teleoster	7
Monocytter/makrofager	8
Nøytrofile granulocytter	9
B-lymfocytter	10
1.4 Fagocytose	11
1.5 Immunrespons mot intracellulære bakterier	14
Immunrespons mot <i>Francisella</i>	17
1.6 Strategier for intracellulær overlevelse i immunceller	19
Livssyklusen til <i>Francisella</i>	22
1.7 Hensikten med studiet	24
2.0 Material & metode	25
2.1 Fisk	25
2.2 Isolering av leukocytter	25
Telling og kvalitetsundersøkelse av isolerte leukocytter	26
2.3 Cytospinpreparater	29
2.4 Dyrkning av adherente leukocytter	29
2.5 Dyrkning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	30
Vekstkurve	30
Dyrkning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> på CHA med 5 % saueblod. 31	
SDS-PAGE	32
Western blott og immunodeteksjon	33
2.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	34
2.8 Fluorescensmerking	35

Phalloidinmerking og optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter	37
Merking av adherente PBL i brønner med kanin anti-TO	37
Merking av leukocytter på cytospinpreparater med kanin anti-TO	38
2.9 <i>In vitro</i> smitte av leukocytter med <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	38
2.10 Intracellulær merking av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i leukocytter.	39
Merking av adherente leukocytter og bakterier.....	39
Lokalisering av intracellulære bakterier ved konfokalmikroskopi	41
2.11 Immunfluorescens-dobbeltmerking	41
Dobbeltmerking av smittede adherente leukocytter og bakterier.....	41
Dobbeltmerking av smittede leukocytter og bakterier på cytospinpreparat.....	43
2.12 Elektronmikroskopi (TEM).....	44
2.13 Dyrkning av bakterier fra smittede leukocytter.....	44
2.14 Bildebehandling	46
3.0 Resultater	47
3.1 Diff-Quick farging av cytospinpreparater	47
3.2 Vekstkurve til <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	48
3.3 Vekst av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> på CHA med 5 % saueblod.....	49
3.4 SDS-PAGE & Western blot	50
3.5 ELISA.....	51
3.6 Merking av adherente leukocytter.....	52
Phalloidinmerking og optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter i brønner	52
Merking av adherente leukocytter med kanin anti-TO	55
Merking av leukocytter på cytospinpreparat med kanin anti-TO	55
3.7 Påvisning av intracellulære bakterier i adherente leukocytter	56
Lokalisering av intracellulære bakterier ved konfokalmikroskopi	59
3.8 Påvisning av intracellulære bakterier i B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter	61
Cytospinpreparater av smittede B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter	62
Konfokalmikroskopi av smittede B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter	65
3.9 Elektronmikroskopi (TEM).....	68
3.10 Dyrkning av bakterier fra smittede adherente leukocytter	69

4.0 Diskusjon	72
Dyrkning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	72
Antiserum mot <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	73
Optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter	74
Merking av adherente leukocytter.....	75
Påvisning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i phalloidinmerkede leukocytter.....	76
Påvisning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i ulike leukocytter ved bruk av MAb	78
<i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i B-lymfocytter.....	78
<i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i nøytrofile granulocytter	80
Forekomst av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> i andre celletyper.....	80
<i>Francisellas</i> vei inn i vertscellene.....	81
Dyrkning av <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> fra smittede adherente leukocytter.....	82
Konklusjon og fremtidsperspektiver:	84
4.0 Referanser	85
6.0 Appendiks	101

1.0 Introduksjon

1.1 *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

Francisellose

Francisella philomiragia subsp. *noatunensis* er en gram-negativ fakultativ intracellulær bakterie som er etiologisk agens for den systemiske sykdommen francisellose hos Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) (Nylund *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006). I 2004 ble sykdommen for første gang påvist fra syk torsk, assosiert med høy dødelighet i oppdrett i Rogaland (Nylund *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006), og har siden da utviklet seg til å bli det mest alvorlige sykdomsproblemet hos Atlantisk torsk i oppdrett. Det ble offisielt registrert 14 utbrudd i 2008, som er tilnærmet en fordobling av antall registrerte utbrudd fra 2007, da 8 utbrudd ble rapportert (Hellberg *et al.*, 2008). Sykdommen opptrer epidemisk i både villfisk og oppdrettsfisk (Mikalsen, 2008; Mikalsen *et al.*, 2009), og fisk som overlever infeksjonen blir trolig bærer av sykdommen (Karlsbakk *et al.*, 2008). Sykdomsutbrudd forekommer langs hele norskekysten, men hovedsakelig er Vestlandet hardest rammet, antakeligvis på grunn av høye sjøtemperaturer i dette området (Ottem *et al.*, 2008).

Infisert fisk kan kjennetegnes ved manglende appetitt, og har ofte mørkfarget pigmentering og redusert svømmeferd (Nylund *et al.*, 2006). Karakteristisk for francisellose er hovedsakelig indre kliniske tegn som fremgår ved senere sykdomsforløp, hvor svulne organer med granulomer er vanlig, men ikke entydig for sykdommen (Nylund *et al.*, 2006; Ottem *et al.*, 2007a; Karlsbakk *et al.*, 2008) (Figur 1). Histologisk er det vist at granulomene inneholder vertsceller som fibroblaster, fagocytter, lymfocytter og få eller ingen bakterier. I terminalt stadium av sykdommen observeres utvikling av nekrose i granulomenes kjerne, som da består av transparent væske (Nylund *et al.*, 2006). Andre kliniske tegn på bakteriesykdommen kan være sår og knuter i huden. Atlantisk torsk er imidlertid kjent for å utvikle granulomer, samt knuter og sår i huden, i respons til flere infeksjose agens. Viktige differensialdiagnoser til francisellose er atypisk furunkulose (Hellberg *et al.*, 2008), mykobakterier og sopp (Mikalsen *et al.*, 2009).

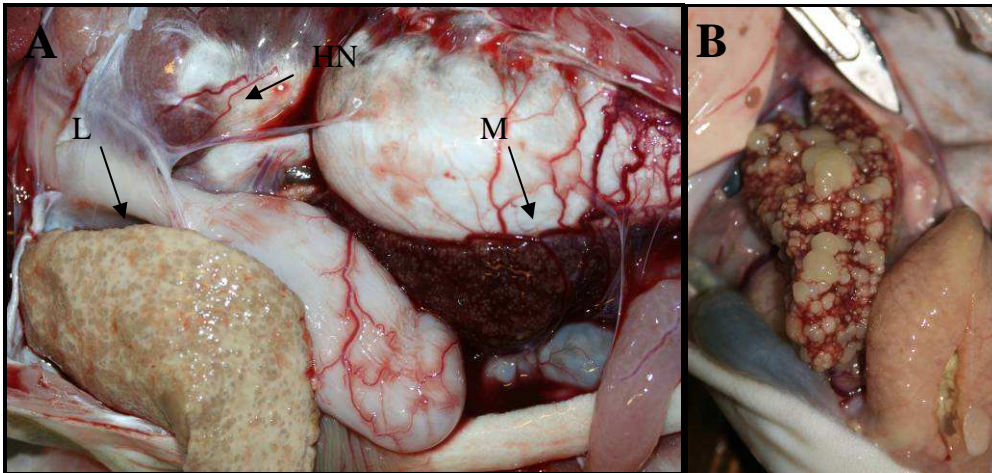
Francisellose er i dag en begrensende faktor for utviklingen av torskeoppdrett ettersom det ikke eksisterer en effektiv vaksine mot sykdommen, og bakterien responderer dessuten dårlig på antibiotikabehandling. Francisellose er en sakte utviklende kronisk sykdom, og høy

dødelighet er uvanlig i anlegg som er infisert med sykdommen (Mikalsen, 2008). Utbrudd av francisellose medfører imidlertid ofte store økonomiske tap, hovedsakelig i form av nedklassifisering på slaktelinjen (Ottem *et al.*, 2007a; Ottem *et al.*, 2008).

Den fiskepatogene *Francisella*-bakterien er vidt geografisk utbredt, og representerer derfor ikke bare en trussel for norsk torskoppdrett. I flere land er det rapportert om dødelighet som følge av infeksjon med *Piscirickettsia*-lignende organismer (PLO) for flere ikke-beslektede fiskearter, både i ferskvann og saltvann. Flere av disse infeksjonene har i ettertid blitt bekreftet å være forårsaket av *Francisella* spp. (Mikalsen, 2008) (Se tabell 1). Tilsynelatende er *Francisella* sp. som er isolert fra Atlantisk torsk, noe ulik *Francisella* sp. som forårsaker sykdom i oppdrett i Asia, men alle er vist å tilhøre *F. philomiragia* (Mikalsen, 2008; Ottem *et al.*, 2009). *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har ikke vært isolert fra andre arter enn Atlantisk torsk og Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) (Mikalsen, 2008).

Tabell 1: Geografisk utbredelse av francisellose.

Vertsart	Geografisk område	Saltvann/ferskvann	Referanse
Atlantisk torsk (<i>Gadus morhua</i> L.)	Norge	SV	Nylund <i>et al.</i> , 2006; Olsen <i>et al.</i> , 2006
Tilapia (<i>Oreochromis spp.</i>)	Asia, Amerika	FV	Hsieh <i>et al.</i> , 2006; Mauel <i>et al.</i> , 2007
Three-line grunt (<i>Parapristipoma trilineatum</i>)	Japan	SV	Fukuda <i>et al.</i> , 2002
Hybrid striped bass (<i>Morone saxatilis</i>)	Amerika	FV	Ostland <i>et al.</i> , 2006
Grouper (<i>Epinephelus melanostigma</i>)	Taiwan	FV	Chen <i>et al.</i> , 2000
Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.)	Chile	FV	Birkbeck <i>et al.</i> , 2007



Figur 1: Makroskopiske kjennetegn på francisellose i indre organer hos Atlantisk torsk. **A)** Tydelige granulomer i lever (L) og milt (M). Man kan også skimte granulomer i hodenyren (HN). **B)** Sterkt affisert milt.

Foto: Ø. Brevik.

Utviklingen av vaksine mot francisellose vil være viktig i bekjempelsen av sykdommen. Ut fra erfaringer med sykdommene bakteriell nyresyke (BKD) og rickettsiose hos Atlantisk laks, er det vanskelig å utvikle en fullgod vaksine mot fiske sykdommer forårsaket av intracellulære bakterier. Fremdeles er kunnskapen mangelfull når det gjelder immunsystemet til Atlantisk torsk, noe som inntil videre setter en begrensning for vaksineutviklingen. En vaksine mot francisellose kan derfor ikke forventes å være klar med det første.

Bakteriekarakteristika

Tabell 2: Taksonomi.

Rike	Bacteria
Fylum	Proteobacteria
Klasse	Gammaproteobacteria
Orden	Thiotrichales
Familie	<i>Francisellaceae</i>
Slekt	<i>Francisella</i>
Art	<i>F. tularensis</i> <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> <i>F. novicida</i> <i>F. philomiragia</i> <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>philomiragia</i> <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> <i>F. piscicida</i>

I tidligere publiserte artikler har bakterien status som både egen art og som underart av *Francisella philomiragia*, og har derfor to navn; henholdsvis *Francisella piscicida* (Ottem *et al.*, 2007a) og *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* (Mikalsen *et al.*, 2007). Begge navnene refererer imidlertid til samme bakterie (Hellberg *et al.*, 2008). Ottem *et al.*, (2009) har nylig publisert en artikkel hvor det fremgår at *F. piscicida* og *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er identiske, og *Francisella noatunensis* er foreslått som navn på bakterien. Tabell 2 viser taksonomi av *Francisella* slik den fremstår i dag. I forbindelse med denne masteroppgaven vil navnet *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* bli benyttet.

F. tularensis forårsaker sykdommen tularemia (harepest) hos både dyr og mennesker (Sjøstedt, 2006). På bakgrunn av sykdommens zoonotiske karakter og alvorlighetsgrad, er denne arten best studert innen slekten *Francisella*. Mye av det som er antatt for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er derfor basert på det som er kjent om *F. tularensis* (Nano & Elkins, 2006), og inntil nylig har studier av *F. tularensis* vært kilde for mye av kunnskapen vi har om torskesykdommen (Hellberg *et al.*, 2008). Medlemmer av slekten *Francisella* er rapportert å infisere makrofager, men kan tilsynelatende også oppholde seg i en rekke andre celletyper som endotelceller, fibroblaster, hepatocytter og muskelceller (Keim *et al.*, 2007).

Intracellulær replikasjon er også beskrevet for flere *Francisella*-arter i pattedyr både *in vitro* og *in vivo* (Allen, 2003). På bakgrunn av histopatologiske undersøkelser rapporterte Nylund *et al.*, (2006) at målcellene for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* syntes å være fagocytter og celler med fagocytiske funksjoner (retikuloendoteliale system, RES).

Karakteristika av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er velkjent og er beskrevet i flere publikasjoner (Nylund *et al.*, 2006, Olsen *et al.*, 2006, Ottem *et al.*, 2007a) som mikroaerofil, aerob, ikke-motil, svakt katalase-positiv, oksidase-negativ og indole-positiv. Bakterien kan ikke hydrolysere gelatin og produserer H₂S i cystein-supplementert agar. Tilsetning av aminosyren cystein i agar er vist å øke veksten av bakterien. *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* vokser ved 6-29 °C *in vitro*, men 20-22 °C er optimal temperatur for dyrkning av bakterien. Morfologisk kjennetegnes *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ved at den er svært polymorf, og rangerer fra coccoide til korte staver. Størrelsen varierer fra 0,5 µm -1,5 µm i diameter.

1.2 Torskens immunforsvar

Teleoster representerer den tidligste gruppen av vertebrater hvor immunsystemet består av både uspesifikt og spesifikt forsvar, selv om det sistnevnte trolig er mindre utviklet i forhold til høyere vertebrater (Warr, 1995). Det er også vist at teleoster, inkludert Atlantisk torsk, har leukocyttopulasjoner som ligner dem som er funnet for høyere vertebrater, med tilstedeværelse av granulocytter, lymfocytter og mononukleære fagocytter (Rowley *et al.*, 1988). I forhold til Atlantisk laks og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er kunnskapen mangelfull med hensyn på immunforsvaret hos Atlantisk torsk. Interessen for torskens immunsystem er imidlertid økende og det drives i dag aktiv forskning på dette området.

Antistoffer kalles også immunoglobulin (Ig), og i teleoster produseres hovedsakelig klasse IgM av typen tetramer (Pilström *et al.*, 2005). Det er vist at Ig hos Atlantisk torsk er ulik Ig hos Atlantisk laks både i organisering og struktur av IgM samt i organisering og repertoar av Ig gener (Magnadóttir, 1998). Det er imidlertid vanskelig å relatere disse observasjonene til biologiske funksjoner (Solem & Stenvik, 2006). IgD er også karakterisert i teleoster, og er også funnet å ha noe ulik struktur i Atlantisk torsk sammenlignet med IgD fra andre undersøkte fiskearter (Stenvik & Jørgensen, 2000). Atlantisk torsk har et høyt innhold av naturlige eller uspesifikke antistoffer i serum, og konsentrasjonen av IgM i plasma er vist å

være omtrent ti ganger så høy sammenlignet med laks (Israelsson *et al.*, 1991). Naturlige antistoffer blir produsert i fravær av antigenstimulering, og er velkjent også i fisk (Magnadottir, 2006). Selv om betydningen av disse er uklar (Whyte, 2007), er det foreslått at de naturlige antistoffene medvirker i torskens førstelinjeforsvar mot virus og bakterier (Gonzalez *et al.*, 1988; Sinyakov *et al.*, 2002; Magnadottir, 2006), og gir trolig øyeblikkelig og bred beskyttelse mot patogener (Boes, 2000).

Et annet aspekt av immunforsvaret hos Atlantisk torsk er at den sammenlignet med andre kjente arter i oppdrett viser fraværende eller lav økning i nivå av spesifikke antistoffer etter en antigenstimulering (Magnadottir *et al.*, 2001; Schrøder *et al.*, 1992; Espelid *et al.*, 1991; Rønneseth *et al.*, 2007). Dette kan indikere at andre immunmekanismer er mer aktuelle i denne arten (Rønneseth *et al.*, 2007). De fleste undersøkte fiskearter produserer spesifikk antistoffrespons som følge av infeksjon eller immunisering (Magnadottir *et al.*, 2001). Flere forsøk er utført for å indusere humoral antistoffrespons i torsk ved injeksjon eller immersjonsvaksinering. Blant annet har injeksjonsforsøk med drepte *Vibrio anguillarum* og *Vibrio salmonicida* vist fravær i økning av spesifikke antistoffer på tross av at torsken blir beskyttet mot infeksjon (Schrøder *et al.*, 1992; Espelid *et al.*, 1991). I andre forsøk er det imidlertid rapportert om økning i antistoffrespons ved eksponering for ulike patogener. Det er vist at torsk kan produsere kraftigere spesifikk antistoffrespons etter immunisering med *Aeromonas salmonicida* sammenlignet med *V. anguillarum* (Lund *et al.*, 2006). Resultatene indikerte dessuten at antistoffene i torsk var i stand til å skille mellom LPS antigener fra atypiske og typiske stammer av *A. salmonicida*. Schrøder *et al.*, (2008) har nylig publisert en artikkel som beskriver signifikante responser i Atlantisk torsk etter immunisering med *V. anguillarum*, *A. salmonicida* og *Francisella* sp. Ved immunisering med de to førstnevnte bakteriene varierte den individuelle spesifikke responsen fra fraværende til høy respons, mens alle individene viste høy spesifikk respons ved immunisering med *Francisella* sp. De varierende resultatene med hensyn på torskens antistoffrespons kan trolig skyldes forskjeller i fiskens alder, vekt, opphav, konsentrasjon og type antigen samt hvilken adjuvant som brukes ved immunisering (Schrøder *et al.*, 2008; Magnadottir *et al.*, 1999). Magnadottir *et al.*, (1999) spekulerte i om de høye nivået av naturlige antistoffer i torsk kompenserte for den lave spesifikke antistoffresponsen.

Rønneseth *et al.*, (2007) har ved hjelp av flow cytometri analysert prosentvis mengde leukocytter i hodenyre (HNL), blod (PBL) og milt (ML) hos Atlantisk torsk. Resultatene viste en høy andel nøytrofile granulocytter i PBL, hvor prosentvis andel ble anslått å være 84 %, i forhold til 48 % i HNL og 18 % i ML. Andel nøytrofile granulocytter i PBL var dessuten over

dobbel så høy sammenlignet med nøytrofile granulocytter i PBL hos laks. Det høyeste nivået av B-lymfocytter ble påvist i ML, der 73 % av leukocytterne var Ig-positive. HNL ble funnet å inneholde 30 % B-lymfocytter, og det laveste nivået av B-lymfocytter ble observert for PBL, med kun 13 %. Uavhengig av dette ble det i et annet forsøk vist at ved stimulering med kjente immunostimulanter var responsen av torskemakrofager svakere sammenlignet med makrofager fra pattedyr og andre fiskearter, som Atlantisk laks (Steiro *et al.*, 1998). På bakgrunn av dette, samt påvisningen av den store mengde nøytrofile granulocytter i torskeblod, er det indikasjoner på at nøytrofile granulocytter spiller en sentral rolle ved fagocytose. Det er videre vist at fagocytter i Atlantisk torsk aktiveres hurtigere og har høyere ”respiratory burst” sammenlignet med Atlantisk laks og regnbueørret (Nikoskelainen *et al.*, 2006), som indikerer at fagocytose er en svært viktig faktor i immunforsvaret hos Atlantisk torsk.

1.3 Profesjonelle fagocytter i teleoster

Det medfødte immunforsvar karakteriseres som det såkalte førstelinjeforsvaret mot invaderende organismer. Sammenlignet med høyere vertebrater utgjør det medfødte immunsystemet i teleoster en viktigere rolle for bekjempelsen av patogener. Grunnen til dette er blant annet at teleoster tilhører gruppen av poikiloterme vertebrater der det spesifikke forsvaret er mindre utviklet sammenlignet med høyerestående vertebrater, og blant annet er syntesen av antistoffer begrenset ved lave temperaturer (Ellis, 2001; Gomez & Balcazar, 2008).

Leukocytterne som er involvert i det medfødte forsvar i fisk ligner i stor grad det man finner hos pattedyr (Plouffe *et al.*, 2005). Selv om de fleste celletyper har fagocytisk kapasitet, er det vanlig å skille mellom to grupper fagocytter, henholdsvis profesjonelle og uprofesjonelle fagocytter (Li *et al.*, 2006; Frankenberg *et al.*, 2008). Uprofesjonelle fagocytter omfatter blant annet celletyper som fibroblaster, epitelceller og eosinofile granulocytter. Disse cellene har mindre kapasitet til å ta opp partikler ettersom de uttrykker et begrenset antall reseptorer på celleoverflaten (Rabinovitch, 1995). Monocytter, makrofager, nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter er spesialiserte celler med høy fagocytisk kapasitet som refereres til som profesjonelle fagocytter i fisk (Rabinovitch, 1995; Frankenberg *et al.*, 2008). Den fundamentale rollen til fagocytterne er å begrense vekst og spredning av de invaderende organismene (Neumann *et al.*, 2001). De fagocytiske cellene innehar verken spesifisitet eller

hukommelse (Esteban & Meseguer), og fungerer best sammen med proteiner og celler fra det spesifikke forsvar (Beutler, 2004). Fagocytose av antigener initierer det medfødte forsvar som videre dirigerer det ervervede forsvar ved at nedbrutte rester av antigenet presenteres av fagocytene til andre typer immunceller. Dette induserer en systemisk immunrespons (Aderem & Underhill, 1999; Frankenberg *et al.*, 2008). På bakgrunn av dette kaller man gjerne de profesjonelle fagocytene for antigen-presenterende celler (APC) (Cuesta *et al.*, 2006).

De fagocytiske cellene dannes hovedsakelig fra stamceller i hodenyren, som er hoved-hematopoietiske organ i teleoster. Etter hvert som cellene modnes vil de spres til ulike områder i fisken, og er oftest til stede i hodenyre, blod, lever, milt, gjeller, atrium og i ”gut-associated” lymfoid vev (GALT). Makrofagene spiller størst rolle i vev hvor det finnes rikelig av disse cellene, mens nøytrofile granulocytter utgjør en vesentlig rolle i blod (Esteban & Meseguer, 2006). At fagocytose trolig er en svært viktig mekanisme i immunforsvaret hos Atlantisk torsk er blant annet verifisert ved at adherente torskeceller fagocytterer latekskuler (Kolstø, 2008).

Monocytt/makrofager

Makrofagene er store (15-18 μm) mononukleære celler, assosiert med størst fagocytisk kapasitet i fisk (Rowley *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 2001; Beutler, 2004; Secombes, 1996; Esteban & Meseguer, 2006). Disse fagocytene finnes som monocytter i blod og differensierer til makrofager i vev (Secombes, 1996; Bogen & Munthe, 2002; Beutler, 2004). Selv om både monocytter og makrofager er fagocytterende, har hovedsakelig makrofagene den viktigste beskyttende funksjonen ettersom de fleste infeksjoner forekommer i vev (Murphy *et al.*, 2008). Neumann *et al.*, (2001) beskriver makrofagene som en svært heterogen cellepopulasjon hvor flere sub-populasjoner er tilpasset ulike deler av kroppen og har unike karakteristikk og funksjoner. Tilstedeværelse av makrofager i gjeller, hud, epitel og vev, tyder på at de utgjør en viktig rolle i bekjempelsen av invaderende mikroorganismer i teleoster (Dalmo *et al.*, 1997; Press & Evensen, 1999). Makrofagenes funksjonelle egenskaper omfatter blant annet kjemotaksi, fagocytose, drap og nedbrytning, samt presentasjon av antigener (Secombes & Fletcher, 1992; Secombes, 1996). En rekke stimulanter kan aktivere makrofagene og gjøre dem mer potent i elimineringen av invaderende mikrober (Secombes, 1996; Sahoo, 2006). Det er også vist at makrofager har lang levetid i pattedyr (Murphy *et al.*, 2008).

Makrofagene har flere reseptorer til stede på celleoverflaten som kan detektere mikrobielle produkter (Secombes, 1996; Sahoo, 2006). Makrofagene er dessuten viktig for å fjerne celleavfall og apoptotiske celler. For å fagocyttere en apoptotisk celle må reseptorer på makrofagenes membran gjenkjenne en ligand på de apoptotiske cellene som ikke finnes på friske celler (Aderem & Underhill, 1999). Det er foreslått at ved fagocytose av apoptotiske nøytrofiler vil makrofagene kunne erverve myeloperoksidase og nyttiggjøre seg denne. Fagocytose av apoptotiske nøytrofile granulocytter og deres granuler kan derfor være en måte å overføre mikrobiell aktivitet fra de nøytrofile granulocyttene til makrofagene. På denne måten kan den baktericide aktiviteten øke (Afonso *et al.*, 1998; Ellis, 1999). I følge Laskay *et al.*, (2008) vil aktiviteten av makrofagene generelt ikke øke ved opptak av apoptotiske nøytrofile granulocytter.

Nøytrofile granulocytter

Nøytrofile granulocytter er viktige fagocytter i fiskens førstelinjeforsvar og har kjemotaktisk og baktericidal aktivitet (Esteban & Meseguer, 2006). De nøytrofile granulocyttene skiller seg fra makrofagene ved at de er små, 10-12 μm (Ellis, 1977), og har kromatin-tett og ofte lappedelt kjerne i tillegg til omliggende granuler i cytoplasma (Esteban & Meseguer, 2006; Kindt *et al.*, 2007; Laskay *et al.*, 2008). På bakgrunn av cellekjernens morfologi kaller man gjerne de nøytrofile granulocyttene for polymorfonukleære leukocytter (PMNL) (Murphy *et al.*, 2008). Cellekjernens morfologi kan imidlertid variere mellom ulike fiskearter (Zinkl *et al.*, 1991). I pattedyr er det vist at sammenlignet med makrofagene har de nøytrofile granulocyttene kort levetid (Rabinovitch, 1995; Beutler, 2004; Murphy *et al.*, 2008).

De nøytrofile granulocyttene er de første cellene som rekrutteres fra sirkulasjon og lymfoid vev til infeksjonsstedet. Et forsøk utført av Matsuyama *et al.*, (1999), viste at rekrutteringen av nøytrofile granulocytter i karpe (*Cyprinus carpio*) og havkaruss (*Pagrus major*) var delt i to faser hvor nøytrofile granulocytter med høyest migrasjonsevne var de første cellene som kom frem til infeksjonsstedet for å begrense spredningen av patogenene. I en noe senere fase migrerte nøytrofile granulocytter med størst kapasitet for fagocytose og drap til infeksjonsstedet.

Nøytrofile granulocytter har overflatereseptorer som komplementreseptorer og Fc-reseptorer (Rabinovitch, 1995; Secombes, 1996; Esteban & Meseguer, 2006). Selv om fagocytose foregår på samme måte som i makrofagene, har de nøytrofile granulocyttene

baktericidale substanser og lytiske enzymer i primære (azurofile) og sekundære (spesifikke) granuler i cytoplasma istedenfor i lysosomer (Neumann *et al.*, 2001; Segal, 2005; Kindt *et al.*, 2007; Laskay *et al.*, 2008). En viktig bestanddel i de primære granulene er myeloperoksidase (MPO), som er sterkt baktericidal (Hampton *et al.*, 1998), men sammenlignet med makrofagene er den baktericidale aktiviteten ofte svakere for nøytrofile granulocytter, men siden det er et større antall av disse cellene vil de to celletypene trolig bidra like mye til eliminering av patogener (Secombes, 1996).

B-lymfocytter

Det er kjent at teleoster har B-lymfocytter som på mange områder er lik dem man finner i pattedyr (Miller *et al.*, 1998). B-lymfocytterne utvikles fra stamceller som dannes i hodenyren, og er små celler (5-8 μm) som har en stor kjerne i forhold til cytoplasma (Rowley *et al.*, 1988). Det var lenge antatt at disse cellene ikke hadde evne til fagocytose i teleoster, da B-lymfocytter fra pattedyr mangler egenskapen til å ta opp store partikler ved fagocytose. I 2006 rapporterte Li *et al.*, at B-lymfocytter i regnbueørret og andre tidlige vertebrater hadde høy fagocytisk aktivitet, med påfølgende fagolysosomdannelse og intracellulært drap. B-lymfocytterne i teleoster kan derfor betegnes som profesjonelle fagocytter. Selv om B-lymfocytterne karakteriseres som profesjonelle fagocytter ble det i fagocytoseforsøk med kuler vist at disse cellene fagocytterte et lavere antall kuler sammenlignet med monocytter og granulocytter. Ved opsonisering med komplement eller IgM økte den fagocytiske evnen til B-lymfocytterne. Det synes derfor som at B-lymfocytterne har en viktig rolle i bekjempelsen av mikrober (Li *et al.*, 2006). B-lymfocyttenes kapasitet til å delta i de medfødte immunfunksjonene hos fisk, som i mennesker er begrenset til andre profesjonelle fagocytter, reflekterer trolig det medfødte immunsystemets fremtredende rolle i teleoster, der det spesifikke immunsystemet er forholdsvis ufullstendig sammenlignet med pattedyr (Solem & Stenvik, 2006).

På samme måte som i pattedyr er B-lymfocytterne også involvert i den spesifikke immunresponsen hos teleoster. Spesifikke reseptorer er samlet i en spesiell posisjon på B-lymfocyttenes overflate, som gjør at cellene kan respondere på ett spesifikt epitop på antigener. Disse membranreseptorene kalles antistoff eller immunoglobuliner (Ig), og i teleoster finnes hovedsakelig IgM (Pilström & Bengtén, 1996; Swain, 2006; Kindt *et al.*, 2007). Når en naiv B-lymfocytt møter på et antigen for første gang vil bindingen mellom det membranbundne antistoffet og antigenet medføre hurtig celledeling hvor cellene

differensieres til plasmaceller og/eller hukommelsesceller (Kindt *et al.*, 2007). Plasmacellene er hovedsakelig konsentrert i hodenyre og milt, men distribueres også til andre deler av organismen (Swain, 2006). Plasmacellene skiller ut rikelig med antistoffer i løpet av den korte levetiden, men i motsetning til B-lymfocytene mangler disse membranbundet antistoff. Hukommelsescellene har imidlertid lenger levetid enn de naive cellene, og har antistoff bundet til membranen (Kindt *et al.*, 2007).

1.4 Fagocytose

Fagocytose kan beskrives som en form for endocytose hvor relativt store partikler (over 0,5 μm) som mikroorganismer, celleavfall og døde vertsceller blir tatt opp og brutt ned i endocytiske vakuoler (Rabinovitch, 1995; Secombes, 1996; Allen & Aderem, 1996; Aderem & Underhill, 1999; Goldsby *et al.*, 2003). Prosessen av fagocytose er vist for profesjonelle fagocytter som monocytter/makrofager, nøytrofile granulocytter (Secombes, 1996; Neumann *et al.*, 2001) og B-celler i fisk (Li *et al.*, 2006). Forsvarsmekanismen ved fagocytose ble først beskrevet av Metchnikoff så tidlig som i 1882 (Metchnikoff, 1968).

Fagocytene tiltrekkes den invaderende mikroben eller den infiserte vertscellen ved kjemotaksi, som kan beskrives som direkte bevegelse mot infeksjonsstedet som følge av utskilling av biologiske aktive molekyler fra den invaderende mikroben eller fra vertscellen (Neumann *et al.*, 2001; Rabinovitch, 1995; Esteban & Meseguer, 2006). Ettersom granulocytene er svært mobile vil nøytrofile granulocytter dominere i den første perioden ved en infeksjon, etterfulgt av et økt antall makrofager (Matsuyama *et al.*, 1999; Allen, 2003; Goldsby *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2006).

Fagocytosen startes ved adheranse mellom mikroorganismen og den fagocytiske cellen, som involverer hydrofobiske interaksjoner eller sukker/lektin interaksjoner (Secombes, 1996; Neumann *et al.*, 2001; Ellis, 2006). Detektering av mikroorganismene fører til sekresjon av pro-inflammatoriske cytokiner og aktivering av antimikrobielle substanser, modning av fagocytter, fagocytose og nedbrytning av antigener (Hornef *et al.*, 2002). Gjennom pattern recognition receptors (PRR) på celleoverflaten har fagocytene utviklet seg slik at de kan gjenkjenne konserverte ligander på patogenene, såkalte pathogen associated molecular patterns (PAMP), som ikke er tilstede i høyere eukaryoter (Medzhitov & Janeway, 1997; Aderem & Underhill, 1999; Aderem, 2003; Stuart & Ezekowitz, 2005; Akira *et al.*, 2006). PAMP inkluderer immunostimulanter som lipopolysakkarid (LPS) fra gram-negative

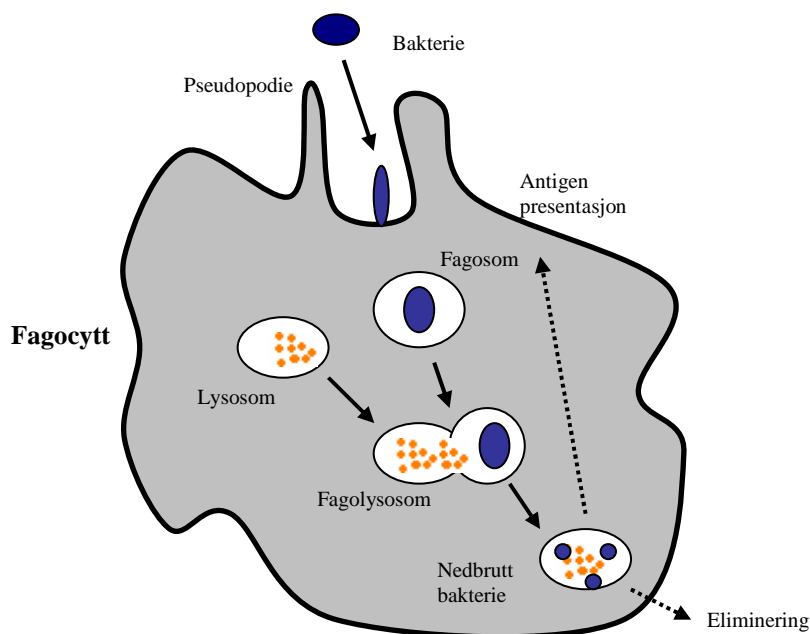
bakterier, peptidoglykan, bakterie-flagellin og DNA. Mønstrene er felles for de fleste typer patogene mikroorganismer (Ellis, 2001; Janeway & Medzhitov, 2002; Akira *et al.*, 2006; Magnadottir, 2006) og er dessuten evolusjonært stabile ettersom de er viktige for mikroorganismenes overlevelse. PRR er i tillegg alltid til stede i verten og kan gjenkjenne patogener uavhengig av hvilket livsstadie patogenene befinner seg i (Akira *et al.*, 2006). Toll-like reseptorer (TLR) er en gruppe membranreseptorer som karakteriseres som hoved-PRR på fagocytterne, og er også beskrevet for teleoster (Hornef *et al.*, 2002; Iliev *et al.*, 2005; Magnadottir, 2006; Whyte, 2007). Prosessen hvor PRR binder til PAMP er uspesifikk og refereres til som opsonin-uavhengig fagocytose (Ofek *et al.*, 1995).

Gjenkjenning av patogenene kan også være opsonin-avhengig, som er vist å indusere en mer effektiv fagocytose av antigener (Ofek *et al.*, 1995; Aderem & Underhill., 1999; Sahoo, 2006; Esteban & Meseguer, 2006; Kindt *et al.*, 2007). Opsonisering av bakteriene hvor opsoniner som komplement eller immunoglobulin festes til mikobenes overflate, øker adheransen mellom partikkelen og komplement- eller antistoffreseptorene (Fc-reseptor) på APC. Dette innebærer en mer spesifikk mekanisme av fagocytose. Hos både pattedyr og fisk er det vist at C3-komponenten av komplementsystemet er den mest aktive promotoren ved fagocytose (Ellis, 1999; Goldsby *et al.*, 2003; Sahoo, 2006).

Som følge av adheranse mellom en fagocytisk celle og antigen vil opptak av antigen vanligvis foregå ved at den fagocytterende cellen folder ut en eller to pseudopodier som omslutter partikkelen (Secombes, 1996). Mekanismen for opptak er svært heterogen, og er relatert til reseptortype, partikkelen som skal fagocytteres, samt reorganisering og polymerisering av aktin (Aderem, 2003). Like etter opptak vil fagosomet bevege seg nedover i cellen og smelte sammen med lysosom eller granuler slik at det dannes et fagolysosom. Ved elektronmikroskopi er det vist at fagocytter i teleoster har mer enn ett fagosom i cytoplasma og flere av disse fusjonerer til et stort fagosom med flere ulike partikler (Neumann *et al.*, 2001). Fagocyttenes lysosomer og granuler inneholder potente antimikrobielle molekyler som frigis til fagolysosomet sammen med andre degraderende enzymer, og fører til nedbrytning og uskadeliggjøring av antigenet. Dette kan skje ved enten oksygen-uavhengige eller oksygen-avhengige drapsmekanismer. Drapsresponsen til de fagocytiske cellene øker ved stimulering med cytokiner (Secombes, 1996; Neumann *et al.*, 2001). Etter nedbrytning elimineres antigenfragmentene ved eksocytose eller presenteres på celleoverflaten (Bogen & Munthe 2002; Neumann *et al.*, 2001; Aderem, 2003; Stuart & Ezekowitz, 2005; Ellis, 2006; Esteban & Meseguer, 2006). Prosessen av fagocytose er vist i Figur 2.

Antigenpresentasjonen foregår ved at fagocytiske APC fremviser fragmenter av det nedbrutte antigenet i assosiasjon med MHC molekyler som gjenkjennes av T-cellereseptoren (TCR) på T-celler (Goldsby *et al.*, 2003; Esteban & Meseguer, 2006). I tillegg til antigenpresentasjon kan infiserte makrofager også skille ut interleukin-1 (IL-1), som aktiverer CD4⁺-lymfocytene. Kryss-kommunikasjonen mellom APC og TCR resulterer i stimulering av både T-celler og APC som begge bidrar til aktivering av videre immunrespons (Kerksiek & Pamer, 1999; Pieters, 2001; Goldsby *et al.*, 2003; Esteban & Meseguer, 2006). På bakgrunn av at fagocytose er sentral i aktiveringen av både humorale og cellemedierte immunresponser, kan den sies å være en bro mellom det spesifikke og uspesifikke immunsystemet (Dalmo *et al.*, 1997; Press & Evensen, 1999; Beutler, 2004).

Fagocytose og drapsmekanismene påvirkes av både eksogene og endogene faktorer, som stress, omgivelsesforhold, cytokiner og patogener (Hardie *et al.*, 1994; Secombes, 1996). Det bør også nevnes at fagocytose er en vanlig mekanisme som brukes av intracellulære patogener for å invadere vertscellen (Lanzavecchia, 1996; Aderem & Underhill, 1999). Mange infeksjoner er derfor et direkte resultat av patogenenes tilpasninger til et intracellulært liv (Neumann *et al.*, 2001).



Figur 2: Prosess av fagocytose.

1.5 Immunrespons mot intracellulære bakterier

Fiskens uspesifikke forsvarssystem mot bakterier inkluderer blant annet produksjonen av et bredt spekter antimikrobielle substanser, aktivering av komplementsystemet, frigiving av cytokiner og akutt-fase proteiner, inflammasjon og fagocytose. Imidlertid har evolusjonen bidratt til at en rekke bakterier innehar strategier for å unngå disse forsvarsmekanismene. (Ellis, 2001). Flere bakterier har evne til å oppholde og reprodusere seg i immuncellene (Splitter *et al.*, 1996; Esteban & Meseguer, 2006).

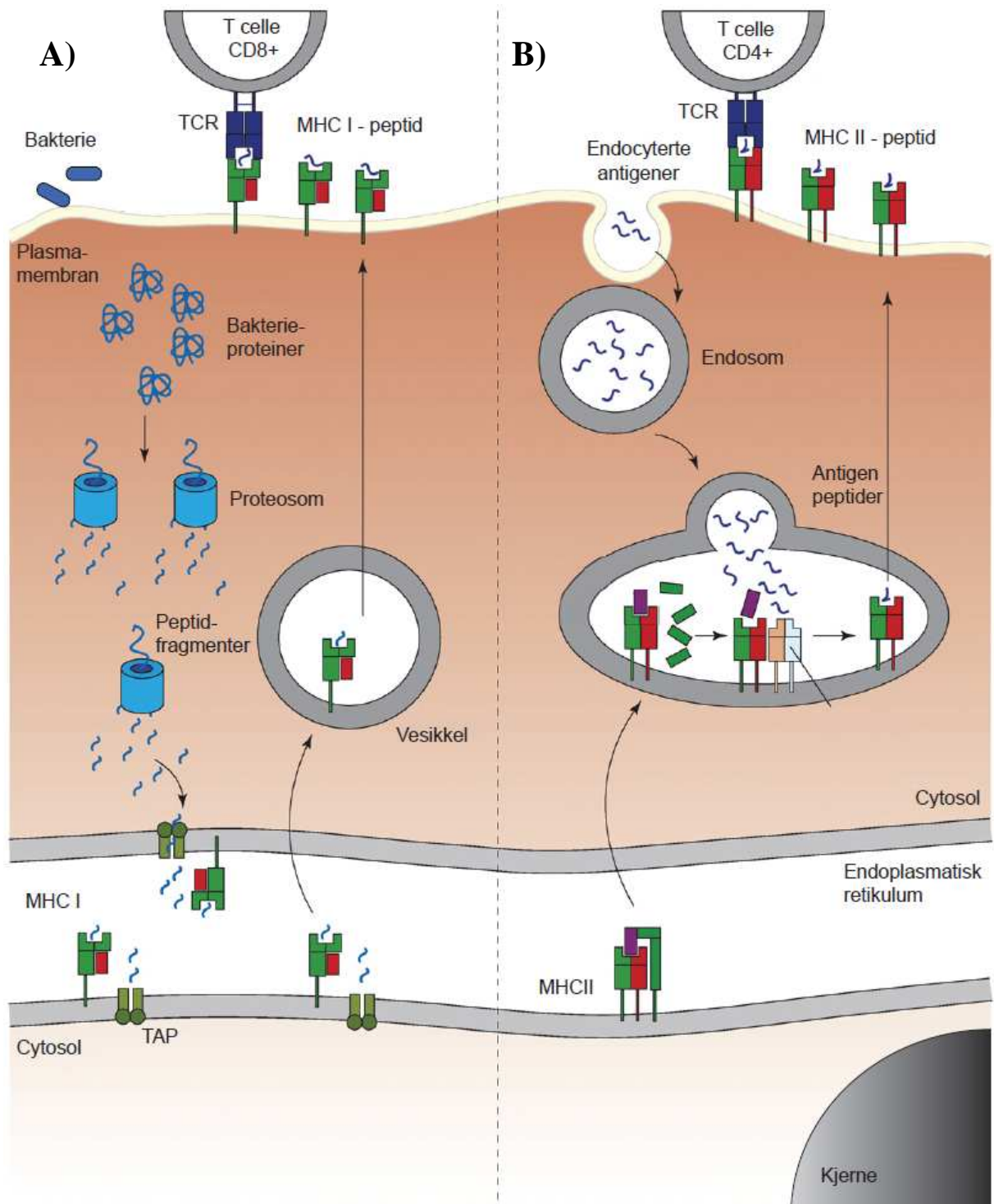
Intracellulære bakterier blir beskyttet mot de uspesifikke og spesifikke humorale forsvarsmekanismene som ekstracellulære bakterier vanligvis utsettes for. Andre immunresponser må derfor igangsettes for å eliminere intracellulære bakterier (Splitter *et al.*, 1996; Kindt *et al.*, 2007). I pattedyr avhenger forsvar mot intracellulære infeksjoner av samspill mellom det uspesifikke og det spesifikke forsvar, og en spesifikk T-cellerespons er nødvendig for å kontrollere infeksjoner forårsaket av intracellulære bakterier (Nauciel, 1999; Bogen & Munthe, 2002; Stenmark *et al.*, 2003; Esteban & Meseguer, 2006). Sannsynligvis er dette også tilfellet i teleoster. Etersom det er funnet gener for TCR hos teleoster er det grunnlag for å tro at teleoster også har T-celler som en del av det spesifikke forsvarssystemet (Nakanishi *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2006). Sykdomskontroll mot intracellulære bakterier er avhengig av at APC presenterer antigen til T-cellene. Dette vil videre resultere i en kaskade av hendelser tidlig i infeksjonen. Dersom de intracellulære bakteriene befinner seg inne i vertens fagosomer, vil antigenpresentasjonen foregå via MHC klasse II (Figur 3B). Ved stimulering av antigen i assosiasjon med MHC klasse II eller av signaliserende substanser fra infiserte APC, vil CD4⁺-lymfocytene aktiveres til å sekretere cytokiner, såkalte makrofag-aktiverende faktorer (MAF) (Bogen & Munthe, 2002; Neumann *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2003; Ellis, 2006). Aktiverte makrofager uttrykker større mengde MHC klasse II molekyler på overflaten som fører til effektiv stimulering av CD4⁺-lymfocytene (Secombes, 1996; Goldsby *et al.*, 2003). Tilbakekoblingsløyfen mellom fagocytene og T-lymfocytene er funksjonell ettersom aktiverte makrofager mer effektivt kan bryte ned og eliminere intracellulære bakterier sammenlignet med ikke-aktiverte makrofager. Aktiverte makrofager gjennomgår morfologiske endringer og kjennetegnes ved at de blir større og får flere lysosomer. Lysosomene inneholder dessuten større mengder oksygenradikaler og cytotoxiske enzymer (Bogen & Munthe, 2002). De aktiverte makrofagene skiller også ut mange pro-inflammatoriske mediatorer, som for eksempel IL-1 β . IL-1 β rekrutterer blant annet andre fagocytter til infeksjonsstedet (Secombes, 1996; Goldsby *et al.*, 2003; Gomez & Balcazar,

2008). Ved aktivering av MAF vil monocytter stimuleres til å differensiere til makrofager (Bogen & Munthe, 2002).

MAF omfatter tumor nekrose faktor alpha (TNF- α) og interferon gamma (IFN- γ), hvor sistnevnte er vist å være den mest potente aktivatoren av makrofager (Ellis, 1999; Bogen & Munthe, 2002; Goldsby et al., 2003; Raupach & Kaufmann, 2001; Lindgren *et al.*, 2004; Ellis, 2006). IFN- γ kan tilsynelatende også påvirke funksjoner i nøytrofile granulocytter og øker granulocyttenes antimikrobielle effekt på flere intracellulære patogener (Laskay *et al.*, 2008). TNF- α er også viktig i kontrollen av intracellulære bakterieinfeksjoner (Secombes, 1996; Raupach & Kaufmann, 2001), og utøver biologiske funksjoner som makrofagaktivering, nøytrofilmigrasjon, fagocytose og lymfocytt proliferering (Qin *et al.*, 2001). I pattedyr sekreses TNF- α fra monocytter, makrofager, nøytrofile granulocytter, T-celler og NKK-celler etter stimulering med LPS (Whyte, 2007), og regulerer blant annet cellulær aktivering, proliferering og apoptose (Gomez & Balzacar, 2008). Gener fra TNF- α og IFN- γ er identifisert og beskrevet fra flere fiskearter, og det er ytterligere indikasjoner på at disse er analog til dem som er funnet i pattedyr (Plouffe *et al.*, 2005; Swain & Sahoo, 2006; Fischer *et al.*, 2006)

CD8⁺-lymfocytter gjenkjenner antigene peptider assosiert med MHC klasse I molekyler, hvor de fleste peptidene stammer fra proteosom-nedbrutte proteiner i vertscellens cytoplasma (Kerksiek & Pamer, 1999; Clemens *et al.*, 2004; Esteban & Meseguer, 2006) (Figur 3A). CD8⁺-lymfocytene kan drepe den infiserte verten og dermed bidra til å redusere replikasjonen av de intracellulære bakteriene (Splitter *et al.*, 1996; Esteban & Meseguer, 2006). I mange tilfeller samarbeider de to T-celletypene i forsvaret mot intracellulære bakterieinfeksjoner (Kerksiek & Pamer, 1999).

Antistoffenes rolle i forsvaret mot intracellulære patogener har vært kontroversiell. Det har generelt vært antatt at antistoffene er viktig i beskyttelsen mot ekstracellulære patogener, mens cellemediert beskyttelse er viktig i forsvaret mot intracellulære patogener. Flere studier har nylig rapportert at antistoffer også er aktive i bekjempelsen av infeksjoner forårsaket av intracellulære patogener (Kirimanjeswara *et al.*, 2008).



Figur 3: Antigenpresentasjon. **A)** Nedbryting av mikrobielle proteiner til peptider i vertscellens cytosol. Prosessen foregår ved hjelp av proteosomer. Peptidene transporteres til endoplasmatisk retikulum (ER) av en TAP (transporter associated with antigen processing) og bindes til MHC I. Det resulterende peptidkomplekset presenteres på celleoverflaten til TCR på CD8⁺-cellene. T-celle responsen kan føre til destruksjon av vertscellen. **B)** Mikrobielle produkter blir brutt ned i vesikler og peptidene bindes til MHC II. På celleoverflaten gjenkjennes peptidkompleksene av CD4⁺-celler som fører til en spesifikk immunrespons. Figuren er modifisert fra Halling-Brown *et al.*, (2008).

Immunrespons mot *Francisella*

Immunresponsen mot *Francisella* har trolig mye til felles med immunresponsen mot andre intracellulære patogener (Elkins *et al.*, 2007). Immunresponsen mot *Francisella philomiragia subsp. noatunensis* er lite studert, og de fleste studiene som er gjort på slekten *Francisella* har hovedsakelig fokusert på ulike underarter av *F. tularensis*. Det eksisterer derfor begrenset kunnskap om *F. philomiragia*. Da flere fellestrekk er kjent for *F. tularensis* og *F. philomiragia subsp. noatunensis*, som blant annet den intracellulære tilstedeværelsen og trolig celletypene som affiseres, kan immunresponsen mot *F. tularensis* bidra til å øke kunnskapen ved infeksjon med *F. philomiragia subsp. noatunensis*. Etersom bakterien er godt tilpasset intracellulært habitat er vertens respons mot *Francisella* sannsynligvis avhengig av T-cellemediert immunitet (Clemens *et al.*, 2004; Lindgren *et al.*, 2004). Immunresponsen mot *F. tularensis* er mye undersøkt, men flere lignende forsøk som viser varierende og motstridende resultater antyder at immunresponsen mot *Francisella* fremdeles ikke er helt forstått.

En viktig faktor for spredningen av *F. tularensis* er at bakterien har mulighet til å infisere og formere seg i makrofager før de bryter ut og infiserer nye makrofager (Elkins *et al.*, 2003; Sjøstedt *et al.*, 2006). Forsøk har antydnet at aktivering av makrofager er sentral i kontroll av infeksjonen (Elkins *et al.*, 2007), og ved stimulering med MAF kan makrofagene delvis beskytte seg mot bakterienes strategi. Dette kan forklares ved at den påfølgende økte baktericidale aktiviteten begrenser bakteriereplikasjonen (Loe gring *et al.*, 2006). Det er imidlertid uklart om oksygen-avhengig og oksygen-uavhengig mekanisme virker baktericidal eller bakteriostatisk på bakterien (Forestal *et al.*, 2007). I følge Santic *et al.*, (2006) har det aldri vært beskrevet at intracellulære bakterier kan formere seg i aktiverte makrofager.

Det fremgår fra flere forsøk at cytokinene TNF- α og IFN- γ bidrar til effekten av intracellulært drap og kontroll over *Francisella*-infeksjonen (Cowley & Elkins, 2003; Elkins *et al.*, 2007; Forestal *et al.*, 2007; Krocova *et al.*, 2008). I en oversiktsartikkel av Sjøstedt (2006) ble det rapportert at IFN- γ ikke kunne forhindre, men medførte likevel at *F. tularensis* i mindre grad var i stand til å unnsnippe fra fagosom til cytoplasma i humane makrofager. Imidlertid var denne prosessen blokkert for *F. tularensis subsp. novicida* når IFN- γ var tilsatt. Et forsøk av Parsa *et al.*, (2008) viste at *Francisella* nedregulerer IFN- γ responsen ved infeksjon. Nano & Elkins (2006) rapporterte at *F. tularensis* har LPS som mangler immunomodulerende aktiviteter, som blant annet stimulering av TNF- α - produksjonen.

Resultater fra smitteforsøk utført av Loe gring *et al.*, (2006) indikerte at avkom av *F. tularensis* som hadde brutt ut fra makrofager aktiverte immunsystemet på en annen måte enn

bakterier som ikke hadde replikert intracellulært i forkant. I den forbindelse ble det blant annet observert en hemming av makrofagens produksjon av de inflammatoriske cytokinene som skal føre til baktericidal aktivitet, og dette var sannsynligvis forårsaket av en endring på bakterienes overflate. Videre vil dette kunne medføre at infeksjonen kan forløpe uten at vertens antibakterielle funksjoner blir aktivert.

Flere intracellulære bakterier, inkludert *F. tularensis*, kan overleve og formere seg i nøytrofile granulocytter (Laskay *et al.*, 2008). I et forsøk utført av McCaffrey & Allen (2006) fremgikk det at *F. tularensis subsp. holarctica* LVS som var opsonisert ble hurtig fagocyttert, men ikke eliminert av humane nøytrofile granulocytter. Det ble videre funnet at "respiratory burst" ikke ble igangsatt ved fagocytose av LVS, grunnet en forløpig ukjent mekanisme der ansamlinger av NADPH oksidase i fagosomet ble forhindret. Videre unnslopp bakterien fra granulocyttenes vakuole til cytoplasma. I kontrast til dette viste imidlertid resultatene fra et forsøk av Sjöstedt *et al.*, (1994) at nøytrofile granulocytter kan være kritisk i forsvaret mot infeksjon av *F. tularensis* i mus, da disse cellene begrenset veksten av bakterien.

Et forsøk av Stenmark *et al.*, (2003) indikerte at spesifikke antistoffer muligens kunne bidra i beskyttelsen mot stammer av *F. tularensis subsp. holarctica*. Dette ble vist ved å injisere immunserum til smittede mus som manglet B-lymfocytter. Resultatene viste injisering av immunserum reduserte konsentrasjonen av bakterier sammenlignet med kontrollen. Forestal *et al.*, (2007) viste at normale mus som ble gitt en subletal infeksjon av *F. tularensis* LVS var overraskende sterkt resistent mot letal LVS infeksjon som ble gitt kun 2-3 dager senere. Mekanismen bak resistensen kunne muligens være lymfocyttafhengig (Forestal *et al.*, 2007). Andre forsøk har imidlertid antydnet at B-lymfocytterne ikke kunne bidra til intramakrofag LVS infeksjon (Bosio & Elkins, 2001). I en artikkel av Elkins *et al.*, (2003) ble blant annet viktigheten av det medfødte forsvar ved en *Francisella*-infeksjon beskrevet. Dette ble demonstrert i lymfocytt-manglende mus, hvor dyrene overlevde i 3-4 uker før infeksjonen ga dødelig virkning. I følge Elkins *et al.*, (2003), kan det synes som at spesifikke antistoffer mot *Francisella* er fordelaktig i noen situasjoner, særlig ved eksponering for lave doser av bakterien. Ved høyere doser er trolig effekten av antistoffer liten sammenlignet med T-celle funksjoner. I likhet med de fleste andre intracellulære patogener vil sannsynligvis langtidsimmunitet mot *Francisella*-infeksjoner være avhengig av T-celler (Elkins *et al.*, 2003; Elkins *et al.*, 2007). Generelt vil en naturlig infeksjon av *Francisella* medføre sterkere immunitet mot sekundære infeksjoner (Elkins *et al.*, 2007)

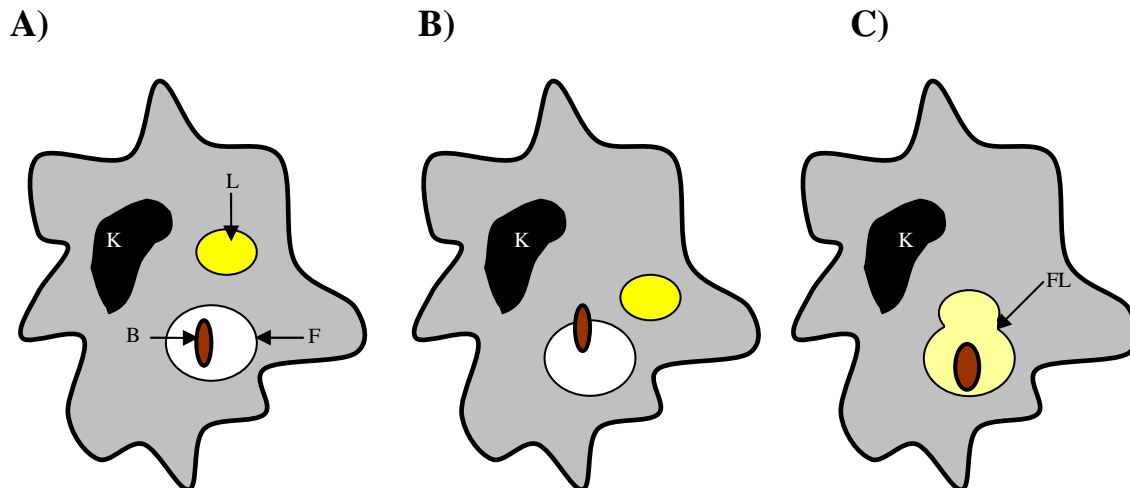
I flere tilfeller er det en koeksistens mellom fisken og bakterien som medfører at fisken går inn i et bærer stadium. Dette er også kjent for *F. philomiragia subsp. noatunensis*.

Dersom fisken utsettes for en stressor vil dette kunne gi alvorlige konsekvenser med sykdomsutbrudd og dødelighet som resultat. Imidlertid gir bærerstatusen et signal om at det medfødte forsvar er i stand til å gi en viss grad av beskyttelse (Ellis, 2001). Francisellose og andre infeksjonssykdommer forårsaket av intracellulære bakterier kjennetegnes ofte ved granulomer, som er vertens forsøk på å innkapsle patogenet (Grayson *et al.*, 2002).

1.6 Strategier for intracellulær overlevelse i immunceller

Til tross for at fagocytose er en effektiv forsvarsmekanisme har høyt suksessfulle patogener utviklet ulike strategier for å infisere fagocytter (Finlay & McFadden, 2006; Esteban & Meseguer, 2006; Parsa *et al.*, 2008), og kan utnytte immuncellene som vert for replikasjon (Neumann *et al.*, 2001). Suksessen er avhengig av at patogenene har evne til å motstå, nøytralisere eller omdanne vertens forsvarsmekanismer (Hornef *et al.*, 2002). Komplement og antistoffer kan ikke trenge gjennom cellemembranen og den intracellulære lokaliseringen beskytter derfor mot vertens humorale forsvarsmekanismer. Disse forholdene vil ha betydning for sykdommens forløp og manifestasjon. I dag kjenner vi bare til noen få intracellulære bakterier som kan overleve og formere seg i immuncellene (McCarthy *et al.*, 2008). Det ble tidlig rapportert at *F. philomiragia subsp. noatunensis* oppholder seg intracellulært i torskemakrofager (Nylund *et al.*, 2006), og i likhet med flere andre intracellulære bakterier kan den muligens også formere seg i immuncellene.

Mekanismene for opptak i cellene og for overlevelse varierer mellom ulike bakterier (Splitter *et al.*, 1996). Neumann *et al.*, (2001) beskrev tre hovedstrategier for intracellulær overlevelse av bakterier i fagocytene som er fremstilt i Figur 4.



Figur 4: Hovedstrategier for intracellulær overlevelse i immunceller. **A)** Blokkering av sammensmeltning mellom lysosom og fagosom. **B)** Unnslipping til vertcellens cytoplasma før dannelsen av fagolysosom. **C)** Overlevelse i fagolysosomet. K= kjerne; B= bakterie; L= lysosom; FL= fagolysosom. Figuren er hentet og modifisert fra Neumann *et al.*, 2001.

Blokkering av sammensmeltningen av lysosom og fagosom er en strategi som hemmer senkningen av pH i fagosomet som er nødvendig for intracellulært drap (Figur 4A) (Esteban & Meseguer, 2006). Dette medfører konsekvenser for nedbrytingen av bakterien og påfølgende kobling med MHC II komplekset som er sentral i aktiveringen av immunsystemet (Pieters, 2000). En rekke patogener kan utnytte cellenes cytoskjelett ved infeksjon (Figur 4B). Cytoskjelettet er et dynamisk nettverk i cellens cytoplasma som består av mikrotubuler og aktinfilamenter. Mange intracellulære bakterier kan unnslippe fra fagosom til cytoplasma før det dannes et fagolysosom og vil trolig unngå antimikrobielt forsvar (Dramsai & Cossart, 1998; O’Riordan & Portnoy, 2002; Cascadewall, 2008). Det er blant annet vist at *F. tularensis* benytter en lignende form for strategi ved infeksjon (Clemens *et al.*, 2004; Lindgren *et al.*, 2004). Bakteriene som har tilgang til cytoplasma har tilsynelatende spesialiserte mekanismer for å bryte ut av fagosomet. Muligens er også de intracellulære omgivelsene svært næringsrik for de bakteriene som har tilpasset seg overlevelse i cytoplasma (Cascadewall, 2008). Generelt blir det antatt at alle bakterier som har tilgang til vertens cytoplasma, også har evne til å formere seg i disse omgivelsene (Goebel & Kuhn, 2000).

Intracellulære bakterier som eksisterer inne i fagosomet er resistent mot eller kan påvirke vertscellens drapsmekanismer (Figur 4C) (O’Riordan og Portnoy, 2002; Cascadewall, 2008). Noen bakterier er tilsynelatende avhengig av sur pH i fagosomet for å kunne formere

seg. En polysakkarid kapsel kan også hindre nedbrytning ved å gi beskyttelse mot de sure omgivelsene i fagolysosomet (Esteban & Meseguer, 2006). Bakterier som overlever inne i fagosomet kan imidlertid få redusert tilgang på essensielle næringsstoffer. På bakgrunn av dette er det viktig at patogenet kan indusere metabolske veier slik at de kan overleve intracellulært (Ernst *et al.*, 1999).

Laskay *et al.*, (2008) har publisert en artikkel over intracellulær overlevelse i nøytrofile granulocytter, hvor det fremgår at flere intracellulære bakterier ikke bare overlever, men kan også formere seg i de nøytrofile cellene. Sammenlignet med makrofager har nøytrofile granulocytter kort levetid, og i den forbindelse er spontan apoptose en essensiell mekanisme for å opprettholde homeostase (Bogen & Munthe, 2002; McCaffrey & Allen, 2006; Laskay *et al.*, 2008.; Frankenberg *et al.*, 2008). Noen intracellulære bakterier har imidlertid evne til å kontrollere celledød og forlenger de nøytrofile granulocyttenes overlevelse (McCaffrey & Allen, 2006). Det er også vist at apoptotiske nøytrofile granulocytter fagocytteres av makrofager hvorved enkelte bakterier overføres fra de nøytrofile granulocytterne til makrofagene. Opptak av apoptotiske celler vil hemme eller ikke indusere antimikrobielle mekanismer i makrofagene, og bakteriene vil dermed kunne overleve og reproducere seg i disse cellene. Det er mulig at de nøytrofile cellene bare er en midlertidig vert og at makrofagene er sluttvert (Laskay *et al.*, 2008).

En oversiktsartikkel av Finlay & McFadden (2006) omhandler såkalte anti-immune strategier, som er bakterielle forsvarsstrategier. Disse er gjengitt i Tabell 3. Slike strategier inkluderer blant annet mekanismer for hemming av pro-inflammatoriske cytokiner, induksjon av immunsuppressive cytokiner, induksjon av apoptose og svekkelse av antigenpresentasjon.

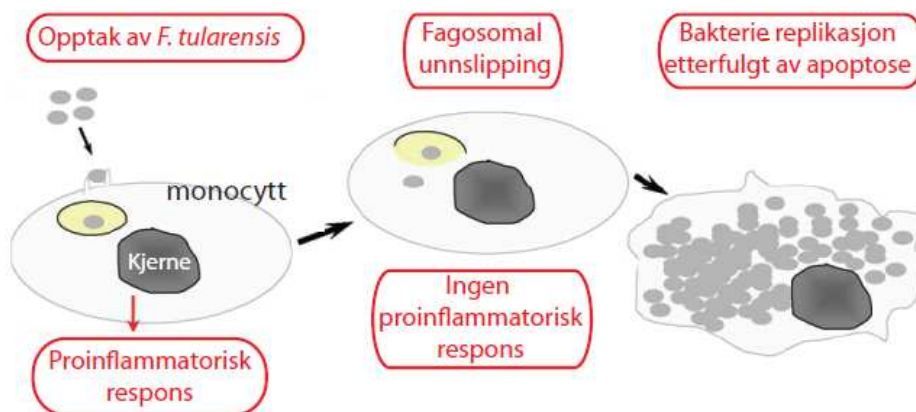
Tabell 3: Bakteriers anti-immune strategier, og eksempler på faktorer som bidrar til disse strategiene. Tabellen er gjengitt fra Finlay & McFadden (2006), og er noe modifisert.

Bakteriers anti-immune strategier:	Eksempler:
Sekrering av modulatorer eller toksiner	Flere toksiner, proteaser
Modulering av patogen-overflaten	Kapsel, ytre membran proteiner, adhesiner og invasiner, Lipid A fra LPS på gram-negative bakterier
Unngåelse av immunsystemets forsvarsmekanismer	Unngå fagolysosomdannelse, hindre fagocytose
Antigen hypervariabilitet	Variasjon mellom bakteriestammer, variere overflatestrukturer
Omdanning eller drap av celler/fagocytter	Unngå fagolysosomdannelse, blokkere inflammatoriske veier, replikere i immunceller
Blokkering av ervervet immunitet	Blokkere antigenpresentasjonen
Hemming av komplement	Proteaser som degraderer komplement
Hemming av cytokin/interferon/kjemokin produksjon	Blokkere inflammatoriske veier, sekreere degraderende proteaser
Modulering av apoptose/"autophagy"	Hindre apoptose, påvirke apoptotiske signalveier
Påvirking av TLR	Binde til TLR for å dempe inflammasjon, påvirke TLR for å minke gjenkjenning av antigenet
Blokkering av antimikrobielle molekyler	Sekreere degraderende proteaser, hindre innsetting av peptider på celleoverflaten
Blokkering av indre cellulære veier	Påvirke ubiquitin veier

Livssyklusen til *Francisella*

Livssyklusen til *F. philomiragia subsp. noatunensis* er forløpig ukjent, men kan muligens ligne det som er antatt for livssyklusen til *F. tularensis*, som er fremstilt i Figur 5. Fagocytosen initieres ved at bakterien fester seg til ligander på celleoverflaten. Ved hjelp av elektronmikroskopi er det blant annet vist at *F. tularensis* blir tatt opp i humane makrofager ved såkalt "looping fagocytose" (Clemens & Horwitz, 2007). Etter at bakterien er fagocyttert blokkeres dannelsen av fagolysosomet. Bakteriene går gradvis fra fagosom til cytosol ved å

bryte ned den fagosomale membranen ved en foreløpig ukjent mekanisme (Lai *et al.*, 2001; Golovliov *et al.*, 2003; Santic *et al.*, 2006). Nedbrytningen starter etter 2-4 timer, og det kan ta 8-12 timer før alle bakteriene er fritt i cytoplasma. Dette er ulikt andre intracellulære bakterier som unnslipper til cytoplasma bare minutter etter fagosomdannelsen (Santic *et al.*, 2006). Når tilstrekkelig antall bakterier er tatt opp, hemmes tilsynelatende den pro-inflammatoriske responsen som inkluderer utskilling av cytokiner (Sjøstedt, 2006). Bakterien formerer seg i cytoplasma og vil til slutt indusere programmert celledød (apoptose) som følge av liten næringstilgang. De frigitte bakteriene vil infisere omliggende celler som da blir nye vertsceller for *F. tularensis*. I ikke-aktiverte celler vil *F. tularensis* formere seg effektivt intracellulært i 24-48 timer. I følge Lai *et al.*, (2001) starter ikke bakteriereplikasjonen før 6-12 timer etter invasjonen. Bakteriens livssyklus i andre celletyper enn makrofager, er uklar (McCaffrey & Allen, 2006).



Figur 5: Tentativ modell for livssyklusen til *F. tularensis* i makrofager. Figuren er fra Sjøstedt, (2006), og er noe modifisert.

1.7 Hensikten med studiet

Hensikten med studiet er å undersøke opptak av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i immuncellene hos Atlantisk torsk *in vitro*. Det er ønskelig å verifisere hvilke immunceller som inneholder bakterien etter smitteforsøk, og å lokalisere bakteriene intracellulært i torskeleukocytene ved hjelp av fluorescens- og konfokalmikroskop. Bakteriene skal merkes med antiserum fra kanin. For å få et godt visuelt bilde av cellestrukturen skal phalloidinmerking utprøves. Ved bruk av denne merkemethoden vil det trolig bli enklere å lokalisere intracellulære bakterier i leukocytene. I tillegg skal leukocytene merkes med monoklonale antistoffer for å identifisere om bakterien oppholder seg i spesifikke subpopulasjoner.

Lite er kjent om *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* og bakteriens virulensmekanismer og interaksjoner med torskens immunceller. Om mulig skal infiserte immunceller undersøkes i elektronmikroskop for å studere eventuelt opptak av bakterien i cellene. Da flere arter innen slekten *Francisella* er rapportert å formere seg intracellulært er det også ønskelig å undersøke om *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har evne til intracellulær replikasjon i immuncellene. Dersom bakterien har en slik evne kan dette gi konsekvenser for sykdommens forløp og manifestasjon, og det er derfor viktig å forstå patogenesen ved francisellose. Generelt er kunnskapen om torskens immunsystem mangelfull. En bedre forståelse av hvordan torskens immunforsvar reagerer ved smitte av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* kan derfor ha betydning for utviklingen av vaksiner mot francisellose.

2.0 Material & metode

2.1 Fisk

Torskeyngel (5-15 gram) fra Sagafjord Sea Farm AS på Stord ble levert til Industrielaboratoriets (ILAB) våtlaboratorier ved Høyteknologisenteret i Bergen (HIB), 27.03.08. Fisken ble holdt i kar ved 8°C og 24 timers kontinuerlig lys (LD 24:0), og ble fôret med et kommersielt tørrfôr fra Skretting som var beregnet på marin fisk. Gjennomsnittsvekten av fisken som ble brukt i dette studiet var $278 \pm 92,2$ g (gjennomsnitt \pm SD, N=42).

2.2 Isolering av leukocytter

Isolering av torskeleukocytter ble basert på en etablert metode for isolering av lakseleukocytter, beskrevet av Pettersen *et al.*, (1995, 2000), og innebærer sentrifugering over percollgradient. Metoden er modifisert for torsk.

Fisken ble avlivet ved slag mot hodet, og 700 μ l blod ble tappet fra *Vena caudalis* og øyeblikkelig overført til vakutainerrør med heparin. Videre ble blodet fortynnet til 5 ml i L-15 medium (se appendiks).

Hodenyrevev ble dissekert ut og overført til vakutainerrør med 2 ml L-15 medium. Gjennomsnittelig vekt av hodenyrevev som ble brukt var $0,3 \pm 0,1$ g (N=52). For å få en suspensjon av hodenyreleukocytter, ble vevet presset forsiktig gjennom et Falcon 100 μ m nylonfilter (Becton Dickinson) ved hjelp av to bøydde pasteurpipetter og 2,5 ml L-15 medium som ble tilsatt i porsjoner på 500 μ l. Prøver av blod og hodenyre ble oppbevart på is gjennom hele prosedyren.

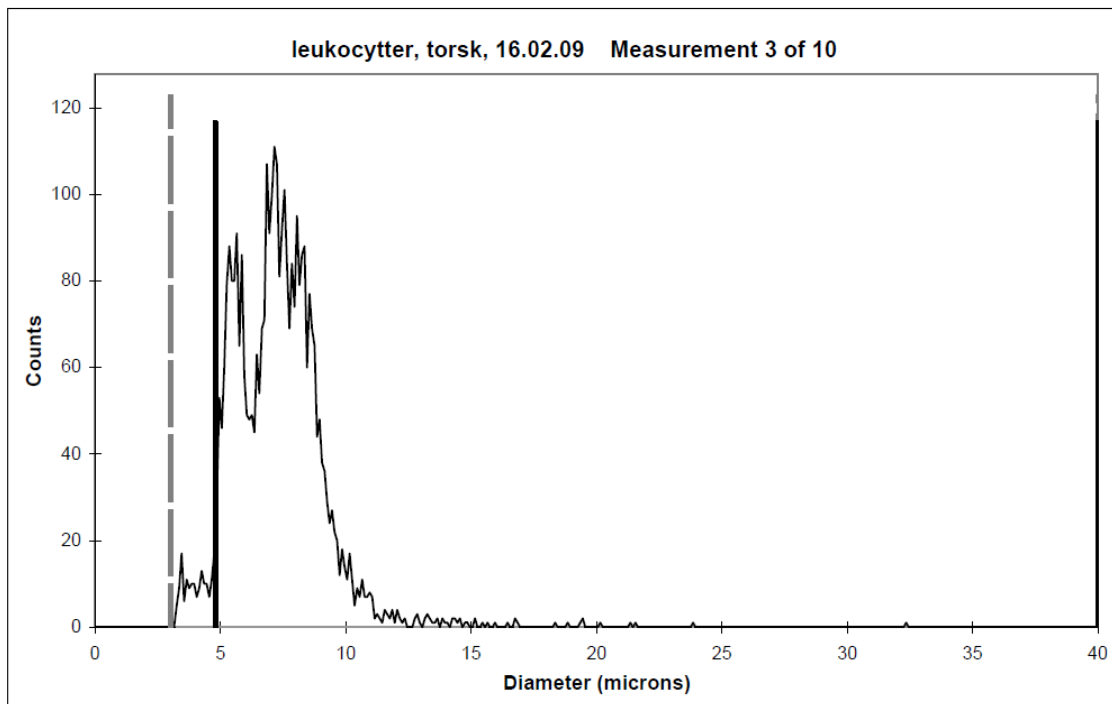
I bunnen av sentrifugerør ble det tilsatt 3 ml Percoll-løsning med tetthet 1,070 g/ml (se appendiks). Ved hjelp av pasteurpipette ble det over denne forsiktig lagt på 2,5 ml Percoll-løsning med tetthet 1,050 g/ml (se appendiks). De fortynnede cellesuspensjonene fra blod og hodenyre ble lagt øverst på gradientene og sentrifugert ved 400xg i 40 minutter ved 4 °C (Beckman Coulter Allegra X-15R sentrifuge). Etter sentrifugering kunne leukocytfraksjonen observeres som et bånd mellom de to lagene i gradienten samt i 1,070 g/ml laget. Leukocytfraksjonen ble tatt ut med en pasteurpipette og overført til nye sentrifugerør.

Leukocytterne ble vasket ved at rørene ble fylt opp med L-15 medium og sentrifugert ved 200xg i 10 minutter ved 4 °C. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og leukocytterne resuspendert i minimum 0,5 ml L-15 medium, avhengig av størrelsen på cellepelleten. Leukocytterne ble talt i CASY (se under), og cellekonsentrasjonen ble justert til 1×10^7 celler/ml ved å fortynne med L-15 medium.

Telling og kvalitetsundersøkelse av isolerte leukocytter

Ved alle forsøk ble cellekonsentrasjonen beregnet ved hjelp av CASY[®] Cell counter + Analyser system Modell TT (Innovatis AG). CASY er et kombinert celleteller- og celleanalyse instrument som gir hurtige og presise målinger, og er et viktig verktøy for kvalitative og kvantitative vurderinger av leukocytter i suspensjon. Instrumentet angir cellekonsentrasjon og størrelsesspredning i tillegg til informasjon om levende celler/ml, celleavfall/ml og aggregeringsfaktor.

Målinger ble gjort ved å fortynne 100 µl leukocytt suspensjon i 10 ml sterilfiltrert Casy[®]ton, som er en elektrolytt utviklet særlig for dette formål, og som ivaretar og stabiliserer cellene gjennom målingene. Leukocytt suspensjonene ble fortynnet i L-15 til en konsentrasjon på 1×10^7 celler/ml (konsentrasjon brukt i alle forsøk), på grunnlag av den beregnede cellekonsentrasjonen i CASY. Målinger av representative prøver fra hodenyreleukocytter (HNL) er vist i Figur 6 og fra perifere blodleukocytter (PBL) er vist i Figur 7.

CASY[®]excell 2.2

TT-SerialNo.	TT-Setup	Date	Time
TT-2GA-1335	TORSKTORS	16.02.09	14:24

File

leukocytter, torsk, 16.02.09

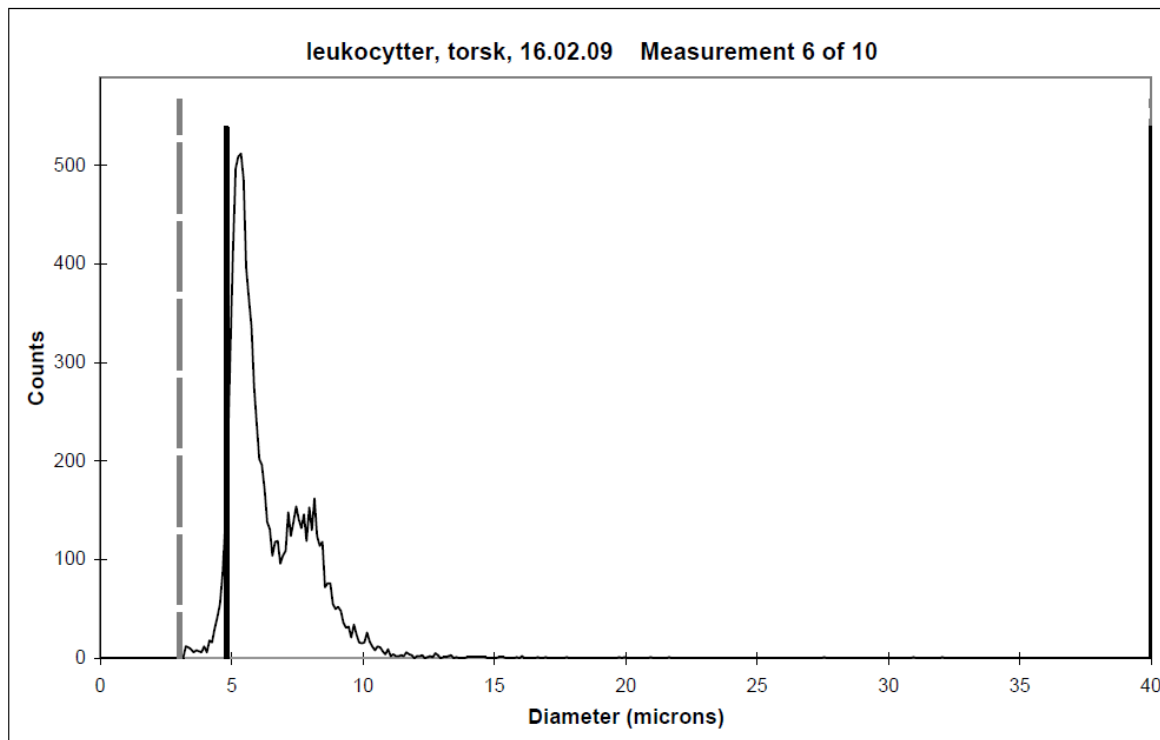
Comment

Measurement 3 HNL 3

User/Signature

Capillary	150 µm	Conc. Range	Ok	Volume/ml	7,797E+07 fl
Size Scale	40 µm	Counts	3495		
Left Norm.Cursor	3,00 µm	Counts > 40 µm	2,604E+02		
Right Norm.Cursor	40,00 µm	Aggregation Corr.	Auto	Mean Volume	2,571E+02 fl
Left Eval.Cursor	4,80 µm	Aggregation Factor	1,208	Peak Volume	2,128E+02 fl
Right Eval.Cursor	40,00 µm	Viable Cells/ml	3,664E+05	Mean Diameter	7,40 µm
Sample Volume	3 x 400 µl	Total Cells/ml	3,803E+05	Peak Diameter	7,41 µm
Dilution	1,000E+02	% Viability	96,33 %		
%Calculation	% Viability	Cell Debris/ml			

Figur 6. CASY[®] Cell Counter utskrift fra representativ måling av isolerte HNL. Grafen viser at to distinkte cellediameterer (ca. 6 µm og 8 µm) er dominerende i leukocyttsuspensjon. Cellerester vises til venstre for den grå stiplede linjen. Området mellom heltrukken og grå stiplet linje viser døde celler, og til høyre for den heltrukne linjen vises levende celler.

CASY[®] excell 2.2

TT-SerialNo.	TT-Setup	Date	Time
TT-2GA-1335	TORSKTORS	16.02.09	14:31

File

leukocyttter, torsk, 16.02.09

Comment

Measurement 6
PBL 1

User/Signature

Capillary	150 µm	Conc. Range	Ok	Volume/ml	1,328E+08 fl
Size Scale	40 µm	Counts	8789		
Left Norm.Cursor	3,00 µm	Counts > 40 µm	1,736E+02		
Right Norm.Cursor	40,00 µm	Aggregation Corr.	Auto	Mean Volume	1,740E+02 fl
Left Eval.Cursor	4,80 µm	Aggregation Factor	2,236	Peak Volume	7,782E+01 fl
Right Eval.Cursor	40,00 µm	Viable Cells/ml	1,706E+06	Mean Diameter	6,50 µm
Sample Volume	3 x 400 µl	Total Cells/ml	1,745E+06	Peak Diameter	5,30 µm
Dilution	1,000E+02	% Viability	97,74 %		
%Calculation	% Viability	Cell Debris/ml			

Figur 7. CASY[®] Cell Counter utskrift fra representativ måling av isolerte PBL. Figuren viser at aggregeringsfaktoren for torskeleukocyttter kan være meget høy, men den individuelle variasjonen er stor. Grafen viser at en cellediameter på omtrent 6 µm er dominerende i leukocyttsuspensjon. Cellerester vil vises til venstre for den grå stiplede linjen. Området mellom heltrukken og grå stiplede linje viser døde celler, og til høyre for den heltrukne linjen vises levende celler.

2.3 Cytospinpreparater

Cytospinpreparater ble laget ved å sentrifugere 100 µl leukocyttuspensjon (minimum $1,2 \times 10^6$ celler/ml) i 3 minutter ved 1000 rpm (Shandon Cytospin III cytosentrifuge). Preparatene ble lufttørket mørkt i 12 timer før videre behandling.

I tillegg til kvalitetsanalyse ved bruk av CASY, ble cytospinpreparater av isolerte leukocytter farget med Diff Quick (Medion Diagnostics) for å visuelt kvalitetssikre cellene som skulle brukes i ulike forsøk. Diff-Quick fargede cytospinpreparater gir også et bilde av hvilke leukocytter som er representert i leukocyttuspensjonen. God cellekvalitet kjenntegnes av intakte celler, i tillegg til lite cellerester, lite røde blodceller, og få aggregerte celler på preparatene. Preparatene ble studert i lysmikroskop (Nikon Phase contrast-2) og i mikroskop (Zeiss) med tilhørende digitalt kamera (Nikon). I tillegg til preparater av torskeleukocytter ble det laget cytospinpreparater av leukocytter fra laks (*Salmo salar* L.), for å sammenligne celler fra de to ulike artene. Lakseleukocytterne var isolert som beskrevet av Pettersen *et al.*, (2000).

2.4 Dyrkning av adherente leukocytter

Dyrkning av HNL og PBL ble gjort ved at 0,5 ml leukocyttuspensjon (1×10^7 celler/ml) ble tilsatt hver brønn på 4-brønners sterile "chamber slides" av glass (Lab-TekTM II Chamber SlideTM, Nunc), som er et objektglass med avtakbare brønner. Brettene ble dekket med "sealing-tape" (Nunc) og lokk og inkubert ved 12 °C. Etter 2 timer inkubering ble L-15 medium med ikke-adherente leukocytter fjernet og erstattet med nytt L-15 medium tilsatt 5 % (v/v) føtalt bovint serum (FBS) (Cambrex), for å forbedre de adherente leukocyttenes overlevelse og vekst gjennom videre inkubering. Konsentrasjonen av ikke-adherente leukocytter ble bestemt ved hjelp av CASY (se avsnitt 2.2), for å estimere konsentrasjonen av adherente leukocytter i brønnene.

2.5 Dyrkning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

Det ble dyrket bakterier for å lage vekstkurve, og for å ha tilgang på bakterier til smitteforsøkene. Kultivering av bakteriene ble basert på Bacto™ Eugon Broth (Becton Dickinson and Company), som er et flytende dyrkningsmedium (se appendiks). Sterilteknikk ble gjennomgående praktisert i forbindelse med alle bakterieforsøk.

I forkultur med 50 ml dyrkningsmedium ble det tilsatt 2 ml *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* (isolat NCIMB 14265^T som opprinnelig var isolert og dyrket ved Veterinærinstituttet i Oslo, og var en gave fra D. J Colquhoun), som var dyrket og fordelt i eppendorfrør og fryst ned ved - 80 °C, 15.01.08. Forkulturen ble inkubert i risteinkubator på 150 rpm, ved 20 °C. Optisk tetthet av bakterier i kultur ble målt ved OD_{600nm} i Hitachi U-11 spektrofotometer, og ved verdier mellom 1,5-1,8 ble 10 ml forkultur overført til hovedkultur med 250 ml dyrkningsmedium. Hovedkulturen ble inkubert ved 20 °C i risteinkubator på 150 rpm. Etter 50-60 timer (se vekstkurve, avsnitt 3.2) var bakteriene i hovedkulturen i god eksponentiell vekst, og 10 ml bakteriesuspensjon ble da overført til en ny hovedkultur. Ved å overføre bakterier i god eksponentiell vekst fra en hovedkultur til en ny var det mulig å ha god tilgang på bakterier til enhver tid.

Bakterier ble også kultivert og fryst ned for å kunne benyttes ved senere anledninger. Dette ble gjort ved å sentrifugere 50 ml bakterier i kultur (OD_{600nm} verdi $\geq 1,7$) ved 2530xg i 20 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet og bakteriepelleten resuspendert i 4 ml Bacto™ Eugon Broth uten ampicillin og jernklorid. Glycerol (G2025, Sigma) ble tilsatt til 20 % (v/v). Bakteriesuspensjonen ble fordelt i 1 ml porsjoner i eppendorfrør og fryst ned ved - 80 °C.

Vekstkurve

Vekstkurven til *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ble basert på målinger av OD_{600nm}-verdier over en tidsperiode, for å få med alle fasene i vekstforløpet. Ved samtlige målinger ble 2 parallelle hovedkulturer benyttet og gjennomsnittlig OD_{600nm}-verdi ble beregnet. Vekstkurven ble utarbeidet på grunnlag av de gjennomsnittlig målte OD-verdiene. Avslutningsvis ble 100 µl bakteriekultur sådd ut på cystein hjerteagar (CHA), med 5 % saueblod (se appendiks) og inkubert ved 20 °C i 7-10 dager for å kontrollere at kulturen ikke var kontaminert med andre bakterier. Vekstkurven fungerte som et hjelpemiddel for å få en

oversikt over når bakteriene var i god eksponentiell vekst, slik at bakterier i samme fase kunne benyttes i smitteforsøk.

Dyrkning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* på CHA med 5 % saueblod

Det ble utført et forsøk hvor *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ble fortynnet i L-15 medium med og uten tilsetning av gentamicin (Bio Whittaker). Dette ble gjort for å observere veksten av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* etter inkubering i vanlig L-15 medium som inneholder 50 µg/ml gentamicin. Bakteriesuspensjonene ble inkubert ved 12 °C, og 100 µl suspensjon ble sådd ut på cystein hjerteagar med 5 % saueblod ved starten av forsøket (tid 0) og hver time fra 1-5 timer etter tid 0. Agarskålene ble inkubert i 10 dager ved 20 °C.

Et forsøk ble utført for å undersøke om utsåing av *Francisella*-kulturer med samme OD_{600nm} ga reproduerbare resultater på agar. Fra samme hovedkultur ble det laget en fortynningsrekke (10x fortynning (OD=0,240), 100x fortynning (OD=0,023) og 1000x fortynning (OD=0,01)), og 100 µl bakteriesuspensjon fra hver fortynning ble sådd ut på tre parallelle agarskåler. Agarskålene ble inkubert ved 20 °C i ca. 10 dager.

2.6 SDS-PAGE & Western blott

Elektroforese er vandring av ladete molekyler i løsning gjennom et elektrisk felt. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis) er en teknikk som baseres på å separere proteiner på grunnlag av molekylvekt, som måles i kilodalton (kDa). En standardprøve med proteiner av kjent molekylvekt benyttes som referanse for bestemmelse av proteinenes molekylvekt. Prøvematerialet som skal undersøkes tilsettes prøvebuffer (se appendiks) som inneholder 2-βmerkaptøetanol og SDS, hvor sistnevnte er en sterk anionisk detergent som binder til proteiner. Ved tilsetning av SDS vil de fleste av proteinenes ikke-kovalente interaksjoner brytes fordi negative ladninger på SDS molekylene frastøter hverandre. Dermed ødelegges proteinets sekundær-, tertiær- og kvartærstruktur, og proteinet får en utstrakt form. Samtidig vil 2-βmerkaptøetanol redusere disulfidbindinger og bidrar på denne måten til denaturering av proteiner. SDS-proteinkompleksene foreligger som anioner, og vandrer derfor mot den positive elektroden (anoden) i et elektrisk felt. Hvor raskt proteinene migrerer i gelen avhenger av proteinenes størrelse. Små molekyler vandrer raskere i gelen da større proteiner møter mer motstand.

Etter SDS-PAGE kan man utføre immunoblotting, såkalt Western blott (WB). Prinsippet med metoden er å overføre de separerte proteinene fra gel til nitrocellulosemembran (NC). Ved hjelp av spesifikke antistoffer og påfølgende farging kan antigen på membranen påvises. Ved WB-analyse kan man derfor detektere proteiner av interesse fra en blanding av mange proteiner. I tillegg får man informasjon om proteinets størrelse ved å sammenligne med proteiner av kjent molekylvekt (standardprøve for WB).

I forbindelse med dette studiet ble Bio-Rad kit for SDS-PAGE og Western blott benyttet, og metoden ble utført i henhold til leverandørens protokoll.

SDS-PAGE

Gelen er sammensatt av konsentrerende gel (se appendiks) og separerende gel (se appendiks). De to gelene har blant annet ulike konsentrasjoner av polyakrylamid, som er avgjørende for porestørrelsen. Før montering ble glassplatene vasket med dH₂O og 70 % etanol. To glassplater ble montert sammen og den separerende gelen ble tilført mellom disse, opp til et markeringsmerke ca. 3 cm under kanten av den minste platen. På forhånd var det testet for lekkasje med dH₂O, da det var viktig at det var helt tett ved tilsetning av gelen. For at separasjonsgelen skulle få en jevn overflate ble dH₂O forsiktig lagt på toppen av gelen. Etter 1 time var gelen ferdig polymerisert, og vannet ble fjernet med et filterpapir før den konsentrerende gelen ble lagt over den separerende gelen. For å forme brønner ble en kam plassert mellom platene, øverst i den konsentrerende gelen. Kammen ble plassert forsiktig for å unngå luftbobler. Da den konsentrerende gelen var ferdig polymerisert (etter ca 45 min), ble kammen fjernet og TGS (se appendiks) ble tilsatt brønnene for at gelen ikke skulle tørke ut.

1 ml *F. philomiragia subsp. noatunensis* i dyrkningsmedium uten ampicillin og jernklorid, fryst ned i eppendorfrør ved -80 °C, ble tint og sentrifugert i 1 minutt ved 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico). Supernatanten ble fjernet, og bakteriepelleten ble vasket ved å resuspendere i 1 ml fosfat buffret saltvann (PBS) (se appendiks) før sentrifugering ble gjentatt. Supernatanten ble fjernet og bakteriepelleten ble resuspendert i 1 ml dH₂O. Prøvematerialet i vannløsning ble deretter fortynt 1:1 i prøvebuffer (se appendiks) og en videre to folds fortyningsserie i prøvebuffer (fra 1:2-1:64) ble satt opp. Prøvene ble varmet til 95 °C i 5 minutter og avkjølt før 10 µl av hver prøve i fortynningsrekken av bakterien ble tilsatt hver brønn i gelen. 10 µl oppvarmet molekylvektstandardløsning for sølvfarging, fortynt 1:20 i prøvebuffer, ble tilsatt første brønn for gel som skulle sølvfarges. For gel som skulle immunoblottes ble 10 µl molekylvektstandardløsning for WB tilsatt første brønn.

Gelene ble plassert i elektroforesekammer med elektroforesebuffer (TGS). Elektroforesen ble utført ved 190 Volt og ble avsluttet når det blå båndet, BPB (bromophenol blue), var nederst på kanten av gelen, etter ca. 50 minutter.

Etter elektroforesen ble gelen som skulle sølvfarges fiksert i fikseringsvæske (se appendiks) i 20 minutter. Deretter ble gelen vasket 2 ganger à 10 minutter med dH₂O før den ble farget med løsning for sølvfarging (se appendiks) i 15-20 minutter. Fargereaksjonen ble stoppet med 5 % (v/v) eddiksyre (Fluka) i dH₂O i minimum 15 minutter, og gelen ble så vasket i dH₂O i 5 minutter og oppbevart i dH₂O ved romtemperatur frem til fotografering.

Western blott og immunodeteksjon

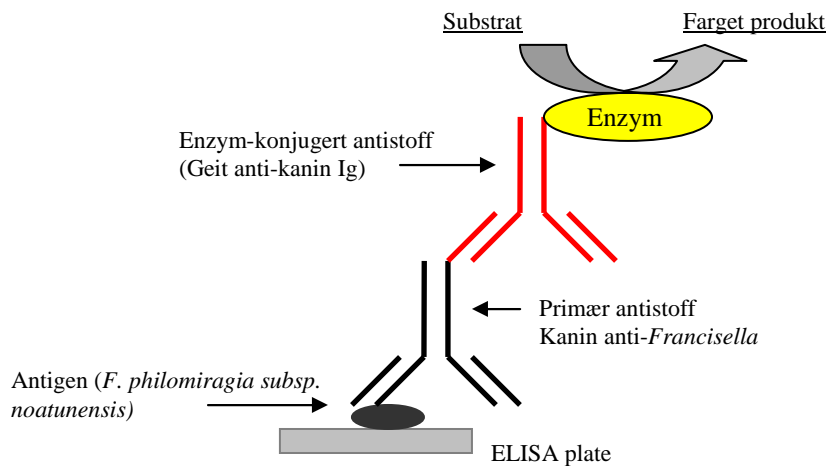
Western blott ble utført for å undersøke det polyklonale kanin anti-*Francisella* antiserumets (gave fra D. J Colquhoun ved Veterinærinstituttet, Oslo) spesifisitet mot komponentene av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Normalserum fra kanin (Ø~472) ble benyttet som negativ kontroll. Etter separering av proteinbåndene ved SDS-PAGE ble gelen og nitrocellulosemembranen lagt i blottebuffer i 30 minutter. For hver gel som skulle blottes ble to filterpapir og to svampunderlag mettet med blottebuffer. Nitrocellulosemembranen og gelen ble deretter lagt sammen i en beholder omgitt av filterpapir og svampunderlag på hver side, med filterpapirene vendt inn mot gel-membran komplekset. Blottebuffer og isblokk ble tilført blottekaret og elektroblotting ble utført ved 100 Volt i 1 time. Etter elektroblottingen ble membranen fuktet i TBS (se appendiks) og inkubert ved forsiktig vipping over natt i en blokkeringsløsning bestående av 3 % (w/v) tørrmelk (Fluka) i TBS, for å hindre uspesifikke bindinger av primært antistoff til membranen.

Membranen ble vasket 3 ganger à 5 minutter med TTBS (se appendiks) ved forsiktig vipping. Membranen ble deretter dekket med primærantistoff, kanin anti-*Francisella*, fortynnet 1:10 000 i TTBS og inkubert i 2 timer ved forsiktig vipping. Normalserumet ble fortynnet på samme måte som primærantistoffet. Vaskeprosedyren ble gjentatt før membranen ble inkubert i 90 minutter med sekundærantistoff, HRP-konjugert geit anti-kanin Ig, fortynnet 1:3000 i TTBS. Membranen ble vasket 3 ganger à 5 minutter med TTBS før nylaget substratløsning (se appendiks) ble tilsatt. Etter ca. 45 minutter ble fremkallingen stoppet ved å vaske 2 ganger à 5 minutter med dH₂O.

2.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA ble benyttet til påvisning av spesifikke antistoff mot *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i kanin anti-*Francisella* serumet. ELISA er en spesifikk og sensitiv metode som brukes til påvisning av antigen og spesifikke antistoff. Ved å påvise antistoffer mot en bestemt bakterie eller et bestemt virus kan man bekrefte eller avkrefte om et individ har gjennomgått infeksjon, eller om det etter immunisering er dannet spesifikke antistoffer mot antigen. Prinsippet for ELISA er vist i Figur 8.

1 ml kultur med *Francisella* i god vekst ble sentrifugert i 1 minutt ved 13000 rpm (Heraeus Biofuge pico), og bakteriepelletten ble resuspendert i 0,5 ml PBS. Hele bakterier ble sonikert og fortynnet til 5 µg/ml (våttvekt) i PBS. På 96 brønners brett (Nunc maxi sorb) ble det tilsatt 150 µl antigenløsning i hver brønn, med unntak av brønnene langs kantene. Platene ble dekket med lokk og inkubert i 1 døgn ved 4 °C. Ubundet antigen ble fjernet ved å tømme ut innholdet og brønnene ble så vasket 3 ganger i 0,05 % (v/v) Tween (Merck) i PBS (PBS-T). For å blokkere ledige plasser og uspesifikke bindinger av antistoff til plastoverflaten, ble brønnene mettet med 200 µl blokkeringsløsning bestående av 3 % (w/v) tørrmelk i PBS-T og inkubert i 1 time ved romtemperatur. Videre ble det satt opp en fortynningsserie av kanin anti-*Francisella* i PBS-T og etter at vaskeprosedyren var gjentatt ble 50 µl av fra hver fortynning tilsatt to parallelle brønner på brettet. Fortynninger av normalserum fra kanin i PBS-T ble brukt som negativ kontroll. Det ble også tatt med blankprøver av PBS-T der testserum var utelatt. Brettene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Brønnene ble vasket 3 ganger med PBS-T før 100 µl peroxidase-konjugert geit anti-kanin Ig, fortynnet 1:2000 i PBS-T, ble tilsatt hver brønn. Brettene ble inkubert 1 time ved romtemperatur. Vaskeprosedyren ble gjentatt med 200 µl PBS-T per brønn før 100 µl av peroxidase substrat løsning (O-phenyleneidamine, OPD) ble tilsatt hver brønn. Reaksjonen ble stoppet etter 6 minutter med 100 µl 2,5 N H₂SO₄ i hver brønn. Optisk tetthet ble målt vha spektrofotometrisk mikroplate reader (Titertek Multiskan) ved en bølgelengde på 490 nm.



Figur 8. Prinsipp for ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

2.8 Fluorescensmerking

Tabell 4 gir en oversikt over antistoffer, antiserum, phalloidin og andre fluorescerende reagenser som ble brukt i fluorescensstudiene, og fortyningene som ble benyttet. Ulike monoklonale og polyklonale antistoffer (primære antistoffer), samt konjugater (sekundære antistoffer) ble anvendt til merking av leukocyttopulasjoner. De monoklonale antistoffene CO1, E3D9 og 4D11 er produsert ved immunisering av mus. CO1 og E3D9 er spesifikk for henholdsvis B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter hos torsk. 4D11 er spesifikk mot *Vibrio salmonicida* og ble brukt som negativ isotypisk kontroll i flere av forsøkene. De polyklonale antistoffene anti-*Francisella* og anti-TO er produsert etter immunisering av kanin. Kanin anti-TO er produsert mot TO-celler, som er en cellelinje med opprinnelse i hodenyre fra Atlantisk laks (Wergeland & Jakobsen, 2001). Kanin anti-TO er trolig spesifikk for torskuleukocytter ettersom felles epitoper forekommer i laks og torsk. Kanin anti-*Francisella* ble benyttet til merking av *F. philomiragia subsp. noatunensis* ved smitteforsøkene.

Ved dobbeltmerking er det svært viktig å ta den primære antistoffproduksjonen i betraktning, blant annet for å velge passende konjugat ved merking. Dersom man kombinerer CO1 og E3D9 vil konjugat som er spesifikt mot IgG fra mus merke både B-celler og nøytrofile granulocytter med samme fluorescerende farge. For å unngå slike reaksjoner kan man ved dobbeltmerking kombinere to antistoffer produsert i forskjellige dyr, for eksempel kanin anti-*Francisella* sammen med E3D9 eller CO1, som er produsert i mus. Normalserumet

fra kanin tappes i forkant av antistoffproduksjonen og skal derfor ikke inneholde spesifikke antistoffer.

Phalloidin er et phallotoxin isolert fra den giftige soppen *Amanita phylloides*. Phalloidin binder til cellenes cytoskjelett (F-aktinet) og kan kombineres med de fleste antistoffer. Dette stoffet er imidlertid merket med fluorokromet Alexa Fluor® 488, som gir grønn fluorescens, noe som er viktig å ta hensyn til ved valg av fluorokrom-konjugater ved dobbeltmerking.

Tabell 4. Oversikt over antistoffer og fluorescerende reagenser som ble benyttet i fluorescensforsøkene.

Antistoffer, antiserum og reagenser:	Merking av:	Konsentrasjon/fortynning (i PBS):
<u>Monoklonale antistoffer (MAb):</u>		
E3D9	Nøytrofile granulocytter	2 µg/ml
CO1	IgM- positive celler	5 µg/ml
4D11	Negativ isotypisk kontroll	2 µg/ml
<u>Polyklonale antiserum/antistoffer:</u>		
Kanin anti- <i>Francisella</i>	<i>F. philomiragia subsp. noatunensis</i>	1:30 000
Kanin anti-TO (KaTO)	Leukocytter	1:1000
<u>Konjugat (sekundær antistoff):</u>		
Alexa Fluor® 488, F (ab') ₂ fragment, geit anti-kanin IgG (Molecular probes, Invitrogen)	KaTO merkede leukocytter	5 µg/ml
Alexa Fluor® 555, F (ab') ₂ fragment, geit anti-kanin IgG (Molecular probes, Invitrogen)	<i>Francisella</i> bakteriene (Kanin anti- <i>Francisella</i>)	5 µg/ml
Alexa Fluor® 488, F (ab') ₂ fragment, geit anti-mus IgG (Molecular probes, Invitrogen)	E3D9 + CO1 merkede leukocytter	5 µg/ml
<u>Normalserum og andre reagenser:</u>		
Normalserum Ø~472, fra kanin	Negativ kontroll	1:30 000
Alexa Fluor® 488, phalloidin (Molecular probes, Invitrogen)	Cellens aktin/cytoskjelett	5 µl i 200 µl PBS for hver brønn
ProLong Gold Antifade m/DAPI (Molecular probes, Invitrogen)	Cellekjernen	1 dråpe for montering av dekkglass

Phalloidinmerking og optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter

Adherente leukocytter ble isolert og dyrket i henhold til prosedyre beskrevet i avsnitt 2.2. Hovedsakelig ble "chamber slides" av glass benyttet ved dyrkning av adherente leukocytter. "Chamber slides" av permanox (Lab-Tek™ Chamber Slides, Nunc) ble også utprøvd for å undersøke eventuelle forskjeller mellom adherente leukocytter som var dyrket på ulikt materiale. Flere inkuberingstider, henholdsvis 90 minutter, 1 døgn og 2 døgn ble testet for å oppnå best mulig cellekvalitet og spredning av celler på preparatet.

Etter endt inkubering ble ikke-adherente leukocytter i brønnene fjernet og hver brønn ble vasket to eller flere ganger med 1 ml PBS. Vaskeprosedyren foregikk ved å vippe hver brønn forsiktig før PBS ble trukket opp med pasteurpipette. Videre ble leukocytene fiksert 10 minutter i 1 ml 3,7 % (w/v) paraformaldehyd (Sigma) i PBS for hver brønn. Vanlig formaldehyd må ikke brukes ettersom denne inneholder metanol som kan ødelegge aktinet i cellene under fikseringsprosessen. Etter fiksering ble leukocytene vasket to ganger med PBS, før hver brønn ble tilsatt 1 ml permeabiliseringsløsning bestående av 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma) i PBS. Alternativt kan permeabilisering av cellene foregå ved bruk av iskald (-20 °C) aceton (Fluka). Iskald aceton ble tilsatt noen få brønner for å sammenligne preparater med ulike permeabiliseringsvæsker. Etter 3-5 minutter ble permeabiliseringsvæsken fjernet og vaskeprosedyre gjentatt. Monolaget av adherente leukocytter ble dekket med 5 µl Alexa Fluor® 488 phalloidin, fortynnet i 200 µl PBS med 1 % (w/v) bovine serum albumine (BSA) (Sigma), og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur. BSA ble tilsatt for å redusere uspesifikk bakgrunnsfarge på preparatene. Brønnene ble vasket to ganger med PBS for å fjerne overflødig phalloidin og brønnene på objektglasset ble deretter fjernet. Preparatene ble lufttørket før 1 dråpe av monteringsmediet ProLong Gold antifade med DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ble tilsatt og dekkglass ble lagt forsiktig på for å unngå luftbobler. Preparatene ble lagret kaldt og mørkt i 12 timer før undersøkelse i fluorescensmikroskop.

Merking av adherente PBL i brønner med kanin anti-TO

Det ble gjort et forsøk på å merke PBL i brønner med det polyklonale antistoffet kanin anti-TO (kaTO), som tidligere er vist å binde seg til lakseleukocytter (Sviland 2008). Utprøving med dette antistoffet vil bekrefte om kaTO også er egnet for merking av torskeleukocytter.

PBL ble dyrket og inkubert ved 12 °C i ca. 2 døgn. Metode for fiksering og permeabilisering var den samme som ble brukt ved phalloidinmerking. Kanin anti-TO ble

fortynnet 1:1000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA og de adherente leukocytterne ble inkubert i 1 time med 0,5 ml antistoffløsning per brønn. Etter inkubering ble brønnene vasket 3 ganger à 5 minutter med PBS og leukocytterne ble videre inkubert i 45 minutter 0,5 ml med konjugat, Alexa Fluor® 488, geit anti-kanin IgG, fortynnet 1:400 i PBS. Vaskeprosedyre med PBS ble gjentatt for å fjerne ubundet konjugat før brønnene ble tatt av. Preparatene ble lufttørket og dekkglass ble montert med ProLong Gold antifade med DAPI. Preparatene ble oppbevart mørkt og kjølig i 12 timer før undersøkelse i fluorescensmikroskop.

Merking av leukocytter på cytospinpreparater med kanin anti-TO

Cytospinpreparater av isolerte HNL, PBL og ML (milt-leukocytter) ble laget for å merke leukocytterne med ka-TO. Leukocytter fra milt ble isolert på samme måte som hodenyreleukocytterne (avsnitt 2.2). Cytospinpreparater ble lufttørket i 12 timer før videre behandling.

Ved hjelp av DAKO-penn (DAKO A/S) ble en voksring tegnet rundt monolaget av leukocytter, og preparatene ble fiksert 90 sekunder i aceton:metanol (1:1) bad. Preparatene ble deretter vasket 5 minutter i PBS-bad. For å blokkere uspesifikk bakgrunnsfarge ble preparatet dekket med PBS tilsatt 0,5 % (w/v) BSA og inkubert i 30 minutter i fuktekammer. Preparatene ble vasket ved at de ble dyppet 3 ganger i PBS-bad før de ble inkubert mørkt i 1 time med kaTO fortynnet 1:1000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA. Preparatene ble vasket 3 ganger à 5 minutter i PBS-bad, og inkubert i 45 minutter med konjugat, Alexa Fluor® 488, geit anti-kanin IgG, fortynnet 1:400 i PBS. Etter endt inkubering ble preparatene vasket 2 ganger à 5 minutter i PBS-bad, og dekkglass ble montert med 1 dråpe ProLong Gold antifade reagent med DAPI, mens preparatet fortsatt var litt vått. Preparatene ble oppbevart mørkt og kjølig i 12 timer før undersøkelse i fluorescensmikroskop.

2.9 *In vitro* smitte av leukocytter med *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

Etter at optimale forhold for celledyrkning var fastsatt kunne smitteforsøk utføres. Smitteforsøkene foregikk *in vitro*, som vil si at forsøkene ble utført i cellekulturer. HNL og PBL ble dyrket i brønner på ”chamber slides” av glass ved prosedyre som tidligere beskrevet.

Det var ønskelig å ha en bakteriekonsentrasjon på 1×10^7 bakterier/ml ved smitteforsøkene. *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er små bakterier (ca. 0,5-1,5 μm), og det

var derfor vanskelig å telle bakteriene ved hjelp av tellekammer i lysmikroskop. Det ble gjort forsøk på å plate ut bakterier med bestemte OD_{600nm} -verdier på agar-skåler, men variable resultater med hensyn på kolonidannende enheter, CFU (Colony Forming Units) etter inkubering medførte at metoden ikke var pålitelig nok til å fastslå det faktiske antallet bakterier i en løsning. Bakteriekultur fortynnet til OD_{600nm} -verdi på 0,2 i L-15 medium uten gentamicin viste seg imidlertid å være passende ved smitteforsøkene, da det ble observert høy forekomst av bakterier i leukocyttpreparatene. Ettersom det ikke var mulig å fastslå konsentrasjonen av bakterier, ble det besluttet å benytte denne OD_{600nm}-verdien ved samtlige smitteforsøk. 1 ml bakteriesuspensjon ble tilsatt brønnene med adherente leukocytter og videre inkubert ved 12 °C i 3-5 timer, for at bakteriene skulle bli tatt opp i cellene.

Smitteforsøk ble også utført med leukocytter i løsning (adherente og ikke-adherente celler). I disse forsøkene ble leukocyttsuspensjonen tilført bakteriesuspensjon i et volumforhold på 1:1, og inkubert i 3-5 timer ved 12 °C.

2.10 Intracellulær merking av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i leukocytter

Merking av adherente leukocytter og bakterier

I dette forsøket ble merking av smittede leukocytter utført i brønner på "chamber slides" av glass. Ved å kombinere fluorescerende phalloidin og antistoffer mot *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, kan en påvise bakterier inne i leukocytene. Ved å merke kjernen kan en også få informasjon om bakterienes beliggenhet i cellene.

Adherente leukocytter, både PBL og HNL, ble smittet i 3 og 5 timer som beskrevet i avsnitt 2.9. Tabell 5 gir en oversikt over smittede leukocytter og negative kontroller som ble benyttet i forsøket. De negative kontrollene ble tatt med for å utelukke uspesifikke bindinger av det sekundære antistoffet. Etter fiksering og permeabilisering av de adherente leukocytene (som beskrevet i avsnitt 2.8), ble antiserumet kanin anti-*Francisella* spesifikt for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, fortynnet 1:30 000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA. 1 ml fortynnet antiserum ble tilsatt hver brønn med smittede celler og til kontroller med usmittede celler og inkubert i 1 time ved romtemperatur. Kanin anti-*Francisella* er tidligere testet og har vist god reaktivitet mot *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* (Kolstø 2008). I negative kontroller med smittede og usmittede leukocytter ble antiserumet erstattet med normalserum

fra kanin, også fortynnet 1:30 000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA. I andre negative kontrollbrønner ble det ikke tilsatt primært antistoff.

Etter inkubering med primært antistoff ble leukocytene vasket 3 ganger à 5 minutter med PBS og 1 ml konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG, fortynnet til 1:400 i PBS, ble tilsatt hver brønn med smittede leukocytter og til kontrollene. Konjugat ble også tilsatt negative kontrollbrønner hvor primært antistoff var utelatt. Leukocytene ble inkubert mørkt i 45 minutter ved romtemperatur og vasket 2 ganger à 5 minutter i PBS, før 5 µl Alexa Fluor® 488 phalloidin stock løsning, fortynnet i 200 µl PBS, med 1 % (w/v) BSA ble tilført hver av brønnene. Leukocytene ble videre inkubert mørkt i 20 minutter og vasket med PBS før brønnene ble fjernet og dekkglass ble montert med ProLong Gold antifade reagent med DAPI. Preparatene ble lagret mørkt og kjølig i 12 timer før de ble studert i fluorencensmikroskop.

Tabell 5. Oversikt over prøver med smittede adherente leukocytter og kontroller som ble brukt for påvisning av *F. philomiragia subsp. noatunensis*

Prøver:	Merket med (preserum, antistoffer, konjugater)*:
Smittede celler:	
PBL	Kanin anti- <i>Francisella</i> + konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL	
Kontroller:	
PBL, smittet	Normalserum + konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL, smittet	
PBL, smittet	Konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL, smittet	
PBL, usmittet	Kanin anti- <i>Francisella</i> + konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL, usmittet	
PBL, usmittet	Normalserum + konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL, usmittet	
PBL, usmittet	Konjugat (sekundærantistoff), Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL, usmittet	

* I tillegg til de nevnte konjugater ble både usmitede og smittede celler farget med Alexa Fluor® 488, phalloidin stock løsning.

Lokalisering av intracellulære bakterier ved konfokalmikroskopi

I forhold til vanlig fluorescensmikroskop som gir et overflatebilde av hele preparatet, kan man ved konfokalmikroskopi få informasjon fra et tynt plan av preparatet. Ettersom bakgrunnsfarge reduseres eller elimineres fra det fokale planet vil man kunne få et klarere bilde av det fluorescensmerkede området. Målet med konfokalmikroskopi var å snitte gjennom smittede leukocytter for å verifisere at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* befinner seg intracellulært i leukocytter fra hodenyre og blod, og for å observere bakterienes beliggenhet i cellene.

Ved dyrkning av HNL og PBL for konfokalmikroskopi ble leukocytene inkubert i 1 døgn i brønner på "chamber slides" av polystyrene (Lab-TekTM II Chambered Coverglass, Nunc). Disse hadde dekkglass i bunnen og var derfor godt egnet for konfokalmikroskopering. Leukocytene ble inkubert i 4 timer med bakterier, fortynnet til OD_{600nm} lik 0,2 i L-15 medium. Phalloidinmerking og merking av bakterier ble utført ved samme prosedyre som beskrevet tidligere. Ettersom det ikke skulle monteres dekkglass på preparatet, ble en DAPI løsning (Invitrogen) anvendt til merking av cellekjernene. DAPI stock-løsning (14,3 mM) ble fortynnet til 300 nM i PBS, og 200 µl DAPI-løsning ble tilsatt per brønn etter at overflødig phalloidin var vasket bort med PBS. Brønnene ble inkubert i 4 minutter, og deretter vasket 4 ganger med PBS. Ettersom "chamber slides" av polystyrene ikke var benyttet ved tidligere forsøk ble de smittede leukocytene studert i omvendt fluorescensmikroskop (Zeiss) før videre undersøkelse i konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510 Meta). Konfokalmikroskoperingen ble utført ved Molecular Imaging Centre (MIC), UiB.

2.11 Immunfluorescens-dobbeltmerking

Dobbeltmerking av smittede adherente leukocytter og bakterier

Ved hjelp av spesifikke antistoffer er det mulig å detektere B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter fra torsk. Antistoffene merker tydelig distinkte cellepopulasjoner hvor B-lymfocytter og plasmaceller identifiseres ved hjelp av det monoklonale antistoffet (MAb), CO1, som er spesifikt for IgM hos torsk. Nøytrofile granulocytter merkes av MAb, E3D9, som er vist å binde spesifikt til nøytrofile granulocytter både i laks (Pettersen *et al.*, 2000), ørret (Hamdani *et al.*, 1998) og torsk (Rønneseth *et al.*, 2007).

Smittede adherente HNL og PBL i brønner ble fiksert i aceton:metanol (1:1) i 90 sekunder, og vasket 3 ganger à 5 minutter med PBS. Videre ble brønnene tilsatt 0,5 ml 1 %

(w/v) bovine serum albumin (BSA) i PBS i 30 minutter for å redusere uspesifikk bakgrunnsfarge. Brønnene ble vasket 1 gang og leukocytene ble dobbeltmerket med kanin anti-*Francisella*, fortynnet 1:30 000 i PBS med 0,5 % (w/v) BSA kombinert med 5 µg/ml CO1 eller 2 µg/ml E3D9. Cellene ble inkubert i 1 time med primærantistoffene og vasket 3 ganger à 5 minutter før inkubering med sekundærantistoffer (konjugater). Konjugatene Alexa Fluor® 488, geit anti-mus IgG, og Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG, ble blandet i likt volum til en sluttkonsentrasjon på 5 µg/ml for begge (se Tabell 1 for alle fortynninger). 0,5 ml konjugatløsning ble tilsatt hver brønn og inkubert mørkt i 45 minutter. Leukocytene ble vasket 2 ganger à 5 minutter før brønnene ble fjernet, og dekkglass ble montert med ProLong Gold antifade med DAPI.

Noen preparater ble fiksert med 3,7 % (w/v) paraformaldehyd i PBS for å undersøke hvorvidt dette ville påvirke resultatene. Høyere konsentrasjoner av MAb, henholdsvis 15 µg/ml CO1 og 10 µg/ml E3D9, ble også utprøvd ettersom konsentrasjon av MAb ved merking av leukocytter i brønner ikke var testet tidligere. Det var derfor ønskelig å undersøke hvilke konsentrasjon av MAb som ga best resultat ved denne merkeprosedyren. Som negative kontroller ble normalserum fra kanin og antistoffet 4D11 benyttet i forsøket. Tabell 6 gir en oversikt over ulike kombinasjoner av primær- og sekundærantistoff som ble brukt ved dobbeltmerking av leukocytene

Tabell 6. Oversikt over prøver med *Francisella*-smittede leukocytter og kontroller som ble benyttet i forsøk med dobbeltmerking.

Prøver:	Dobbeltmerking:
Smittede celler:	
PBL	Primærantistoff 1; Kanin anti- <i>Francisella</i> og sekundærantistoff 1; Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL	Primærantistoff 2; CO1 og sekundærantistoff 2; Alexa Fluor® 488, geit anti-mus IgG
PBL	Primærantistoff 1; Kanin anti- <i>Francisella</i> og sekundærantistoff 1; Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
HNL	Primærantistoff 2; E3D9 og sekundærantistoff 2; Alexa Fluor® 488, geit anti-mus IgG
Kontroller:	
PBL, smittet	Primærantistoff 1; CO1 eller E3D9 og sekundærantistoff 1; Alexa Fluor® 488, geit anti-mus IgG
HNL, smittet	Primærantistoff 1; Normalserum og sekundærantistoff 2; Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG
PBL, smittet	Primærantistoff 1; 4D11 og sekundærantistoff 1; Alexa Fluor® 488, geit anti-mus IgG
HNL, smittet	Primærantistoff 2; Kanin anti- <i>Francisella</i> og sekundærantistoff 2; Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG

Dobbeltmerking av smittede leukocytter og bakterier på cytospinpreparat

Det ble laget cytospinpreparater av adherente leukocytter som var smittet etter dyrking i brønner, samt av smittede ikke-adherente og adherente leukocytter i suspensjon. De sistnevnte var ikke dyrket, men ble smittet like etter isoleringsprosedyren. Dette ble gjort for å øke mengden B-lymfocytter på preparatene da det var av interesse å undersøke om disse cellene inneholdt bakterier. På bakgrunn av at milt er vist å inneholde høyest andel B-lymfocytter (Rønneseth *et al.*, 2007), ble det i forbindelse med dette forsøket også laget cytospinpreparater fra smittede og usmittede ML.

Ved smitte av leukocyttuspensjoner (adherente og ikke-adherente leukocytter), ble cellekonsentrasjonen på forhånd justert til 1×10^7 celler/ml, og 3 ml leukocyttuspensjon ble tilsatt hver brønn i 6-brønners celledyrkningsbrett (Nunc). Bakteriesuspensjon i eksponentiell fase ble fortynnet til OD_{600nm} lik 0,4 i L-15 medium, og 3 ml bakteriesuspensjon ble tilsatt leukocyttuspensjonen slik at OD_{600nm} av bakteriekultur ved fortykning 1:1 i cellemedium etter overføring til brønnene var omtrent 0,2. Brønnene ble inkubert ved 12 °C i 3-4 timer. 6-brønners celledyrkningsbrett med adherente leukocytter (PBL, HNL, ML) ble inkubert i 1 døgn før 3 ml bakteriesuspensjon med OD_{600nm}- verdi lik 0,2 ble tilsatt hver brønn og inkubert i 3-4 timer for at bakteriene skulle bli tatt opp i cellene.

Etter inkubering med bakterier ble leukocyttuspensjonen med ikke-adherente leukocytter overført til en ny brønn. Til de gjenværende adherente leukocytene samt til brønner med adherente leukocytter, inkubert i 1 døgn, ble det tilsatt 350 µl trypsin (Trypsin Versene (Cambrex), 17-161E), for at de adherente leukocytene i bunnen av brønnene skulle løsne. Dette fikk stå i 5 minutter i romtemperatur før leukocytene forsiktig ble skrapet løs med en bøyd pasteurpipette. Leukocyttuspensjonen ble så overført tilbake til den opprinnelige brønnen. Øverst på 3 ml PBS/BSA/glukose matte (se appendiks) i flowcytometrirør ble det forsiktig lagt på 1 ml leukocyttuspensjon. Rørene ble sentrifugert ved 200xg i 10 minutter ved 4 °C, for å fjerne bakterier som ikke var tatt opp i cellene. Etter sentrifugering ble supernatanten tømt av og bakteriepelletten resuspendert i minimum 250 µl L-15 medium. Cytospinpreparater ble laget og lufttørket i 12 timer. Noen av preparatene ble farget med Diff-Quick for å vurdere cellenes kvalitet.

Ved hjelp av DAKO-penn ble det tegnet en sirkel rundt monolaget av celler før preparatet ble fiksert 90 minutter i aceton:metanol (1:1). Preparatene ble deretter vasket i 5 minutter i PBS- bad. Preparatene ble dekket med PBS tilsatt 0,5 % (w/v) BSA og inkubert mørkt i 30 minutter og deretter dyppet noen ganger i PBS-bad. Ved dobbeltmerking med kanin anti-*Francisella* og ett MAb (CO1 eller E3D9) ble antistoffene fortynnet til bestemte

konsentrasjoner i PBS med 0,5 % BSA. 4D11 og normalserum fra kanin ble benyttet som negative kontroller. Preparatene ble dekket med antistoffløsning, inkubert i 1 time i fuktekammer og deretter vasket 3 ganger à 5 minutter før inkubering med sekundærantistoffer (Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin IgG og Alexa Fluor® 488, mus anti-IgG) i 45 minutter i fuktekammer (mørkt) (se Tabell 1 for alle fortyninger). Preparatene ble til slutt vasket 2 ganger à 5 minutter i PBS og dekkglass ble montert med ProLong Gold antifade med DAPI mens preparatet fortsatt var litt vått. Preparatene ble oppbevart mørkt i 12 timer før de ble studert i både fluorescens- og konfokalmikroskop.

2.12 Elektronmikroskopi (TEM)

Transmisjonselektronmikroskopi (TEM) ble benyttet for å lokalisere intracellulære *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i leukocytene. I tillegg var det ønskelig å se opptak av bakterien i cellene. 0,5 ml leukocyttsuspensjon (1×10^7 celler/ml) fra hodenyre ble tilsatt hver brønn på to 24-brønners celledyrkningsbrett (Nunc) og inkubert ved 12 °C. Etter 1 døgn ble leukocytene smittet med 1 ml bakteriesuspensjon fortynnet til OD_{600nm} lik 0,2 i L-15 medium uten gentamicin. De to celledyrkningsbrettene ble inkubert i henholdsvis 1 og 3 timer. Brønner med usmittede leukocytter ble benyttet som negativ kontroll. Etter inkubering ble mediet fjernet og de smittede og usmittede leukocytene ble så fiksert med 5 % (v/v) glutaraldehyd i 0,2 M Na-Cacodylatbuffer (fått fra MIC) fortynnet 1:1 i celledyrkningsmedium (L-15) slik at total konsentrasjon ble 2,5 % (v/v) glutaraldehyd i 0,1 M Na-Cacodylatbuffer. Innstøping, snitting og farging ble gjort ved Molecular Imaging Centre (MIC). De ferdige snittene hadde en tykkelse på 40 nm og 60 nm og var farget med uranyl og blyløsning. Transmisjons elektronmikroskop med betegnelsen Jeol JEM-1230 ble benyttet ved mikroskopering.

2.13 Dyrkning av bakterier fra smittede leukocytter

For å undersøke om *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* vokser intracellulært, ble det utført smitteforsøk av adherente PBL og HNL, der de smittede leukocytene ble lysert og løsningen ble platet ut på agarskåler. Vekst av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* på agarene kan være en indikasjon på at bakteriene også er i stand til å vokse og muligens formere seg

intracellulært. Adherente leukocytter i brønner på "chamber slides" av glass ble smittet med 1 ml bakteriesuspensjon fortynnet til OD_{600nm} lik 0,25 i L-15 medium uten gentamicin. Leukocytene ble inkubert i 4-5 timer på bakgrunn av de oppnådde resultatene ved konfokalmikroskopi (jamfør avsnitt 3.5), som viste at mesteparten av bakteriene lå inne i cellene ved disse tidspunktene. Leukocytter ble også inkubert med bakterier i 6 og 24 timer for å observere eventuelle forskjeller i vekst på agarskåler ved lengre inkuberingstider.

Cystein hjerte agar (CHA) med 5 % saueblod ble benyttet til dyrkningsforsøket, men på bakgrunn av resultatene jamfør avsnitt 3.10 i resultatdelen, ble det samme forsøket gjentatt med tilsetning av 5 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin i agaren. De smittede cellene ble behandlet ved ulike prosedyrer før utplating (se Tabell 4). Til noen brønner med smittede celler ble det etter inkubering med bakterier tilsatt 1 ml L-15 medium med ulike konsentrasjoner (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ eller 150 $\mu\text{g/ml}$) av gentamicin. Brønnene ble videre inkubert i 2 timer ved 12 °C. Gentamicin vil være baktericidal for de fleste ekstracellulære bakteriearter (Vosbeck *et al.*, 1984), og det er tidligere vist at *Francisella* sp. er følsom for dette antibiotikumet (Ottem *et al.*, 2007). Eventuelle kolonier fra smittede, lyserte leukocytter vil trolig derfor stamme fra intracellulære bakterier.

Fra noen brønner med smittede celler ble 100 μl av L-15 mediet med bakterier som var tilsatt ved smitte sådd ut på agar i forkant av cellelysering for å observere vekst av ekstracellulære bakterier fra mediet samt for å bekrefte at kun *Francisella* var til stede. Celler som var inkubert med bakterier i 6 timer ble behandlet på samme måte som cellene fra brønner I (se Tabell 4), mens celler som var inkubert med bakterier i 24 timer ble behandlet som cellene fra brønner III (se tabell 4).

Før lysering ble cellene vasket godt med PBS. Cellene ble lysert i 20 minutter med dH_2O , etterfulgt av relativt kraftig bearbeiding av leukocytene ved hjelp av en bøyd pasteurpipette, for å frigi eventuelle intracellulære bakterier. Ved bruk av omvendt mikroskop ble det verifisert at cellene var ødelagt før 100 μl av suspensjonen ble sådd ut på agarer. Som kontroller ble det i dette forsøket sådd ut usmittede lyserte celler samt bakterier inkubert i L-15-medium.

Tabell 7. Forsøksoppsett, smitteforsøk etterfulgt av dyrking av bakterier fra lysere celler.

Brønner:	Prosedyre:
I: Smittede leukocytter:	<ul style="list-style-type: none"> - leukocytterne ble vasket med PBS - leukocytterne ble lysert med dH₂O - 100 µl løsning ble sådd ut på agar
II: Smittede leukocytter:	<ul style="list-style-type: none"> - leukocytterne ble vasket med PBS - leukocytterne ble inkubert med L-15 medium tilsatt gentamicin - leukocytterne ble vasket med PBS - leukocytterne ble lysert med dH₂O - 100 µl løsning ble sådd ut på agar
III: Smittede leukocytter:	<ul style="list-style-type: none"> - leukocytterne ble vasket med PBS - L-15 mediumet ble fjernet, og 100 µl av dette ble sådd ut på agar - leukocytterne ble lysert med dH₂O - 100 µl løsning ble sådd ut på agar
IV: Bakterier:	<ul style="list-style-type: none"> - 100 µl løsning ble sådd ut på agar
V: Usmittede leukocytter:	<ul style="list-style-type: none"> - leukocytterne ble lysert med dH₂O - 100 µl løsning ble sådd ut på agar

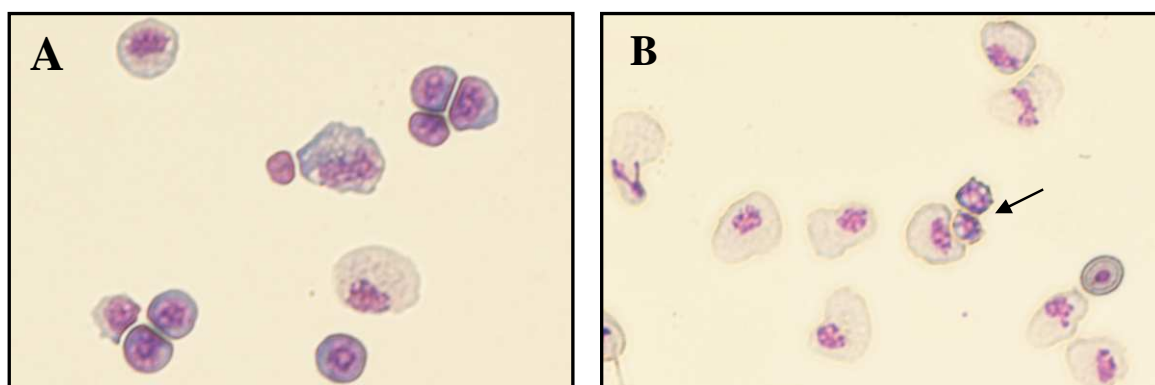
2.14 Bildebehandling

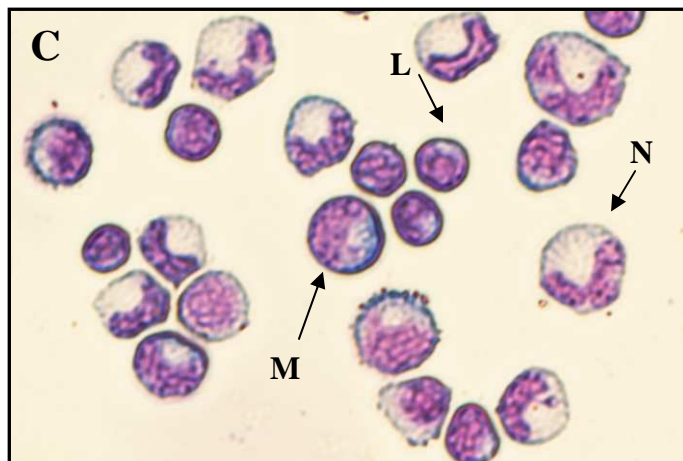
Alle fluorescensmerkede preparater ble undersøkt i fluorescensmikroskop (Zeiss Axioskop 2 plus) med tilkoblet digitalt kamera (Nikon DS camera DS-5M). Bildene ble behandlet ved bruk av Adobe photoshop CS2, versjon 9.0.

3.0 Resultater

3.1 Diff-Quick farging av cytospinpreparater

Kvaliteten av isolerte leukocytter ble visuelt kontrollert ved hjelp av Diff-Quick fargede cytospinpreparater (Figur 9). Diff-Quick fargede torskeleukocytter ble også sammenlignet med Diff-Quick fargede lakseleukocytter (*Salmo salar* L.). Resultatene i Figur 8, viser betydelig forskjell i cellemorfologien for de to ulike artene. Ved bruk av lysmikroskop kan man enkelt gjenkjenne morfologien av ulike celletyper hos laks (Figur 9C), hvor makrofagene er store med bønneformet kjerne. De nøytrofile granulocytterne kjennetegnes hovedsakelig ved at de er polymorfonukleære. I likhet med de fleste vertebrater kan i tillegg lymfocytterne differensieres fra andre celler ved at de er små og har en relativt stor kjerne i forhold til cytoplasma (Figur 9C). Celler med typisk lymfocyttmorfologi kan også sees hos torsk (markert med pil, Figur 9B), men det er vanskelig å identifisere makrofager og nøytrofile granulocytter fra torsk ved Diff-Quick farging. Dette skyldes at den karakteristiske forskjellen av kjernemorfologi mellom de ulike leukocytterne som kan observeres for laks, ikke er tilsvarende for torsk. Det er likevel mulig å se at isolerte leukocytter fra torsk består av flere forskjellige celletyper, og ved hjelp av Diff-Quick farging vil man kunne danne et inntrykk av kvaliteten på torskeleukocytterne. Ved mikroskopering ble det registrert en høyere tendens til aggregering av torskeleukocytter sammenlignet med lakseleukocytter, men cellekvaliteten var ellers jevnt god for begge artene.



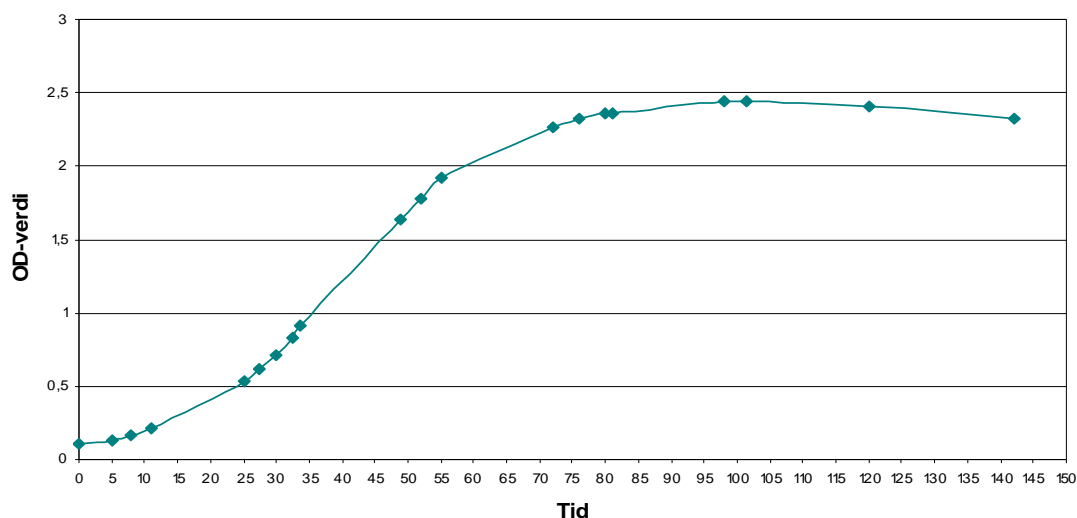


Figur 9. Cytospinpreparater av isolerte leukocytter fra torsk og laks farget med Diff-Quick. **A)** HNL fra torsk **B)** PBL fra torsk. En celle med typisk lymfocyttemorfologi er markert med pil **C)** Representativt bilde av HNL fra laks, N= nøytrofil granulocyt, M= makrofag, L= lymfocytt. Bildene er tatt med 400x forstørrelse.

3.2 Vekstkurve til *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

En vekstkurve ble utarbeidet basert på OD_{600nm} -verdier, målt over en lengre tidsperiode. Som vist i Figur 10 får vekstkurven tydelig frem de ulike fasene i vekstforløpet. Den eksponentielle fasen varer fra ca. 11 timer og frem til den stasjonære fasen inntreffer etter omtrent 65 timer. Flere like vekstforsøk viste samme forløp, og viser at vekstkurven er reproduserbar. Etter siste OD-måling ble 100 μ l av bakteriekulturene sådd ut på CHA med 5 % saueblod, og det ble utelukkende observert *Francisella* sp. på agarskålene.

Vekstkurven ble brukt som grunnlag for å bestemme bakterienes vekstfase i alle videre forsøk. Ved samtlige forsøk ble det brukt bakterier som var seint i den eksponentielle fase, dvs. $OD_{600nm} \geq 1,5$ (Figur 10).



Figur 10. Vektskurve til *Francisella philomiragia subsp. noatunensis* basert på gjennomsnittelig OD_{600nm}-verdi fra to parallelle hovedkulturer.

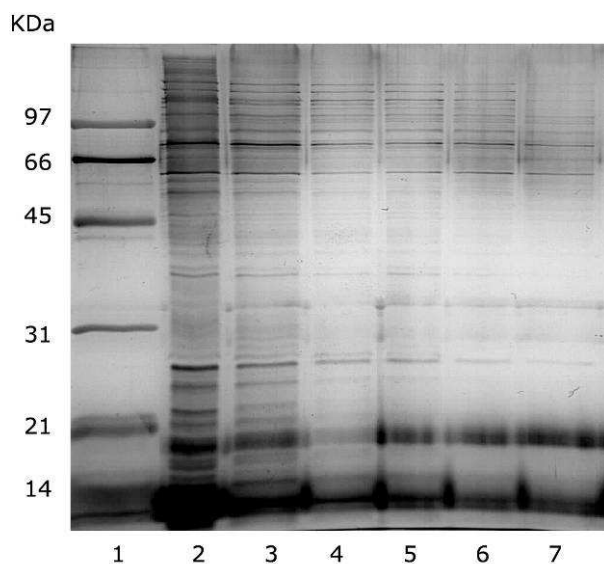
3.3 Vekst av *Francisella philomiragia subsp. noatunensis* på CHA med 5 % saueblod

I forsøket hvor *F. philomiragia subsp. noatunensis* ble inkubert i L-15 medium både med (50 µg/ml) og uten gentamicin ble det ved ulike tidspunkt sådd ut 100 µl suspensjon på CHA med 5 % saueblod. Resultatene viste at konsentrasjonen av gentamicin i L-15 mediumet tilnærmet halverte veksten av *Francisella* på agarskåler sammenlignet med bakterier som var fortynnet i L-15 medium uten gentamicin. Det ble observert at bakterieveksten på agarskålene minket med økende inkuberingstid, uavhengig av om bakteriene var inkubert i L-15 med eller uten gentamicin.

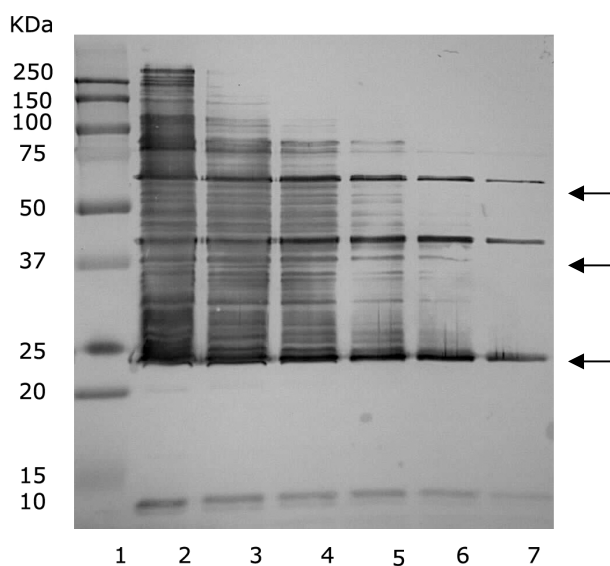
Det ble også gjort et forsøk for å undersøke om det var mulig å oppnå reproduerbare resultater ved utplating av bakteriesuspensjon med samme OD_{600nm}-verdi på tre parallelle agarskåler. Resultatene var ikke reproduerbare ettersom forsøkene viste variabel vekst på agarskålene.

3.4 SDS-PAGE & Western blot

Figur 11 viser proteinprofilen fra SDS-PAGE av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Proteinene som ble separert ved SDS-PAGE ble overført til NC-membran, og spesifisiteten av det polyklonale kanin anti-*Francisella* antiserumets respons mot *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ble undersøkt ved immunoblotting. Antiserumet reagerte med flere proteiner, men var særlig reaktivt mot tre proteiner med molekylvekter på ca. 65, 40 og 23 kDa (Figur 12). Disse sees ved sterkt positive bånd på nitrocellulosemembranen (markert med pil, Figur 12). Kontrollserumet (normalserum fra kanin) var negativt ved at det ikke reagerte med noen komponenter (ikke vist).



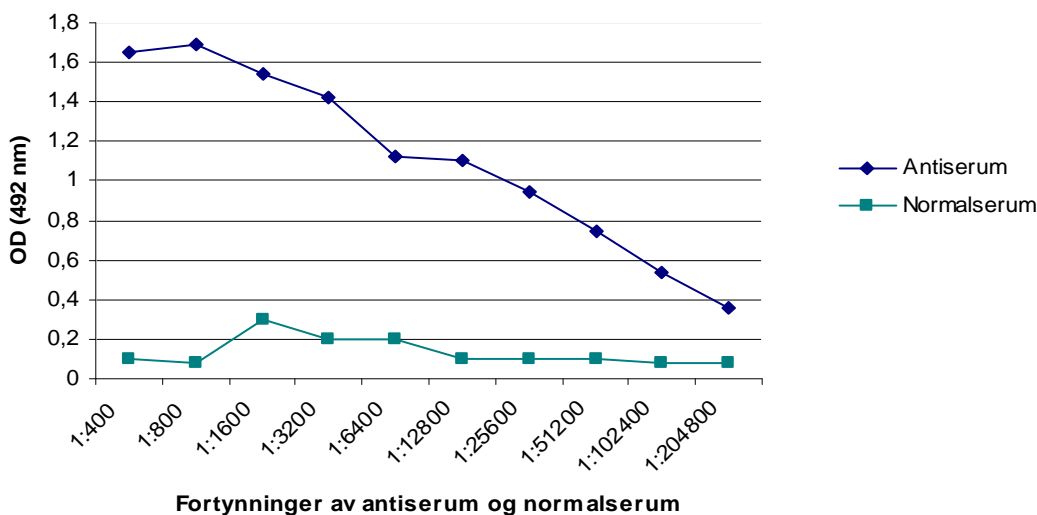
Figur 11. SDS-PAGE. Sølvfarging viser proteinsammensetningen av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*. Brønn 1 er standardprøve for sølvfarging med kjent molekylvekt. Brønn 1 er standardprøve for sølvfarging., og brønn 2-7 er to folds fortyning av prøven.



Figur 12. Westernblott. Reaktiviteten av kanin-antiserum mot *Francisella philomiragia subsp. noatunensis* (antigen). Antiserumet kanin anti-*Francisella* reagerer særlig med tre komponenter som er markert med pil. Brønn 1 er standardprøve med kjent molekylvekt, og brønn 2-7 er to folds fortyning av prøven.

3.5 ELISA

Reaktiviteten av kanin anti-*Francisella* mot *F. philomiragia subsp. noatunensis* ble undersøkt i ELISA, og resultatene viste god reaktivitet av antiserumet, også ved høye fortyninger (Figur 13). Verdier for normalserum fra kanin (negativ kontroll) ligger langt under verdier for antiserumet (Figur 13). Prøver uten serum (blankprøver) hadde gjennomsnittelig verdi OD_{492nm} lik 0,05 (ikke vist).



Figur 13. Antistoff mot *Francisella* i kanin anti-*Francisella* antiserum og normalserum, målt ved ELISA.

3.6 Merking av adherente leukocytter

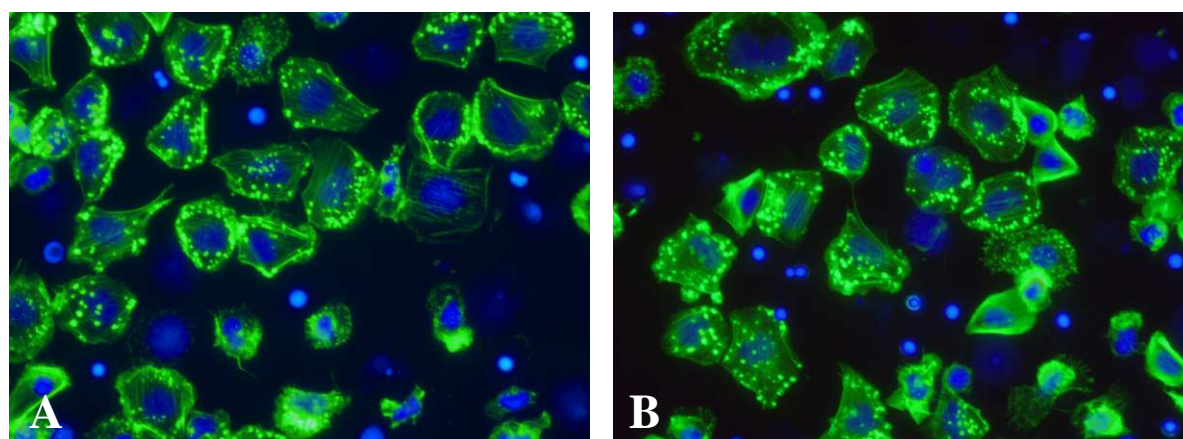
Phalloidinmerking og optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter i brønner

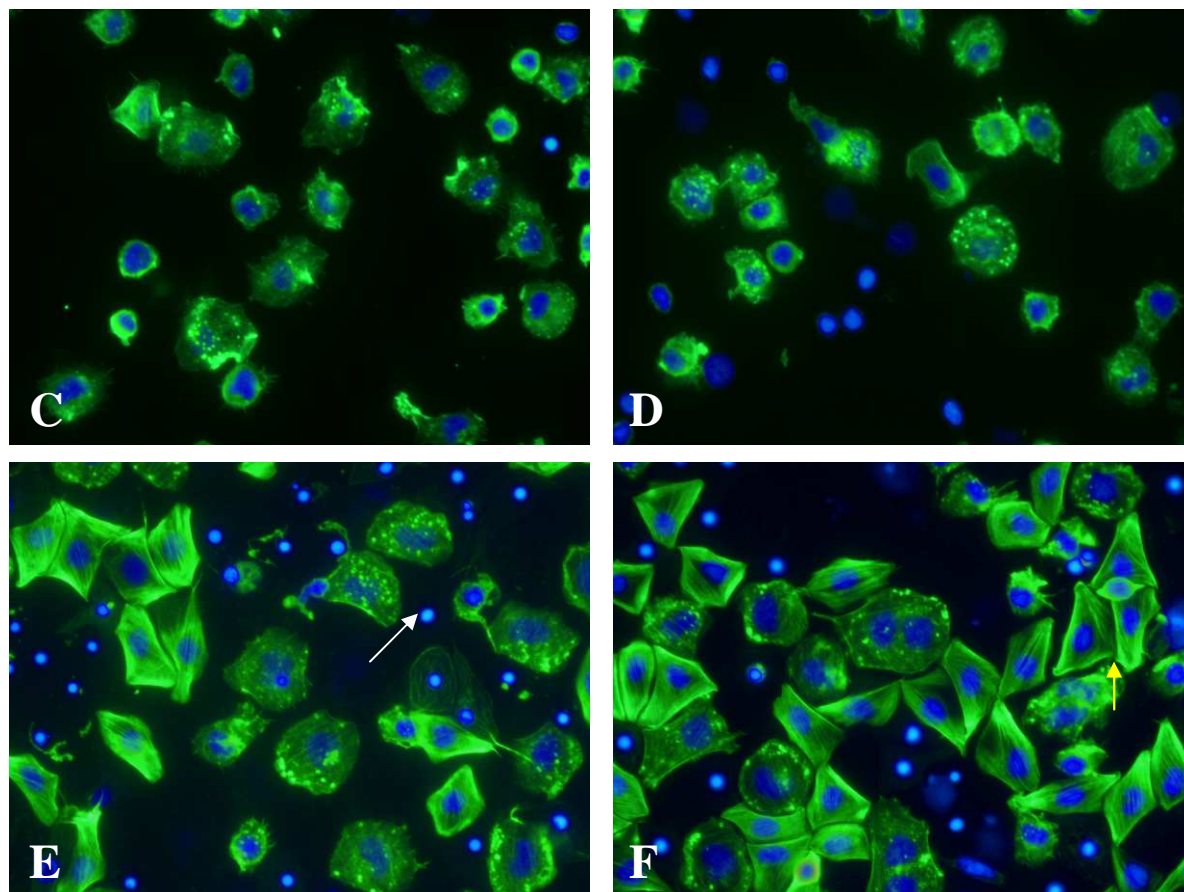
Etter inkubering i 2 timer ble ikke-adherente leukocytter fjernet og talt i CASY. Gjennomsnittlig konsentrasjon av adherente PBL og HNL i brønnene på "chamber slides" av glass ble estimert til $7,98 \times 10^6 \pm 0,71 \times 10^6$ adherente celler/ml for PBL og $7,8 \times 10^6 \pm 0,24 \times 10^6$ adherente celler/ml for HNL.

0,1 % Triton X-100 og iskald aceton ble prøvd ut for permeabilisering av leukocytene i forkant av phalloidinmerkingen. Fluorescensmikroskopi viste at det visuelt ikke kunne observeres noen morfologiske forskjeller med hensyn på cellekvalitet mellom leukocytter som var permeabilisert med de to ulike permeabiliseringsvæskene. Uspesifikk bakgrunnsfarge var neglisjerbar, og kontrasten mellom ikke-fargede og fargede områder var stor, uavhengig av permeabiliseringsvæske. I forhold til aceton viste imidlertid celler som var permeabilisert med 0,1 % (v/v) Triton X-100 i PBS sterkere fluorescensintensitet. Ved fotografering av acetonpermeabiliserte preparater måtte eksponeringstiden være tre ganger så høy sammenlignet med fotografering av preparater som var permeabilisert med triton (Figur 15). "Chamber slides" av permanox var dårlig egnet for aceton, da brønnene "sprakk" under permeabiliseringen. Etersom triton ga best fluorescens ved phalloidinmerking ble det besluttet å anvende denne permeabiliseringsvæsken i videre forsøk.

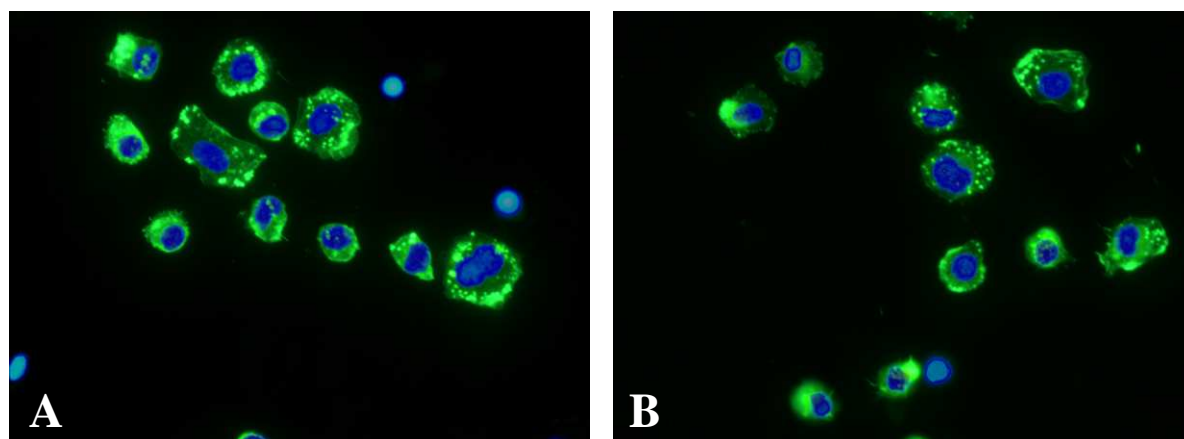
Ved utprøving av ulike inkuberingstider ble det etter phalloidinmerking og påfølgende undersøkelse i fluorescensmikroskop observert tydelig høyere celletetthet på preparatene ved inkubering i 90 minutter sammenlignet med 2 døgn. Høy celletetthet ble også observert etter 1 døgn, men i betraktelig mindre grad enn ved 90 minutter. Celletettheten var best ved inkubering i 2 døgn, da lite aggregering ble registrert både for HNL og PBL. På preparater av HNL var cellekvaliteten jevnt god, uavhengig av de undersøkte inkuberingstider. På preparater av PBL var cellekvaliteten redusert etter 2 døgn, noe som blant annet ble sett ved tilstedeværelse av et flertall runde kjerner uten cytoplasma (markert med pil, Figur 14E). I noen tilfeller ble det også registrert skisser av cellemateriale rundt disse små kjernene. Flere leukocytter hadde dessuten rullet seg opp, som trolig også er et tegn på dårlig cellekvalitet (markert med pil, Figur 14F). Redusert cellekvalitet kunne også observeres ved inkubering i 1 døgn, men problemene syntes likevel ikke å være like uttalte som ved 2 døgn. Ingen lignende tendenser ble observert for HNL og inkubering i 2 døgn syntes å være passende for HNL til å spre seg på objektglasset i bunnen av brønnene. Inkuberingstid på 1 døgn ble valgt ved smitteforsøkene på bakgrunn av de resultatene som ble vist i dette forsøket. Det ble ikke funnet synlige forskjeller mellom leukocytene på "chamber slides" av glass og permanoxmateriale.

I alle forsøk var preparatene gjennomgående gode og leukocytene ble godt farget av phalloidin. Ved sammenligninger av bildene i Figur 14 kan man se at aktintrådene er noe bedre synlig i PBL (Figur 14A-B) i forhold til HNL (Figur 14C-D).





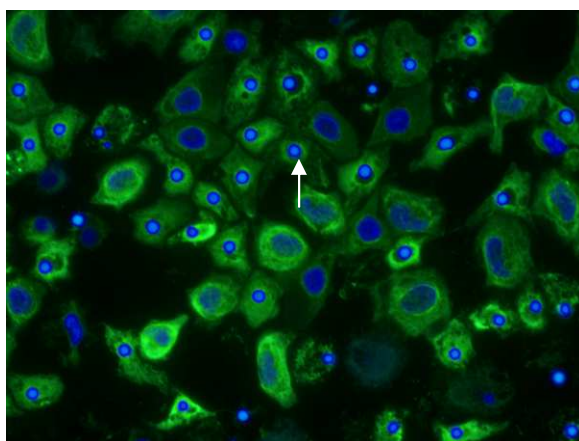
Figur 14. Phalloidinmerking av adherente torskeleukocytter med Alexa Fluor® 488, phalloidin. Cellenes aktin (grønt) kan tydelig observeres i form av prikker og tråder. Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A-B:** PBL **C-D:** HNL **E-F:** Representative bilder av PBL (inkubert 1 døgn) med mange runde kjerner uten phalloidinmerket cytoskjelett (markert med hvit pil). Det kan også observeres celler som har rullet seg opp (markert med gul pil). Bildene er tatt med 630x forstørrelse og behandlet i Adobe photoshop.



Figur 15. Phalloidininfargede HNL, permeabilisert med ulike løsninger. **A)** HNL permeabilisert med triton. Eksponeringstiden ved fotografering var 1,5 sekunder. **B)** HNL permeabilisert med acetone. Eksponeringstiden ved fotografering var 3 sekunder. Bildene er tatt med 630x forstørrelse og behandlet i Adobe photoshop.

Merking av adherente leukocytter med kanin anti-TO

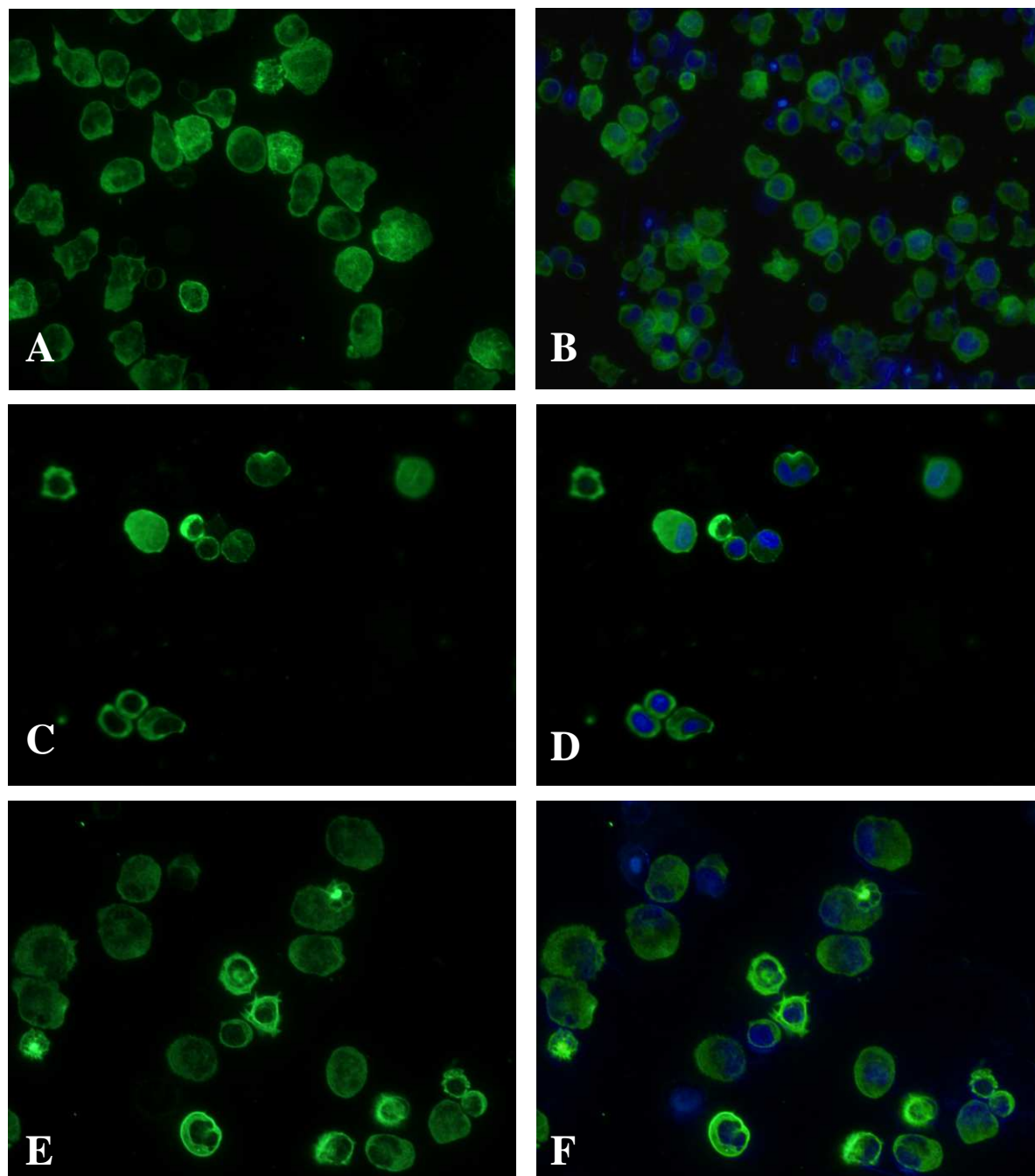
Som vist i Figur 16 viste det polyklonale antistoffet kanin anti-TO (kaTO) god reaktivitet med adherente torskeleukocytter i brønner. I dette forsøket ble kun PBL benyttet. Få celler var kaTO-negative ved at det sjeldent ble observert DAPI-merkede cellekjerne uten cellemateriale. Selv rundt de kulerunde kjernene ble noe cellemateriale merket, og et eksempel er vist ved pil i Figur 16. Det kaTO-merkede cellematerialet rundt de kulerunde kjernene syntes imidlertid å være mer fragmentert sammenlignet med de andre cellene med normal kjerne.



Figur 16. Adherente PBL (inkubert i 2 døgn), merket med kanin anti-TO (kaTO) (grønt). **A)** Cellekjernene er merket med DAPI (blått). Flere kulerunde kjerner er til stede (markert med hvit pil). Bildene er tatt ved 630x forstørrelse, og behandlet i Adobe photoshop.

Merking av leukocytter på cytospinpreparat med kanin anti-TO

Det ble laget cytospinpreparater av HNL, PBL og ML for å få med både adherente og ikke-adherente celler ved merking med kaTO. KaTO var godt egnet til å merke leukocytter på cytospinpreparater (Figur 17). Selv om DAPI-merkingen var dårlig, kan man se at de fleste cellene merkes av antistoffet, da få enkle kjerner ble observert.



Figur 17. Cytospinpreparater av isolerte leukocytter merket med kaTO (grønt). Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A-B:** HNL **C-D:** ML **E-F:** PBL. **A, E, F:** Bildene ble tatt ved 630x forstørrelse. **B-D:** Bildene ble tatt ved 400x forstørrelse. Bildene er behandlet i Adobe photoshop.

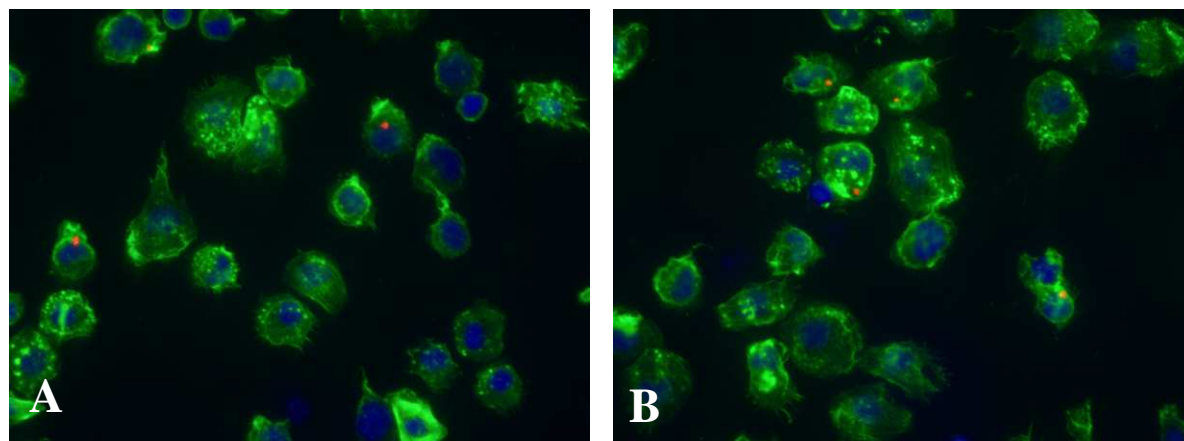
3.7 Påvisning av intracellulære bakterier i adherente leukocytter

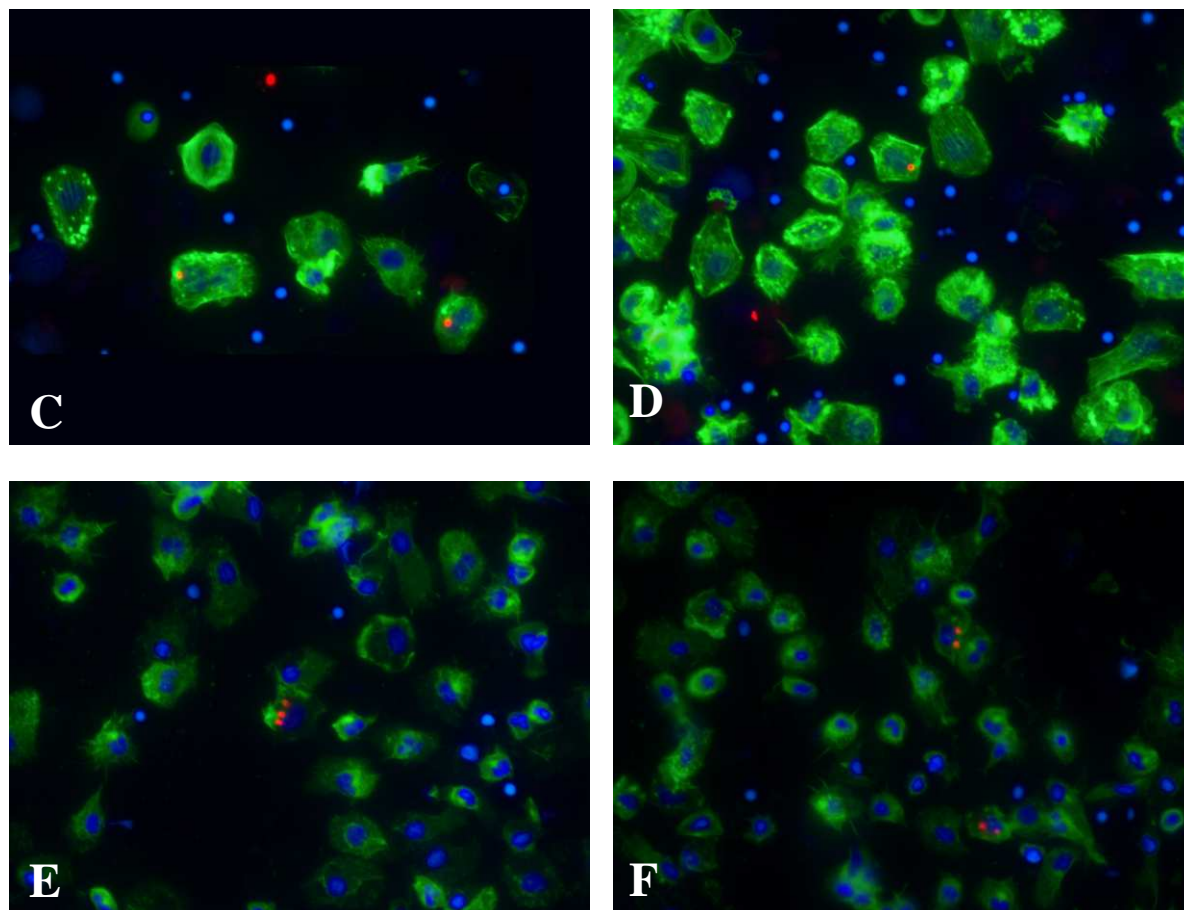
Studier av smittede phalloidinmerkede adherente leukocytter i fluorescensmikroskop tydet på at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* var til stede i leukocytene etter både 3 og 5

timer smitteeksponering. Bakteriesuspensjon fortynnet til OD_{600nm} -verdi lik 0,2 syntes å være tilstrekkelig ved smitte da det ble observert høy forekomst av bakterier på preparatene. Bakteriene var tydelig merket med det spesifikke antiserumet og var synlig i form av lysende røde prikker mot det grønnfargede aktinet og de DAPI-fargede cellekjernene. I HNL ble flertallet av bakteriene funnet i leukocytene og få eller ingen bakterier ble observert ekstracellulært (Figur 18A-B). Etter 5 timers inkubering med bakterier ble det registrert noe økende forekomst av tilsynelatende intracellulære bakterier i HNL. Hovedsakelig kunne 1-2 bakterier sees i en enkelt celle. Til sammenligning ble betydelig mindre tilsynelatende intracellulære bakterier observert i PBL, og de fleste bakteriene ble lokalisert ekstracellulært (Figur 18C-D). Ekstracellulære bakterier befant seg ofte i nær assosiasjon med leukocytene og kunne observeres i ansamlinger på ytterkanten av cellene. På tross av at flere bakterier ble observert intracellulært i enkelte leukocytter etter 8 timers smitteeksponering, ga ikke økt inkuberingstid noen store endringer med hensyn på antall smittede PBL (Figur 18E-F).

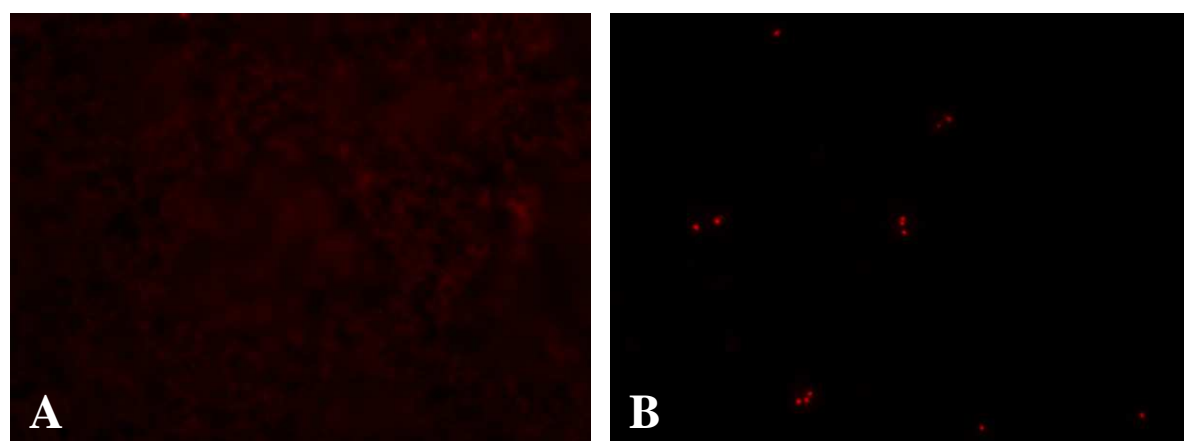
Intracellulære bakterier både i HNL og PBL ble oftest observert i de minste cellene samt i celleaggregater. Da phalloidin merker cytoskjelettet i de fleste celler, var det imidlertid ikke mulig å fastslå hvilke celletyper som inneholdt bakterier.

Resultater for negative kontroller er vist i Figur 19A. Spesifisiteten av merkingen av bakteriene (Figur 19B) var verifisert ved mangel på signaler fra preparater med kontroller. Alle kontrollene ga tilsvarende bilde som Figur 19A.





Figur 18. Adherente torskeleukocytter smittet *in vitro* (3 og 8 timer) med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Bakteriene vises tydelig som røde prikker mot det phalloidinmerkede aktinet i cellene (grønt). Bakteriene er merket med kanin anti-*Francisella* (rødt). Cellekjernene er merket med DAPI (blått) **A-B**: HNL, smittet 3 timer **C-D**: PBL, smittet i 3 timer **E-F**: PBL, smittet i 8 timer. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse og er behandlet i Adobe photoshop.

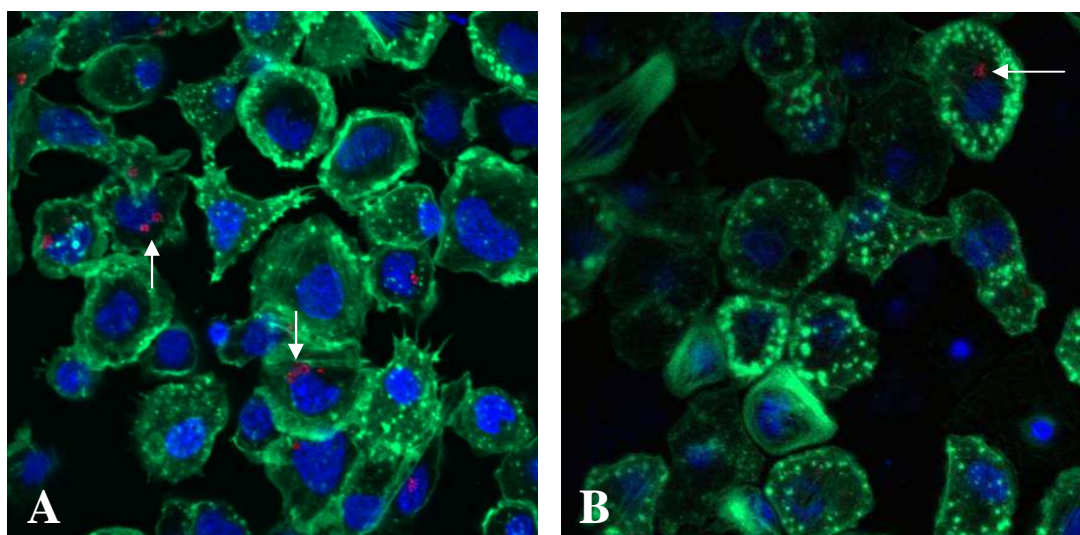


Figur 19. Immunfluorescenspreparater. **A**) Negativ kontroll. Usmittede HNL, tilsatt normalserum og konjugat, Alexa Fluor® 555, geit anti-kanin (rødt). Eksponeringstid: 7 sekunder. **B**) Representativt bilde av *Francisella* sp. (rødt) i preparat med HNL. Preparatene med smittede HNL kjennetegnes ved at det er mange bakterier i hele preparatet.

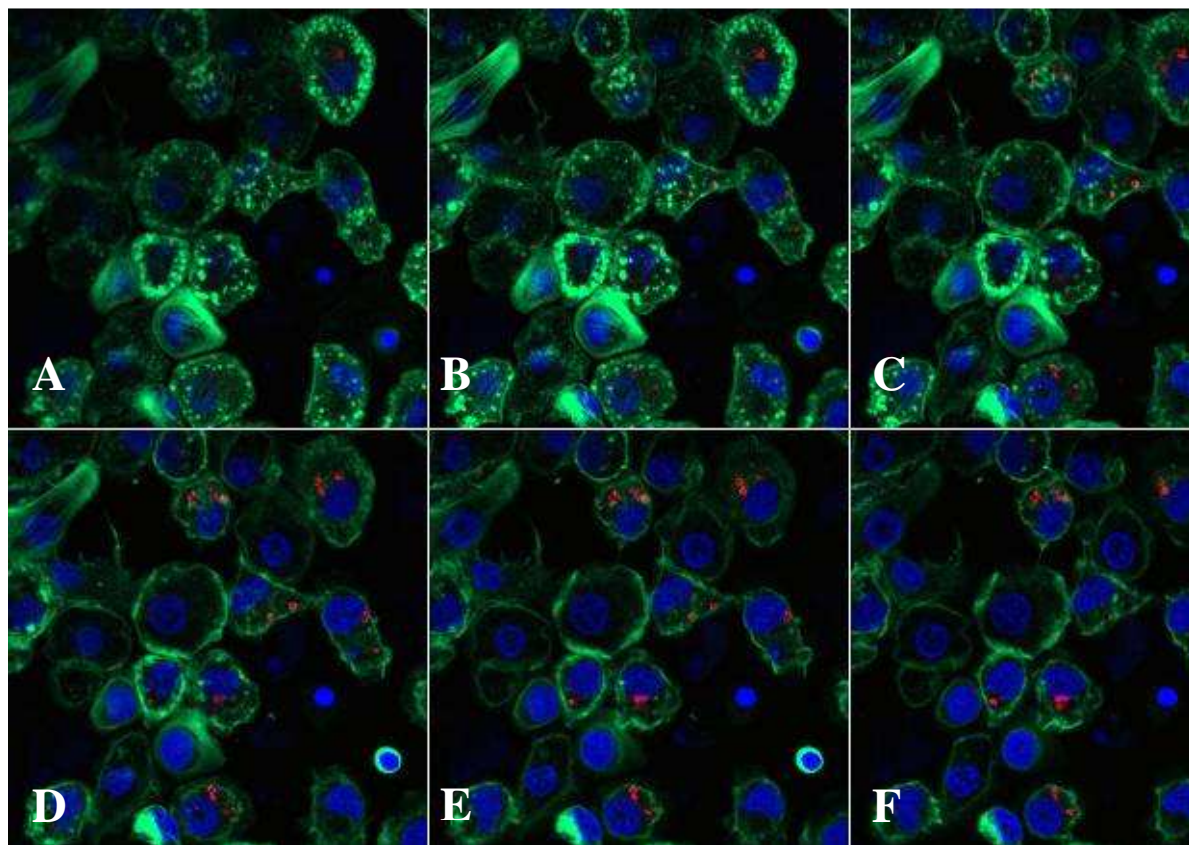
Lokalisering av intracellulære bakterier ved konfokalmikroskopi

De adherente leukocytene festet seg godt til "chamber slides" av polystyrene. Cellene var godt merket med phalloidin, og det syntes dessuten som cellekjernen ble tydeligere merket av DAPI-løsningen sammenlignet med ProLong Gold antifade med DAPI. Preparatene bleknet imidlertid raskt ettersom det ikke var tilsatt antifade. Ved bruk av fluorescensmikroskop er det ofte usikkert hvorvidt bakterier er intracellulært i leukocytene eller om de kun ligger på leukocyttenes overflate, noe som kan stadfestes ved bruk av konfokalmikroskop.

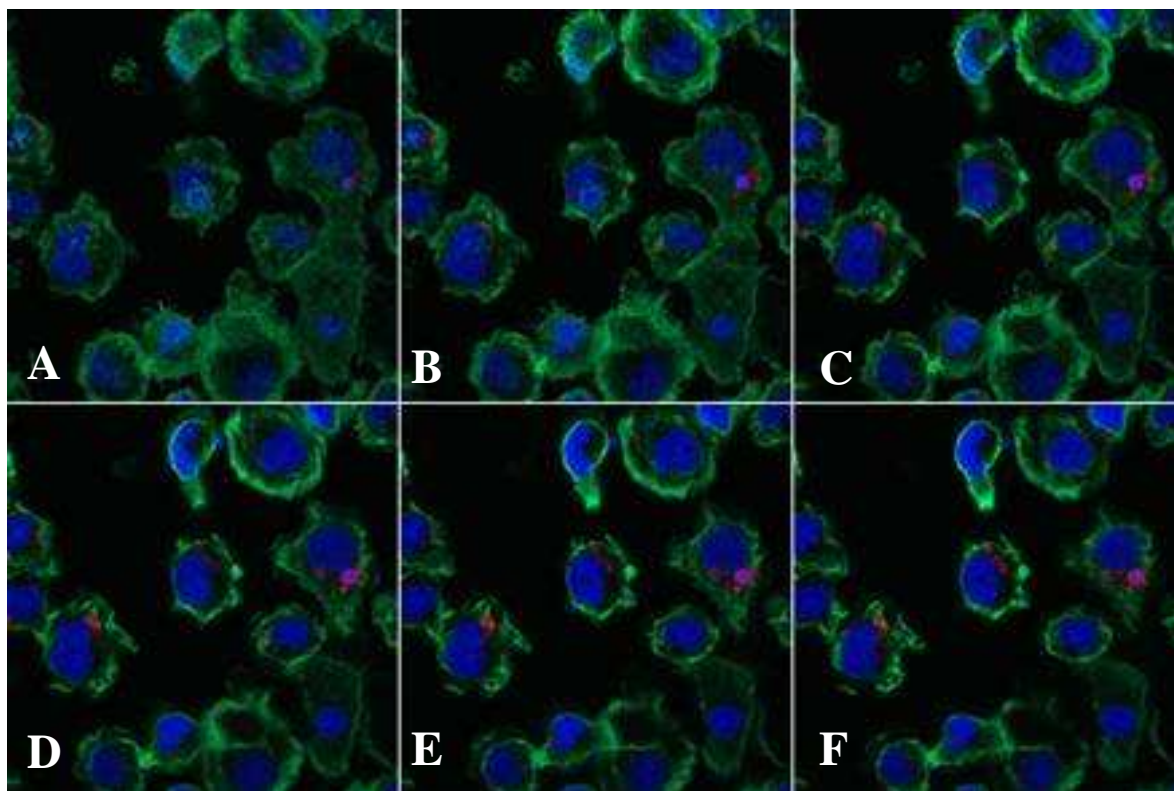
Konfokalmikroskopet viste bakterienes beliggenhet både intracellulært og ekstracellulært. Høyere forekomst av bakterier ble observert i HNL i forhold til PBL (Figur 20). Som vist i Figur 21 og Figur 22 kunne det ved snitting nedover i cellene observeres langt flere bakterier intracellulært i både HNL og PBL i forhold det som ble observert i fluorescensmikroskop. Det ble funnet mange ekstracellulære bakterier i preparater av PBL men få ekstracellulære bakterier ble registrert i preparater av HNL. De intracellulære bakteriene ble hovedsakelig sett i små ansamlinger eller i nærheten av hverandre. I HNL ble bakteriene gjennomgående funnet å ligge inntil cellekjernen (vist med pil, Figur 20A), og noen få bakterier ble registrert inne i kjernen. I PBL lå bakteriene noe mer spredt i cellen (vist med pil, Figur 20B). Det var hovedsakelig de minste cellene som inneholdt bakterier, og dette samsvarer med det som ble observert i fluorescensmikroskop. Konfokalmikroskopi viste også at aktintrådene i PBL var tydeligere sammenlignet med aktintrådene i HNL.



Figur 20. Konfokalmikroskopi av adherente torskuleukocytter merket med phalloidin (grønt). Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A)** Smittede HNL. Pilene viser at de fleste bakteriene (røde) ligger i nær assosiasjon med cellekjernen. **B)** Smittede PBL. Pilen viser bakterier i cytoplasma. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse og behandlet i Adobe photoshop.



Figur 21. En serie av snitt nedover i preparat av smittede PBL, merket med phalloidin (grønt), i konfokalmikroskop. Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A-B:** Få bakterier (røde) er synlig. **C-F:** Flere bakterier observeres etter hvert som man snitter. Bakteriene ligger i nærheten av hverandre, eller sammen i grupper. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse.



Figur 22. En serie av snitt nedover i preparat av smittede HNL, merket med phalloidin (grønt) i konfokalmikroskop. Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A-B:** Få bakterier (røde) er synlig. **C-F:** Flere bakterier observeres etter hvert som man snitter. Bakteriene ligger i nærheten av hverandre, eller sammen i grupper. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse.

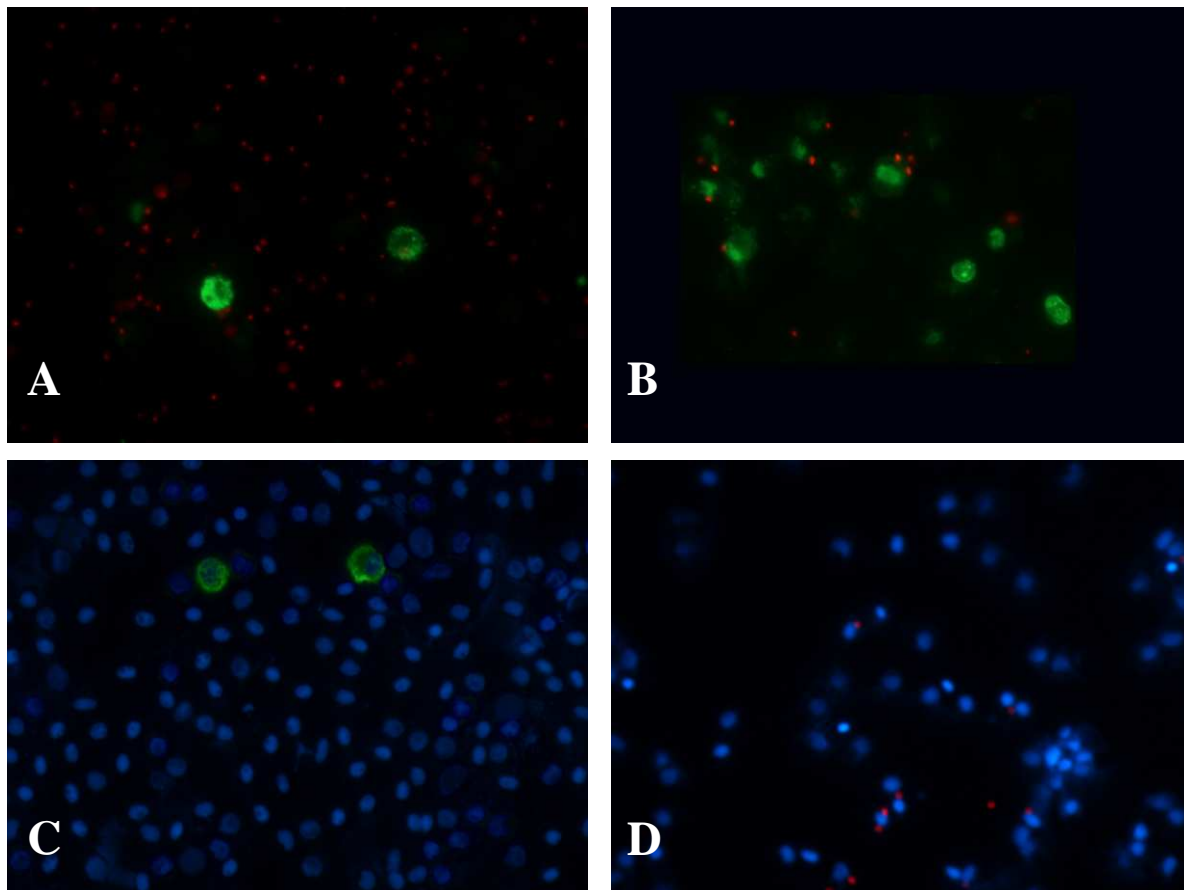
3.8 Påvisning av intracellulære bakterier i B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter

På preparater med adherente PBL var det en høy andel svakt fargede E3D9 positive celler. Det var færre E3D9-positive celler i HNL sammenlignet med PBL. Påfallende få CO1-positive celler ble observert både i PBL og HNL, selv om noe flere positive celler ble observert i HNL. Noen av cellene hadde sterk cytoplasmatisk farging, og lignet plasmaceller. Ved økt konsentrasjon av primære antistoffer viste cellene høyere spesifikk fluorescensintensitet, men bakgrunnsfargen økte også i disse tilfellene. Det var marginale forskjeller mellom leukocytter på preparater som var fiksert med ulike fikseringsvæsker.

Selv om det var rikelig med bakterier på preparatene, ble det observert lite eller ingen *Francisella*-positive B-celler i både HNL og PBL (Figur 23A). Ekstracellulære bakterier ble funnet i nær assosiasjon med flere nøytrofile granulocytter både i HNL og PBL. Bakteriene ble hovedsakelig sett på ytterkanten av disse cellene (Figur 23B). Det er vanskelig å stadfeste

at bakteriene er intracellulære i de nøytrofile granulocytterne, ettersom cellenes avgrensninger er utydelig.

Alle kontrollene var negative ved at ingen bakterier ble fluorescensmerket ved bruk av normalserum (Figur 23C), og ved at ingen leukocyttter ble fluorescensmerket av 4D11 (Figur 23D).



Figur 23. Adherente leukocyttter inkubert med bakterier i 3 timer. Leukocytterne er merket med MAb CO1 og E3D9 (grønt). Bakteriene er merket med kanin anti-*Francisella* (rødt). Cellekjernen er merket med DAPI (blått) **A)** B-celler merket med CO1, HNL. **B)** Nøytrofile granulocytter, merket med E3D9, PBL. **C)** Negativ kontroll, smittede PBL, inkubert med CO1 og normalserum. **D)** Negativ kontroll, smittede HNL, inkubert med kanin anti-*Francisella* og 4D11. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse, og behandlet i Adobe photoshop.

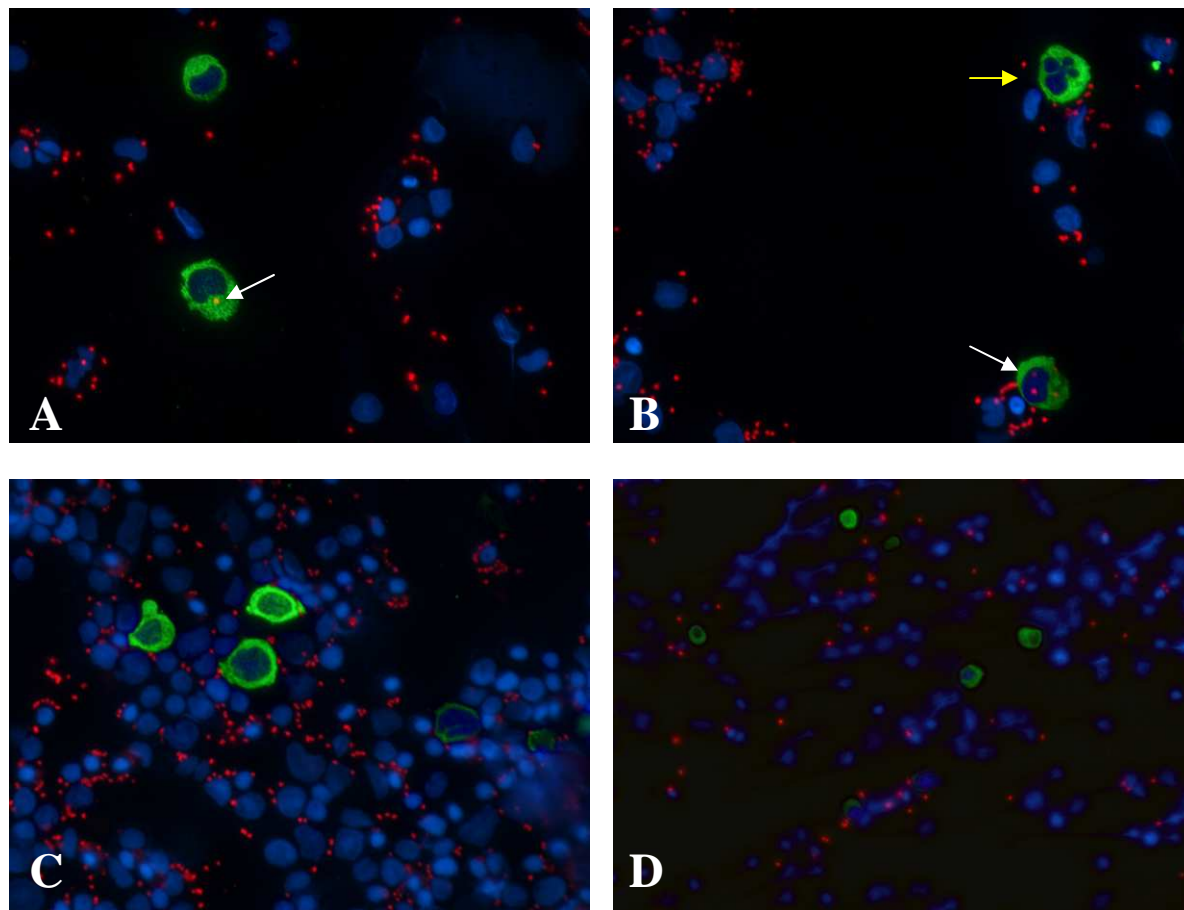
Cytospinpreparater av smittede B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter

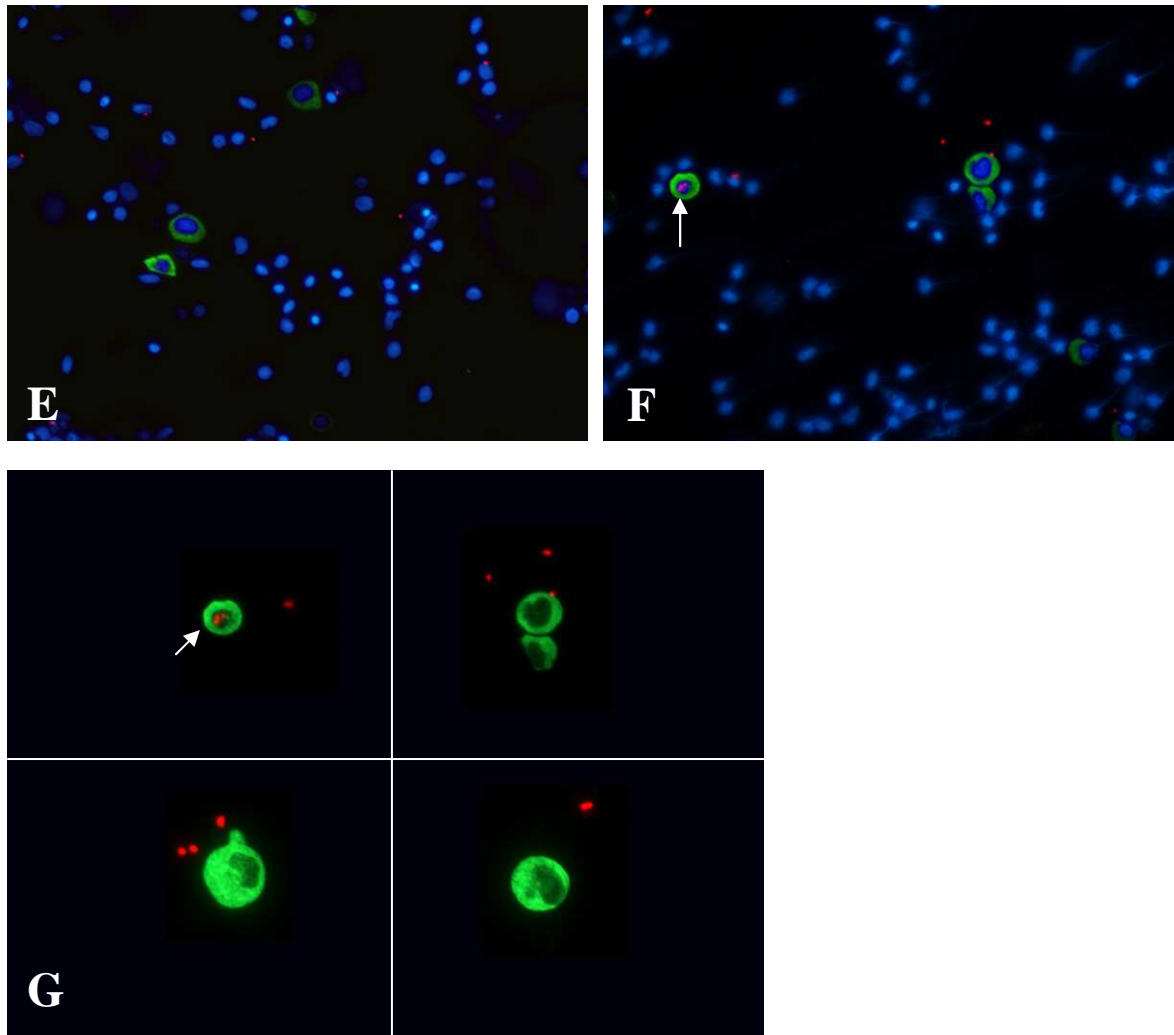
Det ble laget cytospinpreparater av adherente HNL og PBL som var smittet med *F. philomiragia subsp. noatunensis* i 3-5 timer ved 12 °C. Studier av adherente leukocyttter i fluorescensmikroskop viste at de få B-lymfocytterne som var tilstede, ikke inneholdt bakterier.

Cytospinpreparater ble også laget av leukocytter smittet i suspensjon. Da det var av stor interesse å undersøke om B-lymfocytterne inneholdt bakterier, ble det også laget cytospinpreparater av ML, som er vist å inneholde flest B-lymfocytter i torsk (Rønneseth *et al.*, 2007). Generelt ble det observert få bakterier i B-lymfocytterne, også i ML, men enkelte B-lymfocytter med bakterier ble funnet (Figur 24A, B, F, G). På Figur 24B vises også en B-lymfocytt med apoptotisk kjerne (markert med gul pil).

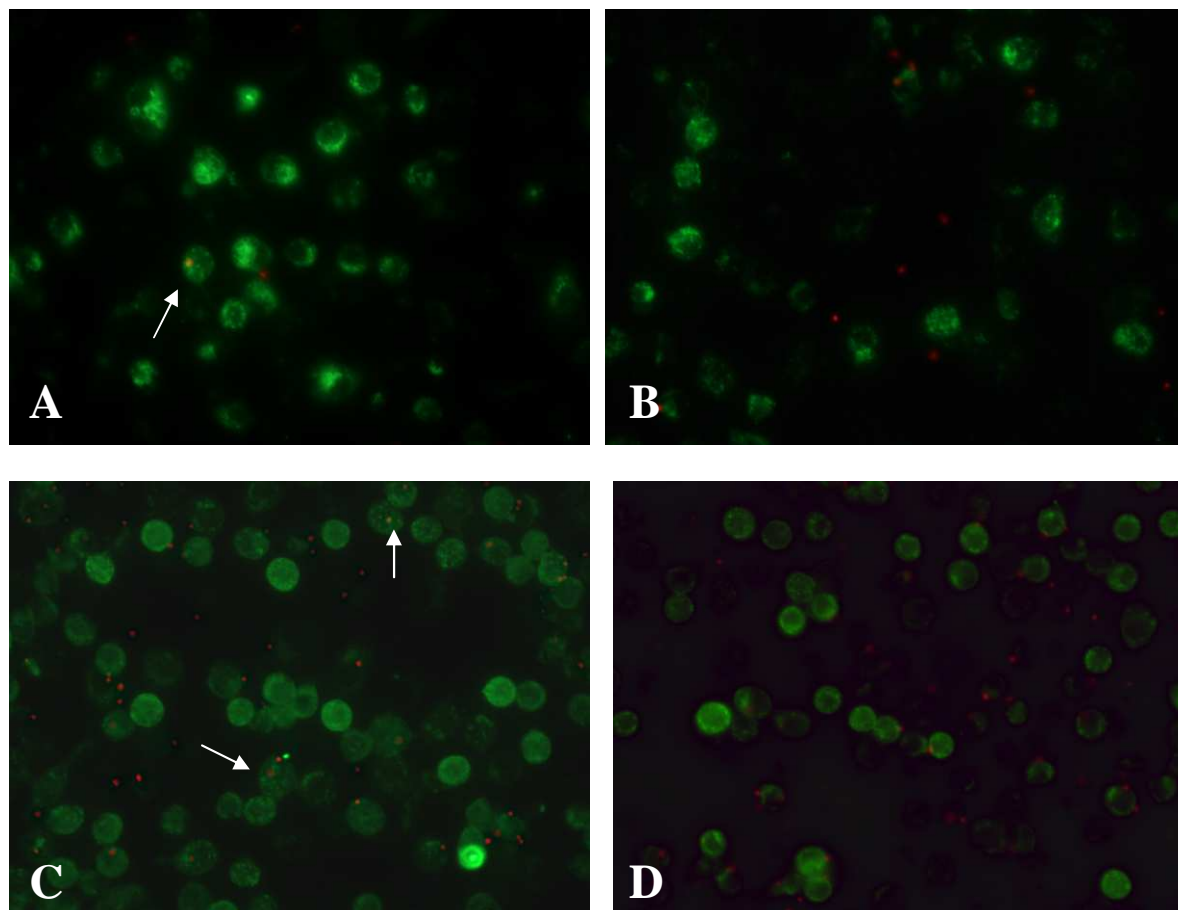
På preparater med E3D9 positive leukocytter ble bakterien sett i nær assosiasjon med cellene og befant seg i de fleste tilfeller på ytterkanten av disse. Det var likevel tydelig at noen av bakteriene forekom intracellulært i de nøytrofile granulocytterne (Figur 25A-D), og eksempler på celler med bakterier er markert med pil.

Kontrollene som bestod av den isotypiske kontrollen 4D11 samt normal kaninserum var negative.





Figur 24. Cytospinpreparater av smittede leukocytter, merket med MAb, CO1 mot B-lymfocytter (grønt). Bakteriene er merket med kanin anti-*Francisella* (rødt). Cellekjernene er merket med DAPI (blått). **A)** Adherente B-lymfocytter, PBL, 630x. **B)** B-lymfocytter fra hele leukocytt suspensjonen, PBL, 630x. **C)** Adherente B-lymfocytter, HNL, 630x. **D)** B-lymfocytter fra hele leukocytt suspensjonen, HNL. 400x. **E-F):** B-lymfocytter fra hele leukocytt suspensjonen, ML. 400x. **G)** B-lymfocytter fra hele leukocytt suspensjonen, ML. De to øverste bildene er tatt med 400x forstørrelse, og de to nederste er tatt med 630x forstørrelse. Hvite piler viser celler med intracellulære bakterier. Gul pil viser apoptotisk B-lymfocytt. Alle bildene er behandlet i Adobe photoshop.



Figur 25. Cytospinpreparater av smittede leukocytter, merket med MAb mot nøytrofile granulocytter (grønt) og bakteriene er merket med kanin anti-*Francisella* (rødt). **A-B:** PBL **C-D:** HNL. Pilene viser eksempler på leukocytter med intracellulære bakterier. Bildene er tatt ved 630x forstørrelse og behandlet i Adobe photoshop.

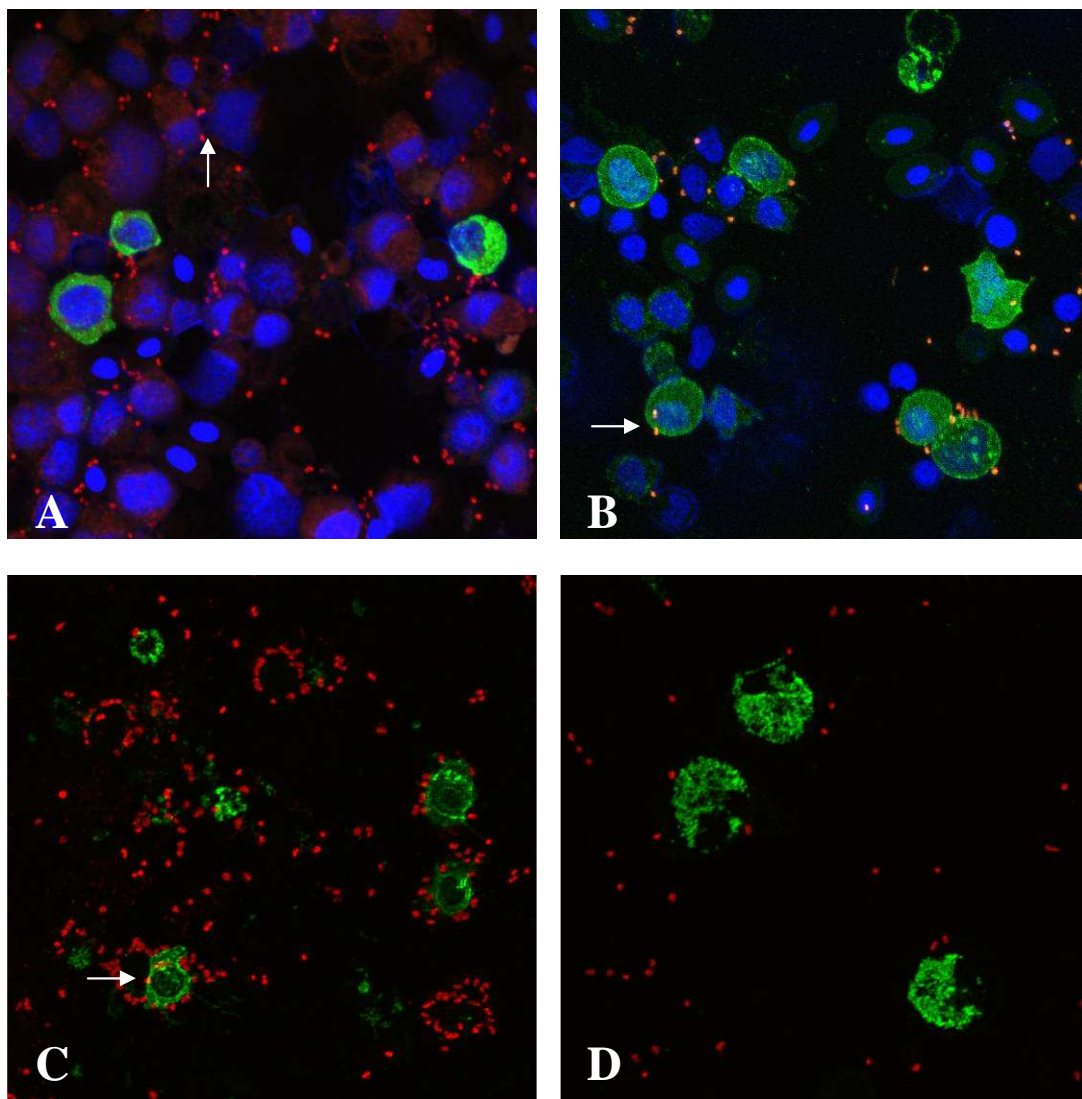
Konfokalmikroskopi av smittede B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter

Flest nøytrofile granulocytter ble observert i PBL. E3D9- positive leukocytter ble også observert i HNL, men svært få ble observert i ML. Det var få B-lymfocytter blant de adherente leukocytene, men flere B-lymfocytter ble funnet på cytospinpreparater av smittede leukocytter i løsning bestående av adherente og ikke-adherente celler. Generelt ble flere B-lymfocytter observert for HNL enn for PBL. Mest B-lymfocytter ble imidlertid funnet i ML.

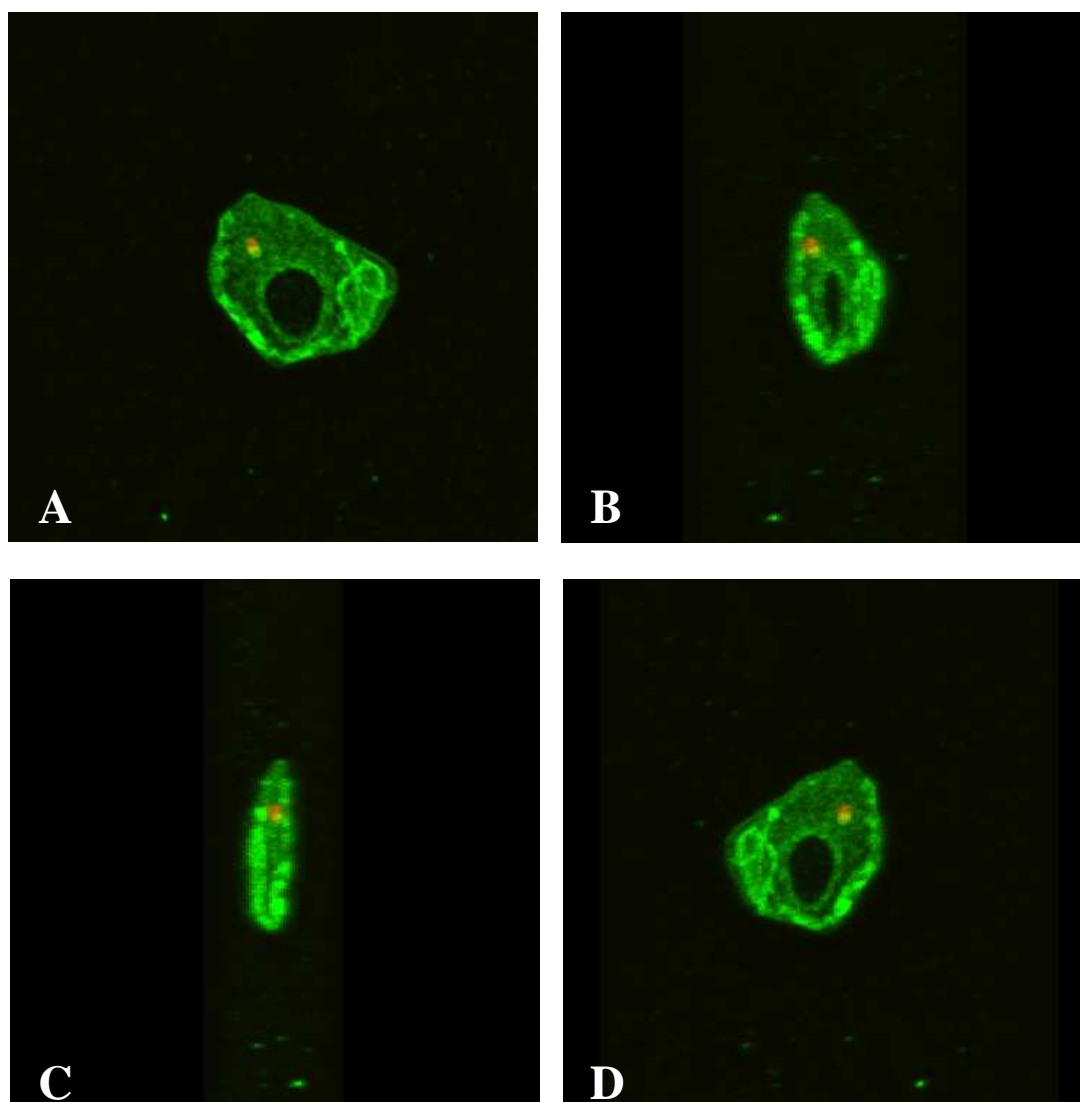
Størst mengde bakterier ble funnet på preparater med HNL, hvor de fleste bakteriene befant seg intracellulært. Dette ble blant annet sett ved at bakteriene lå i nær assosiasjon med DAPI-merkede kjerner av ellers umerkede leukocytter (markert med pil, Figur 26A). Det ble observert påfallende lite bakterier intracellulært i nøytrofile granulocytter, og ekstracellulære bakteriene ble ofte observert på cellenes overflate. Det høye bakterieantallet på Figur 26C gjør at det er vanskelig å fastslå om bakteriene er intracellulære eller om de ligger på

overflaten av de nøytrofile granulocytterne. Det kan imidlertid synes som at bakterier befinner seg intracellulært i minst én av disse cellene (markert med pil). På Figur 26B, ser det også ut som at bakterien befinner seg intracellulært i nøytrofile granulocytter i HNL (markert med pil).

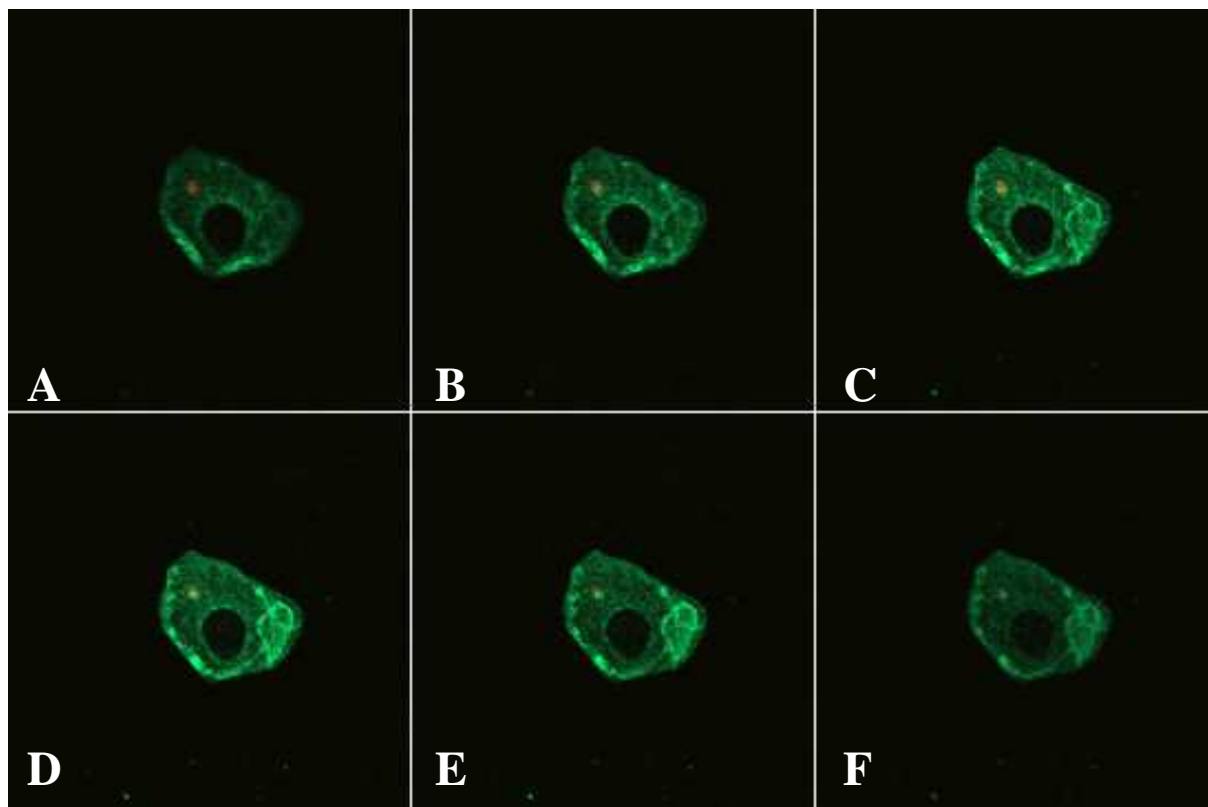
Det var få B-lymfocytter som inneholdt bakterier, og det var få bakterier per celle. Det tredimensjonale bildet i Figur 27 samt i snittserien som er vist i Figur 28, viser tydelig at det forekommer bakterier intracellulært i smittede B-lymfocytter.



Figur 26. Konfokalmikroskopibilder av smittede leukocytter. **A)** HNL (adherente) er merket med CO1 (grønt) og kanin anti-*Francisella* (rødt). **B)** HNL (adherente og ikke-adherente) er merket med E3D9 (grønt). **C)** PBL (adherente) merket med E3D9. **D)** PBL (adherente og ikke-adherente) merket med E3D9. Cellekjernene i C) og D) var dårlig merket og ble ikke tatt med. Pilene viser eksempler på celler med intracellulære bakterier. Alle bildene er behandlet i Adobe photoshop.



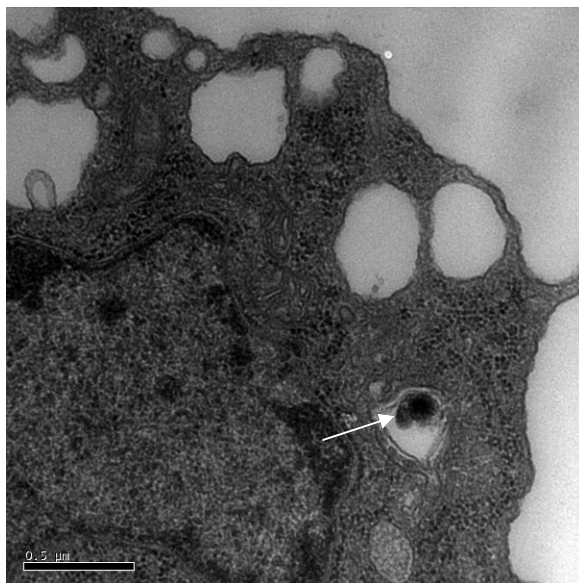
Figur 27. Tre-dimensjonalt bilde av en B-lymfocyt fra milt. Cellen vises fra forskjellige vinkler og viser tydelig at bakterien er intracellulær.



Figur 28. A-F: Serie av snitt gjennom en B-lymfocyt fra milt, som tydelig viser at bakterien er intracellulær.

3.9 Elektronmikroskopi (TEM)

Ved studier i TEM var det vanskelig å observere *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* intracellulært i leukocytene, men vi kunne anta at noen av de elektrontette strukturene som vi observerte var bakterier. Snittene av de smittede leukocytene på 60 nm, var muligens noe tykt. Flere forfattere rapporterte om elektronmikroskopi av snitt som var 40 nm ved evaluering av *F. tularensis* intracellulært i leukocytter. Ultrasnitt ble derfor laget uten at dette ga noe endret resultat. Figur 29 viser et representativt bilde fra TEM hvor det ble funnet en elektrontett struktur som kunne ligne bakterie.



Figur 29: Elektronmikroskopi av smittede HNL. I vakuolen kan man se en elektrontett struktur som kan ligne en bakterie (markert med pil). Det er imidlertid vanskelig å stadfeste hvorvidt det er en bakterie eller ikke. Tykkelsen på snittet var 60 nm.

3.10 Dyrkning av bakterier fra smittede adherente leukocytter

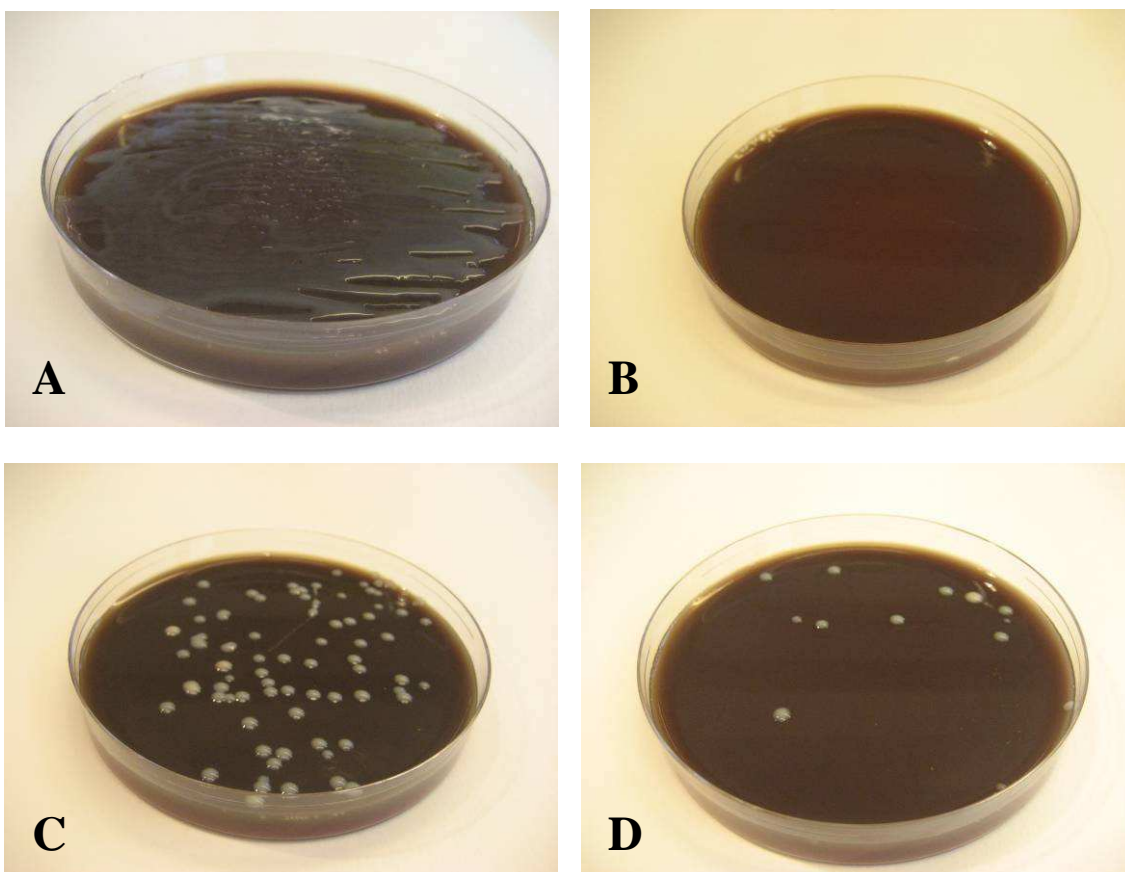
I det første forsøket som ble gjort ble suspensjoner av smittede, lyserte adherente leukocytter sådd ut på agar uten tilsatt ampicillin. I dette forsøket ble det utelukkende observert noen gule kolonier av en ukjent bakterie på agarskålene, noe som tyder på kontaminering ettersom kolonier av *Francisella* sp. kjennetegnes ved at de er typisk grå-hvite. Kontaminering forekom selv om det til enhver tid var arbeidet sterilt. På agarskåler som var inkubert med renkultur ble det kun observert kolonier av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, og det ble derfor antatt at kontamineringen forekom under isoleringsprosedyren.

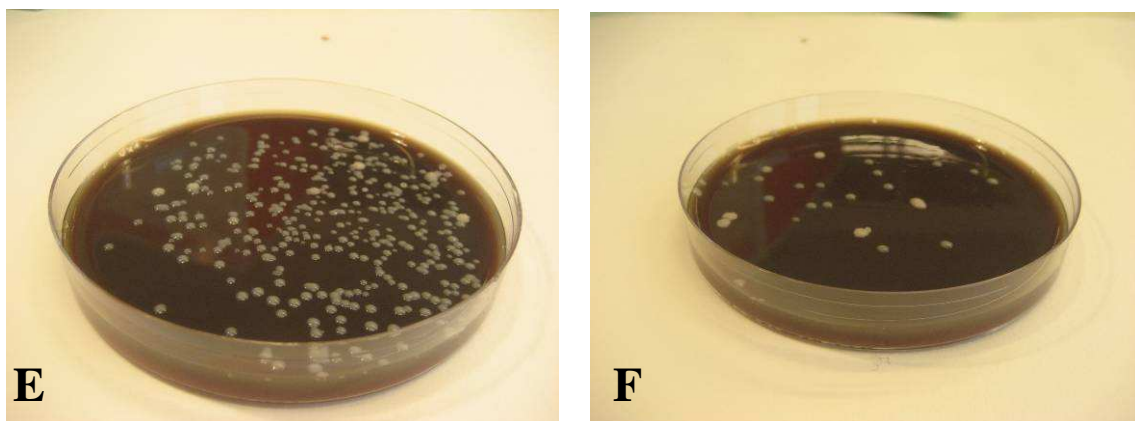
Det er kjent at *Francisella* sp. er en dårlig konkurrent som i de fleste tilfeller taper i konkurranse med andre bakterier. På bakgrunn av dette ble ampicillin tilsatt agarskålene og det samme forsøket ble gjentatt. Dette reduserte problemene med kontaminering, selv om det innimellom kunne observeres 1-2 gule kolonier av en ukjent bakterie på noen av agarskålene. Den ukjente bakterien kunne ikke observeres på agarskåler hvor det var sådd ut renkultur av *Francisella*.

Figur 30 viser representative resultater fra forsøket. På agarskåler med renkultur kan man se et tykt lag av bakterien over agaroverflaten (Figur 30A), mens på agarskåler hvor det var sådd ut suspensjon av smittede, lyserte leukocytter kan man se tydelige kolonier av *F.*

philomiragia subsp. *noatunensis* (Figur 30C-F). Det ble gjennomgående sett flere kolonier på agarskåler med smittede HNL sammenlignet med PBL. Ett unntak forekom imidlertid ved smitteeksponering i 6 timer, hvor noe flere kolonier ble observert i PBL. Det var imidlertid stor variasjon i antall CFU mellom de parallelle skålene.

Flest kolonier ble observert på agarer med lyserte HNL som var eksponert for bakterier i 24 timer. Det vokste også rikelig med bakterier på agarskåler hvor mediet med ekstracellulære bakterier var sådd ut etter endt smittetid. Bakteriene lå som et tykt lag over hele agaroverflaten, som er indikasjon på store mengder ekstracellulære bakterier. Smittede leukocytter som var inkubert med ulike konsentrasjoner av gentamicin (50 µg/ml, 100 µg/ml eller 150 µg/ml) i L-15 i forkant av lysering og utsåing på agar viste ingen kolonier.





Figur 30. Bakterier på cystein hjerte agar (CHA) med 5 % saueblod. **A)** Representativt bilde av agar hvor det var sådd ut ekstracellulære bakterier i L-15 medium som ble fjernet etter inkubering. **B)** Agar hvor det var sådd ut lyserte leukocytter etter inkubering i 2 timer med 50 µg/ml gentamicin i L-15 medium. **C)** Agar hvor det var sådd ut lyserte HNL etter smitte i 4 timer. **D)** Agar hvor det var sådd ut lyserte PBL etter smitte i 4 timer. **E)** Agar hvor det var sådd ut lyserte HNL etter smitte i 24 timer. **F)** Agar hvor det var sådd ut lyserte PBL etter smitte i 24 timer.

4.0 Diskusjon

Francisellose er i dag den viktigste sykdommen i oppdrett av Atlantisk torsk, og dens alvorlighetsgrad er bekymringsfull. Det er stort behov for økt kunnskap rundt bakteriens natur og virulensfaktorer. I likhet med flere andre intracellulære bakterier er det velkjent at flere *Francisella*-arter oppholder seg og formerer seg i fagocytiske celler hos pattedyr. Basert på fluorescensmerking med leukocyttspesifikke antistoffer i tillegg til antiserum mot bakteriene, ble det i dette studiet vist at *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* forekommer intracellulært i fagocytiske celletyper hos torsk. Forsøk som ble gjort videre i oppgaven indikerte dessuten at bakterien formerer seg i fagocytene. Dette kan være en sentral faktor i utviklingen av sykdommen.

Dyrkning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

Dyrkningsmediet og dyrkningsforholdene som ble benyttet var velegnet for kultivering av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. I smitteforsøkene skulle det anvendes bakterier som var seint i den eksponentielle vekstfasen, og en vekstkurve basert på målte OD_{600nm}-verdier ble derfor utarbeidet. Vekstkurven var reproducerbar ettersom flere forsøk viste nøyaktig samme vekstforløp, og ga en god oversikt over når bakteriene tidsmessig befant seg i de ulike vekstfasene. Etter den eksponentielle fase starter den stasjonære fase der næringsstoffene i dyrkningsmediet minker, og som følge av konkurranse kan det på dette tidspunkt befinne seg både levende og døde bakterier i mediet. Da det er viktig å bruke levende bakterier i smitteforsøk, ble *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* fra den eksponentielle fasen benyttet i disse forsøkene. Bakteriens overflatestrukturer og ekstracellulære produkter vil dermed være mer stabile mellom forsøk, og en slik prosedyre kan derfor styrke reproducerbarheten.

Ved utarbeidelse av vekstkurven og ved flere av forsøkene, ble bakteriekulturen sådd ut på cystein hjerte agar (CHA) med 5 % saueblod for å verifisere at kulturen ikke var kontaminert med andre bakterier. Agarskålene ble inkubert ved 20 °C, som er optimal temperatur ved dyrkning av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* *in vitro* (Ottem *et al.*, 2007b). *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er imidlertid en bakterie med sakte vekst og kolonier ble ofte ikke observert før etter 10-14 dager. Dyrkningen viste alltid renkultur av *F. philomiragia*

subsp. *noatunensis* uten andre bakterier til stede. I forbindelse med ett smitteforsøk hvor lyserte torsk leukocytt var platet ut på agar, ble det observert en ukjent bakterie og veksten av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* på CHA med 5 % saueblod var da fraværende eller lav. Det er kjent at *Francisella* er lite konkurransedyktig, og klarer seg dårlig i kombinasjon med andre bakterier (Mikalsen *et al.*, 2009). Ved å tilsette ampicillin (5 µg/ml) i agaren vil en kunne hemme oppvekst av andre bakterier i tilfeller hvor det kan være fare for at andre bakterier er til stede. Veksten av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* vil ikke affiseres ettersom denne bakterien er resistent mot mange typer antibiotika, inkludert ampicillin (Ottem *et al.*, 2007a).

På CHA med 5 % saueblod hvor det var sådd ut bakterieløsning med like OD_{600nm}-verdier fikk vi ikke reproducerbare antall CFU på agarskålene. Årsakene til dette er ukjent. En mulig årsak kan være at bakteriene aggregerer i større eller mindre grad, slik at kolonitallene varierer. Vanskelighetene med å få reproducerbare CFU medførte at konsentrasjonen av bakteriene som ble brukt i forsøkene ikke kunne estimeres. Dette er grunnen til at bakterieløsningen i stedet måles ved OD_{600nm}.

Antiserum mot *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

Ved produksjon av det polyklonale antiserumet kanin anti-*Francisella* er kaninen immunisert med hele bakterien. Kaninen kan da produsere spesifikke antistoffer mot flere bakteriekomponenter. Ved hjelp av Western blott og ELISA ble det verifisert at kanin anti-*Francisella* var svært reaktivt mot komponenter av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Immunoblottet viste særlig tre komponenter med sterk immunreaktivitet. Ved bruk av Western blott og ELISA ble det også vist at normalserumet fra kanin (Ø~472) ikke inneholdt spesifikke antistoffer mot *Francisella* og derfor var godt egnet som negativ kontroll i forsøkene.

Reaktiviteten av antiserum fra torsk mot *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* bør undersøkes i videre forsøk, da kanin og torsk kan vise ulike immunsvær. Schrøder *et al.*, (2008) fant at antiserum fra immunisert torsk viste sterk respons mot én *Francisella*-komponent på ca. 20-25 kDa. De viste også at et antiserum fra kanin var særlig reaktivt mot en komponent på ca. 20 kDa. Selv om figuren i artikkelen er litt utydelig, synes det likevel som at komponenten som er beskrevet er identisk med komponenten som vi observerte på ca. 25 kDa. I kontrast til forsøket som ble gjort i denne masteroppgaven fikk ikke Schrøder *et al.*, (2008) spesifikke bånd for de to andre komponentene, verken fra kanin-antiserum eller fra

torske-antiserum. I likhet med Schrøder *et al.*, (2008) kunne vi ikke observere sterke bånd for de reaktive komponentene ved proteinsølvfarging. De sterke båndene på Western blott kan derfor skyldes antistoff som reagerer med glykosylerte proteiner. Det ville vært interessant å karakterisere komponentene som ble funnet ved immunoblotting for å finne om de kan ha betydning for sykdomsutvikling og immunsvær. En komponent fra *F. victoria*, isolert fra tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) og som var sterkt immunogen i kanin, ble også vist å ha molekylvekt på ca. 20 kDa. Denne komponenten ble karakterisert som et lipooligosakkarid (Kay *et al.*, 2006). I en nylig publisert artikkel av Bönquist *et al.*, (2008) ble det rapportert at tre proteiner (23 kDa, 47 kDa, 59 kDa) som var vist ved immunoblott, var essensiell for overlevelse og replikasjon av *F. tularensis* LVS i makrofagene. I immunoblott med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* viste antiserumet fra kanin reaktivitet mot antigener i tilsvarende størrelsesorden. Det bør undersøkes om antiserum fra torsk har tilsvarende reaksjonsmønster.

Optimalisering av dyrkningsbetingelser for adherente leukocytter

Leukocytter ble inkubert i 1 og 2 døgn for å finne optimal inkuberingstid for god cellekvalitet og lite celleaggregering på preparater av dyrkede HNL og PBL. På preparater med dyrkede PBL ble det observert en rekke DAPI-fargede runde kjerner, samt celler som hadde rullet seg opp, ved inkuberingsperioder både i 1 og 2 døgn. De runde kjernene stammer trolig fra apoptotiske leukocytter. Apoptose er blant annet en viktig funksjon for å opprettholde homeostase og for immunomodulerende mekanismer (Frankenberg *et al.*, 2008), og kan sees ved kondensering av kjernen og cellekrymping (Squier *et al.*, 1995). Senere i prosessen kan fragmentering av kjernen observeres. Ved hjelp av kjernefarging ble disse karakteristikkene vist av Lai *et al.*, (2008), og hadde likhetstrekk med det som ble observert i dette studiet. Problemet med redusert cellekvalitet for PBL var gjennomgående ved alle forsøkene, og skyldes dermed ikke individforskjeller. Ingen lignende tendenser ble observert for HNL. Muligens er PBL mer sensitive ved isoleringsprosedyren og/eller stiller andre krav til inkuberingsbetingelsene. Nøytrofile granulocytter har kort levetid og det er vist at etter 48 timer i kultur, vil overlevelsen synke betraktelig (Secombes, 1996). Sørensen *et al.*, (1997) rapporterte at adherente granulocytter fra HNL hos torsk, rundet seg opp og løsnet i løpet av de første dagene i kultur. Den store mengden nøytrofile granulocytter (84 %) i torskeblod (Rønneseth *et al.*, 2007), gjør også at det er nærliggende å tro at de apoptotiske cellene er nøytrofile granulocytter. Men en kan ikke utelukke at andre celletyper i torskeblod går lett i

apoptose, og man vet heller ikke med sikkerhet om de nøytrofile granulocytterne har kort levetid i teleoster. I videre forsøk bør andre inkuberingsforhold utprøves, inkludert noe lavere temperaturer og/eller et kortere inkuberingstid, men risiko for dårlig cellespredning vil kunne være et dilemma. Steiro *et al.*, (1998) rapporterte at 4-6 °C var optimal temperatur ved kultivering av torskeleukocytter. Lave temperaturer ved inkubering med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er sannsynligvis lite gunstig da det er vist at veksten av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis in vitro*, er svært dårlig ved temperaturer under 10 °C (Ottem *et al.*, 2007b). Muligens bør inkuberingstemperaturen økes til 12 °C (temperatur brukt i smitteforsøkene i dette studiet) ved tilsetning av bakterier. Hvorvidt temperaturendringer fra 4-12 °C vil påvirke torskeleukocytterne er ukjent.

Merking av adherente leukocytter

Phalloidin og kanin anti-TO ble anvendt for merking av adherente leukocytter. Resultatene viste blant annet at phalloidin var velegnet for merking av cytoskjelettet i både HNL og PBL. Noen få kjerner uten cytoplasma kunne tyde på at noen leukocytter ikke ble merket av phalloidin, men muligens har disse cellenes cytoskjelett blitt vasket bort under merkeprosedyren. Ved studier i fluorescensmikroskop var aktintrådene tydeligere i leukocytter fra blod sammenlignet med leukocytter fra hodenyre.

Antiserumet kanin anti-TO har tidligere vært brukt til merking av lakseleukocytter (Sviland, 2008). Antistoffet fungerte også svært bra til fluorescensmerking av torskeleukocytter på bakgrunn av at felles epitoper forekommer i leukocytterne fra laks og torsk. I forhold til phalloidinmerkingen syntes det som at noe flere torskeleukocytter ble merket av ka-TO, og selv rundt de apoptotiske kjernene ble noe cellemateriale merket. Dette kan indikere at kanin anti-TO er reaktivt med en rekke cellekomponenter.

Det var mest hensiktsmessig å benytte phalloidin i videre smitteforsøk da kanin anti-TO er lite egnet til forsøk hvor det dobbeltmerkes med antiserumet kanin anti-*Francisella*. Dette er fordi konjugat spesifikk for kanin IgG kan reagere med begge antistoffene. Det finnes imidlertid prosedyrer for å dobbeltmerke med to antistoffer som er produsert i samme art, som for eksempel ved å direktemerke antistoffene med ulike fluorokrom. Denne metoden ville tidsmessig vært lite praktisk i forbindelse med forsøkene gjort i dette studiet.

Påvisning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i phalloidinmerkede leukocytter

Det er etter det vi kjenner til ikke publisert noen artikler der Alexa Fluor® 488 phalloidin er brukt til merking av torskeleukocytter. Imidlertid har McCarthy *et al.*, (2008) nylig publisert en artikkel der stoffet var benyttet til merking av aktin i lakseleukocytter ved smitteforsøk med den intracellulære bakterien *Piscirickettsia salmonis*.

Ved permeabilisering av cellemembranen vil antistoffer trenge inn i cellene og spesifikke antistoffer vil kunne binde seg til komponenter, som blant annet intracellulære bakterier (Rose *et al.*, 1991). Fluorescensmikroskop ble benyttet for å påvise og lokalisere fluorescensmerkede bakterier i leukocytterne. Det var likevel noe usikkert hvorvidt bakteriene var intracellulært i de leukocytterne, eller om de var festet til celleoverflaten. I forsøk der hensikten er å undersøke om bakteriene forekommer intracellulært er det svært viktig å skille intracellulære bakterier og bakterier som er festet til celleoverflaten. For å verifisere at bakteriene befant seg intracellulært ble preparatene undersøkt i konfokalmikroskop, der det ved snitting nedover i cellene var mulig å vise intracellulære bakterier i leukocytterne.

Studier av smittede HNL, både i fluorescensmikroskop og konfokalmikroskop, viste at en mengde bakterier befinner seg intracellulært. Forholdsvis mange leukocytter var infisert og få ekstracellulære bakterier ble observert. Ved studier i fluorescensmikroskop var tilstedeværelsen av bakterier i PBL overraskende lav. Ved bruk av konfokalmikroskop og snitting nedover i cellene ble det imidlertid stadfestet at flere bakterier var til stede intracellulært i PBL. Dette viser viktigheten av å ta i bruk flere verktøy ved analyser av intracellulære bakterier.

Makrofager er kjent for å være store, sterkt fagocytiske celler, og blir ansett som hovedvert for overlevelse og replikasjon av *Francisella* sp. Det var derfor overraskende at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ofte ble registrert i de minste leukocytterne i hodenyre. Bakteriene som ble påvist intracellulært i HNL lå som regel i ansamlinger, noe som kan antyde at bakteriene er avhengig av hverandres nærvær i cellen, men kan også skyldes andre egenskaper av bakterien. Quorum sensing, som er en form for bakteriekommunikasjon, kan heller ikke utelukkes. En slående observasjon var at bakteriene ofte ble funnet i nær assosiasjon med kjernen, og noen bakterier ble også registrert inne i kjernen. Det er ukjent hvilke konsekvenser dette medfører, men kan muligens føre til at cellens funksjoner endres. Det er vanskelig å si om de intracellulære bakteriene er levende eller døde, og markører eller gode metoder for å påvise levende bakterier ville vært verdifullt i denne sammenheng. Det

ville vært interessant å studere hvorvidt bakterienes beliggenhet i leukocytene endres over tid.

I PBL lå intracellulære bakterier noe spredt i cytoplasma. Også her ville det være interessant å observere endringer i bakterienes beliggenhet over tid. Ettersom det gjennomgående ble observert mange ekstracellulære bakterier på preparater av PBL ble det utført et smitteforsøk med lenger inkuberingstid (8 timer) av PBL og bakterier. Dette medførte tilsynelatende ikke økt andel av smittede leukocytter, men det syntes som at flere bakterier var til stede i hver av de smittede cellene. Det kan spekuleres om dette skyldes bakteriereplikasjon, ettersom det blant annet er vist at formering av *F. tularensis* i makrofager starter 4-24 timer etter at bakterien er tatt opp i cellen (Loeving *et al.*, 2006). Dersom en replikasjon har forekommet vil det forventes at cellene blir apoptotiske etter en tid (Sjöstedt, 2006). Muligens kan flow cytometri benyttes for å undersøke om replikasjon forekommer intracellulært, og eventuelt ved hvilket tidspunkt replikasjonen starter.

En fakultativ intracellulær bakterie, som *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, har evne til å vokse både intracellulært og ekstracellulært. Forestal *et al.*, (2007) fant at *F. tularensis* i blod fra infisert mus hadde en signifikant ekstracellulær fase ved at flertallet av bakteriene eksisterte i plasma istedenfor å oppholde seg i leukocytene. Ved en slik ekstracellulær fase kan man ikke utelukke at humoral immunitet utgjør en vesentlig rolle. Bakterien kan trolig nyttiggjøre seg av komponenter fra celler eller blod for å vokse og reproducere seg. Dersom *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har en slik evne kan dette være en viktig faktor for utviklingen av sykdommen.

Det kan være viktig å stadfeste om *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har kapsel, da denne kan bidra til intracellulær overlevelse (Dubreil *et al.*, 1990; Gutenberger, 1997). Forsøk hvor kapselen på *F. tularensis* er fjernet tyder på at bakterien blir mindre virulent (Nano & Elkins, 2006). I et forsøk med gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) utført av Arijo *et al.*, (1998), ble det funnet stor forskjell i makrofagers fagocytoseaktivitet der *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* uten kapsel ble fagocyttert i større grad sammenlignet med *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* med kapsel. Det ble likevel ikke funnet signifikante forskjeller i baktericidal aktivitet mot de to ulike stammene.

Torsken som ble brukt i forsøkene viste ingen tegn på infeksjon med bakterier. Antiserum mot *Francisella* påviste heller ingen bakterier ved merking av usmittede torskeleukocytter. Ved smitteforsøk er det av vesentlig betydning at bakteriene som brukes i forsøkene er levende. Ved smitteforsøkene i dette studiet ble det benyttet bakterier fra kultur som var i sein eksponentiell vekstfase, og det var svært god vekst på agar-skålene hvor

bakterieløsningen som ble benyttet i forsøket var platet ut. Dette viser at bakteriene var levende ved inkubering med leukocytene.

Påvisning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i ulike leukocytter ved bruk av MAb

Det finnes i dag MAb som er reaktive med nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter i torsk (Rønneseth *et al.*, 2007). Ettersom de fleste *Francisella* arter er rapportert å formere seg intracellulært i makrofager hadde det vært ønskelig med et monoklonalt antistoff mot makrofager og monocytter i torsk. Köllner *et al.*, (2001) beskrev et monoklonalt antistoff (MAb 45) mot makrofager og monocytter i regnbueørret. Dette antistoffet viste ingen kryssreaksjon med andre celletyper. MAb mot monocytter/makrofager i torsk er så langt vi kjenner til ikke beskrevet.

***Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i B-lymfocytter**

Det er noe uklart om B-lymfocytter fra fisk er adherente. Blant annet omtaler Li *et al.*, (2006) B-lymfocytter fra ørret som celler med ikke-adherente egenskaper. I smitteforsøkene med merking av adherente torskeleukocytter i brønner og på cytopspinpreparat ble det observert lite B-lymfocytter både fra hodenyre og blod. Videre ble få av disse adherente B-lymfocytene observert i assosiasjon med bakterier, og det var dessuten usikkert hvorvidt bakterier befant seg inne i eller utenpå cellen. For å kunne fastslå om B-lymfocytene inneholdt bakterier, ble det besluttet å lage cytopspinpreparater fra smittede leukocytter i suspensjon for å få med flere B-lymfocytter. Ved å sentrifugere løsningen med smittede leukocytter over en BSA matte ble de fleste ekstracellulære bakterier fjernet. Dette ga et forbedret resultat som gjorde det enklere å skille mellom de gjenværende intracellulære og ekstracellulære bakteriene. Særlig mange B-lymfocytter ble funnet i milt, som samsvarer med forsøket gjort av Rønneseth *et al.*, (2007). Preparatene ble undersøkt både i fluorescens- og konfokalmikroskop og viste lite bakterier i assosiasjon med B-lymfocytter, men det var tydelig forekomst av intracellulære bakterier i noen av dem. I kontrast til det som ble sett ved konfokalmikroskopi av phalloidin-fargede adherente leukocytter, hvor flere bakterier lå i nærheten av hverandre i samme celle, var det interessant at *Francisella*-positive B-lymfocytter ikke inneholdt mer enn 1-2 bakterier.

Infeksjon med intracellulære bakterier i B-lymfocytter er lite studert og få artikler er publisert (Krocova *et al.*, 2008). Det er etter det vi kjenner til ikke publisert noen artikler som

omhandler *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i B-lymfocytter hos torsk. Nylig er det publisert en artikkel hvor Krocova *et al.*, (2008) fant at *F. tularensis* adhererer til og invaderer B-lymfocyt-cellelinjer fra både mus og mennesker, og der over 20 % av B-lymfocytene var infisert. De samme forfatterne fant videre at det for det meste var én og aldri mer enn to bakterier i hver B-celle. Dette samsvarer med det som ble observert for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i B-lymfocytter hos torsk i dette studiet. Krocova *et al.*, (2008) observerte også apoptotiske B-lymfocytter i flere cellelinjer som var smittet med levende bakterier. Apoptotiske B-lymfocytter ble ikke observert ved smitte med døde bakterier, og det kan derved stilles spørsmål om apoptose av B-lymfocytter skyldes formering av bakteriene slik det er beskrevet for livssyklusen til *F. tularensis* i makrofager (se Figur 5). Imidlertid kan apoptose være forårsaket av flere alternative forhold som intracellulær signalisering fra nærliggende vertsceller, sekretede proteiner eller andre bakterielle komponenter (Krocova *et al.*, 2008). I ett av preparatene der forekomst av bakterier i B-lymfocytter ble studert i fluorescensmikroskop, ble det observert en apoptotisk kjerne i en B-lymfocyt. Dette kunne stadfestes ved at B-lymfocytter i utgangspunktet ikke har polymorfonukleær kjerne. Ettersom cellen ikke var dyrket på en overflate var den for ”tynn” til at den kunne snittes gjennom ved konfokalmikroskopi. Det hadde imidlertid vært interessant å få bekreftet om denne B-lymfocytten inneholdt intracellulære bakterier. Det er indikasjoner på at B-lymfocytter hos torsk kan være profesjonelle fagocytter (Øverland *et al.*, 2009, manuskript), noe som bør tas i betraktning da det er mulig at disse cellene fagocytterer bakterien. Dersom B-cellene infiseres ved sykdom vil trolig en vaksine mot sykdommen ha begrenset effekt.

Hvilke konsekvenser intracellulære bakterier kan medføre for B-lymfocytene er lite studert. Det er imidlertid vist at bakterier i B-lymfocytter kan være svært alvorlig. Ved eksponering for den intracellulære bakterien, *Listeria monocytogenes*, ble humane B-lymfocytter påvirket i form av tap av overflatemolekyler, celledvelling, poredannelse, membran ødeleggelse og apoptose (Menon *et al.*, 2003).

Det kan ikke utelukkes at noen av de CO1 positive cellene er plasmaceller ettersom plasmacellene er IgM-positive. Ved permeabilisering vil antistoffet kunne trenge inn og på denne måten også merke plasmacellene. Plasmaceller er ikke vist å ha fagocytterende aktivitet, og det er derfor mulig at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har evne til å infisere disse cellene.

***Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i nøytrofile granulocytter**

Flest nøytrofile granulocytter ble funnet i PBL, og svært få ble funnet i ML. Dette samsvarer med det som ble beskrevet av Rønneseth *et al.*, (2007). Det ble funnet intracellulære bakterier i nøytrofile granulocytter både fra hodenyre og blod, men bare en liten andel av cellene inneholdt bakterier. I likhet med *Francisella*-positive B-lymfocytter ble det sjelden observert mer enn 1-2 bakterier i hver av de nøytrofile granulocyttene. En rekke bakterier ble imidlertid observert i nær assosiasjon med de nøytrofile granulocyttene ved at de befant seg på celleoverflaten. Dette ble observert uavhengig av inkuberingstid for leukocytter og bakterier, og lenger inkuberingstid økte ikke forekomsten av bakterier i leukocyttene. Hvilke faktorer som gjør at bakteriene adhererer til celleoverflaten av nøytrofile granulocytter er foreløpig ukjent.

Flere obligate og fakultativ intracellulære bakterier, er rapportert å overleve og reprodusere seg i nøytrofile granulocytter (Laskay *et al.*, 2008), og det er vist at *F. tularensis* også har en slik evne. På samme måte som for B-lymfocytter kan tilstedeværelsen av bakterier i nøytrofile granulocytter indikere at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* infiserer disse cellene. På bakgrunn av den lave prevalensen av bakterier i B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter er disse celletypene sannsynligvis ikke primære vertsceller for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Kun ett patogen (*Anaplasma phagocytophilum*) er per i dag rapportert å ha nøytrofile granulocytter som hovedvertscelle (Laskay *et al.*, 2008).

Forekomst av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i andre celletyper

Dette studiet viser at nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter hos torsk ikke hovedvertsceller for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Observasjon av bakterieansamlinger i andre adherente leukocytter, sett ved phalloidinmerking, viser at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har preferanse for andre celletyper. Fra pattedyr er det kjent at *Francisella* sp. hovedsakelig oppholder seg i mononukleære fagocytter, og muligens gjelder dette også for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* hos torsk. Det er velkjent at monocytter og makrofager fra teleoster har sterke adhereringsegenskaper (Sørensen *et al.*, 1997), og det er dessuten rapportert om store mengder makrofager i hodenyre (Verburg-Van Kemanade *et al.*, 1994). Ved phalloidinmerking ble det observert høy forekomst av intracellulære bakterier i HNL, og det er derfor sterke indikasjoner på at makrofagene er hovedvertscelle for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Det kan også være sannsynlig at intracellulære bakterier i PBL forekommer i monocytter. På grunn av mangel på spesifikke markører, er det imidlertid ikke

mulig å fastslå med sikkerhet om det er makrofager og monocytter som er hovedsete for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*.

Ved hjelp av TEM karakteriserte Sørensen *et al.*, (1997) hodenyremakrofager fra torsk, og viste at det er mulig å morfologisk differensiere makrofagene fra andre celler. Dette fordi makrofagene inneholder få granuler, og har mange vakuoler til stede i cytoplasma. I et smitteforsøk som ble utført i forbindelse med denne oppgaven ble TEM benyttet for å observere bakterien intracellulært i adherente leukocytter fra hodenyre. Flere av cellene lignet makrofager i henhold til morfologiske karakteristikk som beskrevet av Sørensen *et al.*, (1997). Det var imidlertid vanskelig å observere bakterier i disse cellene. På bakgrunn av det som ble observert i konfokalmikroskop skal det være høy forekomst av intracellulære bakterier i adherente HNL, særlig etter smitte i 4 timer, og det er mulig at størrelsen på snittene ikke var optimale for å se bakteriene. En metode som innebærer gullmerking av antistoff mot bakteriene ville trolig gjort det enklere å lokalisere bakteriene i cellene.

Det er kjent at fiskens fagocytter, særlig makrofager, spiller en essensiell rolle i forsvaret mot bakterielle infeksjoner. Olivier *et al.*, demonstrerte i 1985 ved *in vivo* forsøk at fisk med redusert eller blokkert fagocytffunksjon hadde betydelig redusert sykdomsresistens mot bakterier. På bakgrunn av at makrofagene har lang levetid, kan de muligens utgjøre en biologisk nisje som tilrettelegger forholdene for utviklingen av subakutt eller kronisk infeksjon som videre forbindes med granulomdannelse (Nauciel, 1999).

En flow cytometri metode er påbegynt for å beregne antall leukocytter med intracellulære bakterier, både fra hele celleduspensjoner og distinkte celletyper. I denne sammenheng ville det vært interessant å undersøke eventuelle endringer i smittede leukocytter fra både *in vitro* og *in vivo* forsøk ved økende temperaturer, ettersom det rapporteres om flest sykdomsutbrudd ved høyere sjøtemperaturer.

***Francisellas* vei inn i vertscellene**

Forsøk med TEM ble gjort for å observere eventuelt opptak av bakterien i leukocytene. Å definere prosessen for opptak kan være viktig i forståelsen av bakteriens virulensmekanismer. Adherente HNL ble inkubert i 1-4 timer før fiksering, og ettersom fagocytose ikke ble observert er det mulig at den inntreffer på et tidligere tidspunkt. Dette bør tas i betraktning i videre studier av bakteriens opptaksmekanismer. Det er vist at *F. tularensis* blir tatt opp i makrofager ved såkalt "looping fagocytose" (Clemens *et al.*, 2005). Fagocytose kan derfor være en mekanisme som bakteriene utnytter for å komme seg inn i cellen.

Clemens & Horwitz (2007) beskrev et forsøk hvor opsoniserte *F. tularensis* bakterier og humane makrofager ble blandet ved 4 °C og sentrifugert for å øke kontakten mellom bakteriene og cellene. Videre ble makrofag-bakterie komplekset varmet til 37 °C i 3-5 minutter for å initiere fagocytose før de til slutt ble fiksert for TEM. En slik oppvarming er ikke mulig for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i torskelleukocytter da denne temperaturen vil være høy for både bakterier og torskeceller. Det kunne likevel vært interessant å undersøke om fagocytose av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* forekommer ved temperaturer over 12 °C. Lite er kjent om cellenes kvalitet ved høyere temperaturer, men da det om sommeren kan komme opp i temperaturer på over 18 °C i sjøen, er det grunnlag for å tro at torskelleukocytterne tåler 3-5 minutter oppvarming til 20-22 °C som er optimal temperatur for dyrkning av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* *in vitro*.

I TEM forsøket som ble utført i forbindelse med dette studiet kunne ikke fagocytose observeres. Scanning elektron mikroskop (SEM) bør benyttes i videre forsøk, da det er mulighet for at det er enklere å observere en eventuell fagocytose, samt bakterier som adherer til celleoverflaten. Opsonisering av partikler øker adheransen til makrofager (Rose & Levine, 1992; Matsuyama *et al.*, 1992). Trolig kan det være en fordel å opsonisere *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i forkant av smitteforsøkene, da flere forfattere har rapportert at opsonisering med komplement faktorer øker opptak av *F. tularensis* (McCaffrey & Allen, 2006; Clemens & Horwitz, 2007).

Laskay *et al.*, (2008) beskrev at flere patogener entrer makrofager som følge av makrofagenes opptak av apoptotiske nøytrofile granulocytter. Det kan derved tenkes at nøytrofile granulocytter kun er en mellomvert, og at makrofagene er en sluttvert, da bakteriene overlever og reproducerer seg i makrofagene. Det er ikke kjent om *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* benytter en slik mekanisme for å komme inn i makrofagene. I forbindelse med dette studiet kunne observasjonen av få nøytrofile granulocytter med intracellulære bakterier antyde at denne mekanismen ikke er vanlig for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*.

Dyrkning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* fra smittede adherente leukocytter

Til dyrkningsforsøkene av bakterier fra infiserte torskelleukocytter ble det benyttet CHA med 5 % saueblod som også var tilsatt ampicillin (5 µg/ml), da det kan være fare for kontaminering ved uttak og isolering av leukocytter fra torsk. Ved utplatinger av lyserte HNL

og PBL, på forhånd smittet i 5 timer med en suspensjon av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, viste resultatene tydelige forskjeller mellom smittede HNL og PBL. Det ble observert betraktelig flere CFU fra lyserte HNL som var sådd ut på agar sammenlignet med PBL. Eventuelle feilkilder bør likevel taes til betraktning, som blant annet at gjenværende ekstracellulære bakterier fra smittediet ikke var vasket godt nok bort før leukocytene ble lysert og derfor fremdeles var i nær assosiasjon med cellene. Dersom CFU stammer fra intracellulære bakterier som ble frigitt ved lysering av leukocytene, samsvarer resultatene imidlertid med det som ble funnet ved konfokalmikroskopi, hvor HNL inneholdt flest intracellulære bakterier.

De få koloniene som vokste fra lyserte PBL kan også tyde på at dette var intracellulære bakterier, og at de ekstracellulære bakteriene ble fjernet ved vask. Dette samsvarer også med det som ble sett ved fluorescensmerking, hvor det ble funnet få bakterier i PBL. Dersom de ekstracellulære bakteriene i PBL ikke var vasket bort ville en forventet et høyere antall CFU, ettersom det sammenlignet med HNL var betraktelig flere ekstracellulære bakterier i PBL.

Det er stor sannsynlighet for at de intracellulære bakteriene også kan reproducere seg i leukocytene. Man kan spekulere i om dette er årsaken til at så mange flere CFU ble observert i HNL ved smitte i 24 timer. Dersom de intracellulære bakteriene var effektivt drept av leukocytene ville det ikke vokst bakteriekolonier på agarskålene. Det er sannsynlig at *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* formerer seg intracellulært i immuncellene, da dette er i samsvar med publiserte artikler av andre *Francisella* arter.

I forsøket som ble gjort med tilsetning og inkubering i 2 timer med ulike fortyninger av gentamicin (50 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml og 150 µg/ml) for å drepe ekstracellulære bakterier, kunne ingen bakterievekst observeres etter lysering av smittede celler. Dette ble observert selv ved tilsetning av L-15 med gentamicin (50 µg/ml), noe som ikke var forventet da det tidligere har vært god vekst av bakteriene ved tilsetning av L-15 med gentamicin. Den høye konsentrasjonen av gentamicin kan ha resultert i at både ekstracellulære og intracellulære bakterier ble drept. En annen årsak kan være at gentamicinen ikke ble vasket godt nok ut av brønnene, og at det fremdeles var noe igjen da de lyserte leukocytene ble sådd ut, som videre hemmet veksten av bakteriene på agarskålene. På grunn av flere mulige feilkilder og usikkerhet i resultatene, samt at tidsbegrensninger gjorde at gentamicinforsøket kun ble utført en gang, bør flere forsøk utføres for å verifisere det som ble observert.

Konklusjon og fremtidsperspektiver:

Fagocytiske leukocytter som monocytter/makrofager, nøytrofile granulocytter og B-lymfocytter er sentrale for medfødt immunrespons mot invaderende bakterier hos teleoster. I forbindelse med forsøkene som er gjort i denne masteroppgaven var det flere forhold som tydet på at *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* har preferanse for makrofager hos torsk. Blant annet viste resultatene av fluorescensmikroskopi at adherente HNL inneholdt svært mange bakterier etter smitteforsøk. Dette støttes også av at andre *Francisella*-arter har makrofager som målceller. Et spesifikt antistoff mot torskemakrofager ville gjort det mulig å fastslå om monocytter/makrofager er hovedsete for bakteriene.

Ved dobbeltmerking av B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter med spesifikke MAb og antiserum mot bakterien var det klart at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* forekom intracellulært i disse celletypene. Disse celletypene var trolig ikke primære vertsceller for bakteriene da forekomsten av smittede B-lymfocytter og nøytrofile granulocytter var svært lav. I tillegg var det kun 1-2 bakterier intracellulært i disse cellene.

Om det er bakteriene som infiserer leukocytene eller om det er cellene som fagocytterer bakteriene som en del av sin forsvarsmekanisme er foreløpig ukjent. Det bør derfor gjøres videre studier for å fastslå opptaksmekanismen for *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i leukocytene.

Arbeid er påbegynt for å etablere protokoll for mer nøyaktig beregning av antall *Francisella*-infiserte torskeceller ved hjelp av flow cytometri. Sammenlignet med andre metoder hvor bakteriene telles på mikroskoppreparat, er flow cytometri en meget hurtig og presis metode, som gjør det mulig å analysere intracellulære bakterier i et stort antall celler over et kort tidsrom.

På bakgrunn av den konserverte mekanismen for patogenese som er rapportert for slekten *Francisella*, er det mulig at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har lignende livssyklus i de fagocytiske cellene hos torsk. Flere forsøk bør gjøres for å verifisere intracellulær replikasjon i torskens fagocytiske celler. Forståelse av bakteriens livssyklus, samt cellulære og molekylære mekanismer med hensyn på intracellulær overlevelse, er svært avgjørende for hvordan en kan bekjempe eller forebygge sykdommen. Videre bør en undersøke om bakterien kan ha en kapsel da dette kan ha betydning for bakteriens virulens og vertens immunrespons.

Det er generelt behov for bedre forståelse av torskens kompliserte immunforsvar for at torsk i oppdrett skal oppnå god helse ved bruk av hensiktsmessig immunprofylakse. Lite er

kjent om variasjoner i torskens immunrespons ved ulike vanntemperaturer. Det er mulig at høye vanntemperaturer sammen med andre faktorer kan bidra til at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* forårsaker persistent infeksjon i torsk. Interaksjoner mellom *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* og immunceller bør undersøkes ved ulike temperaturer både i *in vitro* og *in vivo* forsøk.

5.0 Referanser

Aderem,A., Underhill,D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual Review of Immunology 17, 593-623.

Afonso,A., Silva,J., Lousada,S., Ellis,A.E., Silva,M.T., 1998. Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology 8, 319-338.

Akira,S., Uematsu,S., Takeuchi,O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124, 783-801.

Allen,L.A.H., 2003. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. Microbes and Infection 5, 1329-1335.

Allen,L.A.H., Aderem,A., 1996. Mechanisms of phagocytosis. Current Opinion in Immunology 8, 36-40.

Arijo, S., Borrego, J.J., Zorilla, I., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 1998. Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* in the protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Spaus aurata*, L) macrophages. Fish & Shellfish Immunology 8, 63-72.

Beutler,B., 2004. Innate immunity: an overview. Molecular Immunology 40, 845-859.

Birkbeck,T.H., Bordevik,M., Frøystad,M.K., Baklien,A., 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. Journal of Fish Diseases 30, 505-507.

Boes,M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Molecular Immunology 37, 1141-1149.

Bogen,B.,Munthe,L.A., 2002. Immunologi. Universitetsforlaget.

- Bosio,C.M., Elkins,K.L., 2001. Susceptibility to secondary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection in B-cell-deficient mice is associated with neutrophilia but not with defects in specific T-cell-mediated immunity. *Infection and Immunity* 69, 194-203.
- Bönquist,L., Lindgren,H., Golovliov,I., Guinea,T., Sjöstedt,A., 2008. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine. *Infection and Immunity* 76, 3502-3510.
- Cascadevall,A., 2008. Evolution of Intracellular Pathogens. *Annual Review of Microbiology* 62, 19-33.
- Chen,S.C., Wang,P.C., Tung,M.C., Thompson,K.D., Adams,A., 2000. A *Piscirickettsia salmonis*-like organism in grouper, *Epinephelus melastigma*, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 23, 415-418.
- Clemens,D.L., Horwitz,M.A., 2007. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Francisella tularensis: Biology, Pathogenesis, Epidemiology, and Biodefence* 1105, 160-186.
- Clemens,D.L., Lee,B.Y., Horwitz,M.A., 2005. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infection and Immunity* 73, 5892-5902.
- Clemens D.L, Lee B.Y, Horwitz M.A., 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infection & Immunity* 72, 3204-3217.
- Cowley,S.C., Elkins,K.L., 2003. CD4(+) T cells mediate IFN-gamma-independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 171, 4689-4699.
- Cuesta,A., Esteban,M.A., Meseguer,J., 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology* 43, 1275-1285.

- Dalmo,R.A., Ingebrigtsen,K., Bogwald,J., 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20, 241-273.
- Dramsi,S., Cossart,P., 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 137-166.
- Dubreil,J.D., Lallier,R., Jacques,M., 1990. Immunoelectron microscopic demonstration that *Renibacterium salmoninarum* is encapsulated. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 313-316.
- Elkins,K.L., Cowley,S.C., Bosio,C.M., 2007. Innate & adaptive immunity to *Francisella*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105, 284-324.
- Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M., 2003. Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infection* 5, 135-142.
- Ellis,A.E., 2006. The immunological defence mechanisms of fish against bacteria and viruses. In: *Fish and Shellfish Immunology, An Introduction*. Editors Swain P., Sahoo, P.K, and Ayyappan S. Dehli: Narendra Publishing House, 37-46.
- Ellis,A.E.,2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827-839.
- Ellis,A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 291-308.
- Ellis,A.E., 1977. The leucocytes of fish, a review. *Journal of fish biology* 11, 453-491.
- Espelid,S., Rødseth,O.M, Jørgensen,T.Ø., 1991. Vaccination experiments and studies of the humoral immune response in cod, *Gadus morhua* L., to four strains of monoclonal-defined *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* 14, 185-97

- Ernst,R.K., Guina,T., Miller,S.I., 1999. How intracellular bacteria survive: Surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *Journal of Infectious Diseases* 179, S326-S330.
- Esteban,M.A., Meseguer,J., 2006. Phagocytosis in teleosts. In: *Fish and Shellfish Immunology, An Introduction*. Editors Swain P., Sahoo, P.K, and Ayyappan S. Dehli: Narendra Publishing House, 37-46.
- Evelyn,T.P.T., 1996. Infection and disease. Fra Iwama G, Nakanishi, T (redaktører). *The fish immune system; organism, pathogen and environment*: Academic Press, 339-358.
- Finlay,B.B., McFadden,G., 2006. Anti-Immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124, 767-782.
- Fischer,U., Utke,K., Somamoto,T., Kollner,B., Ototake,M., Nakanishi,T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 209-226.
- Forestal,C.A., Malik,M., Catlett,S.V., Savitt,A.G., Benach,J.L., Sellati,T.J., Furie,M.B., 2007. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice. *Journal of Infectious Diseases* 196, 134-137.
- Fukuda,Y., Okamura,A., Nishiyama,M., Kawakami,H., Kamaishi,T., Yoshinaga,T., 2000. Granulomatosis of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by an intracellular bacterium. *Fish Pathology* 37, 119-124.
- Frankenberg,T., Kirschnek,S., Hacker,H., Hacker,G., 2008. Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria. *European Journal of Immunology* 38, 204-215.
- Goebel,W., Kuhn,M., 2000. Bacterial replication in the host cell cytosol. *Current Opinion in Microbiology* 3, 49-53.
- Goldsby,R.A., Kindt,T.J., Osborne,B.A., Kuby,J., 2003. *Immunology*. Fifth Edition. New York: W. H. Freeman and Company.

- Golovliov,I., Baranov,V., Krocova,Z., Sjöstedt,A., 2003. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infection & Immunity* 71, 5940-5950.
- Gomez,G.D., Balcazar,J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 52, 145-154.
- Gonzalez,R., Charlemagne,J., Mahana,W., Avrameas,S., 1988. Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. *Immunology* 63, 31-6.
- Grayson,T.H., Cooper,L.F., Wrathmell,A.B., Roper,J., Evenden,A.J., Gilpin,M.L., 2002. Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology* 106, 273-283.
- Gutenberger,S.K., Duimstra,J.R., Rohovec,J.S., Fryer,J.L., 1997. Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. *Diseases of Aquatic Organisms* 28, 93-106.
- Halling-Brown,M., Sansom,C.E., Davies,M., Titball,R.W., Moss,D.S., 2008. Are bacterial vaccine antigens T-cell epitope depleted? *Trends in Immunology* 29, 374-379.
- Hamdani,S.H., McMillan,D.N., Pettersen,E.F., Wergeland,H.I., Endresen,C., Ellis,A.E., Secombes, C.J. 1998. Isolation of rainbow trout neutrophils with an anti granulocyte monoclonal antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63, 369-380.
- Hampton,M.B., Kettle,A.J., Winterbourn,C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Hardie,L.J., Fletcher,T.C., Secombes,C.J., 1994. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 57-66.
- Hellberg,H., Mikalsen,J., Colquhoun,D., Hansen,H., Bornø,G., Nilsen,A., 2008. Helsestatusjonen hos marin fisk 2008. I Fiskehelse rapporten 2008. Veterinærinstituttet.

Hsieh,C.Y., Tung,M.C., Tu,C., Chang,C.D., Tsai,S.S., 2006. Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture* 254, 129-138.

Hornef,M.W., Wick,M.J., Rhen,M., Normark,S., 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* 3, 1033-1040.

Iliev,D.B., Liarte,C.Q., MacKenzie,S., Goetz,F.W., 2005. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. *Molecular Immunology* 42, 1215-1223.

Israelsson,O., Petersson,A., Bengten,E., Wiersma,E.J., Andersson,J., Gezelius,G., Pilstrom,L., 1991. Immunoglobulin concentration in Atlantic Cod, *Gadus-Morhua* L, serum and cross-reactivity between anti-cod-antibodies and immunoglobulins from other species. *Journal of Fish Biology* 39, 265-278.

Janeway,C.A.Jr, Medzhitov,R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 20, 197-216.

Karlsbakk,E., Isaksen,T.E., Ottem,K.F., Nylund,A., Korsnes,K., Nerland,A.H., Patel,S., Bergh,Ø., 2008. Viktige patogener i kystsonen. *Forvaltning av kysten. Kyst og havbruk*, 48-51.

Kay,W., Petersen,B.O., Duus,J.Ø., Perry,M.B., Vinogradov,E., 2006. Characterization of the lipopolysaccharide and β -glucan of the fish pathogen *Francisella victoria*. *FEBS Journal* 273, 3002-3013.

Keim,P., Johansson,A., Wagner,D.M., 2007. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105, 30-66.

Kerksiek,K.M., Pamer,E.G., 1999. T cell responses to bacterial infection. *Current Opinion in Immunology* 11, 400-405.

Kindt,T.J., Goldsby,R.A., Osborne,B.A., 2007. Immunology. Sixth Edition. New York: W. H. Freeman and Company.

Kirimanjeswara,G.S., Olmos,S., Bakshi,C.S., Metzger,D.W., 2008. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. Immunological Reviews 225, 244-255.

Kolstø,S., 2008. Påvisning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i leukocytter fra Atlantisk torsk (*Gadus morhua*). Masteroppgave, Universitetet i Bergen.

Köllner,B., Blohm,U., Kotterba,G., Fischer,U., 2001. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. Fish & Shellfish Immunology 11, 127-142.

Krocova,Z., Härtlova,A., Souckova,D., Zivna,L., Kroca,M., Rudolf,E., Macela,A., Stulik,J., 2008. Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. Microbial Pathogenesis 45, 79-85.

Lai,Y.S., Chiou,P.P., Chen,W.J., Chen,Y.C., Chen,C.W., Chiu,C.W., Chen,S.D., Cheng,Y.H., Chang,C.Y., 2008. Characterization of apoptosis induced by grouper iridovirus in two newly established cell lines from barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Journal of Fish Diseases 31, 825-834.

Lai,X.H., Golovliov,A., Sjöstedt,A., 2001. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. Infection & Immunity 69, 4691-4694

Lanzavecchia,A., 1996. Mechanisms of antigen uptake for presentation. Current Opinion in Immunology 8, 348-354.

Laskay,T., van Zandbergen,G., Solbach,W., 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology 213, 183-191.

Li,J., Barreda,D.R., Zhang,Y.A., Boshra,H., Gelman,A.E., LaPatra,S., Tort,L., Sunyer,J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology* 7, 1116-1124.

Lindgren,H., Golovliov,I., Baranov,V., Ernst,R.K., Telepnev,M., Sjostedt,A., 2004. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *Journal of Medical Microbiology* 53, 953-958.

Loeving,D.J., Drake,J.R., Banas,J.A., McNealy,T.L., McArthur,D.G., Webster,L.M., Lennartz,M.C., 2006. *Francisella tularensis* LVS grown in macrophages has reduced ability to stimulate the secretion of inflammatory cytokines by macrophages in vitro. *Microbial Pathogenesis* 41, 218-225.

Lund,V., Bordal,S., Kjellsen,O., Mikkelsen,H., Schrøder,M.B., 2006. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 1145-1155.

Magnadottir,B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.

Magnadottir,B., Jonsdottir,H., Helgason,S., Björnsson,B., Solem,S.T., Pilstrom,L., 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 11, 75-89.

Magnadottir,B., Jonsdottir,H., Helgason,S., Bjornsson,B., Jorgensen,T.O., Pilstrom,L., 1999. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) - I. The effects of environmental temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 122, 173-180.

Magnadottir,B., 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) in four fish species. *Icel. Agr. Sci.* 12, 47-59.

- Matsuyama,T., Iida,T., Kurokura,H., 1999. Kinetics of defense activities of inflammatory neutrophils in carp and red sea bream. *Fish Pathology* 34, 133-137.
- Matsuyama,H., Yano,T., Yamakawa,T., Nakao,M., 1992. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpi*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish & Shellfish Immunology* 2, 69-78.
- Mauel,M.J., Soto,J.E., Moralis,J.A., Hawke,J., 2007. A *piscirickettsiosis*-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *Journal of Aquatic Animal Health* 19, 27-34.
- McCaffrey,L., Allen,L.A., 2006. Pivotal Advance: *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 1224-1230.
- McCarthy,U.M., Bron,J.E., Brown,L., Pourahmad,F., Bricknell,I.R., Thompson,K.D., Adams,A., Ellis,A.E., 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 477-484.
- Medzhitov,R., Janeway,CAJr., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9, 4–9.
- Menon,A., Shroyer,M.L., Wampler,J.L., Chawan,C.B., Bhunia,A.K., 2003. In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B-cells. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 26, 157-174.
- Metchnikoff,E., 1968. Immunity in infective diseases. New York, NY, Johnson Reprint Corp.
- Mikalsen,J., Olsen,A.B., Rudra,H., Moldal,T., Lund,H., Djonne,B., Bergh,O., Colquhoun,D.J., 2009. Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* for Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and laboratory mice. *Journal of Fish Diseases* 32, 377-381.

- Mikalsen,J., 2008. Diagnosis and characterization of intra-cellular Gram-negative pathogens of marine and salmonid fish. Doktorgradsavhandling. Norges Veterinærhøgskole.
- Mikalsen,J., Olsen,A.B., Tengs,T., Colquhoun,D.J., 2007. *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* subsp nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 1960-1965.
- Miller,N., Wilson,M., Bengten,E., Stuge,T., Warr,G., Clem,W., 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. Immunological Reviews 166, 187-197.
- Murphy,K., Travers,P., Walport,M., 2008. Janeway`s Immuno biology. Seventh edition. GS Garland Science. Taylor & Francis Group, LLC. New York and London.
- Nakanishi,T., Fischer,U., Dijkstra,J.M., Hasegawa,S., Somamoto,T., Okamoto,N., Ototake,M., 2002. Cytotoxic T cell function in fish. Developmental and Comparative Immunology, 26, 131-139.
- Nano,F., Elkins,K., 2006. The Genus *Francisella*. Prokaryotes 6: 1119-1132.
- Nauciel,C., 1999. Immune defenses against intracellular bacterial infections. In: Opportunistic Intracellular Bacteria and Immunity. Edited by Lois J. Paradise *et al.* Plenum Press, New York, 1-16.
- Neumann,N.F., Stafford,J.L., Barreda,D., Ainsworth,A.J., Belosevic,M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Developmental and Comparative Immunology 25, 807-825.
- Nikoskelainen,S., Kjellsen,O., Lilius,E.M., Schrøder,M.B., 2006. Respiratory burst activity of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) blood phagocytes differs markedly from that of rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology 21, 199-208.
- Nylund,A., Ottem,K.F., Watanabe,K., Karlsbakk,E., Krossøy,B., 2006. *Francisella* sp (Family *Francisellaceae*) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. Archives of Microbiology 185, 383-392.

Ofek,I., Goldhar,J., Keisari,Y., Sharon,N., 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 49, 239-276.

Olivier,G., Evelyn,T.P.T., Lallier,L., 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified freund's complete adjuvant: Its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Developmental & Comparative Immunology* 9, 419-432.

Olsen,A.B., Mikalsen,J., Rode,M., Alfjorden,A., Hoel,E., Straum-Lie,K., Haldorsen,R., Colquhoun,D.J., 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *Journal of Fish Diseases* 29, 307-311.

Ostland, V.E., Stannard, J.A., Creek J.J., Hedrick, R.P., Ferguson, H.W., Carlberg, J.M., & Westerman, M.E., 2006. *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 135-145.

O'Riordan,M, Portnoy,D.A., 2002. The host cytosol: front-line or home-front? *Trends Microbiol.* 10, 361-364.

Ottem,K.F., Nylund,A., Karlsbakk,E., Friis-Moller,A., Kamaishi,T., 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp nov., two important fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1231-1243.

Ottem,K.F., Nylund,A., Isaksen,T.E., Karlsbakk,E., Bergh,O., 2008. Occurrence of *Francisella piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases* 31, 525-534.

Ottem,K.F., Nylund,A., Karlsbakk,E., Friis-Moller,A., Krossoy,B., 2007a. Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Archives of Microbiology* 187, 343-350.

Ottem,K.F., Nylund,A., Karlsbakk,E., 2007b. Utbredelse og status av *Francisella* på torsk i Norge. Havbruk. Kyst og havbruk, 178-179.

Parsa,K.V.L., Butchar,J.P, Rajaramb,V.S.M., Cremer,T.J., Gunn,J.S., Schlesinger,L.S., Tridandapania,S., 2008. *Francisella* gains a survival advantage within mononuclear phagocytes by suppressing the host IFN γ response. Molecular Immunology 45, 3428-3437.

Pettersen,E.F., Bjerknes,R., Wergeland,H.I., 2000. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. Fish & Shellfish Immunology 10, 695-710.

Pieters,J. 2000., MHC class II restricted antigen processing and presentation. Advances in Immunology 75, 159-208.

Pilström,L., Bengtén,E., 1996. Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. Fish & Shellfish Immunology 6, 243-262.

Pilström,L., Warr,G.W., Stromberg,S., 2005. Why is the antibody response of Atlantic cod so poor? The search for a genetic explanation. Fisheries Science 71, 961-971.

Plouffe,D.A., Hanington,P.C., Walsh,J.G., Wilson,E.C., Belosevic,M., 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. Xenotransplantation 12, 266-277.

Press,C.M., Evensen,O., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish & Shellfish Immunology 9, 309-318.

Qin,Q.W., Ototake,M., Noguchi,K., Soma,G.I., Yokomizo,Y., Nakanishi,T., 2001. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish & Shellfish Immunology 11, 245-256.

Rabinovitch,M., 1995. Professional and nonprofessional phagocytes - An introduction. Trends in Cell Biology 5, 85-87.

- Raupach,B., Kaufmann,S.H.E., 2001. Immune responses to intracellular bacteria. *Current Opinion in Immunology* 13, 417-428.
- Rose,A.S., Levine,R.P., 1992. Complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 2, 223-240.
- Rowley,A.F., Hunt,T.C., Page,M., Mainwaring,G., 1988. Fish. In: *Vertebrate blood cells*, editors Rowley A.F. and Ratcliffe, N.A. Cambridge University Press, 19-129.
- Rønneseth,A., Wergeland,H.I., Pettersen,E.F., 2007. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 23, 493-503.
- Rønneseth,A., Pettersen,E.F., Wergeland,H.I., 2006. Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 610-620.
- Sahoo,P.K., 2006. Innate/natural resistance and non-lymphoid defence mechanisms in fish. In: *Fish and Shellfish Immunology, An Introduction*, editors Swain P., Sahoo, P.K, and Ayyappan S. Dehli: Narendra Publishing House, 37-46.
- Santic,M., Molmeret,M., Klose,K.E., bu Kwaik,Y., 2006. *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends in Microbiology* 14, 37-44.
- Schrøder,M.B., Ellingsen,T., Mikkelsen,H., Norderhus,E.A., Lund,V., 2009. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish & Shellfish Immunology*, doi:10.1016/j.fsi.2008.11.016.
- Schrøder,M.B., Espelid,S., Jørgensen,T.Ø., 1992. Two serotypes of *Vibrio salmonicida* isolated from diseased cod (*Gadus morhua* L.); virulence, immunological studies and vaccination experiments. *Fish Shellfish Immunology* 2, 211-21.
- Secombes,C.J., 1996. The nonspecific immune system, cellular defenses. Fra Iwama G, Nakanishi, T (redaktører). *The fish immune system; organism, pathogen and environment*: Academic Press, 63-104.

Secombes,C.J., Fletcher,T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2, 53-71.

Segal,A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23, 197-223.

Sinyakov,M.S., Dror,M., Zhevelev,H.M., Margel,S., Avtalion,R.R., 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* 20, 3668-3674.

Sjöstedt,A., 2006. Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes and Infection* 8, 561-567.

Sjöstedt,A., Conlan,J.W., North,R.J., 1994. Neutrophils are critical for host-defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. *Infection & Immunology*, 62: 2779-2783.

Solem,S.T., Stenvik,J., 2006. Antibody repertoire development in teleosts - a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 57-76.

Splitter,G., Oliveira,S., Carey,M., Miller,C., Ko,J., Covert,J., 1996. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 309-319.

Squier,M.K., Sehnert,A.J., Cohen,J.J., 1995. Apoptosis in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 57, 2-10.

Steiro,K., Johansen,A., Gildberg,A., Bogwald,J., 1998. Optimising of culture conditions and stimulation of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 21, 335-344.

Stenmark,S., Lindgren,H., Tärnvik,A., Sjöstedt,A., 2003. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Microbial Pathogenesis* 35, 73-80.

Stenvik,J., Jørgensen,T.Ø., 2000. Immunoglobulin D (IgD) of Atlantic cod has a unique structure. *Immunogenetics* 51, 452-461.

Stuart,L.M., Ezekowitz,R.A.B., 2005. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 22, 539-550.

Sviland,S., 2008., Antistoffer reaktive med lakseleukocytter og TO-celler. Masteroppgave, Universitetet i Bergen.

Swain,P. 2006., Specific defence mechanisms of fish: The basis of antibody production and cell-mediated immune response. In: *Fish and Shellfish Immunology, An Introduction*. Editors Swain P., Sahoo, P.K, and Ayyappan S. Dehli: Narendra Publishing House, 37-46.

Swain,P., Sahoo,P.K., 2006., Cytokines of fish. In: *Fish and Shellfish Immunology, An Introduction*. Editors Swain P., Sahoo, P.K, and Ayyappan S. Dehli: Narendra Publishing House, 37-46.

Sørensen,K.K., Sveinbjørnsson,B., Dalmo,R.A., Smedsrød,B., Bertheussen,K., 1997. Isolation, cultivation and characterization of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 20, 93-107.

Urban,C.F., Lourido,S., Zychlinsky,A., 2006. How do microbes evade neutrophil killing? *Cellular Microbiology* 8, 1687-1696.

Verburg-Van Kemanade,B.M.L., Groeneveld,A., Van Rens,B.T.T.M, Rombout,J.H.W.M., 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Experimental Biology* 187, 143-158.

Vosbeck,K., James,P.R., Zimmermann,W., 1984. Antibiotic Action on Phagocytosed Bacteria Measured by a New Method for Determining Viable Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 25, 735-741.

Warr,G.W., 1995. The Immunoglobulin Genes of Fish. *Developmental and Comparative Immunology* 19, 1-12.

Wergeland,H.I. & Jakobsen,R.A., 2001. A salmonid cell line (TO) for production of infection salmon anaemia virus (ISAV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 44. 183-190.

Whyte,S.K., 2007. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1127-1151.

Zinkl,J.G., Cox,W.T., Kono,C.S., 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative Haematology International* 1, 187-195.

Øverland,H.S., Pettersen,E.F., Rønneseth,A., Wergeland,H.I. 2009. Phagocytosis by B-cells and neutrophilic granulocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Manuscript.

6.0 Appendiks

OPPSKRIFTER:

Isolering av leukocytter

1,5 M NaCl (NaCl: 58,44 g/mol)

NaCl (Riedel- de Haën)	21,915 g
dH ₂ O	til 250 ml

Må autoklaveres!

Percollgradienter for torsk

1.050 g/ml:

1,5 M NaCl	1 ml
Percoll (GE Healthcare Percoll™)	3,4 ml
dH ₂ O	5,6 ml

1.070 g/ml:

1,5 M NaCl	1 ml
Percoll	4,9 ml
dH ₂ O	4,1 ml

Heparin stock-løsning (5000 U/ml)

Heparin 50 000 U (Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, H1027, Sigma):

- Løses i 10 ml dH₂O (filtrert)
- Filtrer gjennom 0,2 µm filter

L-15, 370 mOsm

Løsning A:

dH ₂ O	100 ml
NaHCO ₃ (Sigma)	2,8 g

NaCl	2,4 g
Glukose (D- (+) – Glucose, > = 99,5 %, Sigma)	0,66 g

Steriliser ved filtrering gjennom 0,2 µm filter!

- 5 ml av løsning A
- 95 ml L-15 (Leibovitz)

L-15 medium (100 ml)

Heparin stock-løsning (1000 U → 10 U/ml) (Sigma)	200 µl
Gentamicin sulfate (0,1 % av 50 mg/ml, Cat. No 17-518Z, Bio Whittaker)	100 µl
1M HEPES (15 mM) (Sigma)	1,5 ml
200 mM glutamin (2 mM) (Cambrex)	1 ml
L-15 (370 mOsm)	til 100 ml

Det skal ikke tilsettes gentamicin sulfate i L-15-mediumet som brukes ved fortykning av Francisella!

Dyrkning av Francisella

Eugon Broth; flytende dyrkningsmedium til dyrking av *Francisella*

- Bacto Eugon Broth (Becton Dickinson and Company, cat.no 259010)
- FeCl₃ x 6H₂O (Fluka 44944)
- Ampicillin sodium salt (A0166, Sigma)

Eugon Broth

Bacto™ Eugon Broth pulver (Becton Dickinson and Company, cat.no 259010)	30,4g
dH ₂ O	1 l

Blandes godt før den varmes. Kokes i 1 min for at pulveret skal løses fullstendig i vannet. Fordeles i kolber og autoklaveres i 15 min ved 121 °C.

Jernklorid stock-løsning, 2 M

Iron (III) chloride Hexahydrate, $\text{Cl}_3\text{Fe} \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka 44944)	27,03 g
dH ₂ O	til 50 ml

Må autoklaveres!

Ampicillin stock-løsning

Ampicillin sodium salt (A0166-5G, Sigma)	1 g
dH ₂ O	20 ml

Steriliseres ved filtrering (0,2 µm filter).

Fordeles i porsjoner (1 ml) og oppbevares ved – 20 °C.

Løsning til forkultur:

Eugon Broth	50 ml
Jernklorid	0,05 ml
Ampicillin	0,05 ml

Løsning til hovedkultur

Eugon Broth	250 ml
Jernklorid	0,25 ml
Ampicillin	0,25 ml

Cystein Hjerte agar med 5 % saueblod:

Bacto Heart Infusion Broth (BD 238400)	25 g
Glucose (BDH 100176)	10 g
L-Cystein (Sigma C-7880)	1 g
Agar (Oxoid LP 11)	15 g
dH ₂ O	900 ml

Hemoglobin løsning

Løselig hemoglobin pulver (Oxoid L53)	2 g
dH ₂ O	100 ml

Det løselige hemoglobin pulveret blandes med vannet og varmes forsiktig opp til det er fullstendig oppløst. Autoklaver så ved 121 °C i 15 minutter før nedkjøling til 50 °C i vannbad.

For å lage agaren løses Bacto Heart Infusion Broth, glukose og L-cystein opp i de 900 ml med dH₂O. pH justeres deretter til 6,8 (± 0,2) før agaren tilsettes, og løsningen varmes opp til kokepunkt under konstant omrøring. Løsningen autoklaveres deretter ved 121 °C i 15 minutter. Etter autoklaving kjøles løsningen ned til ca. 48-50 °C i vannbad før 100 ml hemoglobin løsning og 50 ml romtemperert saueblod tilsettes. Løsningen overføres så til petriskåler.

Dersom det er fare for kontaminering tilsettes 5 µg/ml ampicillin i agaren!

Immunfluorescensmerking:

L-15 medium med 5 % FCS

FCS (Australian Origin) (Cambrex)	5 ml
L-15 medium	95 ml

5X PBS, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	3,6 g
NaCl	42,5 g
KH ₂ PO ₄ (Fluka)	1,35 g
dH ₂ O	til 1000 ml

pH justeres til 7,4 før autoklaving!

Vanlig PBS, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,72 g
NaCl	8,5 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
dH ₂ O	til 1000 ml

Evt.	5X PBS	200 ml
	dH ₂ O	800 ml

Må autoklaveres! .

1 M NaOH (til pH justering)

	NaOH	8 g
	dH ₂ O	200 ml

Må autoklaveres!

3,7 % formaldehyd (metanolfri)

	Paraformaldehyd (Merck)	1,85 g
	PBS (pH 7,4)	50 ml

Varmes til 60 °C og avkjøles.

Aceton-metanol fikseringsvæske

	Aceton (Fluka)	100 ml
	Metanol (Fluka)	100 ml

Lages ny for hver gang!

PBS med BSA og glukose:

	Albumin bovine serum (BSA), Fraction V (Sigma)	3 g
	D- (+) – glucose (Sigma)	4,5 g
	PBS (pH 7,4)	100 ml

Løsningen settes på magnetrører til alt er oppløst.

SDS-PAGE & Western blott

<u>Separerende gel</u>	<u>2 geler</u>	<u>4 geler</u>
dH ₂ O	4,4 ml	8,8 ml
1,5M Tris (Fluka), pH 8,8	2,5 ml	5 ml
10% SDS (Sigma)	100 µl	200 µl
40% Acryl (Fluka)	3 ml	6 ml
10% APS (Sigma)	50 µl	100 µl
TEMED (Fluka)	5 µl	10 µl

<u>Konsentrerende gel (4 %)</u>		
dH ₂ O	6,4 ml	9,6 ml
0,5M Tris, pH 6,8	2,5 ml	3,75 ml
10% SDS	100 µl	150 µl
40% Acryl	1 ml	1,5 ml
10% APS	50 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7,5 µl

STOCKLØSNINGER

10x Blottebuffer, 250 ml

Tris (Fluka)	7,57 g
Glycin (Merck)	36,0 g
dH ₂ O	til 250 ml
200 ml metanol pr. liter tilsettes rett før bruk	

10x TBS (200 mM Tris, 5 M NaCl, pH 7,5)

Tris	12,11 g
NaCl	146,1 g
dH ₂ O	til 500 ml

Juster pH til 7,5 med 6M HCL

10x TGS

Tris	30,3 g
Glycin	144,0 g
SDS (Sigma)	10,0 g
dH ₂ O	til 1000 ml

Oppbevares i kjøleskap

BRUKSLØSNINGER:

10 % (w/v) APS

Ammonium persulfat (Sigma)	100 mg
dH ₂ O	10 ml

Lages rett før bruk!

1x Blottebuffer, 1 liter

10x Blottebuffer	100 ml
Metanol	200 ml
dH ₂ O	700 ml

1x TBS (20 Mm NaCl, pH 7,5), 1 L

10x TBS	100 ml
dH ₂ O	900 ml

1x TGS

10x TGS	100 ml
dH ₂ O	900 ml

TTBS (20 mM NaCl, 0,05% Tween-20 pH 7,5)

Tween-20 (Merck)	350 µl
1 x TBS	700 ml

Prøvebuffer

dH ₂ O	4 ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1 ml
Glycerol	0,92 ml
10 % (w/v) SDS	1,6 ml
2-βmerkaptoetanol (Sigma)	0,4 ml
0,05 % Bromophenol blue (BPB)	0,2 ml

Oppbevares i romtemperatur

Blokkeringsløsning (3% tørrmelk), 100 ml

Tørrmelk (Fluka)	3,0 g
TBS	100 ml

Fikseringsløsning

Metanol (Fluka)	200 ml
Eddiksyre (Fluka)	40 ml
Fixative enhancer concentrate (Bio-Rad)	40 ml
dH ₂ O	120 ml

Løsning for sølvfarging

dH ₂ O	35 ml
Silver Complex Solutions (Bio-Rad)	5 ml
Reduction Moderator Solution (Bio-Rad)	5 ml
Image Development Reagent (Bio-Rad)	5 ml
Development Accelerator Solution (Bio-Rad)	50 ml

Lages 5 minutter før bruk! Development Accelerator Solution (romtemperert) tilsettes øyeblikkelig før bruk.

HRP substratløsning, 120 ml

10x HRP fargebuffer (Bio-Rad)	10 ml
dH ₂ O	90 ml
HRP fargestoff B (Bio-Rad)	600 µl

Fargestoff A (Bio-Rad)

20 ml

Fargeløsningen lages rett før bruk!