



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Salmon Gill Poxvirus Disease (SGPVD) i Atlantisk laks (*Salmo salar*), sykdomsutvikling og genuttrykk hos virus og vert

Salmon Gill Poxvirus Disease (SGPVD) in Atlantic salmon (*salmo salar*), development of disease and gene expression in virus and host

Marit Måsøy Amundsen

Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven ble finansiert av Norges forskningsråd (NFR 267491) og utført ved Veterinærinstituttet i Oslo. Oppgaven ble utført i perioden januar 2019 til desember 2019 og er siste del av det 2-årige masterstudiet i bioteknologi ved NMBU.

Det har vært en begivenhetsrik prosess, og jeg har lært ekstremt mye i løpet av året. Oppgaven har vært svært interessant, og jeg føler meg heldig som har fått muligheten til å jobbe med et så spennende fagfelt.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Maria Krudtaa Dahle som har stilt opp hele veien med alt fra praktisk gjennomførelse på laboratoriet til faglig diskusjon. Sammen med veileder Mona Gjessing har de stilt opp for å svare på faglige spørsmål og hjulpet meg med å forme oppgaven. Takk for deres alltid gode humør, tålmodighet og all konstruktive veiledning.

Jeg vil også takke min interne veileder, Torstein Tengs, som har hjulpet meg med det bioinformatiske i oppgaven, samt ingeniørene Saima Nasrin Mohammad og Randi Faller som har hjulpet meg med å optimalisere laboratoriumsteknikkene mine. Jeg vil også gi en spesiell takk til Haitham Tartor som har gitt meg gode tips og råd gjennom hele året, og som har tatt seg tid å lære meg teknikker som jeg vil ta med meg videre inn i arbeidslivet.

Til slutt vil jeg gi en felles takk til alle i seksjonen for forskning fiskehelse. Det har vært inspirerende å se hvor lidenskapelig opptatt de ansatte er av jobben sin. Takk for at dere har tatt meg med og introdusert meg for deres spennende arbeid, og inkludere meg i det sosiale. Dette har motivert meg og gjort at jeg har gledet meg til å møte opp hver dag.

Oslo, desember 2019

Marit Måsøy Amundsen

Sammendrag

Salmon Gill Poxvirus Disease (SGPVD) er en gjellesykdom som er knyttet til høy dødelighet i lakseoppdrettsnæringen og som er ansett som en trussel mot fiskevelferden. Det mangler fortsatt grunnleggende kunnskap om viruset og sykdommen det forårsaker, og rutiner til å kunne takle sykdomsutbrudd i oppdrettsnæringen på best mulig måte. Hovedmålet med denne oppgaven var derfor å øke kunnskapen om viruset og sykdomsforløpet hos laksen. Dette ble undersøkt i sammenheng med stress fordi dette reduserer laksens motstandskraft. Oppgaven baserte seg på et smitteforsøk med to grupper SGPV-smittet laks, der den ene gruppen i tillegg ble injisert med hydrokortison for å få økt kortisol i blodet. Genekspresjon av viruset og laksen ble målt ved bruk av RT-qPCR og kvalitativ deteksjon av virusinfiserte celler ble detektert ved bruk av *in situ* hybridisering. I tillegg ble funksjonelle domener i hypotetiske SGPV-proteiner funnet ved bruk av bioinformatiske verktøy.

Klinisk SGPVD og akutt dødelighet ble bare observert i den hydrokortisoninjiserte gruppen ved virustoppen fra dag 14 og utover. Mens uttrykket av de fleste utvalgte tidlige-, intermediære- og sene virusgenene ikke kunne differensieres gjennom det 28 dager lange smitteforsøket, var ett tidlig virusgen, B22R, uttrykt høyere enn alle andre virusgener ved dag én. Videre ble det i laksens gjeller vist en oppregulering av det interferonstimulerte genet MX1 3 dager etter normal SGPV-infeksjon. I den hydrokortison-injiserte fisken infisert med SGPV ble MX1 ikke uttrykt før dag 10, noe som tyder på at høyt kortisolinnhold hemmer en del av den medfødte immunresponsen. Den samme trenden ble observert for genuttrykk av interferon γ og Granzym A i gjellene, noe som indikerer induksjon av cytotoxisk celleaktivitet. I motsetning til i gjellene ble interferon γ og Granzym A oppregulert i milt kun når den smittede laksen var injisert med hydrokortison. Disse resultatene indikerer at stress hemmer lokal immunrespons i gjellene og samtidig utløser en systemisk immunreaksjon. I en av de hypotetiske proteinsekvensene fra SGPV-genomet (SGPV038) ble det funnet et konservert domene som lignet glykoprotein E med opphav fra alphaherpesvirus. Glykoprotein E er et membranprotein som er knyttet til spredning av virus, og som kan ha en mulig rolle i SGPV.

Resultatene fra studien har bidratt til en bedre forståelse av hvordan viruset uttrykkes i forskjellige faser samt hvordan laksen påvirkes av viruset, med og uten stress. Dette er viktige grunnkunnskaper som kan brukes til videreutvikling for å forstå og takle sykdomsutbrudd i oppdrettsnæringen.

Abstract

Salmon Gill Poxvirus Disease (SGPVD) is a gill disease associated with high mortality in the aquaculture industry and considered as a threat to fish welfare. More basic knowledge on the virus and the disease it causes is needed to be able to cope with disease outbreaks in the aquaculture industry. The main aim of this study was to increase the knowledge about the virus and the salmon response to infection. This was studied in the context of stress, because stress is known to reduce the disease resistance. The thesis were based on a challenge trial with two groups of SGPV-infected salmon, in which one group was also injected with hydrocortisone to increase the cortisol level in the blood. Gene expression from the virus and the salmon was measured using RT-qPCR, and virus-infected cells were detected using *in situ* hybridization. In addition, novel functional domains in the SGPV hypothetical proteins were detected using bioinformatic tools.

Clinical disease and acute mortality was observed only in the hydrocortisone-injected group at the virus peak from day 14 post infection. Most of the selected early, intermediate and late viral genes could not be differentiated through the 28 day study period, but one early viral gene, B22R, was expressed higher than all other viral genes at day one post infection. Furthermore, in gills the interferon-stimulated gene MX1 was induced from day 3 post infection under normal SGPV infection. In the hydrocortisone-injected fish infected with SGPV, however, Mx1 was not expressed until day 10 in the gills, suggesting that high cortisol inhibits parts of the innate immune response. The same pattern of regulation was observed for interferon γ and Granzyme A in the gills, indicating induction of cytotoxic cell activity. In contrast to gill responses, SGPV-infection did not induce any corresponding immune activity in spleen under non-stress conditions, but in fish injected with hydrocortisone, interferon γ and Granzyme A genes were induced in spleen. These data indicate that a stress hormone suppressed local immune response in the gills and a stress hormone triggered systemic immune response. Among SGPV's hypothetical protein sequences, one gene (SGPV038) was found that have a conserved domain similar to glycoprotein E originating from alphaherpesvirus. This is a membrane protein that is associated with the spread of the virus and is possibly expressed in SGPV.

The results of the study have contributed to a better understanding of how the virus is expressed in the fish, as well as how the salmon is affected by the virus, in the presence and absence of stress. This is important basic knowledge that can be used to develop further understanding of how to cope with disease outbreaks in the aquaculture industry.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 Oppdrett av atlantisk laks i Norge	1
1.1.1 Laksen livssyklus	2
1.1.2 Respirasjonssystemet	3
1.2 Fiskens immunforsvar og immunologiske organer	5
1.2.1 Medfødt immunitet.....	5
1.2.2 Adaptiv immunitet.....	5
1.2.3 Interferoner	6
1.2.4 Interferonstimulerte gener	7
1.2.5 Fiskens primære immunologiske organer	7
1.2.6 Sekundære immunologiske organer	8
1.2.7 Stress som immunhemmer	9
1.3 Salmon Gill Poxvirus.....	10
1.3.1 Sykdomsforløp hos smittet laks	11
1.3.2 Virusets opprinnelse og oppbygning.....	12
1.3.3 Replikasjonssyklus	13
1.4 Målet med studien	16
2. Materialer og metoder	17
2.1 Prøvetakingsprosedyre.....	17
2.2 RNA-isolering	18
2.3 DNA-isolering	19
2.4 Konsentrasjonsmålinger	19
2.5 Kvalitetsmålinger.....	20
2.6 cDNA-syntese.....	20
2.7 RT-qPCR	22
2.8 <i>In situ</i> hybridisering.....	27
2.9 Identifikasjon av hypotetiske aminosyresekvenser	30
2.10 Databehandling	30
3. Resultater	32
3.1 <i>In situ</i> hybridisering av formalinfikserte gjellesnitt	33
3.2 Kvantifisering av virusmengde ved bruk av qPCR	35
3.3 Sammenligning av mengde virus analysert fra DNA og RNA	36
3.4 Kvalitetsanalyse av primersett.....	37

3.5	Uttrykk av SGPV-gener i gjellevevsmateriale	39
3.6	Kvantifisering av virusmengde i milt, hodenyre og blod	40
3.7	Uttrykk av immungener fra virustopp for gjelle, milt, hodenyre og blod	41
3.8	Uttrykk av interferonstimulerte gener fra gjelle	43
3.9	Uttrykk av T-cellegener fra gjelle og milt	43
3.10	Uttrykk av IFN γ og GranA fra gjelle- og miltmateriale	45
3.11	Annotering av hypotetiske proteiner	46
4.	Diskusjon.....	48
4.1	Metodediskusjon.....	48
4.1.1	Gjennomførelse av smitteforsøket	48
4.1.2	Metoder for kvalitativ deteksjon av virus	49
4.1.3	Metoder for kvantitativ deteksjon av virus	49
4.2	Hvilke celler er infisert av SGPV?	50
4.3	Sannsynligheten for flere andre agens i samspill med SGPV	51
4.5	Dødelighet og virusmengde – en korrelasjon med økt mengde kortisol?	51
4.6	Svaber – en god nok metode for å kvantifisere virus?	52
4.7	SGPV – en systemisk infeksjon?.....	53
4.8	Kan mengde RNA og DNA samt tidlige-, intermediære- og sene pox-gener differensieres?.....	54
4.9	Bruk av referanseggen og kvalitetsvurdering av primersett	55
4.10	Kan kortisol hemme den medfødte immunresponsen hos laks med SGVD?.....	55
4.11	Adaptiv antiviral respons i gjelle.....	56
4.12	Adaptiv antiviral respons i milt	57
4.13	Glykoprotein E – Et mulig protein i SGPV	58
4.14	Videre arbeid	59
5.	Konklusjon.....	61
6.	Referanseliste.....	62

1 vedlegg

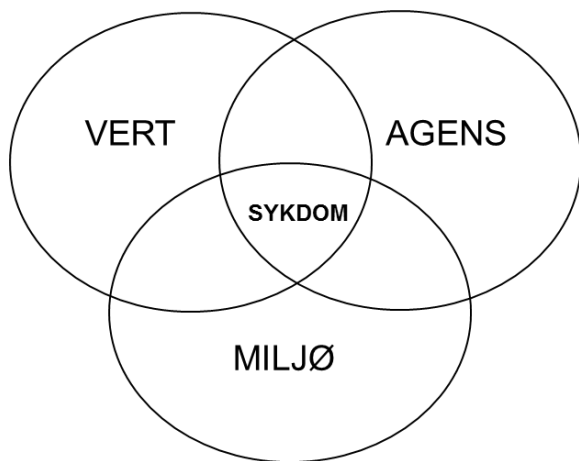
1. Introduksjon

1.1 Oppdrett av atlantisk laks i Norge

Norges plassering i forhold til Barentshavet og Norskehavet gir direkte tilgang til produktive og rene havområder som gir et godt utgangspunkt til å drive med lakseoppdrett. Denne industrien består av flere bedrifter som gir en betydelig verdiskapning i samfunnet. Laksen er i tillegg den største fiskearten i oppdrett målt i verdi og volumuttak, og majoriteten av den produserte laksen blir eksportert til utlandet. I 2018 utgjorde dette et uttak på 1 100 000 tonn med en eksportverdi på 67,8 milliarder kroner (1).

Selv om det i Norge produseres store mengder oppdrettslaks, forekommer det store tap av fisk som dør underveis i produksjonen før slaktning. Fra 2016 til 2018 utgjorde tap som i følge av rømming eller død, et årlig antall på omtrent 53 millioner laks, hvorav 87,2 prosent av dette utgjorde dødfisk (2). Det er stort fokus på fiskehelse og velferd i oppdrettsnæringen grunnet tap av fisk. Tap koster oppdrettsnæringen mye og bidrar til negativ omtale av næringen. Ikke minst gir sykdom dårlig fiskevelferd. Dersom en ser bort fra lakselus, er det virussykdommer som preger fiskehelsen mest. I tillegg til Salmon gill poxvirus disease (SGPVD) er disse virussykdommene ansett som mest utfordrende i oppdrettsnæringen: Kardiomyopatisyndrom (CMS), Pankreassykdom (PD), Infeksiøs lakseanemi (ILA), Hjerter- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og Infeksiøs pankreasnekrose (IPN) (2).

God fiskevelferd er kritisk for å sikre etisk oppdrett samt begrense sykdomsomsfang. De aller fleste sykdommer i oppdrettsnæringen har en sammenheng med forholdene fisken produseres under (3). Fisken kan eksempelvis være infisert av et patogen uten av det nødvendigvis fører til sykdom. Dette har blitt beskrevet nærmere av Snieszko i 1974 (4) som viste hvordan resultatet av en infeksjon er avhengige av tre faktorer. Den første faktoren beskriver vertens mottakelighet mot den aktuelle mikroorganismen. Den andre faktoren beskriver mikroorganismens evne til å fremkalle sykdom. Mens den siste faktoren beskriver miljøet verten og mikroorganismen befinner seg i. Figur 1 illustrer faktorene og hvordan disse til sammen påvirker sykdomsframkallelse. En motstandsdyktig fisk som befinner seg i et godt miljø med lite smittebelastning vil gjerne oppleve lite til ingen sykdom.



Figur 1: helsetriangel – vert, agens og miljø. De tre sirklene illustrerer hvordan sykdom oppstår når en mottakelig vert blir utsatt for et patogen under forskjellige forhold

Et av de forebyggende tiltakene mot utbrudd av infeksjonssykdommer, er vaksiner. For mange år siden, før vaksiner mot bakteriesykdommer kom på plass, var antibiotikaforbruket i næringen stort. På grunn av økt fokus på antibiotikaresistens og større kunnskap om vaksiner, startet man fra midten av 90-tallet en utfasing av antibiotikabehandling til fordel for vaksiner for å forhindre sykdom (5). Vaksiner stimulerer immunforsvaret til å bekjempe infeksjonssykdommer, og det finnes i dag vaksiner til fisk mot både bakterier og virus. Det er likevel mange infeksjonssykdommer som vi ikke har noen vaksiner mot eller behandling for.

1.1.1 Laksen livssyklus

Laksen er anadrom art og kan tilpasse seg både ferskvann og saltvann. I naturen gyter laksen i ferskvannet og her blir yngelen til den er klar for sjøvannet, noe som er omtalt som smoltifisering (6).

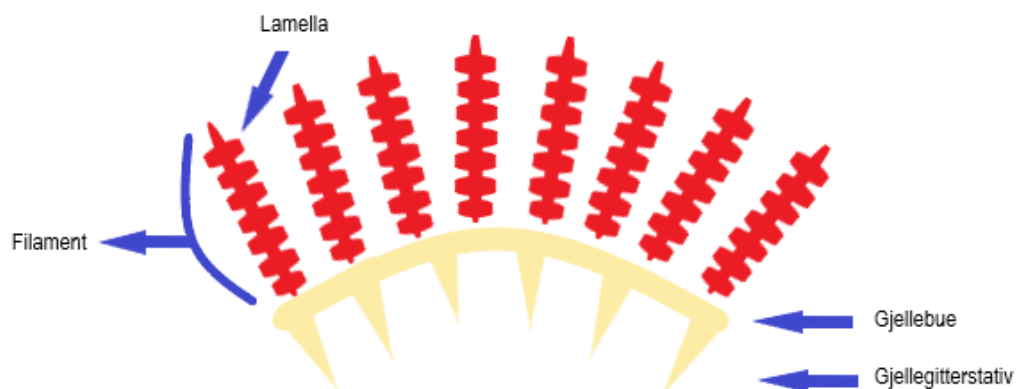
Oppdrettslaksens produksjonssyklus går fra kar på land i ferskvann til merder ut på sjøen. Det tar omtrent to til tre år fra klekking av rogn til slakteklar laks, og gjennom denne prosessen skal laksen gjennom flere prosesstrinn, noe avhengig av anlegg. Fisken utvikles fra rogn til små fisk i ferskvann som videre blir transportert til startfôringskar når de er store nok. Her blir fisken til de er ca. 60-200 gram og sjøsettes når den som smolt er klar for sjøvann. Det finnes flere ulike smoltifiseringsmetoder for laks. En av metodene er å øke saltinnholdet i vannet gradvis for å sakte tilvenne smolten til saltinnholdet i sjøen der den skal være til den er slakteklar, rundt 4,5-5,5 kg (7).

I ferskvann er laksen hyperosmotisk, som gjør at den aktivt må kvitte seg med overskudd av vann da kroppsvæsken har mye høyere saltinnhold enn omgivelse. Vannutstrømningen skjer via fortynnet urin, der noen av de viktige saltionene vil diffundere ut samtidig. Dette er noe laksen må erstatte ved aktivt opptak av Na^+ og Cl^- som skjer gjennom gjellene. På motsatt side er laksen hypoosmotisk i sjøvann, som innebærer at kroppsvæsken har lavere saltinnhold enn sjøvannet. Laksen står da i fare for å miste kroppsvæske og bli dehydrert, samtidig som den får et økt tilslag av ioner. Dette motvirker den med å drikke store mengder sjøvann på samme tid som den skiller ut ioner via gjeller og nyre.

Det er en stor overgang å gå fra ferskvann til sjøvann og dersom laksen blir sluppet for tidlig ut i havet vil fisken dø innen kort tid på grunn av dehydrering. Laksen må være fysiologisk klar, den må være smolt, for å tolerere det hyperosmotiske sjøvannet (6).

1.1.2 Respirasjonssystemet

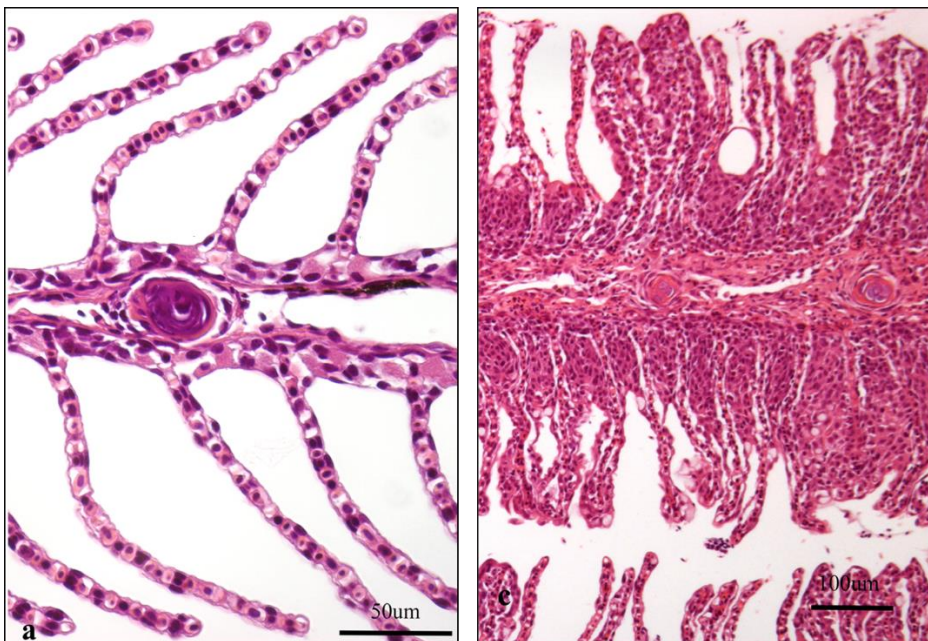
Respirasjon og gassutveksling hos laksen skjer i gjellene. De fleste benfisker som laks har fire gjellebuer på hver side der vannet strømmer gjennom fra munnen, over gjellene og ut gjellelokkets åpning. Figuren under viser, forenklet, oppbygningen av en gjelle. Den delen som er nærmest munnhulen er utstyrt med gjellegitterstaver som består av små tagger/utvekster. Disse har til formål å filtrere bort uønskede matpartikler og plankton før vannet passerer gjellene. Fra gjellebuen og utover er det mange gjellefilamenter (også kalt primærlameller) som står på rad og rekke. Hvert filament er omgitt av blodfylte lameller (også kalt sekundærlameller). Blodkarene i lamellene er dekt av pillarceller (kapillære) og plateepitel. Lamellene sørger for en stor overflate og det er her selve gassutvekslingen foregår (8, s. 93-96).



Figur 2: Forenklet struktur av gjelle

Oksygenet er ca. 30 ganger mindre løselig i vann enn det er i luft, i tillegg til at vannet er ca. 800 ganger tyngre og 50 ganger mer viskøst enn luft. I tillegg har oksygen ulik løselighet ved ulik temperatur og saltholdighet. Jo lavere temperatur og saltholdighet jo høyere oppløselighet av oksygen (9, s. 10, 14). I motsetning til pattedyr som bruker rundt 1-3% av energien sin til pusting inn og ut av lungene, må fisken bruke betraktelig mye mer energi for å få vann med oksygen over gjellene. Ved hjelp av motstrømsprinsippet tar fisken opp oksygen via lamellene ved at vannet og blodet strømmer i hver sin retning over gjellene. På denne måten vil blodet hele tiden møte vann som har noe høyere konsentrasjon av oksygen, noe som tas opp ved passiv diffusjon (9, s. 21, 32).

Figur 3 viser 2 ulike histologiske gjellesnitt der gjellelameller i ulike tilstander blir fremstilt. Snittet til venstre illustrerer gjellelameller fra friske gjeller, hvor lamellene er slanke og har en stor overflate for gassutveksling. Snittet til høyre viser en tilstand kalt hyperplasi, der gjellelamellene er vokst sammen på grunn av overvekst av overflateceller. Dette skjer ved at epitelcellene øker i antall og legger seg lagvis over hverandre. Tilstanden hemmer respirasjonen ved at avstanden mellom vann og blod øker (8, s. 33, 96-97).



Figur 3: Bilde av lameller fra frisk laks (til venstre) og lameller med hyperplastiske celler som danner sammenvoksinger (til høyre) (10)

Fiskens gjeller er multifunksjonelle og er vitale for å kunne opprettholde en rekke ulike funksjoner, slik som gassutveksling, pH-regulering, osmoregulering, hormonproduksjon og opprettholdelse av deler av immunforsvaret. Da gjellene er i direkte kontakt med omgivelsene, er de utsatt for mange typer agens som er i miljøet de befinner seg i. Videre finnes det en rekke årsaker til gjellesykdommer som enten kan skyldes én enkelt faktor, eller mange faktorer som til sammen kan føre til et komplekst sykdomsbilde. Flere gjellesykdommer gir mange av de samme symptomene og det kan derfor være vanskelig å gi en presis diagnose ved sykdomsutbrudd (2).

1.2 Fiskens immunforsvar og immunologiske organer

Fiskenes immunsystem forsøker å beskytte mot sykdom ved å identifisere og eliminere patogener som fisken kommer i kontakt med. Videre har immunforsvaret som oppgave å holde stabile forhold under betennelsesreaksjoner og andre vevsskader. Immunforsvaret kan grovt deles inn i to kategorier; det medfødte immunforsvaret og det adaptive immunforsvaret (11).

1.2.1 Medfødt immunitet

Det medfødte immunforsvaret er førstelinjen i fiskens immunforsvar, og er vanligvis delt inn i tre deler: epitel- og slimbarriere, humorale parametere, samt cellulære komponenter. Fisken er konstant utsatt for potensielle skadelige smittestoff, og derfor er spesielt epitel- og slimbarrieren som omslutter hele fisken viktig som en fysisk barriere. De humorale parameterne er enten uttrykt på celleoverflaten eller i utkilt form, og inkluderer komplementsystemet, antivirale proteiner og cytokiner. De cellulære komponentene består blant annet av fagocyterende celler som makrofager og granulocytter, samt celler som ligner naturlige dreperceller (NK-celler). De fagocyterende cellene kjenner igjen antigener ved hjelp av Pattern Recognition Receptors (PRR), eksempelvis toll-lignende reseptorer (TLRs) som gjenkjenner patogenassosierte molekylære mønstre (PAMP) (11).

1.2.2 Adaptiv immunitet

Det adaptive immunforsvaret aktiveres relativt sakte i forhold til det medfødte immunforsvaret, men reaksjonen strekker seg over lengre tid og er mer spesifikk enn den medfødte immunresponsen. Dette forsvaret omhandler B- og T-cellenes evne til å lage hukommelsesceller som sørger for at fisken gjenkjenner antigener ved en senere anledning, og som gjør at kroppen kan sette i gang en immunrespons mye raskere enn første gang. Dette skjer

ved at cellene enten skiller ut løselige forbindelser som påvirker resten av immunforsvaret, eller ved at cellene går til direkte angrep mot celler som uttrykker antigenet (12, s. 51-52).

Det adaptive immunforsvaret er også delt inn i en humoral og en cellulær del, der B-cellene er involvert i den humorale delen, mens T-cellene er involvert i den cellulære delen. De humorale parameterne som dominerer er immunoglobulin (Ig), som er uttrykt enten som B-cellerreseptorer eller som finnes i sekretert form i plasma. Etter at cellene er blitt aktivert av et spesifikt antigen, for eksempel et peptid fra et virus, enten i løselig form, eller ved kontakt med et vevtypeantigen (MHC) på en antigenpreseterende celle (APC), kan B-cellen utvikle seg til hukommelsesceller og plasmaceller som skiller ut spesifikke antistoff (11).

T-cellene har membranbundne antigenreseptorer som gjenkjenner antigener som er presentert av MHC klasse 1 og 2. MHC klasse 1 finnes i de fleste kroppsceller, og presenterer intracellulære peptider som er avledet fra celler som eksempelvis er infisert av virus. De infiserte cellene med MHC klasse 1 lager en interaksjon med cytotoksiske T-celler som har en CD8-reseptor (CD8 T-celler). CD8 T-cellen gjør at den infiserte cellen går i apoptose for å forhindre spredning av virus (13). Dette gjør den ved hjelp av proteinene perforin og granzym. Perforin perforerer membranen til den infiserte cellen, slik at granzym kan indusere apoptose (14, s. 125, 15) MHC klasse 2 binder peptider som presenteres for T-hjelpeceller med CD4-reseptorer (CD4 T-celler) (13). Dette medfører at CD4 T-cellen skiller ut cytokiner som aktiverer makrofager og B-celler, noe som videre stimulerer antistoffproduksjon (14, s. 11).

1.2.3 Interferoner

Cellene er i kontakt med hverandre, delvis med direkte kontakt, men også ved å sende ut signalmolekyler kalt cytokiner. Disse består gjerne av små polypeptider som fester seg til spesifikke reseptorer til naboceller, og på denne måten kan cellene kommunisere med hverandre. Det finnes flere ulike cytokiner, deriblant interferoner (IFN). Interferoner er lavmolekylære polypeptider som blant annet produseres av virusinfiserte celler. Polypeptidene kan binde seg til friske naboceller som gjør at cellene setter i gang en intracellulær respons. Ved en virusinfeksjon kan interferonene eksempelvis indusere produksjon av enzymer som degraderer virus- og vertscellens produksjon av mRNA, i tillegg til å stanse translasjon ved å inaktivere initieringsfaktorene til ribosomet. Dette hindrer spredning av virus til andre celler (12, s. 48-49). Det er blitt gjennomført flere studier som har vist at det finnes et interferonsystem i organer og serum i fisk. Systemet er imidlertid noe ulikt det som er blitt observert i pattedyr. I laks deles interferonene inn i to grupper; type 1-interferoner og type 2-interferoner. Type 1-

interferoner omfatter hele seks undertyper: IFNa, IFNb, IFNc, IFNd, IFNe og IFNf. Flere av disse induserer blant annet produksjon av myxovirus resistance gene (MX) og interferon stimulated gene (ISG) (16). Type 2-interferoner består av interferon γ (IFN γ) som blant annet er ansvarlig for aktivering av cytotoksiske celler. Disse interferonene blir produsert av naturlige dreperceller (NK-celler) i den medfødte immunresponsen, men også av CD4 T-celler og CD8 T-celler i den adaptive immunresponsen. IFN γ er blitt identifisert i flere fiskearter, inkludert i atlantisk laks. I regnbueørret og i karpe har det blitt påvist at IFN γ kan styrke respirasjonsaktivitet og nitrogenoksidproduksjon, samt styrke fagocytose av bakterier i makrofager (13, 17).

1.2.4 Interferonstimulerte gener

Mx-proteiner er produkter av MX-gener som er mye studert og kjent for å induseres av type 1-interferoner (18). Det er blitt identifisert tre typer Mx-proteiner i laks; Mx1, Mx2 og Mx3 som alle uttrykkes i cytoplasma (16). Disse proteinene tilhører en familie med GTPaser og blir dannet som en del av det medfødte immunforsvaret. Innen denne familien har GTPasene en rekke funksjoner, inkludert endocytose og intracellulær vesikkeltransport. Proteinene blir dannet som et resultat av en virusinfeksjon for å hemme replikasjon av virus (19).

ISG15 er en av de tidligste proteinene som blir induert etter en stimulering med type 1-interferoner. Proteinene ligner Ubiquitin-molekyler som ved hjelp av andre enzymer bindes kovalent til proteiner som skal brytes ned. Dette er påvist i både mennesker, gullfisk og atlantisk laks (20). Proteinet har evne til å binde til både cellulære og virale proteiner, noe som gjør den i stand til å forandre vertsfunksjonen i tillegg til å hemme virusreplikasjon (16).

1.2.5 Fiskens primære immunologiske organer

Fisk og pattedyr har mange likheter når det kommer til oppbygning av immunforsvaret, men har samtidig noen forskjeller med tanke på de immunologiske organene. En av de viktigste forskjellene fra andre varmblodige dyr, er fiskens manglende beinmarg og lymfeknuter. Hos fisken er det nyren som regnes som det viktigste immunorganet i tillegg til milt, thymus og slimassosiert lymfevev (21).

Fisk har to primære immunologiske organer der lymfocytene utvikles og modnes; thymus og hodenyre som henholdsvis utvikler T-lymfocytter og B-lymfocytter (22).

Thymusen befinner seg dorsalt mellom tredje og fjerde gjellebue, mens fiskens nyre ligger dorsalt langs hele lengden i fisken og har en mørk farge grunnet hematopoiese. Den craniale delen av nyren kalles hodenyre eller fornyre, og ligger like bak gjellene (8, s. 125). Denne delen kan sammenlignes med beinmargen som finnes i varmblodige dyr og har ikke ekskretorisk vev som resten av nyren har. Hodenyre har imidlertid en aktiv rolle i dannelsen av og utviklingen av B-lymfocytter, i tillegg til lagring av immunoglobulinsekreterende plasmaceller (23). Videre kan hodenyre også sees på som et sekundært immunologisk organ, på lik linje med en lymfeknute, der den tar opp antigener via blodet (21).



Figur 4: Illustrasjonsbilde av laksens nyre

1.2.6 Sekundære immunologiske organer

Milten er ansett som det største sekundære immunologiske organet i fisken (23), og er sammen med nyre og thymus en av de viktigste hematopoietiske organene. Den befinner seg like ved midttarmen og minner mye om hodenyrens lymfatiske vev. Oppbygningen av milten består blant annet av mange blodkanaler som leukocytter og erythrocytter sendes gjennom i (8, s. 76-78). Milten inneholder også plasmaceller som enten er modne eller under utvikling, i tillegg til makrofager som ligger beskyttet i et nettverk av fibroblastiske celler. De fleste makrofager befinner seg i melanomakrofagsentre, og det antas at det er her nedbrytningen av blant annet erythrocyttene finner sted. Disse sentrene kan også inneholde lymfocytter og det har blitt vist at i melanomakrofagsentrene kan lagre antigener som immunkompleks over lengre perioder (24).

Videre er gjellene også ansett som et sekundært immunologisk organ. I tillegg til å være det respiratoriske organet i fisken, danner gjellene en fysisk barriere mot det ytre miljøet. Det har senere vist seg at gjellene i tillegg innehar lymfatisk vev som ligner det som har blitt observert i slimhinnene til pattedyr. I et studie av Haugarvoll m.fl (25) ble det påvist et interbranchialt lymfatisk vev (ILT) i atlantisk laks.

Ved bruk av elektronmikroskop fant de celleakkumuleringer ved basen av gjellefilamentene og avdekket T-celler ved bruk av RT-PCR. Det har senere blitt gjort flere studier om ILT, men det er fortsatt mye som er ukjent angående den funksjonelle utviklingen av organet. Det har blitt påvist proliferering av T-celler, men det er også stor sannsynlighet for ekstern rekruttering av immunceller i det voksende ILT (26).

1.2.7 Stress som immunhemmer

Den generelle oppfatning av stress er vanskelig å definere, men kan refereres til den reaksjonen som oppstår under en truende situasjon. En stressrespons er initiert og kontrollert av to hormonsystemer; systemet som produserer katekolaminer, eksempelvis adrenalin og noradrenalin, samt systemet som produserer kortikosteroider, hovedsakelig kortisol (27).

I oppdrettsnæringen antas det at stress utgjør en av de største faktorene som gjør oppdrettsfisken mer utsatt for sykdom (28). Stressresponser kan være fordelaktig når fisken er i truende situasjoner, da det blant annet frigis energi og oksygen til vitale deler av kroppen. På motsatt side kan stressresponser være skadelig dersom fisken blir utsatt for stress over lengre tid, noe som eksempelvis kan gi negativ effekt på å takle eventuell sykdom (27). Kortisol kan virke hemmende på immunsystemet under en inflammatorisk respons ved å hindre leukocytter å vandre til det skadede området. Det blir også generelt redusert sirkulasjon av leukocytter og lymfocytter. I studier gjennomført på hydrokortisoninjisert brunørret har det vist seg at dødeligheten øker ved infeksjon av vanlige sopp- og bakteriesykdommer. Dette i takt med økende mengde kortisol i plasma (29). Et annet studie gjennomført på hydrokortisoninjisert laks, infisert med infeksiøs pankreas nekrose virus, ble det vist at virusmengden økte med forhøyet kortisol i plasma. Samme studie viste at høyt kortisolnivå førte til suppresjon av det medfødte immunforsvaret, i tillegg til nedregulering og forsinkelse av ekspresjon av type I interferoner og MX1 (30).

1.3 Salmon Gill Poxvirus

Salmon Gill Poxvirus Disease (SGPVD) er en av virussykdommene som har satt sitt preg på oppdrettsnæringen. En infeksjon med SGPV kan gi varierende konsekvenser med tanke på klinisk forløp og dødelighet. Ifølge fiskehelse rapporten (2) ble det i 2018 påvist SGPV i syk laks ved åtte settefiskanlegg og åtte matfiskanlegg. Dette er basert på saker som kom inn til Veterinærinstituttet. I ti av utbruddene viste seg å være andre smittestoff til stede, slik som amøber og bakterier. Man vil derfor kunne anta at det er lett å overse betydningen til SGPV fordi viruset ofte opptrer i komplekse gjellesykdommer.

For å sikkert kunne diagnostisere sykdommen, må viruset påvises i gjellene. Dette kan gjøres ved analyseverktøy som for eksempel PCR og ved karakteristiske histopatologiske funn (2).



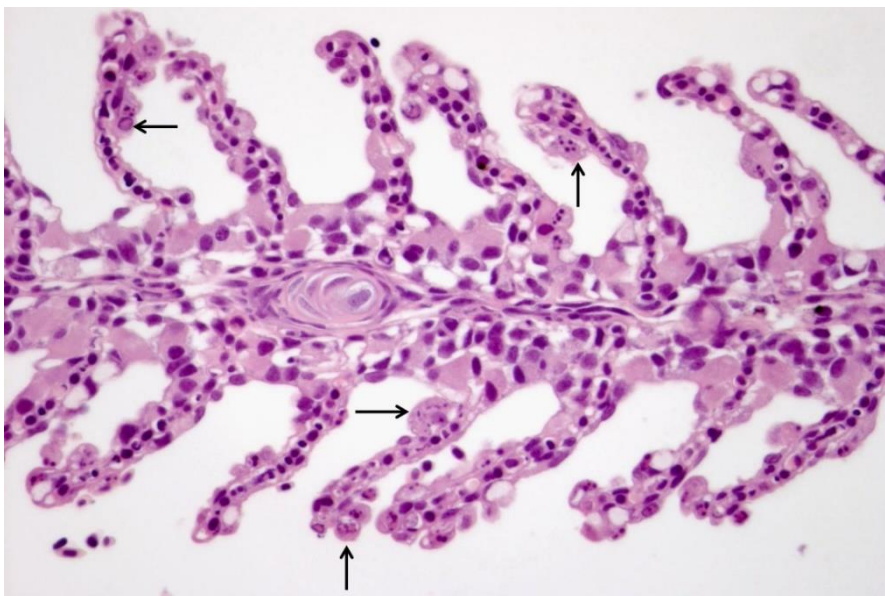
Figur 5: Kart over lokaliteter med SGPV i 2018 (2)

1.3.1 Sykdomsforløp hos smittet laks

SGPV kan forårsake sykdom hos oppdrettslaks og vill laksefisk ved alle utviklingstrinn, både i settefisk- og sjøfasen. Virusets navn tilsier, først og fremst gjellesykdom hos laksen. SGPVD ble første gang mistenkt i 1995 hos settefisk, der det ble observert synlige forandringer på gjellene, og akutt dødelighet i det aktuelle anlegget (31). Poxrelaterte sykdommer i fisk med høy dødelighet er også blitt observert i andre fiskearter, som for eksempel carp edema virus disease (CEVD) i karper og koi. Felles for de to infeksjonssykdommene, er at smittestoffet angriper gjellene som kan føre til nedsatt gjellefunksjon (32).

Det har vist seg at SGPV er svært smittomt og kan overføres ved horisontal smitte fra fisk til fisk i ferskvann (31). Dødelighet i forbindelse med sykdomsutbrudd med SGPVD kan være svært høy og dødelighet opp mot 70% er rapportert (32). En av strategiene for å begrense sykdomsomsfang og dødelighet, er å unngå stressfaktorer i miljøet, tilsette ekstra oksygen i vannet og stoppe fôring (31, 33).

Det viktigste kliniske kjennetegnet til sykdommen er dens påvirkning på fiskenes respirasjonsorgan. Epitelceller i gjellene går inn i apoptose, eller programmert celledød, som vist i figur 6. Dette gjør at den respiratoriske overflaten reduseres, i forhold til hvordan gjellene hadde vært i frisk tilstand. Videre kan det under kroniske tilfeller forekomme overvekst av overflateceller (epitelceller) slik at de respiratoriske enhetene blir mer eller mindre blokkert (32).



Figur 6: Poxinfisert gjelle. Pilene viser apoptotiske epitelceller (Foto: Mona Gjessig)

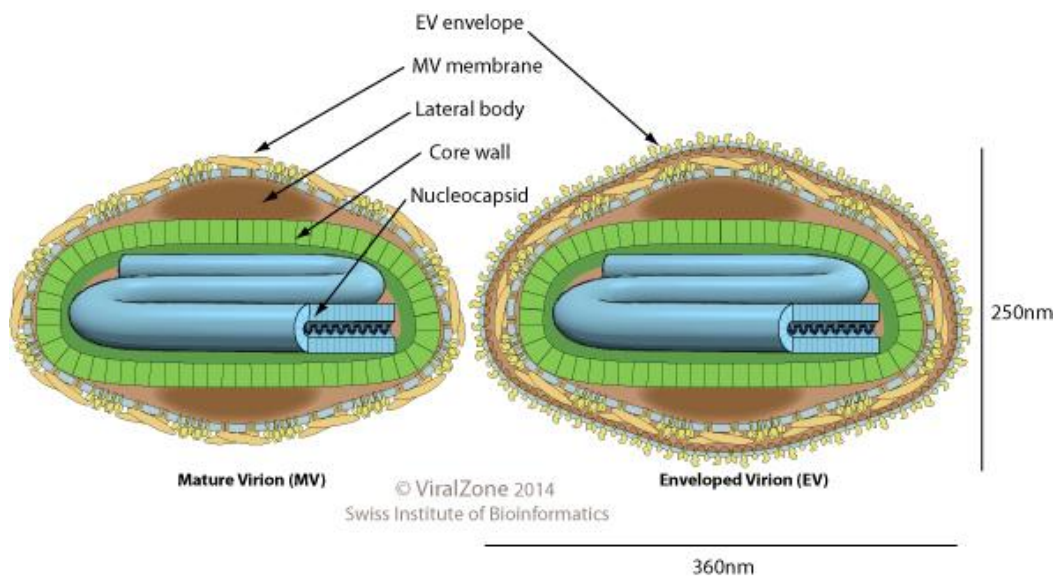
Laks som er infisert med SGPV har som oftest ingen synlige forandringer i organene som kan observeres under obduksjon. I organer som nyre og milt, kan man i enkelte tilfeller observere nedbrutte blodceller. I tillegg kan en av og til under akutte tilfeller observere at gjellene og andre indre organer opptrer som noe bleke, samt at milten har blitt forstørret. Videre har det ved utbrudd i oppdrettsanlegg vist seg at magesekken ofte er tom, noe som kan tyde på at fisken mister appetitt under sykdomsforløpet. Dette kan også være et resultat av at fôring er stanset, noe som er et vanlig tiltak under utbrudd (32).

1.3.2 Virusets opprinnelse og oppbygning

Poxvirus representerer en familie av store DNA-virus som kan forårsake sykdom i flere dyrearter, inkludert fugler, reptiler og fisk (34). Virusfamilien er delt inn i to subfamilier; chordopoxvirus (ChPV) og entomopoxvirus (EnPV) som har henholdsvis virveldyr og insekter som verter. For de fleste er det mest kjente poxviruset Variola virus (VAR) som ligger under familien ChPV (35). Dette viruset ga sykdommen kopper som i løpet av det 20. århundre kostet rundt 300 millioner menneskeliv (36). Koppelignende utbrudd forekommer også i dyr som kyr (kukopper), og på 1700-tallet ble det lagt merke til at budeier som omgikk kyrne ikke var like mottakelige for å bli smittet av det langt mer aggressive viruset, VAR. Dette inspirerte legen Edward Jenner (1749-1823) som oppdaget at inokulasjon av kukopper ga immunitet mot det mer aggressive variola viruset. Metoden ble senere kalt vaksinasjon, etter det latinske ordet «vacca» som betyr ku. I dag er viruset som brukes i vaksine mot VAR betraktet som en egen virusart, og har fått tildelt navnet vaccinia virus (VACV) (37).

Fylogenetiske analyser viser at SGPV også tilhører familien ChPV. Stort sett inneholder viruset de samme viktige genene som andre Chordopoxvirus har, eksempelvis genene som gjør viruset i stand til å replikere og danne viruskappe, i tillegg til andre vitale gener. Likevel er det en del som skiller SGPV fra andre Chordopoxvirus, slik som for eksempel manglende gener involvert i membranbiogenese. På motsatt side, er det indikert at SGPV har flere andre gener som ikke andre Chordopoxvirus har, men per dags dato er det ukjent hvilken funksjon disse proteinene har (34).

Arvematerialet til alle poxvirus består av et lineært og dobbeltrådig DNA (dsDNA) som varierer i størrelse. Denne type virus kommer i flere varianter, og ut fra de ulike slektene kan viruset forekomme som ovalformet eller firkantet (32).

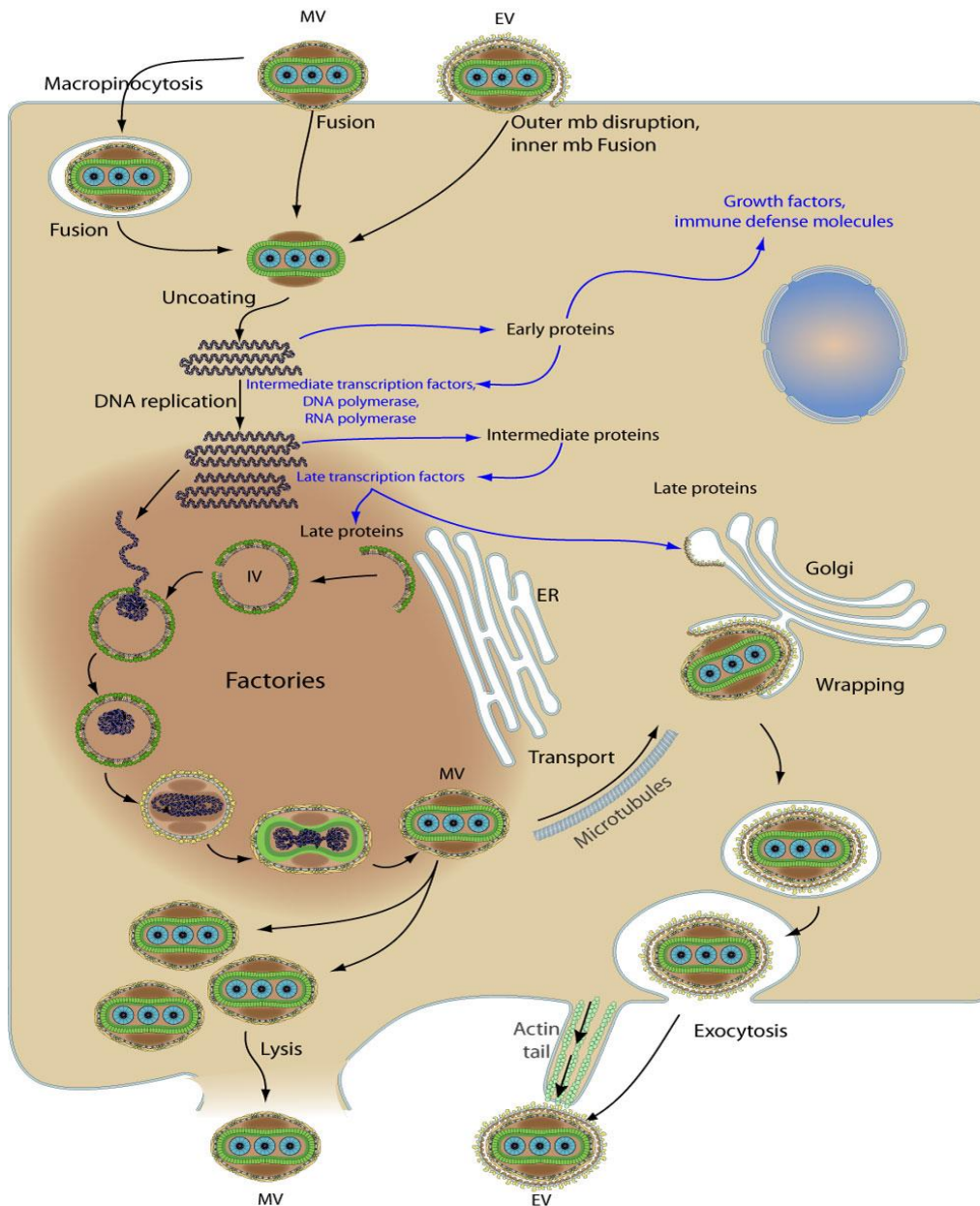


Figur 7: Oppbygning av ett poxvirus. Figuren til venstre viser hvordan viruset ser ut intracellulært, mens figuren til høyre viser viruset i ekstracellulær form med en ekstra membrankappe (38)

SPGV har en størrelse på 360 x 270 x 250 nm (32), og har et arvemateriale bestående av 241,56 kbp, som koder for 210 unike proteiner (39). Avhengig av hvilket plan viruset blir sett på, kan det ses som firkantet til ovalformet med en sentrallokalisert kjerne (32). Den ytre kapsidveggen beskytter arvematerialet, viruskodete enzymer og andre faktorer som tillater transkripsjon av tidlige gener. Dette er igjen omgitt av en lipidmembran som inneholder en rekke proteiner. I ekstracellulær form vil viruset gjerne bestå av en ytterligere membran som inneholder andre proteiner, forskjellig fra den indre membranen. Dette er vist i figur 7 (40).

1.3.3 Replikasjonssyklus

Vaccinia viruset er brukt som en modell for andre poxvirus. Det legges derfor til grunn at også SGPV følger samme mønster når det kommer til replikasjon og genekspressjon (41). I motsetning til de fleste andre virus, skjer hele replikasjonen inne i cytoplasma ved infeksjon av SGPV (42). Dette er vist i figur 8.



Figur 8: Replikasjonssyklus for poxvirus med alternative måter for å infisering og frigjørelse (43)

Vaccinia virus kan spres via to distinkte metoder; ved direkte celle til cellekontakt, eller frigjøring ved å lysere cellen. Spredning fra celle til celle er assosiert med det ekstracellulære viruset som inneholder en ekstra membrankappe. Den ekstra membranen gjør at viruset kan spres til naboceller ved direkte cellekontakt. I motsetning til dette kan viruset frigjøres ved å lysere cellen og deretter infisere nye celler i det ekstracellulære rommet. Dette gjør at viruset har potensiale til å spre seg over lengre avstander, noe som eventuelt gjør det enklere å infisere en ny vert (44).

Som nevnt over er SGPV ofte innkapslet av en ytre membran i ekstracellulær form. Membrankappen inneholder reseptorer som gjenkjenner membranen til cellen der viruspartikkelen trenger inn i. Dette skjer ved at membranspesifikke virusproteiner binder til vertsmolekyler, som kan bestå av membranproteiner, lipider eller karbohydratmotiver som presenteres av enten glykoproteiner eller glykolipider. Figur 8 viser hvordan poxviruset fusjoneres inn i cellemembranen til cellen og hvordan virusets kapsid deretter blir sluppet ut i cytosol. Dette gjør at viruset mister den ytre membranen som til vanlig omslutter viruset i ekstracellulær form (40).

Kapsidet beskytter DNA-genomet sammen med andre virale proteiner, eksempelvis DNA-avhengig DNA-polymerase og RNA-polymerase, tidlige transkripsjonsfaktorer, poly(A) polymerase, capping- og metyleringsenzymmer, samt faktorer for DNA-replikasjon og intermediær transkripsjon (45, s. 2138). RNA-polymerasen og andre initieringsproteiner som ligger inne i kapsidet er viktig for spesifikk gjenkjennelse av promotorer i de tidlige genene i viruset (46, s. 828). Etter at viruset er inne i cytoplasma, vil tidlige gener bli transkribert ved hjelp av den virale RNA-polymerasen. Disse genene blir i pattedyr transkribert bare minutter etter at viruset har infisert den aktuelle cellen, og det transkriberte mRNA'et vil herfra trenge ut i cytoplasma gjennom porene i virusets indre kapsid. Dette skjer ved hjelp av virusets egne proteiner som ligger innebygd inne i nukleokapsidet sammen med arvematerialet (41).

De tidlige genene translateres til en rekke proteiner, inkludert vekstfaktorer, faktorer for DNA-replikasjon og intermediær transkripsjon, samt immunhemmende proteiner (45, s. 2139). B22R er et eksempel på en av genene som antas å bli uttrykt tidlig (47). Dette genet koder for et stort membranprotein som undertrykker vertens adaptive immunrespons ved å inhibere T-lymfocytter (34). Rundt halvparten av de virale genene er uttrykt i den tidlige fasen av infeksjonen, og det transkriberte RNA'et blir videre translatert ved hjelp av det cellulære proteinsyntetiserende maskineriet.

Syntese av de tidlige proteinene initierer også «avkledning» av kapsidet slik at genomet frigjøres i cytosol. Når kapsidet blir plukket fra hverandre fører dette til at de tidlige genene hemmes. Andre tidlige proteiner medierer replikasjon av virus-DNA, som videre fungerer som templat for ytterligere genomreplikering, samt transkripsjon av intermediære gener. Transkripsjon av de intermediære genene er avhengig av virale initieringsproteiner som gir spesifisitet til intermediære promotorer på den virale RNA-polymerasen. Videre er proteiner og transkripsjonsfaktorer som blir dannet fra de intermediære genene viktig for transkripsjon av de sene genene der de strukturelle proteiner blir dannet (46, s. 828-829). I tillegg til å danne de

strukturelle proteinene, vil de sene genene også transkribere mRNA som translateres til transkripsjonsfaktorer og andre enzymer som senere skal pakkes inn i viruspartikkelen.

Oppbygging av viruset starter med dannelse av proteinkapsid der genomet blir pakket inn. Herfra modnes viruset før den blir innpakket av vertens trans-golgi og ført videre ut av cellen ved hjelp av cellens mikrotubuli. Ved frigjøring fra cellen vil viruset fusjoneres med cellens plasmamembran som vil gi et ekstra membranlag (45, s. 2139). Viruset kan eventuelt frigjøres ved å lysere cellen, noe som kun vil gi en enkel membran.

1.4 Målet med studien

Salmon gill poxvirus disease (SGPVD) er en virussykdom som gir gjelleskade i laks. Dødelighet som følge av sykdommen er kostbart for næringen og gir ikke minst dårlig fikevelferd. SGPV ble karakterisert og sekvensert i 2015, men det mangler fortsatt grunnleggende kunnskap for å kunne optimalisere smitteforebygging og smitteredusering. Hovedmålet med denne masteroppgaven var å øke kunnskap om SGPV-infeksjon samt sykdomsutvikling i laks.

Delmål 1: Studere virusets genuttrykk under forskjellige faser av infeksjon

Delmål 2: Studere laksens immunrespons under SGPV-infeksjon

Delmål 3: Studere effekter av kortisol på SGPV-infeksjon og laksens immunrespons

2. Materialer og metoder

Oppdrettslaksen som er brukt i smitteforsøket er hentet fra akvariet på NMBU, og er videre blitt smittet med fersk dødfisk fra et poxutbrudd fra et oppdrettsanlegg i Nordland.

2.1 Prøvetakingsprosedyre

Forsøket baserte seg på 220 laks på ca. 50 gram, som ble delt inn i fire grupper; 55 kontrollfisk (gruppe 1), 55 fisk injisert med hydrokortison (gruppe 2), 55 fisk smittet med SGPV (gruppe 3) og 55 fisk der det både var injisert hydrokortison og som ble smittet med SGPV (gruppe 4). Et depotpreparat med hydrokortison (Sigma-aldrich) ble laget som beskrevet av Gadan m.fl. (30); 10 mg hydrokortison/ml laget i en blanding (1:1) av rapsolje og kokosfett. Denne blandingen ble injisert én dag før smitte, slik at hydrokortisonkonsentrasjonen utgjorde 50 µg hydrokortison per gram kroppsvekt. Fiskene uten hydrokortison (gruppe 1 og 3) fikk kun injisert blanding av rapsolje og kokosfett. Til gruppe 3 og 4 ble ferske dødfisk fra et pågående feltutbrudd med SGPV, lagt i karene. Smittematerialet (dødfisken) ble fjernet etter 24 timer.

Det ble tatt ut blodprøver på heparinrør, svaberprøver samt organuttak fra 5 fisk fra hver gruppe for å følge utviklingen til laksen og viruset; 1, 3, 7, 10, 14, 21 og 28 dager etter smitte. Fisk som viste tegn på alvorlig sykdom, ble avlivet fortløpende.

Gjellene ble svabret med en bomullspinne, og lagret på RLT lysis buffer (Qiagen) for å lysere cellene. Tredje gjelle fra venstre side, thymus, hodenyre og milt ble lagt på RNAlater (Qiagen) for å beskytte og stabilisere cellulært RNA. Svaberprøver og vevsprøvene ble til slutt lagret ved -20°C, mens blodprøvene ble direkte lagret ved -80°C. Videre ble andre gjellebue fra venstre side, tarm, lever, milt, midtnyre og hode lagret på formalin (4 %) for histologisk analyse. For hvert organuttak som var ment for molekulære analyser ble skalpell byttet. Annet utstyr som saks og pinsett ble desinfisert i virkon s (Virkon Tablets Rely⁺ONTM) og deretter lagt i etanol.



Figur 9: Illustrasjonsbilde av blodprøvetaking, svabring av gjelle samt uttak av gjelle.

2.2 RNA-isolering

Genuttrykk kan kvantifiseres ut fra mengde RNA som produseres ved uttrykk av et gitt gen/gener. For å kunne studere uttrykket av de aktuelle genene, må RNA isoleres. Det ble isolert RNA fra milt og gjelle fra hele smittestudien. I tillegg ble det isolert RNA fra hodenyre og blod fra virustoppen/dødelighetstoppen; 14 dager etter smitte. Materialet ble brukt til å undersøke genuttrykk fra SGPV-genomet, men også genuttrykk fra laksens genom.

RNA fra gjellevevet ble ekstrahert ved bruk av RNeasy® Mini kit (Qiagen) med utgangspunkt i produsentens protokoll. 10-20 mg av hver gjelleprøve ble lysert i 500 µl QIAzol (Qiagen) der Tissuelyser II (Qiagen) ble brukt ved 24,7 Hz i 2 x 5 minutter for å homogenisere gjellevevet. Etter homogeniseringen i Tissuelyser ble prøvene tilsatt 100 µl kloroform (VWR), blandet godt, og deretter sentrifugert i en kjølesentrifuge ved 4°C og 11 300 rpm i 15 minutter, for faseparasjon av prøvene.

Etter sentrifugeringen ble 200 µl av den øverste hydrofile fasen pipettert ut og blandet med like mye etanol (70%). Dette ble gjort for å optimalisere bindingen mellom RNA'et og RNeasy-membranen som blandingen ble ført i. Videre ble kolonnen sentrifugert før den ble tilsatt 700 µl RW1 (fra kitet) som hadde til formål å fjerne biomolekyler fra membranen. Deretter ble kolonnen tilsatt 500 µl vaskebuffer, RPE (fra kitet), i to omganger for å rense bort rester av diverse salter fra membranen. Mellom hvert trinn ble prøvene sentrifugert i henhold til produsentens protokoll.

Avslutningsvis ble RNA-prøven eluert med 50 µl RNasefritt vann og sentrifugert i ett minutt ved 10 000 rpm, før renhetsgraden av RNA'et ble målt ved hjelp av NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Resten av prøvene ble tilsatt 2 µl RNaseOUT (Thermo Scientific) (1:4) for å hindre RNA-degradering, før de ble lagret ved -80°C.

Det ble også isolert RNA fra milt, hodenyre og blod på samme måte som forklart over, med unntak av at disse ble lysert i RLT-buffer (fra kitet) istedenfor QIAzol. RLT-buffere ble tilsatt 10 µl β-merkapttoetanol (VWR) per ml RLT-buffer for å denaturere eventuelle RNaser.

2.3 DNA-isolering

DNA-isoleringen ble utført ved bruk av QIAcube Connect (Qiagen), sammen med tilhørende kit; QIAamp DNA Mini QIAcube Kit (Qiagen). I oppgaven ble det isolert DNA fra gjelle hos infisert fisk. Av kontrollfiskene, ble det kun isolert DNA fra dag 1 og fra dag 28.

Før DNA-isoleringen ble ca. 20 mg gjelle tilsatt 180 µl ATL-buffer (fra kitet) for å lysere og løse opp vevet, samt 20 µl Proteinase K (fra kitet) for å bryte ned proteiner i prøven. Prøvene ble deretter inkubert over natt ved 56°C. Resten av isoleringen ble gjennomført på QIAcube under programmet; DNA Blood av Tissue, Tissue and Rodent Tail.

Etter at programmet var ferdig, ble prøvene tilsatt 1 µl (1 mg/ml) ribonuklease A (RNase A) (Sigma-aldrich) per 100 µl DNA-prøve for å bryte ned eventuelle rester av RNA. Renhetsgraden av DNA'et ble målt ved hjelp av NanoDrop 2000 Spectrophotometer før prøvene ble lagret ved -20°C.

Videre ble DNA fra gjellesvaber isolert og analysert av patologisk avdeling ved bruk av MagnNA pure 96 system og Viral NA large Volume kit (LifeScience) i henhold til produsentens protokoll. Parametere for analysen er beskrevet av Gjessing m.fl (34).

2.4 Konsentrasjonsmålinger

Konsentrasjon (ng/µl) samt renhetsgraden (260/280 ratio) av RNA'et og DNA'et, ble målt ved hjelp av NanoDrop 2000 Spectrophotometer i henhold til produsentens protokoll. Det ble analysert to paralleller per prøve.

NanoDrop 2000 ble også brukt til å anslå renhetsgrad av prøvene. Ved en bølgelengde på 260 nanometer, vil lyset som blir sendt ut av spektrofotometeret kunne måle nukleinsyreinnholdet i prøven. Videre vil lys med en bølgelengde på 280 nanometer, absorbere større komponenter slik som for eksempel aromatiske aminosyrer. Ved å måle forholdet mellom A260 og A280, er det mulig å anslå renheten av RNA'et og DNA'et, der et forhold på ~2,0 er ansett som rent RNA, mens en ratio på ~1,8 er ansett som rent DNA (48).

2.5 Kvalitetsmålinger

God kvalitet på RNA er kritisk for å lykkes med analyser knyttet til genekspressjon, eksempelvis ved bruk av RT-qPCR (49). Dette gjelder også DNA, der det er viktig å kvantifisere at riktig gen har blitt amplifisert under PCR-reaksjonen (50).

Ampliconlengden av PCR-produktet (ds-cDNAet) ble målt ved bruk av en 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) sammen med tilhørende kit; DNA 1000 kit (Agilent Technologies), i henhold til produsentens protokoll.

DNA-chipen som følger med kittene, inneholder sammenkoblede mikrokanaler som separerer nukleinsyrefragmenter etter størrelse ved bruk av elektroforens. Forberedelse av chipen innebærer å fordele gelmiks med fluoriserende fargemolekyler inn i brønnene, deretter tilsette markør, ladder, og til slutt prøvene før chipen plasseres inn i Bioanalyzer. Polymerene i gelmiksen gjør at ladete biomolekyler, eksempelvis DNA, kan vandre gjennom gelen og bli separert ved hjelp av elektroforeseprinsippet, der mindre molekyler vil vandre raskere enn de større molekylene. Videre vil fargemolekylene i gelmiksen intrigeres sammen med DNA-tråden som vil avgis ved hjelp av laserindusert fluorescensdeteksjon.

Resultatene fra analysen kommer ut som gel-bilder og elektroferogram. Ladderens som også ble tilført chipen, inneholder komponenter med kjent størrelse som danner en standardkurve. Denne viser sammenhengen mellom migrasjonstid og størrelse på produktene. Den tilsatte markøren justerer ladderens slik at den er i sammenheng med resten av prøvene og fungerer dessuten som en intern kontroll. Markøren inneholder i tillegg kjente konsentrasjoner som gjør at konsentrasjonen og størrelse fra hver prøve kan kalkuleres (51).

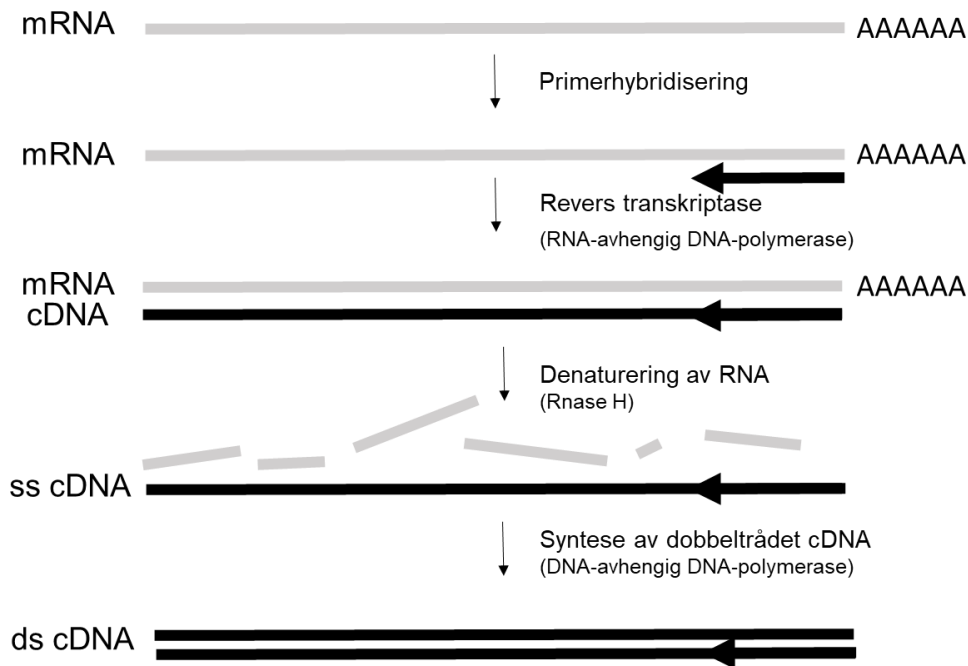
2.6 cDNA-syntese

Complementary DNA (cDNA) er DNA som er blitt syntetisert fra et enkeltrådig RNA-templat. Syntesen består av to hovedtrinn; eliminering av genomisk DNA (gDNA) og deretter revers transkripsjon.

For å oppnå mest mulige nøyaktige resultater fra genekspressionsanalyser, er det viktig å unngå kontaminering av genomisk DNA. Dette da primerne kan amplifisere DNA-sekvenser under RT-qPCR, noe som videre kan gi et unøyaktig resultat.

Selve cDNA-syntesen baserer seg på det multifunksjonelle enzymet, revers transkriptase. Enzymet har sitt opphav fra retrovirus, som har RNA som arvestoff. Dette enzymet har tre hovedfunksjoner under dannelse av cDNA: RNA-avhengig DNA-polymerase, edonuklease

(RNase H) og DNA-avhengig DNA polymerase. Figuren under illustrer enkelt hvordan mRNA blir omdannet til et dobbeltrådet cDNA. Primere vil i første steg hybridiseres til mRNA-sekvensen før RNA-avhengig DNA-polymerase transkriberer cDNA-sekvensen. Videre vil RNase H degradere RNA-tråden som er hybridisert til den nysyntetiserte cDNA-tråden. Avslutningsvis vil den DNA-avhengig DNA-polymerasen syntetisere et dobbeltrådet cDNA-molekyl (52).



Figur 10: Syntese av dobbeltrådet cDNA med mRNA som templat

cDNA-syntesen ble gjennomført i henhold til QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) slik det fremkom av produsentens manual.

Før syntesen ble alle RNA-prøvene fortynnet til 100 ng/μl. gDNA Wipeout Buffer samt RNasefritt vann ble tilsatt alle de aktuelle prøvene og inkubert i to minutter ved 42°C i en T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) med formål å fjerne gDNA fra prøvene. Etter eliminering av gDNA, ble en mastermiks bestående av Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer og RT Primer Mix tilsatt slik at hver prøve før syntesen utgjorde 20 μl med en total input på til sammen 1 000 ng RNA.

Revers transkripsjon ble også utført ved bruk av T100™ Thermal Cycler. Prøvene ble inkubert i 30 minutter ved 42°C for å aktivere revers transkripsjon, og deretter i tre minutter 95°C for å inaktivere reaksjonen. Etter endt syntese ble prøvene frosset ned og oppbevart ved -20°C.

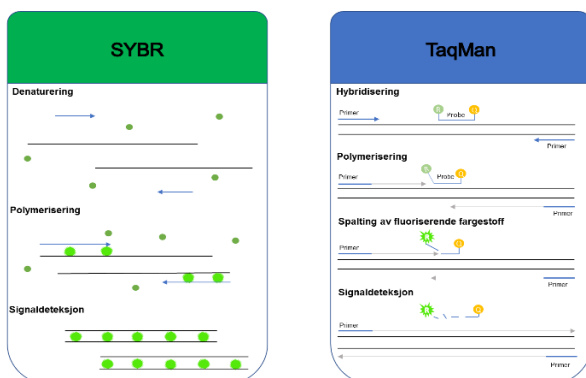
2.7 RT-qPCR

Revers transkriptase qPCR (RT-qPCR) har en viktig rolle i naturvitenskapelig forskning, og kan brukes til å måle genuttrykk. Dette gjøres ved revers transkripsjon som utført i cDNA-syntesen, kombinert med PCR (53). Analysen kan også brukes på DNA-materiale og er senere i oppgaven omtalt som vanlig qPCR.

Prinsippet ved qPCR/RT-qPCR går ut på at DNAet/cDNAet blir amplifisert mens reaksjonen blir monitorert ved hjelp av fluorescens. Det er flere deteksjonsmetoder for qPCR/RT-qPCR og i denne oppgaven er det benyttet to metoder. Den første metoden er basert på en sekvensspesifik TaqMan-probe, mens den andre metoden baserer seg på en ikke-sekvensspesifikk fluorescensfarge, SYBR Green, som fester seg til dobbeltrådig DNA.

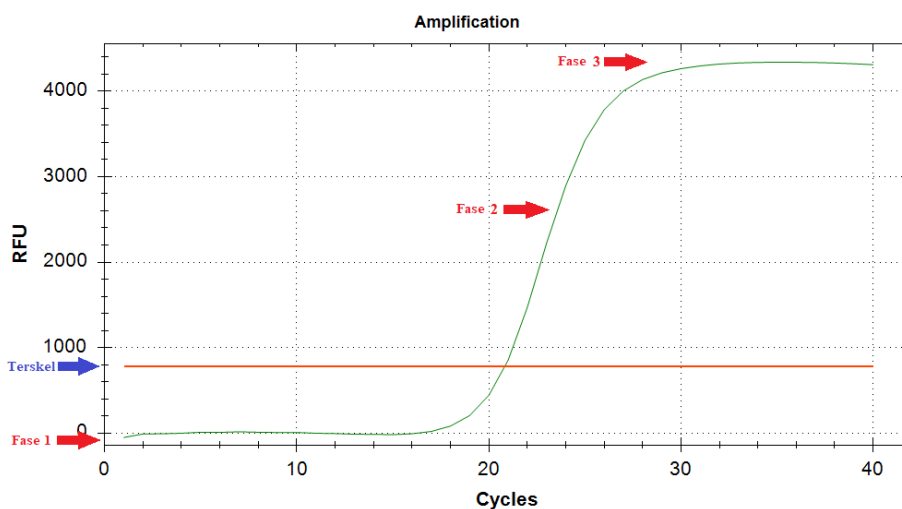
qPCR/RT-qPCR ved bruk av TaqMan er mye brukt på grunn av analysens sensitivitet og spesifisitet. Metoden baserer seg på den varmestabile Taq DNA-polymerasen og dens 5'-3'eksonukleaseaktivitet. Figur 11 viser hvordan TaqMan-proben binder sekvensspesifikt til DNA-tråden med fluoriserende fargestoff ved 5'enden og en quencher ved 3'enden. Quencheren forhindrer at fargestoffet ved 5'enden fluoriserer når proben er intakt. Når proben hydrolyseres av Taq DNA polymerase, vil imidlertid ikke quencheren ha mulighet til å absorbere fluorescensen, og 5'enden vil dermed avgi fluorescensen som detekteres av RT-qPCR-maskinen. Fargestoffmolekylene som avgis, vil være proporsjonal med mengde PCR-produkter.

Den andre metoden baserer seg på en ikke-sekvensspesifikk fluorescensfarge, SYBR green, og er også mye brukt innen utførelse av qPCR/RT-qPCR. SYBR Green binder til dobbeltstrenget DNA, som medfører at fluorescenssignalet øker med 20-100 ganger. I likhet med TaqMan-metoden, vil fluorescenssignalet med SYBR Green øke proporsjonalt med nydannelse av dobbeltrådig DNA. Figur 11 viser hvordan fargemolekylene binder seg til den dobbeltrådig DNA-tråden og avgir fluorescenssignal (54).



Figur 11: Illustrasjonsbilde av RT-qPCR ved bruk av SYBR green og TaqMan-probe

RT-qPCR prosessen kan deles inn i tre trinn/faser som vist i figur 12: I den første og tidlige fasen av PCR-reaksjonen, har ikke fluorescenssignalene steget over bakgrunnen. I den andre fasen har fluorescenssignalet økt betydelig over bakgrunnen, og det blir fastsatt en terskel i det fordoblingen av DNAet vises eksponentielt. Ct-verdien forteller hvor mange sykluser som er gjennomført og er forbundet med hvor høyt uttrykt det aktuelle genet som det testes for; lav ct indikerer at genet er høyt uttrykt, mens høy ct indikerer at genet er mindre uttrykt. Siste fase, platåfasen, oppstår når substratene i reaksjonen blir brukt opp, noe som gjør at reaksjonshastigheten faller og flater ut (54).



Figur 12: Amplifikasjonsplot for en prøve som tester positivt, vist i RT-qPCR. y-aksen viser «relative fluorescence units» (RFU) som beskriver fluorescensintensiteten, men x-aksen viser antall sykluser i reaksjonen.

Når vi studerer genuttrykk, trenger vi et grunnlag for sammenligning av genet/genene av interesse. For å oppnå dette, brukes det et referansegen som er jevnt uttrykt og som uttrykkes i cellene hele tiden. Referansegener er vanligvis gener som er grunnleggende for organismens overlevelse og som ikke påvirkes av ytre stimuli (55). I denne oppgaven ble *Ef1 α* benyttet, som er en translasjonsfaktor som spiller en viktig rolle under proteinsyntesen. Dette er et gen som det av tidligere studier har vist seg å være et velegnet referansegen for atlantisk laks (56).

Videre er det viktig å ha gode primere for å oppnå et riktig resultat under RT-qPCR. Primerparene for laksegenene var blitt brukt i andre genekspressjonstudier for atlantisk laks og var derfor allerede laget. Tabell 1 viser en oversikt over hvilke primere som ble benyttet i oppgaven, rettet mot laksegener.

Tabell 1: Oversikt over benyttet primerpar for atlantisk laks. Input beskriver mengde cDNA som ble brukt for hver analyse.

Genom - gen	Funksjon	Assay - Fluorofor	Input	Sekvens
Atalantisk laks - MX1	Interferonindusert protein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GGTGATAGGGGACCAGAGT -3' RP: 5'- CTCCTCACGGTCTTGGTAGC -3'
Atalantisk laks - ISG15	Interferonindusert protein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- ATATCTACTGAACATATATCTATCATGGAAGTC -3' RP: 5'- CCTCTGCTTTGTTGTGGCCACTT -3'
Atalantisk laks - GranA	Protease	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TAAAGGTCGCATCCCTCATC -3' RP: 5'- TCCAGACACTGAGCAGTTGG -3'
Atalantisk laks - IFN γ	Type 2-Interferon	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- AAGGGCTGTGATGTGTTTCTG -3' RP: 5'- TGACTGAGCGGCATTACTCC -3'
Atalantisk laks - CD4	T-celle - overflate glykoprotein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GCCCCTGAAGTCCAACGAC -3' RP: 5'- AGGCTTCTCTCACTGCGTCC -3'
Atalantisk laks - CD8 α	T-celle - overflate glykoprotein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GTCTACAGCTGTGCATCAATCAA -3' RP: 5'- GGCTGTGGTCATTGGTGTAGT -3'
Atalantisk laks - Ef1a (nytt assay)	Elongeringsfaktor	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TGCCCCTCCAGGATGTCTAC -3' RP: 5'- TCACCAGGCATAGCCGATTC -3'
Atalantisk laks - Ef1a* (gammelt assay)	Elongeringsfaktor	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TGCCCCTCCAGGATGTCTAC -3' RP: 5'- CACGGCCCCACAGGTACTG -3'

*Gammel stock/ikke fungerende

Primerparene for pox-genene ble laget ved hjelp av primer-BLAST (NCBI). Sekvensen til det aktuelle målgenet ble søkt opp i databasen; Refseq mRNA, med følgende spesifikke parametere:

PCR produkt størrelse: fra 70 til 300 bp

Primer smeltetemperatur: fra 58 til 62°C, med temperaturoptimum på 60°C

Ut fra søkeresultatet ble det valgt primere med produktlende fra \approx 100-200 bp, som hadde lav GC-prosent og selvkomplementaritet. Primerne som ble ansett som best anvendelige, ble deretter søkt opp i nukleotid-BLAST (NCBI) for å sjekke treff hos eventuelle andre organismer som kan forekomme i prøvene. Tabell 2 viser oversikt over primere for SGPV som ble benyttet i oppgaven. En mer detaljert beskrivelse av hvert gen er beskrevet av Gjessing m.fl (34). Primerpar merket med stjerne illustrerer ikke-fungerende primersett som ga ct-verdi i negativ kontrollgruppe og/eller kontroll uten RT-enzym.

Tabell 2: Oversikt over primere og prober for SGPV som ble benyttet i oppgaven. Primersett merket med stjerne ble ikke benyttet da de ga amplifisering i negative kontrollprøver. Input beskriver mengde DNA/cDNA som ble brukt for hver analyse.

Genom - gen	Funksjon	Assay - Fluorofor	Input	Sekvens
SGPV, 98 - D13L	Interm.: Major capsid protein	TaqMan FAM	50 ng	FP: 5'- ATCCAAAATACGGAACATAAGCAAT -3'
				RP: 5'- CAACGACAAGGAGATCAACGC -3'
				Probe: 5'-6FAM - CTCAGAACTTCAAAGGA -3'
SGPV, 140 - D12L*	Tidlig: mRNA capping-enzym	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TACGAATAGAGCTGCCGGTG -3'
				RP: 5'- ACTGGCACCTACAAACCACA -3'
SGPV, 140 - D12L	Tidlig: mRNA capping-enzym	SYBR green SYBR	5 ng	P: 5'- CATAGCGGTCTGTACGGAAT -3' RP: 5'- CTGTGACAAGAGTGTCCACACA -3'
SGPV, E9L*	Tidlig: DNA-polymerase	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TCATGTACACGTCAGACGCC -3'
				RP: 5'- GAACCTGCCGGTTGATCTT -3'
SGPV, E9L	Tidlig: DNA-polymerase	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- TCGGGATCATTCCGTCGTTG -3' RP: 5'- TTCGCGGAAAGTTTGGTGAC -3'
SGPV - B22R	Tidlig: Membranprotein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- ATGCGCACATGTCAGGGTTA -3'
				RP: 5'- AGGGTTACTGGGATCCACGA -3'
SGPV - A1L	Interm.: Sein transkripsjons-faktor	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- CGTTTTTGTCTCCGGCATGT -3'
				RP: 5'- CAGGACCCTGACCATTCCAT -3'
SGPV - I6L*	Interm.: Telomer-bindende protein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GCCCCCGATGTATCCTAACG -3'
				RP: 5'- CAGTCCGTTTGATTGCCCG -3'
SGPV - D13L	Interm.: Major capsid protein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GACGGGGCAACTCTTTTCT -3'
				RP: 5'- CACCGTGACCTCGATACGAA -3'
SGPV - F9L	Sein: Myristoylert IMV-protein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- ACCACTGAACTGGTTCGATTCC -3'
				RP: 5'- AGGTTGTCCGGTCTTGTGA -3'
SGPV - A28L	Sein: membranprotein	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- CAGGCATGGTTGATGTGGTC -3'
				RP: 5'- TGACACTGCCCCGTGATTAT -3'
SGPV - G1L	Metalloprotease	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- GTGCAAGGCCCGTAAACATC -3'
				RP: 5'- GGGTAAACAGGGTCTGCCAT -3'
SGPV - A7L	Sein: Vaccinia virus - tidlig transkripsjonsfaktor (VETF)	SYBR green SYBR	5 ng	FP: 5'- ACAGGTATTCGAGGACGGGA -3'
				RP: 5'- ACATCGGTCCCAGAGGTAA -3'

*Ikke-fungerende primersett

Tabell 3: Oppsett for mastermiks. Tabell til venstre viser eksempel på oppsett med for mastermiks ved bruk av assay for TaqMan. Tabell til høyre viser eksempel på oppsett for mastermiks ved bruk av SYBR green-assay.

Mastermiks, volum til	1 reaksjon (μ l)	2,5
RNase/DNasefritt H ₂ O	1,6	4
UDG platinum supermix	5	12,5
ROX ref. dye (25 μ M) (1:10)*	0,2	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	0,3	0,75
POX_160F (10 μ M)	0,4	1
POX_260R (10 μ M)	0,4	1
POX3_MGB (10 μ M)	0,1	0,25
Totalt	8	20
I tillegg:		
DNA (25 ng/ μ l)	2	5

Mastermiks, volum til	1 reaksjon (μ l)	2,5
Mastermix (2X)	5	12,5
Primer F (10 μ M)	0,5	1,25
Primer R (10 μ M)	0,5	1,25
Vann	2	5
Totalt	8	20,00
I tillegg		
cDNA (2,5 ng/ μ l)	2	5

Mastermiks med DNA-prøver for TaqMan probe-assay (Thermo Fisher,) ble laget etter oppsett i tabell 3 og pipettert ut i dubletter på en PCR-plate med 384 brønner (Bio-Rad laboratories). Ved tillaging ble volumet ganget med 2,5 for sikre nok reagenser og prøvemateriale. I tillegg til prøvematerialet ble det kjørt positive kontrollprøver med SGPV sammen med tre ulike negative kontrollprøver:

1. Kontrollprøve med vann
2. Kontrollprøve uten SGPV
3. Kontrollprøve med SGPV uten revers transkriptase (RT-enzym)

Etter pipettering av prøve med mastermiks, ble platen forseglet med plastfilm og sentrifugert. Platen ble deretter analysert i CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad laboratories) med programvaren CFX Manager, versjon 3.1.1621.0826. Følgende program for PCR ble benyttet:

50 °C: 2 minutter
 95 °C: 15 minutter
 94 °C: 15 sek - denaturering (x 45 sykluser)
 55 °C: 30 sek - hybridisering (x 45 sykluser)
 75 °C: 15 sek - polymerisering (x 45 sykluser)

Mastermiks for assay med SYBR green (Bio Rad) ble også laget etter oppsett i tabell 3.

Fremgangsmåten er likt som beskrevet over, og følgende PCR-program ble benyttet:

95 °C: 30 sek
 95 °C: 15 sek - denaturering (x 39 sykluser)
 60 °C: 30 sek - hybridisering og polymerisering (x 39 sykluser)

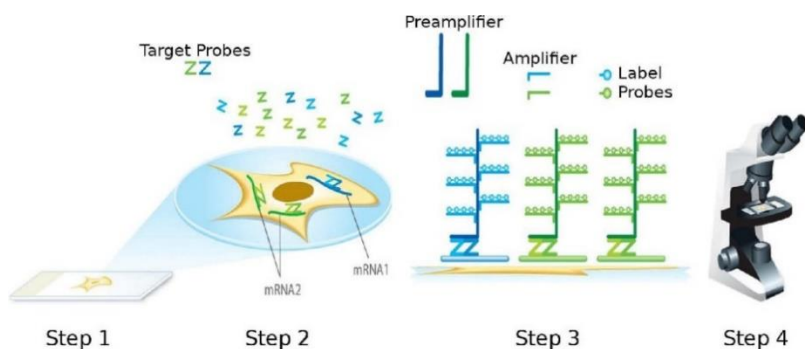
Etter siste syklus ved bruk av SYBR green, ble temperaturen gradvis økt til 95 °C for å detektere eventuelle falske PCR-produkter. Optimalt sett skal alle PCR-produktene ha samme sekvenslegde. Kortere sekvenser separeres eksempelvis raskere enn de lengre sekvensene og dermed avtar fluorescensen raskere ved dissosiering. Ut fra denne informasjonen dannes det en smeltepunktskurve som viser smeltepunkt for hver prøve i analysen. Ut fra denne kurven kan en anslå om riktig målsekvens er blitt analysert og om det er flere produkter som er blitt amplifisert i samme prøve.

qPCR for gjellesvaber ble utført av patologisk avdeling. Alle prøvene fra alle gruppene gjennom hele forsøket ble analysert ved bruk av Stratagene system (Agilent) med programvaren MxPro-Mx3005P. Parametere for analysen er beskrevet av Gjessing m.fl (34).

2.8 *In situ* hybridisering

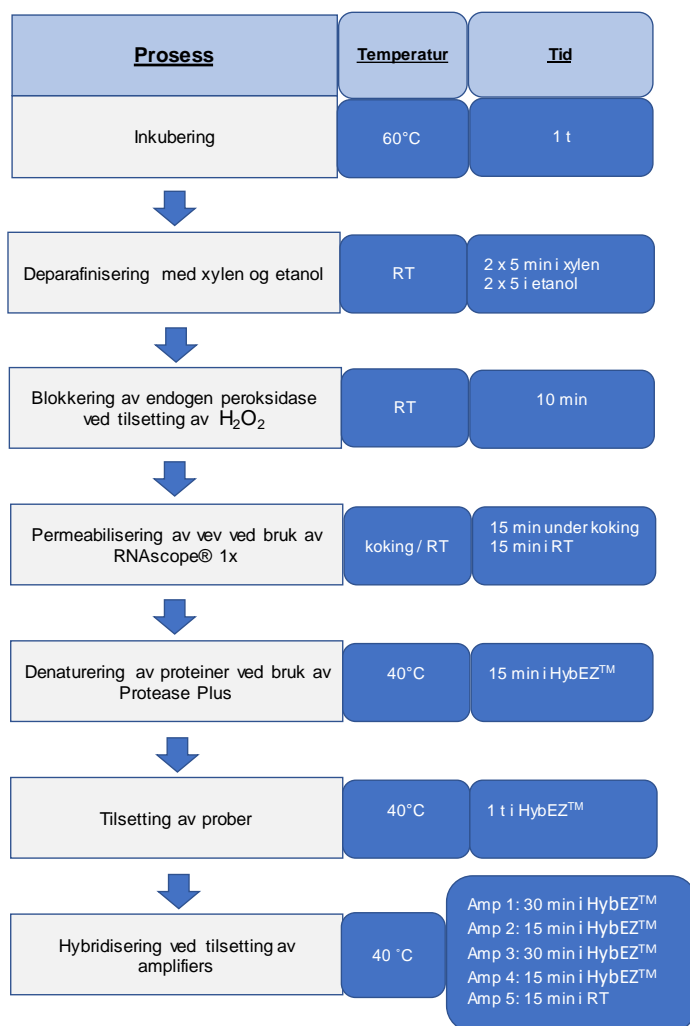
In situ hybridisering (ISH) er en metode som gjør det mulig å studere cellulær lokalisering av genuttrykk i formalinfikser vev. Analysen baserer seg på en nukleotidprobe som er rettet mot en målsekvens i RNA eller DNA, og som videre kan bli visualisert på ulike måter. Metoden ble først beskrevet i 1969, og baserte seg da på en sekvensspesifikk og radioaktiv nukleotidprobe som ble visualisert ved bruk av autoradiografi (57). I de senere år har metoden utviklet seg slik at målsekvensen kan detekteres ved bruk av fluorescens (FISH) eller kromogen (CISH) (58).

I denne oppgaven ble RNAscope® 2.0 HD Red Chromogenic Reagent Kit (Advanced Cell Diagnostics Inc.) benyttet. Dette er et kommersielt kit og derfor har enkelte reagenser ukjent sammensetning og funksjon. Kitten er unikt i form av sitt probedesign som gir større spesifisitet enn andre tradisjonelle metoder. Figuren under illustrerer prosessen. I første trinn blir vevet permeabilisert slik at probene får tilgang til mål-sekvensene. I neste trinn hybridiseres z-formede prober til RNA'et som en multimer. Tredje trinn viser hvordan neste sett med prober hybridiseres til multimerene. Disse er i tillegg konjugert med alkalisk fosfatase som reagerer ved tilsetning av kromogenet «Fast Red». Reaksjonen gir en rød farge og kan visualiseres under mikroskopi i trinn fire (59).



Figur 13: Illustrasjon av ISH-prosedyre ved bruk av RNAscope kit (59)

In situ hybridiserigen ble utført på formalinfiksert og parafininnebygd (FFPE) gjelle fra smittestudien. Det ble valgt ut totalt tre snitt fra 3, 7 og 14 dager etter infeksjon. Produsentens protokoll ble fulgt (60), og hovedtrinnene er gjenfortalt i flytskjemaet under.



Figur 14: Flytskjema over *In situ* hybridiseringsprosessen

Gjellevevet ble først inkubert i 30 minutter ved 60°C for å få vevet til å feste seg til objektglasset. Videre ble objektglassene deparafinert i xylen i 2 x 5 minutter, og deretter dehydrert/vasket i 100 % alkohol i 2 x 1 minutt for å fjerne xylen-restene. Gjellevevet ble i neste trinn avgrenset fra resten av objektglasset ved bruk av en hydrofob merkepen. Dette ble gjort for å begrense bruk av reagenser senere i forsøket.

Hydrogenperoksid fra kitet ble i neste trinn tilsatt vevet med 3-4 dråper. Vevet ble deretter permeabilisert ved koking i RNAscope® retrieval buffer i 15 minutter og videre inkubert i romtemperatur i 15 nye minutter. Etter inkuberingen ble snittene tilsatt Protease Plus og inkubert i 15 minutter ved 40°C i varme- og fuktighetsskapet HybEZ™ (Advanced Cell Diagnostics Inc.). Dette ble gjort for å bryte ned proteinstrukturer, noe som øker tilgangen til proben som ble tilsatt i neste trinn.

Proben som ble benyttet i forsøket var rettet mot SGPV-genet D13L, uttrykt som mRNA. Dette er det samme genet som rutinemessig brukes for å detektere viruset under PCR innad Veterinærinstituttet. For å sikre troverdige og tolkbare resultater, ble det parallelt gjennomført ISH på samme type vev med negativ og positiv kontrollprobe. Den negative kontrollproben var rettet mot en bakteriell gensekvens (dapB) i *Escherichia coli*, og ble brukt for å undersøke bakgrunnsignal. Den positive kontrollproben var rettet mot et gen (ppib) i laksegenomet, og ble brukt til å verifisere analysen.

Etter at probene ble tilsatt vevet, ble objektglassene inkubert i HybEZ™ i 1 time, før neste sett med prober ble tilsatt som angitt i flytskjemaet (omtalt som amplifiers/amp i flytskjema).

Avslutningsvis ble substratet Fast Red brukt for å detektere SGPV-hybridiserte områder på organet. Objektglassene/snittene ble til slutt kontrastfarget i to minutter med Mayer's hematoxylin (Chemi Teknikk) (1:1).

2.9 Identifikasjon av hypotetiske aminosyresekvenser

Når en åpen leseramme blir tolket som et hypotetisk protein, vet man verken om proteinet faktisk eksisterer eller hvilken funksjon det egentlig ville hatt dersom det fantes. Selv om sekvensen er ukjent, er det likevel mulig å forutsi funksjonen basert på beslektede og bedre studerte organismer som har lignende gensekvens og/eller aminosyresekvens (61). I oppgaven ble alle hypotetiske proteiner i pox-genomet (122) undersøkt for konserverte domener samt annen annoteringsinformasjon.

NCBI's Conserved Domain Database (CDD) er en database som inneholder en samling av svært mange sekvenssammenstillinger for velkjente domener og proteiner (62). Denne databasen ble brukt i oppgaven for å finne konserverte domener. Aminosyresekvensen for hvert hypotetiske protein ble brukt til søk med Conserved Domain Blast (CD-blast).

Videre ble de samme sekvensene forsøkt annotert ved bruk av protein-protein Blast (Blastp) med følgende database: RefSeq non-redundant proteins. Dette ble gjort for å undersøke om sekvensen ga treff hos andre virus med kjent funksjon.

Avslutningsvis ble alle 210 proteinsekvenser kjørt gjennom programmet Blast2GO ved hjelp av veileder Torstein Tengs. Dette ble gjort med formål å finne funksjonelle annoteringsdata i form av genontologitermer (GO-termer). GO-termene er delt inn i tre kategorier; cellulær komponent som viser cellulær anatomi (C), molekylær funksjon (F) og biologisk prosess (P) (63).

2.10 Databehandling

Genekspresjonsdata fra RTqPCR/qPCR-analysene ble analysert i Graphpad Prism, versjon 8.0.2. Det ble beregnet relativt genuttrykk med to ulike metoder; ved bruk av relativ standardkurve og ved bruk av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden. For begge metodene ble resultatene normalisert mot referansegenet, EF1 α .

For beregning av relativt genuttrykk ved bruk av standardkurve, ble det laget en 2-fold standardkurve med utgangspunkt fra et vidt spekter av RNA-prøver fra hele smittestudien. Deretter ble standardkurven syntetisert til cDNA og brukt i hver RT-qPCR-analyse for hvert gen. Under RT-qPCR-analyse av et gitt gen, vil ct-verdien fra hver prøve sammenlignes med ct-verdiene fra standardkurven. Ved å sammenligne ct-verdiene, kan en anslå de relative mengdene mRNA i prøvene mot standardkurven (64).

Relativ kvantifisering ved bruk av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden, baserer seg på endring i genekspresjon av et gitt gen i forhold til en referanseprøve eller snittverdi av en referansegruppe (53). Under analysen ble alle prøvene i form av ct-verdier korrigert mot referansegenet EF1 α (målt fra samme prøve) for å få ΔCt . Disse verdiene ble videre korrigert mot snittverdien fra kontrollgruppen (gruppe 1), som ga $\Delta\Delta Ct$. Verdien ble videre satt inn i ligningen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) som ga det relative genuttrykket.

Statistiske signifikante forskjeller mellom de smittede gruppene, med og uten hydrokortisoninjisering ble beregnet med en to-halet ikke-parametrisk Man Whitney-test. Signifikante forskjeller er angitt med stjerne:

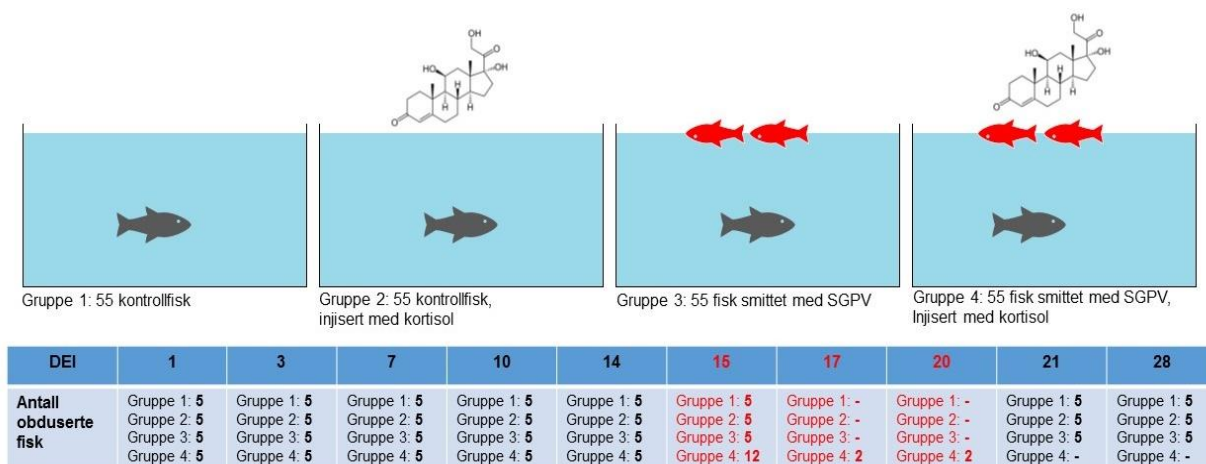
*p > 0.10, **p > 0.05 og ***p > 0.01

Videre er korrelasjon mellom gruppene beregnet med to-halet Spearmans rangkorrelasjon (Spearman r). p-verdien er angitt i figuren det gjelder.

3. Resultater

Hovedresultatene i denne masteroppgaven er basert på tidligere utført smitteforsøk, her gjengitt i figur 15. Fisken ble delt inn i fire kar for å undersøke effekten og forskjellene av hydrokortisoninjisering, virusinfeksjon og kombinasjonen av begge. Organene som ble samlet under obduksjonen ble analysert for utvalgte SGPV-gener samt verts/ immungener ved bruk av qPCR/RT-qPCR. *In situ* hybridisering ble videre benyttet på utvalgte gjellesnitt for å identifisere pox-infiserte celler.

Tidslinjen under viser antall døgn etter eksponering for smitemateriale og hvor mange fisk som ble obdusert fra hver gruppe. Uttak merket i rødt; etter 15, 17 og 20 dager ble gjennomført utenfor planlagt samplingsplan da fisken i gruppe 4 måtte avlives fortløpende grunnet alvorlige tegn på sykdom. Ingen fisk fra gruppe 4 overlevde etter dag 20.



Figur 15: oversikt og tidslinje over smitteforsøket. DEI (Dager etter infeksjon) viser antall døgn etter at smitematerialet ble fjernet. Gruppe 1 i første kar illustrerer kontrollfiskene som kun er injisert med oljebasert depotpreparat, mens gruppe 2 illustrerer kontrollfisk injisert med samme depotpreparat, blandet med hydrokortison ($C_{21}H_{30}O_5$). Gruppe 3 er injisert med depotpreparat uten hydrokortison og karet er tilsatt fersk dødfisk smittet med SGPV. Gruppe 4 er både injisert med hydrokortison og har også fått innført dødfisk smittet med SGPV. Uttak merket i rødt er sampling utført utenfor samplingsplan.

Figur 16 viser forskjeller fra kontrollfisk (gruppe 1) og infisert fisk (gruppe 4) etter 14 dager. Bilde av kontrollfisken til venstre viser en normal gjelle, med frisk farge. Fisken til høyre som er infisert med virus og injisert med hydrokortison, viser en gjelle som fremstår blekere med lyse flekker. Brystfinnen til den infiserte fisken fremstår også som noe rød i forhold til kontrollfisken. Ingen av fiskene fra gruppe 1, 2 eller 3 viste tydelige tegn på sykdom under smitteforløpet.

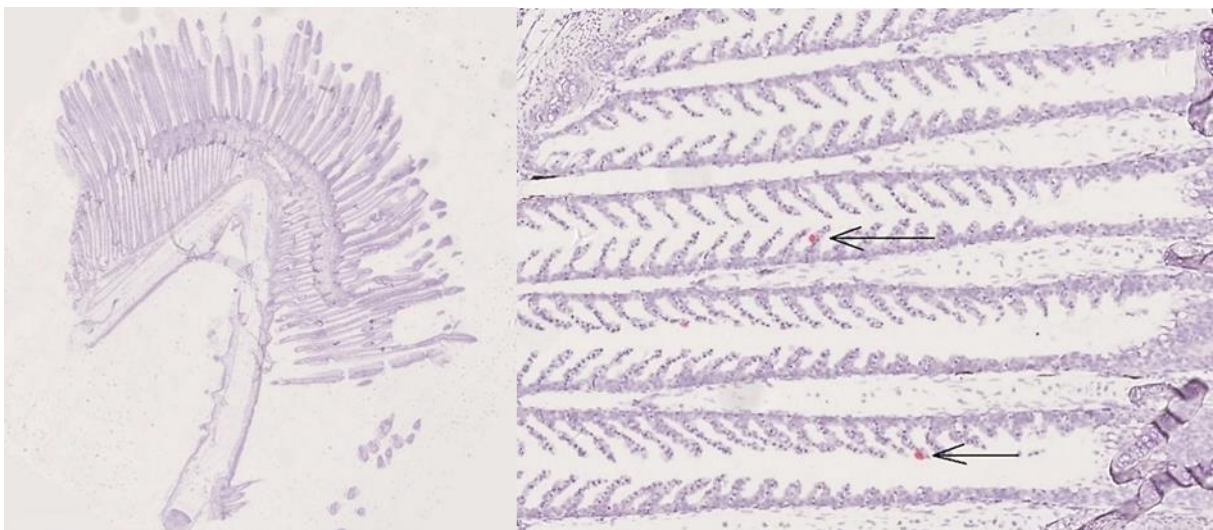


Figur 16: Fotografi av kontrollfisk og smittet fisk etter 14 dager. Bilde til venstre illustrerer gjelle fra kontrollfisk – gruppe 1, mens bilde til høyre viser gjelle fra syk fisk - gruppe 4.

3.1 *In situ* hybridisering av formalinfikserte gjellesnitt

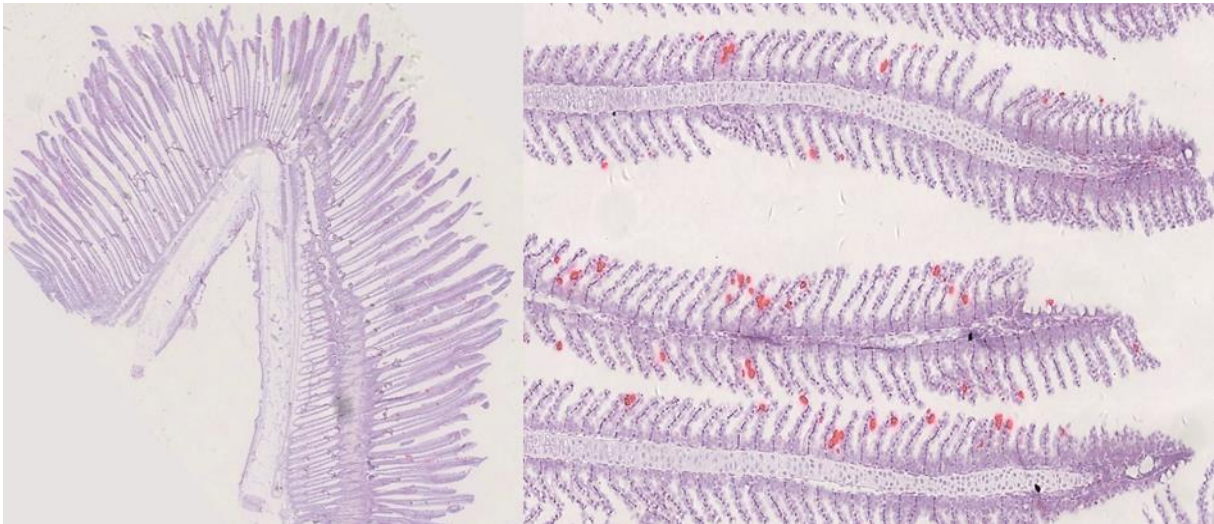
In situ hybridisering ble gjennomført på tre utvalgte parafininnstøpte gjeller fra gruppe 3 og gruppe 4 (2. gjellebue). Dette ble utført for å påvise og visualisere pox-infiserte celler, i tillegg til å validere gitt ct-verdi (3. gjellebue) fra homogenisert gjelle. SGPV-positive celler ble visualisert med rød farge på epitelvevet. Ingen av de negative kontrollene hadde fargesignal.

Første gjellesnitt fra gruppe 3 stammer fra laks 77 (L77) som ble obdusert etter tre dager med smitte. Denne laksen hadde en ct-verdi på 28,23. Figur 17 viser et helportrett av gjellesnittet samt et utsnitt fra samme gjelle. Utsnittet viser at det kun er noen få celler som er blitt infisert med SGPV (merket med pil).



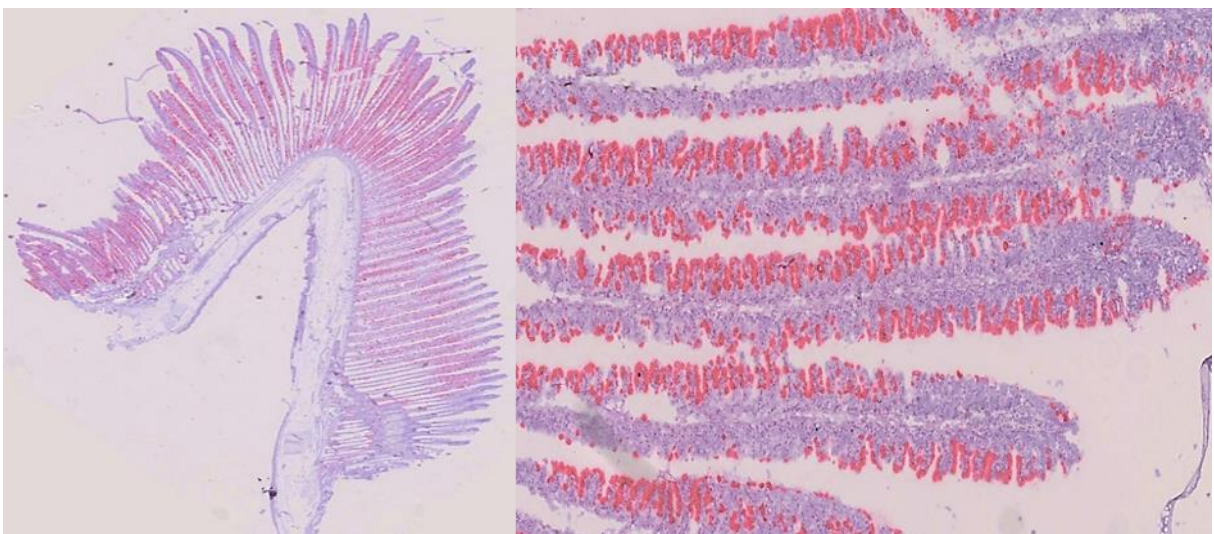
Figur 17: *In situ* hybridisering av gjelle fra gruppe 3, L77, etter 3 dager med smitte (ct: 28,23). Bilde til venstre viser helportrett av gjellesnittet, mens bildet til høyre viser utsnitt av gjellefilamenter fra samme gjelle. Pilene viser SGPV-infiserte celler merket i rødt.

Andre gjellesnitt fra gruppe 4, L101, stammer fra laks obdusert etter syv dager med smitte. Helportrettet av gjellen, vist i figur 18, viser så vidt antydning til infeksjon. Utsnittet viser imidlertid at det er adskillelig flere celler som er blitt infisert etter syv dager i forhold til tre dager. Dette gjenspeiles også i ct-verdien som her er lavere (24,72).



Figur 18: *In situ* hybridisering av gjelle fra gruppe 4, L101, etter 7 dager med smitte (ct: 24,72). Bilde til venstre viser helportrett av gjellesnittet, mens bildet til høyre viser utsnitt av gjellefilament fra samme gjelle. Røde områder viser SGPV-infiserte celler.

Tredje gjellesnitt fra gruppe 4 stammer fra laks L139, som ble obdusert etter 14 dager med smitte. Her vises de poxinfiserte cellene svært godt, både i helportrett og i utsnitt. Ct-verdien her på 19,63 er mye lavere enn fra snitt ved dag 3 og 7. I tillegg til mange poxinfiserte celler, er det i tillegg en stor endring i den funksjonelle respiratoriske overflaten.



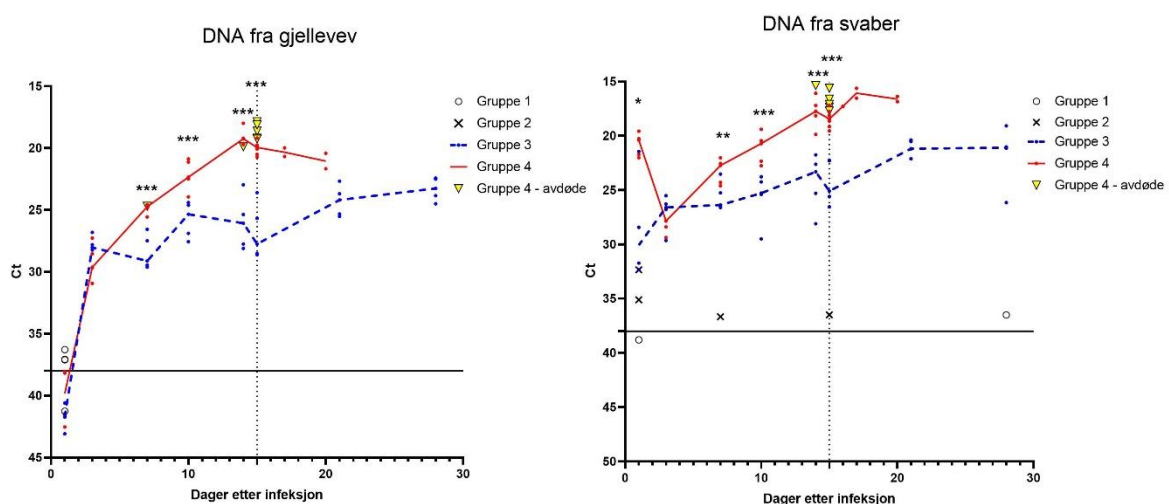
Figur 19: *In situ* hybridisering av gjelle fra gruppe 4, L139, etter 14 dager med smitte (ct: 19,63). Bilde til venstre viser helportrett av gjellen, mens bildet til høyre viser utsnitt av gjellefilament fra samme gjelle. Røde områder viser SGPV-infiserte celler.

3.2 Kvantifisering av virusmengde ved bruk av qPCR

DNA fra gjelle ble isolert og analyser som angitt tidligere i metode. For kvantifisering av mengde virus i gjellematerialet, ble det benyttet et probeassay rettet mot genet D13L. Dette er den samme proben/genet som innad Veterinærinstituttet benyttes for rutinemessig deteksjon av SGPV. Alle gjellevevsprøver fra den smitte gruppen uten hydrokortisoninjisering (gruppe 3) og den smittede gruppen med hydrokortison (gruppe 4) ble analysert med qPCR, mens negative kontrollprøver (gruppe 1 og 2) ble kun analysert fra dag 1 og 28. For svaberprøvene ble alle gruppene gjennom hele smittetforsøket analysert for SGPV-genom av patologisk avdeling.

Figur 20 viser virusforløpet med utgangspunkt i DNA-materiale fra gjellevev og svaber. Figurene er lagt ved siden av hverandre for å sammenligne metodene. Det legges til grunn en «cut off» ved ct-verdi på 38 da det antas av ct-verdier over dette skyldes bakgrunnsstøy i analysen. Grafen for data fra gjellevevsmateriale viser at ct-verdiene for gruppe 3 og 4 er over cut off ved dag 1. Herfra stiger virusmengden, nærmest parallelt mellom begge gruppene til dag 3. Fra dag 7 til dag 15 er det en signifikant forskjell på virusmengde mellom gruppene. Videre fremkommer det av analysen at 3 av 5 kontrollprøver fra gruppe 1 (ved dag 1) kommer ut med positiv ct-verdi under cut off.

Grafen for svabermaterialet viser generelt lavere ct-verdier for alle prøver. I likhet med grafen for gjellevev, er det en signifikant forskjell på virusmengde mellom gruppe 3 og 4 fra dag 7 til dag 15. Det er også en signifikant forskjell mellom gruppene ved dag 1. Av negative kontrollprøver fra gruppe 1 og 2, kom til sammen 5 prøver ut med ct-verdi under cut off.



Figur 20: Sammenligning av virusdata fra DNA, isolert fra gjellevev og svaber. Punktene representerer ct-verdien for hvert individ der den trukne linjen viser medianen for hver gruppe ved hvert uttak. Y-aksen starter ved ct-verdi som tilsvarer antall sykluser i qPCR-analysen og cut off er satt til ct-verdi på 38. Virustoppen/dødelighetstoppen er merket med stiplet linje; 15 dager etter at smittet materialet ble fjernet. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

Videre ble kortisolkonsentrasjonen målt i plasma av kollega Haitham Tartor ved bruk av ELISA. Tabellen under viser mengde kortisol (pg/ml) vist som snittverdier for hver gruppe. Gruppe 2 og 4 som ble injisert med hydrokortison før smitte, var gruppene med høyst mengde målt kortisol gjennom hele forløpet.

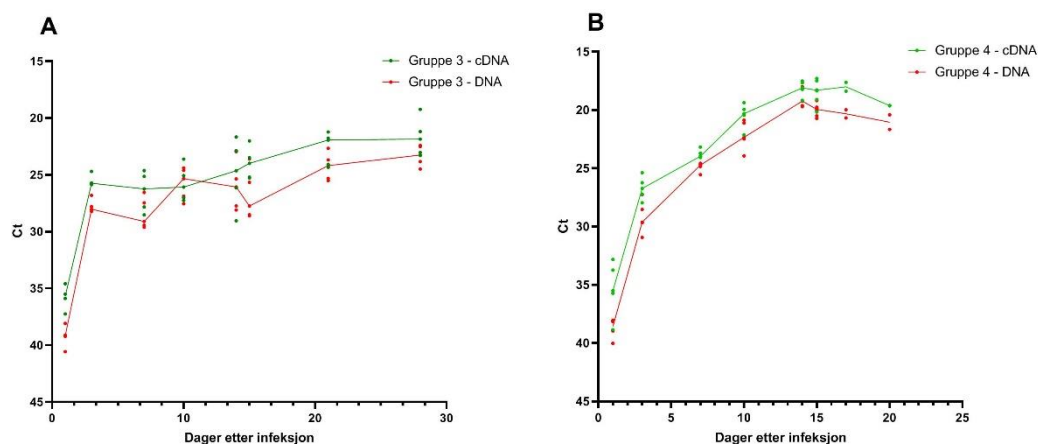
Tabell 4: Kortisolkonsentrasjon (pg/ml) målt i plasma. Tabellen viser gjennomsnittsverdier for hver gruppe (n=5) fra 1 til 15 dager etter infeksjon (DEI).

DEI	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	3741	43865	3853	120238
3	2422	5286	313	1522364
7	866	49391	311	3581
10	183	3855	280	3475
14	456	3672	307	27196
15	81	1662	529	10179

3.3 Sammenligning av mengde virus analysert fra DNA og RNA

Isolering av RNA samt syntetisering av cDNA ble gjennomført i henhold til tidligere utredet metode. Figuren under viser en sammenligning av mengde virustranskript (cDNA) og virusgenom (DNA) i gjellevevsprøver for gruppe 3 og 4, delt inn i hver sin graf. Dette ble gjort for å sammenligne mengde RNA i prøven i forhold til mengde DNA fra samme gjelleprøve. RT-qPCR/qPCR-analysene ble gjennomført med samme probeassay, rettet mot genet D13L.

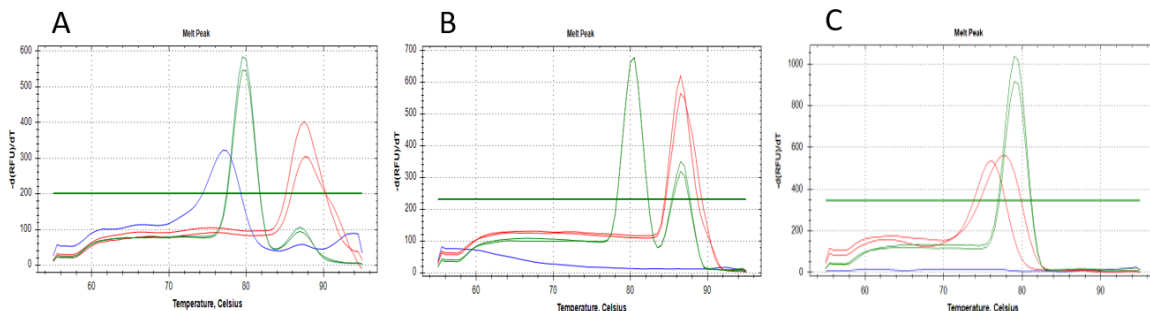
Grafene viser at DNA og cDNA følger samme trend. Mengde virussekvens målt i cDNA er generelt noe høyere enn mengde DNA gjennom hele smitteforsøket. Ingen av de negative kontrollprøvene (inkludert kontrollprøve uten RT-enzym) ga utslag i ct-verdi.



Figur 21: Sammenligning av ct-verdier (gen D13L) fra cDNA og DNA - isolert fra gjellevev. Figuren viser data for gruppe 3 (A) og gruppe 4 (B). Den heltrukne linjen representerer medianen for hver gruppe.

3.4 Kvalitetsanalyse av primersett

Totalt elleve ulike primersett mot pox-gener ble testet på cDNA fra gjellevevsmateriale; 3 tidlige gener, 4 intermediære gener og 4 sene gener. I første omgang ble primersettene testet enkelt ved å kjøre RT-qPCR; dubletter med positive SGPV-prøver i tillegg til negative kontrollprøver og vann. Analysene av E9L og I6L ga ct-verdi i både positiv og negativ gjelleprøve, mens analysen av D12L i tillegg ga ct-verdi i vannprøve. Figuren under viser smeltepunktkurver fra CFX Manager for disse genene/primersettene.



Figur 22: Smeltepunktkurver fra CFX Manger med primersett for D12L (A), E9L (B) og I6L (C). Positive SGPV-prøver er merket i grønt, negative kontrollprøver er merket i rødt og vannprøver er merket med blått.

På bakgrunn av resultatet ble det konstruert og testet nye primersett for E9L og D12L slik at det til sammen ble analysert 3 tidlige gener, 3 intermediære gener og 4 sene gener. Deretter ble det kjørt RT-qPCR på alt gjellemateriale fra gruppe 3 og gruppe 4, sammen med et utvalg av negative kontrollprøver, vannprøve og prøve uten RT-enzym. Ingen av primersettene fikk produkt i negativ kontrollgruppe, vannprøve eller prøve uten RT-enzym.

qPCR-produktene ble i neste steg analysert i BioAnalyzer for å sjekke om ampliconlengden til produktet samsvarte med forventet ampliconlengde. Tabell 5 viser forventet ampliconlengde til alle primersettene.

Tabell 5: Oversikt over forventet ampliconlengde til de ulike primersettene for SGPV.

Uttrykk	Gen	Ampliconlengde (bp)
Tidlig	D12L	134
Tidlig	E9L	130
Tidlig	B22R	225
Intermediært	A2L	206
Intermediært	A1L	200
Intermediært	D13L	241
Sent	F9L	168
Sent	A28L	210
Sent	G1L	186
Sent	A7L	192

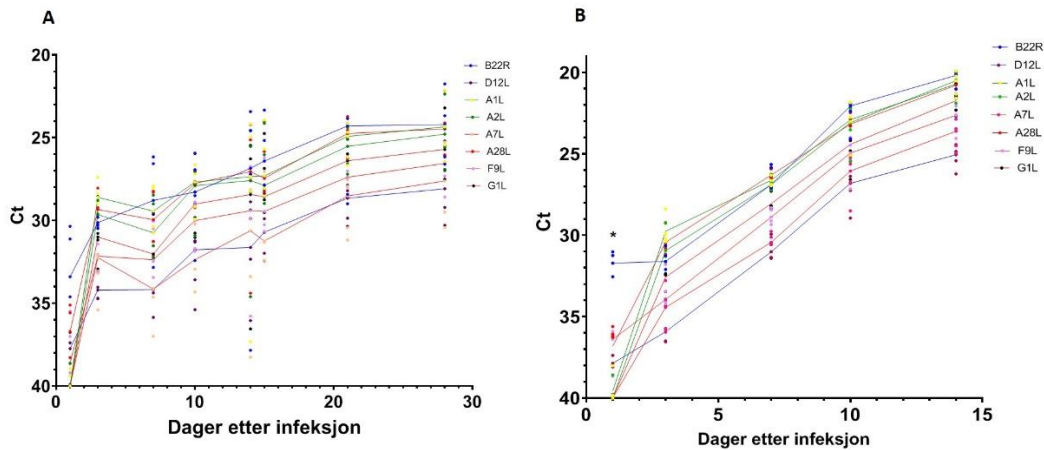
Gelbilde fra BioAnalyser vist i figur 23 viser at alle amplifiserte genprodukter hadde riktig lengde. En nytt primersett for elongeringsfaktor (EF1 α) ble i tillegg konstruert og analysert, da gammel stock-løsning (EF1 α *) ga dårlige smeltepunktsskurver i CFX Manager.



Figur 23: Gelbilde fra BioAnalyser med pox-positivt PCR-produkt for utvalgte gener. Prøve merke «EF1 α » viser gammel stock-løsning for elongeringsfaktor.

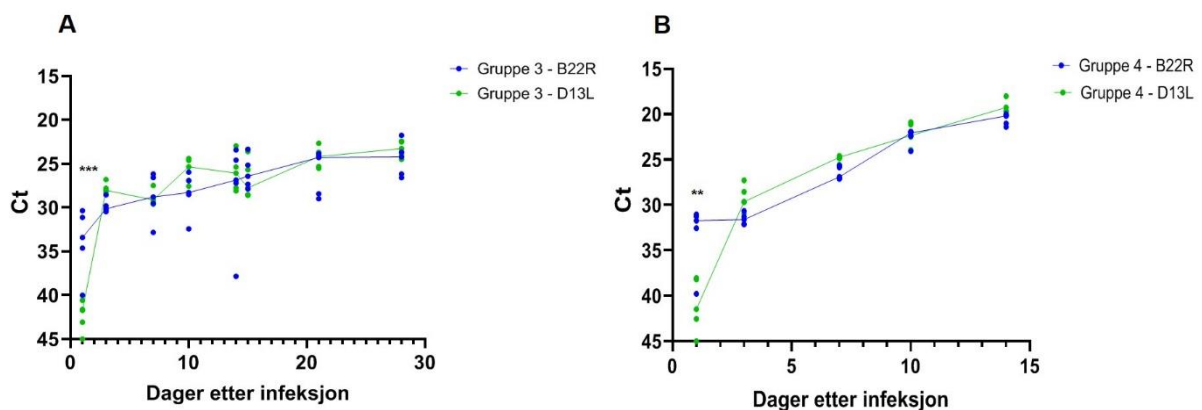
3.5 Uttrykk av SGPV-gener i gjellevevsmateriale

Overnevnte primersett ble testet på gjellevevsmaterialet fra hele smitteforsøket. Ct-verdiene fra analysen er vist i figur 24. Grafene viser at verdiene følger samme trend gjennom hele smitteforsøket for gruppe 3 (A) og gruppe 4 (B). Genet B22R skiller seg imidlertid ut i begge grupper med en høyere ct-verdi ved dag 1.



Figur 24: Analyse av pox-gener fra cDNA for gruppe 3 (A) og gruppe 4 (B). Resultatene er vist med ct-verdier. Den heltrukne linjen representerer medianen for hver gruppe. Blå linje viser tidlige gener, grønn linje viser intermediære gener og røde linje viser sene gener. For den smittede gruppen injisert med hydrokortison (gruppe 4) er det en signifikant forskjell mellom B22R og genet med nest lavest ct-verdi (F9L) ved dag 1.

Videre viser figur 25 en sammenligning av B22R-transkriptet fra cDNA og genomet målt ved D13L-assay fra DNA. Også her skiller B22R-resultatene seg ut med en lavere ct-verdi ved dag 1 med en median på $\approx 33,4$ i gruppe 3. I gruppe 4 ligger median for B22R med en ct-verdi på $\approx 31,7$. Resultatene fra DNA-prøvene kom ut med ct-verdi over cut of på 38 i begge gruppene.



Figur 25: Sammenligning av resultatene for B22R-transkript og virusgenom (D13L-assay) for gruppe 3 (A) og gruppe 4 (B). D13L er analysert fra DNA-prøver ved bruk av probe assay – 45 sykluser, mens B22R er analysert fra cDNA-prøver ved bruk av SYBR green assay – 40 sykluser.

3.6 Kvantifisering av virusmengde i milt, Hodenyre og blod

Fra dag 14 ble det syntetisert cDNA fra milt, Hodenyre og blod fra alle fire grupper; til sammen 80 prøver. Prøvene ble videre analysert for SGPV D13L-transkript ved bruk av RT-qPCR med probeassay som beskrevet tidligere. Dette ble gjort for å undersøke om infeksjon kunne detekteres i andre organer enn i gjellene. Tabell 6 viser prøver med positiv ct-verdi.

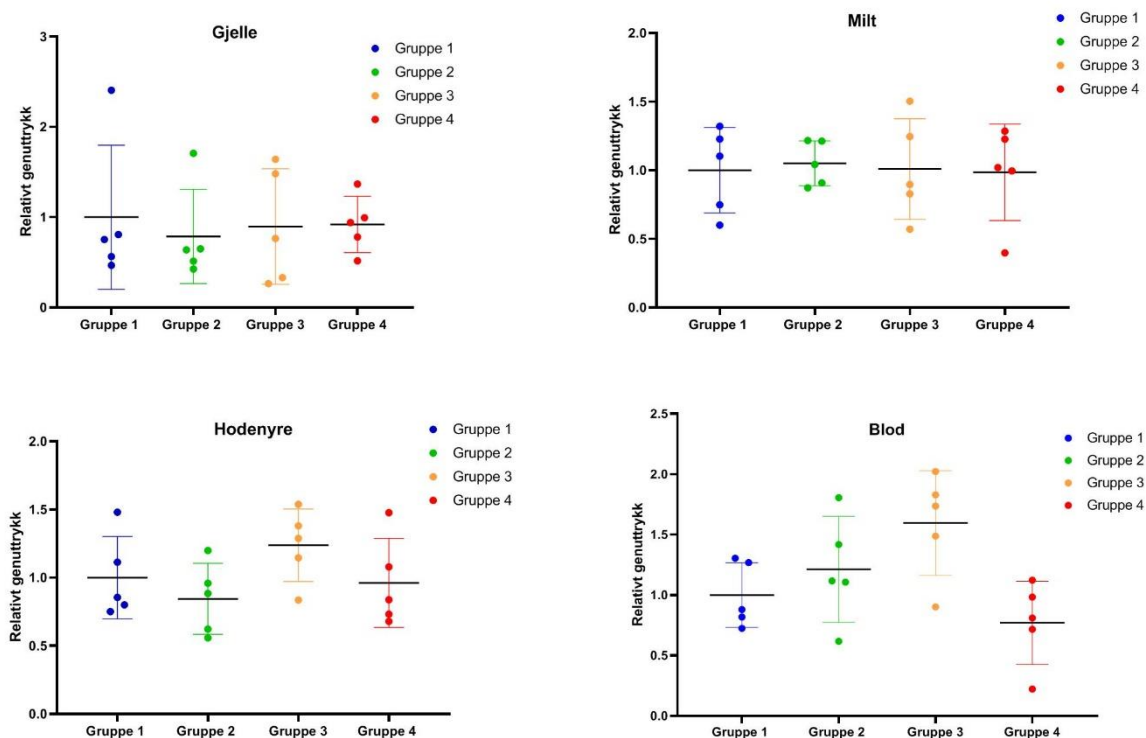
Tabell 6: Oversikt over viruspositive prøver fra milt, Hodenyre og blod. Ct-verdier over cut off på 38 er farget i rødt.

Vevstype	Gruppe	Prøve	Ct
Milt	3	L136	41,835
Milt	4	L139	36,44
Milt	4	L142	34,23
Hodenyre	3	L135	34,88
Hodenyre	3	L136	32,745
Hodenyre	3	L137	38,075
Hodenyre	4	L139	37,405
Hodenyre	4	L141	31,87
Hodenyre	4	L142	37,24
Hodenyre	4	L143	34,43
Blod	4	L142	42,01

3.7 Uttrykk av immungener fra virustopp for gjelle, milt, hodenyre og blod

cDNA fra gjelle, milt, hodenyre og blod fra 14 dager etter infeksjon ble videre analysert for følgende vertsgener: $Ef1\alpha$, MX1, ISG15, $CD8\alpha$, CD4, IFN γ og Granzym A (GranA).

Alle organer ble først analysert for referansegnet $Ef1\alpha$ for å undersøke om genet var uttrykt likt i alle grupper. Figuren under viser relativt genuttrykk for hvert organ, normalisert mot gjennomsnittlig startmengde templat fra gruppe 1. Figuren viser at resultatene fra hodenyre og blod ikke kunne korrigeres for elongeringsfaktor da referansegnet ble uttrykt ulikt i de ulike gruppene.



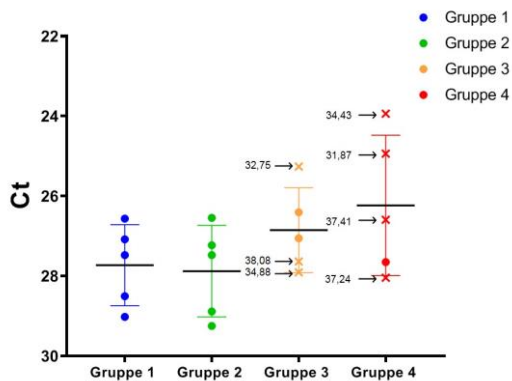
Figur 26: Relativt genuttrykk for elongeringsfaktor ($Ef1\alpha$) fra virustranskript (cDNA) fra gjelle, milt, hodenyre og blod. Prøvene er isolert fra dag 14 etter infeksjon. Punktene visualiserer relativt genuttrykk for hvert individ, normalisert mot gjennomsnittlig startmengde templat fra gruppe 1. Videre er gjennomsnittsverdi og standardavvik merket for hver gruppe.

For hver analyse, ble relativt genuttrykk regnet ut ved bruk av både standardkurve og $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –metoden. Fullstendig oversikt over immungener fremstilt med $2^{-\Delta\Delta Ct}$ –metode og standardkurve fra hodenyre og blod, fremkommer i vedlegg 1.

På bakgrunn av ustabil uttrykk av referansegnet i hodenyre og blod, ble det valgt å legge fokus på miltprøver i tillegg til gjelleprøver. Det ble derfor isolert RNA og syntetisert cDNA av milt fra hele forsøket

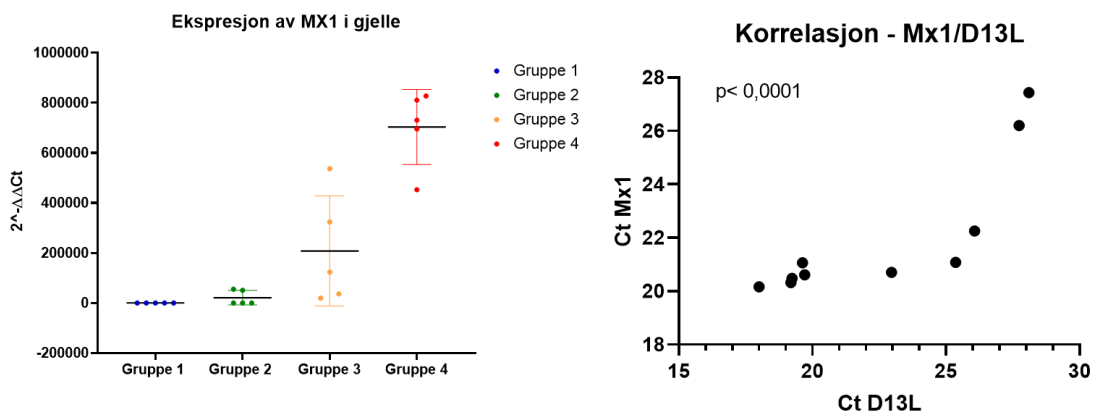
Det var antatt at interferonstimulerte gener som MX1 og ISG15 skulle uttrykkes høyere i virusinfisert vev. Da det var påvist lite virus i milt, ble det ikke analysert for interferonstimulerte gener fra andre organer enn gjeller for hele smitteforøket.

Det var imidlertid 6 av 10 hodenyreprøver som var påvist som viruspositive. Figuren under viser ct-verdier av MX1 i hodenyre fra 14 dager etter infeksjon. Punktene som er merket med kryss, viser ct-verdi fra virus (D13L, DNA) for de samme prøvene.



Figur 27: Uttrykk av MX1 fra hodenyre vist som ct-verdier fra cDNA (14 dager etter infeksjon). Pilene viser viruspositive individer (D13L) merket med kryss og tilhørende ct-verdi fra DNA-assay.

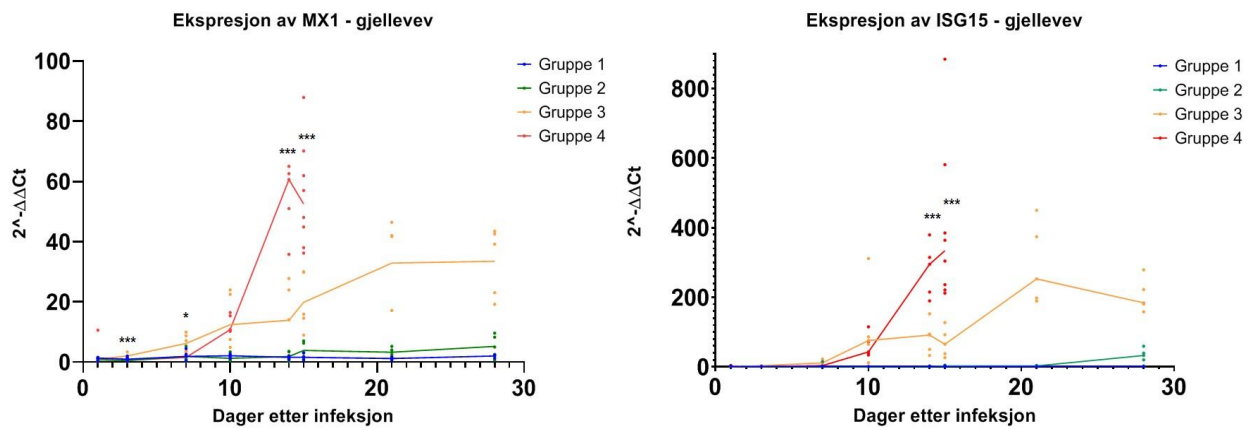
MX1-ekspressjon i gjellevev viser tydelig at genet uttrykkes høyere i virusinfisert vev. Figuren under viser genekspressjon av MX1 (til venstre) fra dag 14 i smitteforsøket. Til høyre vises korrelasjon av ct-verdier med utgangspunkt fra virustranskript (MX1) og virusgenom (D13L). Korrelasjonen viser at det er en statistisk signifikant korrelasjon mellom variablene på signifikansnivå $\alpha=0,01$.



Figur 28: Ekspresjon av MX1 i gjelle (til venstre) samt ct-korrelasjon av MX1 (cDNA) og D13L (DNA). Korrelasjonen vist til høyre viser en p-verdi på $< 0,0001$. Figurene viser data fra dag 14 i smitteforsøket.

3.8 Uttrykk av interferonstimulerte gener fra gjelle

Figur 29 viser ekspresjon av MX1 (til venstre) og ISG15 (til høyre) fra gjelle for hele smitteforsøket. Begge grafene følger samme trend med en gradvis oppregulering av genet for de infiserte gruppene, frem til virustoppen ved 14-15 dager. MX1-transkriptet i gruppe 3 er signifikant høyere enn MX1-transkriptet i gruppe 4 ved dag 3 og 7. Ved dag 14 og 15 er det imidlertid genuttrykket i gruppe 4 som dominerer. For ISG15 er det ingen signifikante forskjeller mellom gruppene før dag 14. Genuttrykket i kontrollgruppene (gruppe 1 og 2) holder seg stabilt lavt gjennom hele forløpet for begge genene.



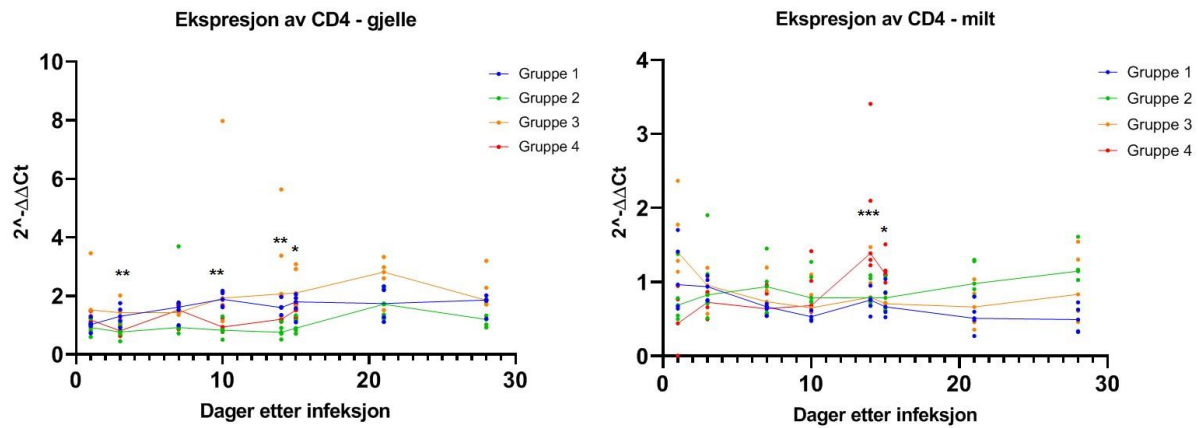
Figur 29: Ekspresjon av MX1 (til venstre) og ISG15 (til høyre) i gjelle. Hvert punkt representerer ett individ, og den heltrukne linjen representerer medianverdien for hver gruppe. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

3.9 Uttrykk av T-cellegener fra gjelle og milt

CD4- og CD8 α -transkript ble analysert fra gjelle og milt fra hele smittestudien. Dette ble gjort for å undersøke tilstedeværelse av T-celler i de to ulike organene.

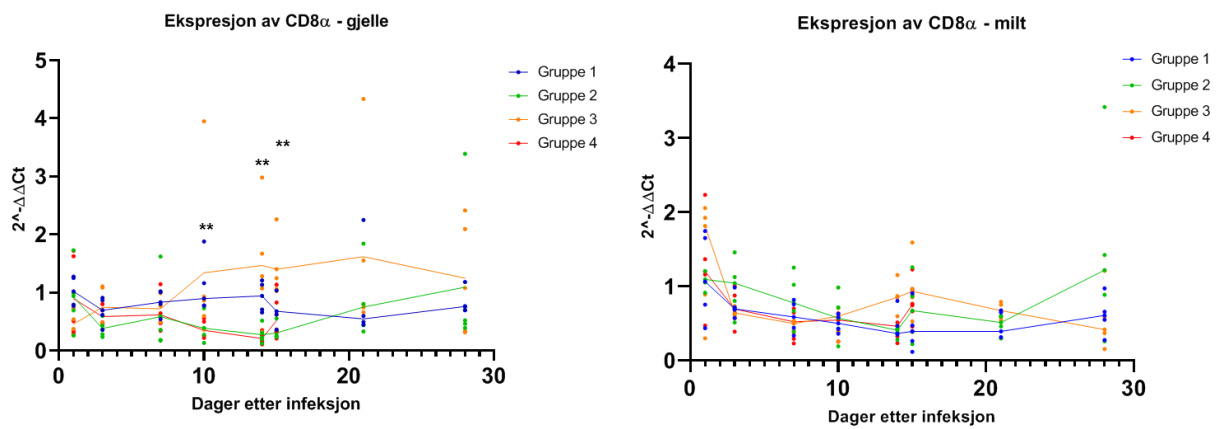
Figur 30 viser at CD4-uttrykket i gruppe 2 og 4 er generelt noe lavere i forhold til gruppe 1 og 3 i gjellene. For dag 3, 10, 14 og 15 er det en signifikant forskjell mellom gruppe 3 og 4, der genuttrykket i gruppe 3 dominerer.

Grafen som illustrerer data fra milt viser at CD4 er relativt likt uttrykt gjennom forløpet i de forskjellige gruppene. Det er imidlertid en signifikant forskjell mellom genuttrykket i gruppe 3 og 4 ved dag 14 og 15, der genuttrykket i gruppe 4 dominerer.



Figur 30: Genespresjonsdata for CD4 i gjelle og i milt. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

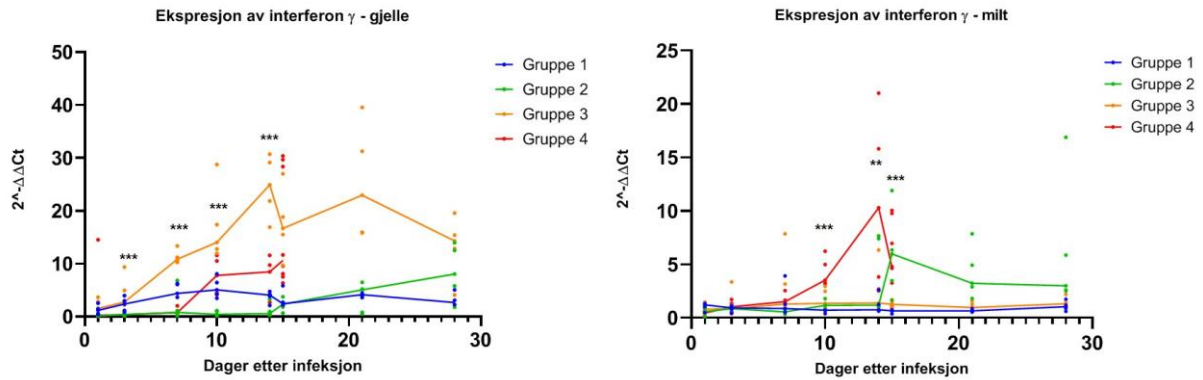
Videre viser figur 31 ekspresjon av CD8 α i gjelle og milt fra hele smittestudien. I gjellemateriale er det en signifikant forskjell mellom genuttrykket i gruppe 3 og 4 fra dag 10 og utover. CD8 α uttrykkes stabilt lavt i gruppe 2 og 4 gjennom hele smitteforsøket. For miltmateriale er det ikke en like klar forskjell mellom gruppene.



Figur 31: Genespresjonsdata for CD8 α i gjelle og i milt fra hele smitteforsøket. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

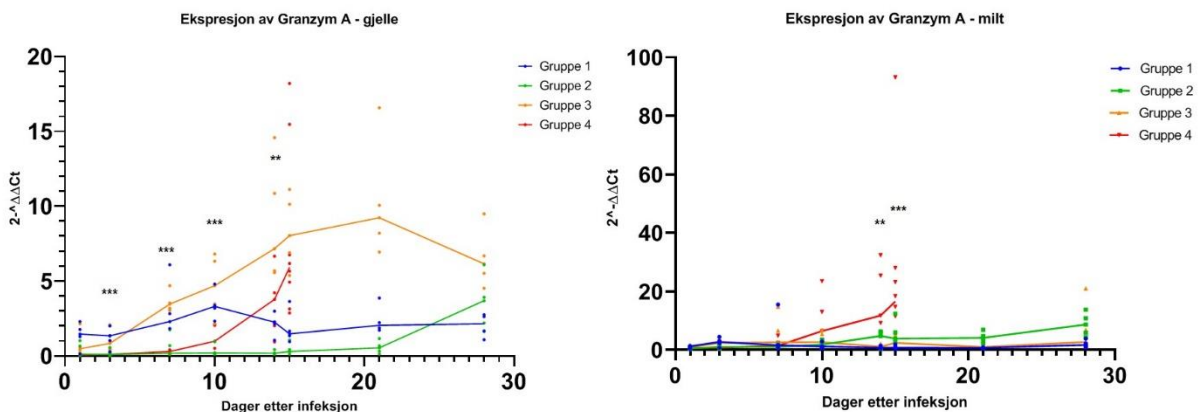
3.10 Uttrykk av IFN γ og GranA fra gjelle- og miltmateriale

IFN γ og GranA ble også analysert på alt av gjelle- og miltmateriale. Data for IFN γ er vist i figur 32. Ekspresjonsdata fra gjellemateriale viser en klar oppregulering av IFN γ i gruppe 3 med en topp på 14 dager. I miltmateriale er det imidlertid genuttrykket i gruppe 4 som oppreguleres.



Figur 32: Genekspresjon for IFN γ i gjelle og i milt fra hele smitteforsøket. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

Ekspresjon av GranA, vist i figur 33, viser samme trend som IFN γ for alle grupper i både gjelle- og miltmateriale. Det er en signifikant forskjell mellom GranA-uttrykket mellom gruppe 3 og 4 i gjellematerialet fra dag 3 og utover. I milt er det en signifikant forskjell mellom gruppe 3 og 4 ved dag 14 og 15.



Figur 33: Genekspresjon av GranA i gjelle og i milt fra hele smitteforsøket. Signifikante forskjeller er målt mellom gruppe 3 og 4.

3.11 Annotering av hypotetiske proteiner

Conserved Domain-søk (NCBI) ble benyttet for å finne nye konserverte domener i SGPV-genomet. Tabellen under viser alle treff fra CDD rangert etter e-verdi. Enkelte treff viser proteinfamilier som er knyttet til andre dobbeltrådig virus, eksempelvis Alphaherpesvirus - glykoprotein E. Resultatene viser også proteiner som er knyttet til immunhemmende responser i vert, eksempelvis immunoglobulin-blokkerende virulensprotein og protein som hemmer CD4 + T-celleaktivering.

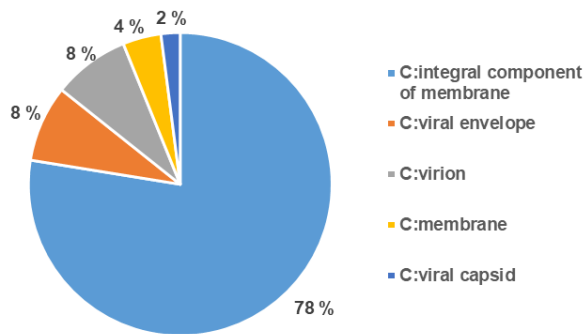
Tabell 7: Oversikt over konserverte domener med hypotetiske proteinsekvenser som input. Tabellen er rangert etter e-verdi med beskrivelse av SGPV-Seqname, hit type og treffsekvensens accession-nummer.

Gen	SeqName	Hitt-type	E-verdi	Accession	Beskrivelse
161	YP_009162533	superfamily	7,69E-15	cl35954	Transportprotein
135	YP_009162507	superfamily	5,81E-12	cl33381	Metylaksepterende kjemotakse-lignende domener
161	YP_009162533	superfamily	2,75E-11	cl37462	Antatt immunoglobulin-blokkerende virulensprotein
88	YP_009162460	superfamily	3,98E-05	cl33133	E3 ubiquitin-protein ligase, spH2
58	YP_009162430	superfamily	5,67E-05	cl24528	Bakteriell kollagen, midtregion
135	YP_009162507	specific	0,00100592	COG0840	metylaksepterende kjemotaksis protein (Tar)
38	YP_009162410	superfamily	0,00500251	cl30037	Alphaherpesvirus - glykoprotein E
39	YP_009162411	superfamily	0,00536111	cl02614	SPRY-domene
48	YP_009162420	superfamily	0,00549487	cl21272	Sen endosomal/lysosomal adapter, MAPK og MTOR-aktivator
11	YP_009162483	superfamily	0,00594118	cl35953	ribonuclease E
20	YP_009162392	superfamily	0,00711369	cl37761	Kalsiumbindende- og "coiled-coil"-domene
161	YP_009162533	superfamily	0,00720267	cl37251	ATP-avhengig Chaperon
172	YP_009162544	superfamily	0,00752904	cl13541	Slimprotein på 15 kDa. Hemmer CD4 + T-celleaktivering
197	YP_009162569	superfamily	0,00792661	cl28910	Major Facilitator Superfamily

Videre ble alle hypotetiske proteiner søkt opp med Blastp. Søkene ga ingen treff som ble ansett som relevante.

Avslutningsvis ble alle proteinsekvenser, både annoterte og hypotetiske, kjørt gjennom Blast2GO for å finne følgende funksjonelle annoteringsdata: cellulær komponent (C), molekylær funksjon (F) og biologisk prosess (P). Proteinsekvensene fikk annotering med enten C, F, P eller en kombinasjon av flere/alle. 82 av 210 sekvenser kom ut med annoteringsdata, hvorav 19 av disse var hypotetiske proteiner.

Sektordiagrammet under viser oversikt over proteinsekvensene som ble annotert med cellulære komponenter, noe som utgjorde 49 av alle proteinsekvensene. Alle 19 hypotetiske proteinsekvenser ble annotert som integrerte membrankomponenter, mens ingen av de hypotetiske proteinene fikk annotering med molekylær funksjon eller biologisk prosess.



Figur 34: Sektordiagram som viser oversikt over funksjonell annoteringsdata for cellulære komponenter. Statistikken baserer seg på 49 av 210 proteinsekvenser.

4. Diskusjon

Som tidligere nevnt er denne studien en del av et større forskningsprosjekt, SALPOX. Prosjektet har som hovedmål å øke kunnskapen om SGPV, slik at en på sikt kan etablere metoder for å kontrollere sykdomsutbrudd i oppdrettsanlegg. Det er da nødvendig å forstå hvordan viruset replikerer og hvordan den påvirker laksens immunforsvar. Stress er en faktor som er knyttet til dårlig fiskevelferd og som generelt gjør oppdrettslaksen mer utsatt for sykdom (28). Store deler av denne oppgaven omhandler derfor om hvor stor grad stress påvirker SGPV og verten.

I oppgaven er diskusjonskapittelet bygd opp etter en kronologisk rekkefølge ut fra resultatene. Metodediskusjon er satt som et eget kapittel.

4.1 Metodediskusjon

4.1.1 Gjennomførelse av smitteforsøket

Smitteforsøket var satt opp med tillatelse fra mattilsynet i henhold til blant annet forskrift om bruk av forsøksdyr (65). Et av formålene med forskriften er å fremme prinsippet om «de tre R». Den første R'en omhandler alternativer for erstatning (Replacement) der en ser på forskningsmetoder hvor man kan oppnå samme resultat uten bruk av forsøksdyr. Den andre R'en omhandler alternativer for reduksjon (Reduction) der en ser på muligheten for å bruke færre forsøksdyr og samtidig få et tilfredsstillende resultat. Den siste R'en handler om alternativer for forbedring (Refinement) der en ser på forskningsmetoder som reduserer forsøksdyrets lidelser (66). Til denne studien ble det valgt så få individer (laks) som mulig som samtidig kunne gi et signifikant resultat. Under smitteforsøket ble fisk som viste alvorlige tegn på sykdom avlivet. Dette ble gjort av et velferdsmessig perspektiv for å minimere fiskens lidelse og smerte. Videre er det per dags dato ingen alternativ forskningsmetode for å erstatte forsøksdyr for SGPV-infeksjon, siden viruset ikke lar seg dyrke. Dette er noe som forskes på internt på Veterinærinstituttet, der SGPV blir forsøkt dyrket i cellekultur. Det er spesielt fokus på en gjelleepitelcellelinje fra laks under prosjektet «GILLMODEL». Målet med prosjektet er å utvikle en *in vitro*-modell for å kunne studere hvordan miljøfaktorer og smittestoffer påvirker epitelcellene i fisken. Dette er gunstig da man kan redusere antall forsøksdyr som per i dag brukes for å forske på gjellesykdom hos fisk.

4.1.2 Metoder for kvalitativ deteksjon av virus

Visualisering av virus har vært mulig helt siden elektronmikroskopet (EM) ble utviklet i 1939 og har vært viktig for å beskrive og differensiere virus (67). Metoden er fortsatt brukt, men gir ingen kunnskap om virusets gener slik som for eksempel *in situ* hybridisering gjør. Ved bruk av *in situ* hybridisering kan man lokalisere viruset ved å detektere virus-DNA eller virus-RNA i fikserte organer (59). I denne oppgaven ble *in situ* hybridiseringen rettet mot RNA. Dette er en fordel med tanke på at en kan detektere en infeksjon i en tidlig fase og er også i mange tilfeller en mer sensitiv analyse fordi det ofte er mer RNA enn DNA i cellene under replikasjonen. Det finnes flere ulike modeller for å utføre *in situ* hybridisering. Kitet som ble brukt i oppgaven (RNAscope®) baserer seg på to z-formede prober som danner en dimer. Dimeren reduserer sjansen for falskt positivt signal da det er mindre sannsynlighet for at begge probene vil hybridisere til feil sekvens (58). En ulempe med å bruke RNA som «target» er at produsert mRNA ikke nødvendigvis blir translatert til protein. Dersom proteinene ikke blir dannet, vil heller ikke viruset dannes.

4.1.3 Metoder for kvantitativ deteksjon av virus

Mens *in situ* hybridisering gir kvalitative og semi-kvantitative resultater, vil analyser ved bruk av RT qPCR og qPCR gi et rent kvantitativt resultat. Per dags dato er RT qPCR regnet som en av de mest utbredte analysemetodene for genekspressjon, men har sin ulempe i at man ikke ser hvilke celletyper eller hvor mange celler viruset har infisert. Ekstraheringsprosessen differensierer heller ikke materialet, noe som utgjør en fare for at en mistolker hvilke celler som er infiserte (59).

I oppgaven ble det benyttet to typer assay; probeassay (TaqMan) for kvantifisering av virus ved qPCR, samt SYBR-green assay ved RT qPCR for å måle virusets og laksens genuttrykk. Begge assayene kan i utgangspunktet brukes til å verifisere virusmengde samt utføre genekspressionsanalyser og har sine fordeler og ulemper. Analyse ved bruk av SYBR green er kostnadseffektivt og enkelt å bruke, men har ikke like høy spesifisitet som analyse ved bruk av probe. Analyse ved bruk av probe er dyrere, men er en mer sensitiv metode. Dette med tanke på en tredje faktor, proben, som skal hybridiseres i tillegg til primerne, og dermed minimerer sannsynligheten for falskt positivt signal. Det er likevel mulig å oppnå nøyaktige resultater ved bruk av SYBR-green ved å blant annet ha fokus på å konstruere gode primere (68). Videre er en av fordelene ved å bruke SYBR-green, evnen til å utføre smeltepunktanalyse som viser smeltetemperatur for hver prøve. Ut fra kurvene kan man sikre at kun ett produkt er blitt

amplifisert. Man kan også få en indikasjon på om riktig gen er blitt amplifisert, men dette er noe som i så fall må bekreftes med kapillærelektroforese eller sekvensering.

4.2 Hvilke celler er infisert av SGPV?

I denne oppgaven var det ønskelig å visualisere SGPV for å få kunne lokalisere infeksjonen. Det var også ønskelig å få et inntrykk av hvor mange celler som ble infisert etter et gitt antall dager med smitte. Resultatene viste at SGPV infiserte gjelleepitelet og at antall infiserte celler økte med lavere ct-verdi fra qPCR.

En av fordelene ved å bruke *in situ* hybridisering, er at cellenes morfologi kan studeres parallelt med signaldeteksjon av transkriptet. Det kan imidlertid være utfordrende å treffe riktig tidspunkt som gjør at infeksjonen visualiseres uten å være over- eller underfarget. Gjellesnittene fra 3, 7 og 10 dager (L77, L101 og L139) ga som forventet økende mengde signal i samsvar med tilhørende ct-verdi fra samme fisk. Snittene viste imidlertid tegn til overfarging, noe som gjorde at cellens morfologi ble vanskelig å vurdere. Dette kan kanskje skyldes for høy konsentrasjon av reagensene som ble brukt eller for lang virketid under inkuberingene.

Snitt L77 (fra gruppe 3) fra 3 dager etter infeksjon viste få smittede celler og ingen tegn på celledskade. Snitt L101 (fra gruppe 4) fra 7 dager etter infeksjon viste langt flere smittede celler, men ingen synlige celledskader. Det siste snittet, L139 (gruppe 4) fra 14 dager etter infeksjon hadde mange SGPV-infiserte celler, og det var i tillegg store skader på epitelcellene. Dette var også synlig under obduksjonen der gjellene virket bleke. Den store endringen i epitelcellene gjør at den respiratoriske overflaten reduseres, noe som blant annet kan føre til lavere oksygenopptak og dårligere utveksling av saltioner (32). Dette kan også sees i sammenheng med at det var fra dag 14 og utover at fisken fra gruppe 4 døde.

Ved dag 14 viste histologiske undersøkelser at det var langt flere apoptotiske celler enn det var ved dag 3 og 7 der det var lite til ingen tegn på apoptose. Dette kan skyldes den drastiske økningen av virusinfiserte celler, som har gitt mer apoptose. Det kan likevel ikke utelukkes at viruset kan ha endret frigjøringsmetode fra å fusjonere med vertens cellemembran i tidlig fase, for å senere gå over til lytisk frigjøring (44).

4.3 Sannsynligheten for flere andre agens i samspill med SGPV

Innledningsvis ble det utredet hvordan SGPV ofte opptrer med andre agens til stede. Det har også tidligere blitt stilt spørsmål om hvorvidt sykdommens alvorlighetsgrad kun skyldes en spesielt aggressiv variant av SGPV, eller om det skyldes et samspill av ulike smittestoff (2). Fiskekarene som ble brukt under smitteforsøket ble grundig vasket med virkons før fiskene ble innført og det ble ikke påvist andre agens under histopatologiske undersøkelser. Det er likevel ikke alle type agens som kan detekteres under mikroskop, og det kan derfor ikke utelukkes at andre mikroorganismer har vært til stede og påvirket virusets og vertens respons under smitteforsøket.

Forsøksrommet er ikke ansett som sterilt og det er heller ikke sikkert at fisken som ble brukt i smitteforsøket var frie for andre mikroorganismer før smitteforsøket startet. Dette er i så fall noe som kan forklare hvorfor enkelte immungener ble såpass oppregulert i kontrollgruppen.

4.5 Dødelighet og virusmengde – en korrelasjon med økt mengde kortisol?

Det var ønskelig å undersøke om stress kunne påvirke infeksjonsforløpet i gjelle, i tillegg til å påvirke sykdomsgrad hos laksen. qPCR-analysene viste at virusmengden og dødeligheten økte i den virusinfiserte gruppen som var injisert med hydrokortison.

For den smittede gruppen som ikke var injisert med hydrokortison (gruppe 3) økte ikke virusmengden i gjelle like drastisk som den smittede gruppen, injisert med hydrokortison (gruppe 4). Det ble heller ikke påvist klinisk sykdom eller dødelighet i denne gruppen. For gruppe 4 økte virusmengden gradvis frem til virustoppen/dødelighetstoppen med en langt lavere ct-verdi enn gruppe 3. Dette stemmer bra med erfaringer fra feltutbrudd der det har blitt observert høy dødelighet i tillegg til kliniske tegn ved høy mengde virus (34, 69). Dette kan også sees i sammenheng med tidligere studier som har vist at dødelighet i forbindelse med sykdom korrelerer med mengde kortisol i plasma (29).

Det er usikkert hvorfor fiskene fra gruppe 1 (kontrollgruppe) hadde såpass høyt kortisolnivå ved enkelte uttak, og hvorfor mengden kortisol gikk i svingninger gjennom forsøket for hver gruppe. Dette med tanke på at betingelsene for hvert kar skulle være like. En mulig forklaring kan være størrelsesvariasjon i fisken. Fisken ble ikke veid og derfor kan den totale hydrokortisonkonsentrasjonen ha blitt høyere i fisk som var noe mindre, og motsatt for de større fiskene. Det ble likevel målt et gjennomsnittlig høyere kortisolnivå for den smittede gruppen som var injisert med hydrokortison. Ut fra målingene og observasjon, kan det se ut til at det er

en sammenheng mellom stress, mengde virus og dødelighet. Dette styrker også argumentet om hvorfor god fiskevelferd er kritisk for å begrense sykdomsomsfang.

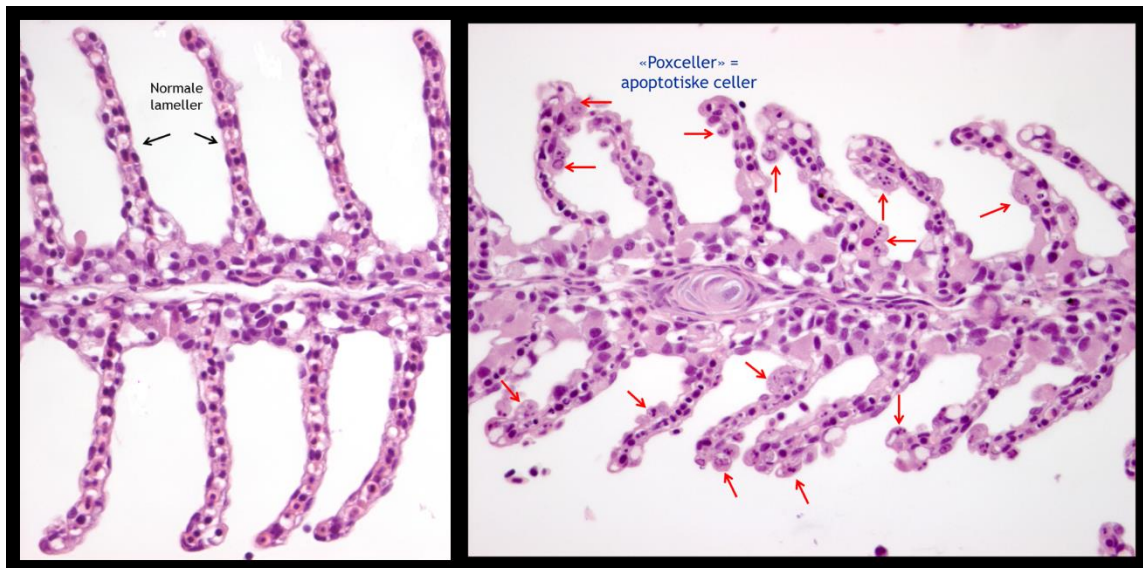
4.6 Svaber – en god nok metode for å kvantifisere virus?

Innhenting av DNA kan gjennomføres ved ulike metoder. I studien ble DNA fra gjelle innhentet på to forskjellige måter; ved svabring og ved gjelleuttak. DNA-materialet fra begge metodene ble undersøkt for virus, og metodene ble deretter sammenlignet. Ut ifra resultatene kan det se ut til at svaber er et godt alternativ for å detektere virus i forhold til homogenisert gjelle. Dette er fordelaktig da prøvene kan tas av levende fisk.

Analysene av virus viste stort sett samme trend for gjellevev og svaber. Svaberranalysen viste imidlertid generelt lavere ct-verdier (som indikerer høyere virusmengde) for alle prøver. Dette kan skyldes ulik metode for DNA-isolering og andre parametere for qPCR. Det må også nevnes at svaberprøvene kan ha inneholdt mer konsentrert virus i forhold til homogenisert gjelle siden viruset frigis på gjelleoverflaten. Ved analyse av homogenisert gjelle har man i tillegg med andre typer celler/vev som ikke er kjent for å inneha virus, slik som for eksempel brusk. Dette kan fungere som en forynningsfaktor.

Ct-verdiene fra dag 1 for svaberranalyse viste en gjennomsnittlig høy virusmengde før den sank igjen til dag 3. Dette kan skyldes metoden som ble brukt til å innhente DNA-materialet. Ved bruk av svaber, strykes en bomullspinne forsiktig over gjellene før den blir lagt over i RLT-buffer. Det kan tenkes at store mengder av DNA-materialet stammet fra vannmiljøet laksen oppholdt seg i. Smittematerialet ble fjernet fra tanken kort tid før svaberprøvene ble utført, og de lave ct-verdiene kan derfor ha sitt opphav fra fritt virus i vannet.

Det er forventet at svaberen skulle ta med seg løst virus fra slim/mucus i den subkliniske fasen, for å deretter å fange opp løse/døde celler i den akutte sykdomsfasen. Dette kan forklares med figur 35. Her ser man hvordan normale epitelceller ser ut tidlig i virusforløpet (til venstre), i motsetning epitelcellene som har gått inn i apoptose (til høyre) som skjer i den akutte sykdomsfasen. De apoptotiske cellene sitter da løst i lamellene. Det kan ikke utelukkes at svaberen har plukket opp friske epitelceller (infisert med virus) i tidlig fase ved at svaberen har blitt strøket for hard over gjellene. Dette er noe som kunne blitt undersøkt videre under mikroskop eller ved qPCR ved bruk av elongeringsfaktor ($EF1\alpha$) som målgen.



Figur 35: Illustrasjonsbilde av normale celler/lameller (til venstre) og pox-infiserte celler som har gått inn i apoptose (til høyre). De røde pilene viser apoptotiske celler som lett løsner ved svabring. Foto: Mona Gjessing

Videre viste det seg at enkelte kontrollprøver fra gruppe 1 og 2 kom ut med positivt utslag i ct-verdi. Dette kan skyldes kontaminasjon under flere ledd. Dersom det hadde vært innført smitte i kontrollkarene ville en forvente at smitten utviklet seg videre. Dette skjedde ikke og det er derfor mer nærliggende å tro at det har skjedd en kontaminering under videre håndtering eller under ulike analyser. SGPV er svært smittomt, og det har under større utbrudd vist seg at sykdommen enkelt kan spre seg fra tank til tank. De ulike karene befant seg nært i samme rom og det kan ikke utelukkes at det har blitt innført smitte i kontrollkar ved eksempelvis kontaminert utstyr eller sprut. Dette er likevel usannsynlig da de fleste SGPV-positive prøvene var innenfor dag 1.

4.7 SGPV – en systemisk infeksjon?

Som tidligere nevnt ble SGPV detektert i gjellene ved bruk av qPCR og *in situ* hybridisering. SGPV er kjent for å angripe gjellene, men det kan ikke utelukkes at viruset infiserer andre organer. For å undersøke dette ble hodenyre, milt og blod analysert for SGPV-transkript ved bruk av RT-qPCR. Analysen ble gjennomført for uttak ved virustoppen; 14 dager etter infeksjon.

RT qPCR-resultatene fra overnevnt organer var enten negative eller ga høye ct-verdier (lav mengde virus). Hodenyre ga flest positive prøver, der 6 av 10 prøver fra gruppe 3 og 4 ga ct-verdi fra ≈ 32 til 38. Selv om mange av prøvene ga positiv ct-verdi, kan det ikke konkluderes

med at viruset uttrykkes i hodenyre. Smitte fra gjelle til indre organer var forventet å skje via blod i fisken, og det var derfor uventet at ingen av blodprøvene ga utslag. Anatomisk sett ligger hodenyren like bak gjellene, og det kan derfor ikke utelukkes at detektert virus-transkript er en følge av kontaminasjon fra gjelleepitelet inne i fisken, eller fra en kontaminering under sampling. Dette kunne vært undersøkt videre ved å gjennomføre *in situ* hybridisering av hodenyre.

4.8 Kan mengde RNA og DNA samt tidlige-, intermediære- og sene pox-gener differensieres?

I motsetning til laksegener, ble genespresjonsdata for SGPV oppgitt som ct-verdier. Dette da det er vanskeligere å korrigere ct-verdier mot et referansegen som blir konstant uttrykt under ulike forhold. I tillegg er det etablert å bruke ct-verdier ved virusanalyse i oppdrettsnæringen.

I oppgaven ble mengden RNA og DNA sammenlignet for virusgenet D13L ved bruk av henholdsvis RT qPCR og qPCR. Innledningsvis ble det utredet hvordan viruset formerer seg ved transkripsjon og translasjon av tidlige-, intermediære- og sene gener som til sammen danner et modent virus som slippes ut av vertscellen. På bakgrunn av denne informasjonen var det forventet at RNA skulle dominere tidlig etter infeksjon, etterfulgt av en DNA-økning. Resultatene fra denne studien viste imidlertid at mengde RNA og DNA for D13L fulgte samme trend gjennom hele smitteforløpet for både gruppe 3 og 4. Dette kan komme av at det var svært begrenset med tidspunkter som det ble tatt ut prøver på.

Videre viste genespresjonsdata for de fleste tidlige-, intermediære- og sene genene også samme trend gjennom hele forsøket for gruppe 3 og 4, foruten genet B22R som var høyere uttrykt ved dag 1. Dette genet regnes som en av de tidlige gene og et interessant funn med tanke på eventuell tidlig deteksjon av viruset. Siden det ser ut til at genet uttrykkes tidligere enn andre gener kan det potensielt brukes som en tidligmarkør og som en markør på subklinisk infeksjon.

Det har tidligere blitt utført genespresjonsstudier for vaccinia virus for å detektere tidlige-, intermediære- og sene gener. Baldick m.fl (70) har klart å differensiere genene i de ulike fasene ved hjelp av en He-La-cellemodell. 20 minutter etter infeksjon kunne de detektere de tidlige genene, 100 minutter etter infeksjon kunne de intermediære genene detekteres, mens de sene genene kunne detekteres etter 140 minutter. På bakgrunn av resultatene fra studien kan det tenkes at uttakene i smitteforsøket ble utført for sent og med for lange opphold mellom hvert

uttak. Under smitteforløpet ble det vist at mengde infiserte celler økte, noe som kan ha gjort det vanskelig å differensiere genuttrykk i de ulike fasene.

4.9 Bruk av referansegene og kvalitetsvurdering av primersett

Som nevnt innledningsvis er det viktig med et velegnet referansegen for å kunne utføre genekspresjonsanalyser. I oppgaven ble referansegene EF1 α benyttet, som fra tidligere studier har vist seg å være et velegnet referansegen for atlantisk laks (56).

I denne studien ble det ikke gått videre med hodenyre og blod da EF1 α ble uttrykt ulikt i de ulike gruppene. Det har tidligere blitt vist at det er vanskelig å finne et velegnet referansegen for forskjellige organer i virusinfisert atlantisk laks. I et studie av Løvoll m.fl (71) ble det testet ut fem referansegene i ulike organer for laks smittet med salmon pancreas disease virus (SPDV); elongeringsfaktor1 α B (EF1 α B), 18S rRNA, β -actin and structural ribosomal protein S20 (RPS20). Kun ett referansegen, EF1 α B, viste seg å være velegnet. Dette betyr ikke at det ikke finnes flere velegnede referansegene og ved en senere anledning kunne det være aktuelt å teste flere typer. Ved å bruke flere typer (gode) referansegene i samme analyse styrkes i tillegg normaliseringsdataen.

Under testing av primersettene for SPGV-genene ga enkelte primersett doble smeltekurver (som indikerer amplifisering av flere gener) samt amplifisering i negativ kontroll og vann. Amplifisering i prøver med vann kan komme av kontaminering, eventuelt primer-dimer. Primer-dimer gir vanligvis kortere produkter som vises med en smeltetemperatur, rundt $\approx 70^{\circ}\text{C}$ (72). Amplifisering i negative kontrollprøver kan også komme av primer-dimer og kontaminering. I tilfeller der smeltetemperaturen forekom med en langt høyere temperatur, var det mer nærliggende å tro at feil genprodukt ble amplifisert. Det kan for enkelte gener finnes flere homologer som ligner hverandre og som dermed gir feil amplifisering. Det kan heller ikke utelukkes at andre mikroorganismer befant deg i miljøet, og som inneholdt gener som lignet målgenet.

4.10 Kan kortisol hemme den medfødte immunresponsen hos laks med SGVD?

Det var forventet at MX1 skulle oppreguleres i samsvar med økt mengde virus i gjellene. MX-proteiner blir dannet som en del av det medfødte immunforsvaret, og det var derfor ønskelig å se om kortisol kunne hemme produksjon av disse proteinene.

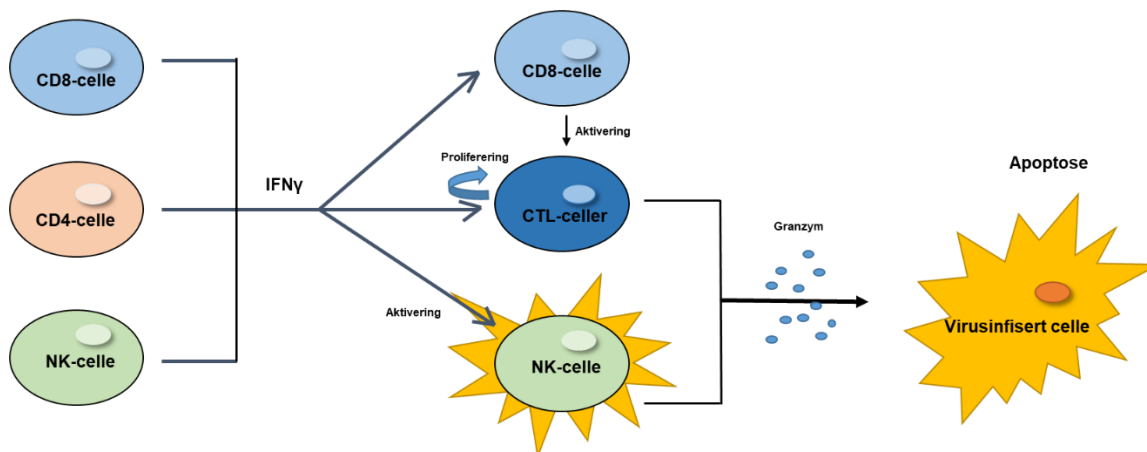
Genekspresjonsdata fra gjellevev viste en klar korrelasjon mellom virusmengde og uttrykk av MX1 etter 14 dager ($p < 0,0001$). Tidligere studier har vist at høyt kortisol-nivå hemmer den medfødte immunresponsen, som videre gir en forsinkelse av MX1-ekspresjon (30). Resultatene fra denne studien viste en jevn oppregulering av MX1 for begge smittede grupper, hvorav den smittede gruppen med hydrokortison hadde en brattere økning etter 10 dager. Ved dag 3 og 7 var det en signifikant forskjell mellom gruppene der MX1 var høyest oppregulert i virusgruppen uten hydrokortison. Etter 14 dager var det imidlertid virusgruppa med hydrokortison som hadde høyest oppregulering av MX1. Det faktum at produksjon av MX1 var høyst oppregulert i den virusinfiserte gruppen uten hydrokortisoninjisering tidlig i smitteforløpet, støtter tidligere studier som viser forsinkelse av MX1-uttrykk ved høyt kortisolnivå.

4.11 Adaptiv antiviral respons i gjelle

Det ble innledningsvis utredet hvordan kortisol virker hemmende på immunsystemet ved at sirkulasjon av leukocytter og lymfocytter blir nedregulert, samt hvordan kortisol hindrer leukocytter å vandre til betennelsesområdet. Resultatene fra denne studien viste at genuttrykket av CD8 α , CD4, GranA og IFN γ fulgte noe av den samme trenden i gjeller. Genene fra den virusinfiserte gruppa uten hydrokortisoninjisering (gruppe 3) ble i større grad oppregulert i forhold til den virusinfiserte gruppa injisert med hydrokortison (gruppe 4).

IFN γ blir produsert av lymfoide celler som en del av den adaptive immunresponsen, som videre hjelper cytotoksiske T-celler og NK-celler med å eliminere infiserte celler. De infiserte cellene drepes ved at det overføres granzym til målcellen cytoplasma, noe som gjør at cellen går inn i apoptose (15).

Fra dag 10 var CD8 α uttrykt signifikant lavere i virus- og kortisolbehandlet gruppe i forhold til gruppen som kun var infisert med virus. For IFN γ og GranA ble det vist en signifikant forskjell mellom gruppene allerede etter 3 dager. Det kan derfor ikke utelukkes at IFN γ og GranA blir produsert av andre cytotoksiske celler, eksempelvis NK-celler. NK-celler utgjør en del av førstelinjeforsvaret mot virusinfiserte celler, og det har tidligere blitt vist at disse cellene også blir hemmet under stress (73). Figur 36 viser en oversikt over noen mulige alternativer for produksjon av GranA og IFN γ .



Figur 36: Illustrasjonsbilde over alternative måter cytotoksiske celler kan induisere apoptose i en virusinfisert celle

Det har også tidligere blitt påvist at kortisol nedregulerer IFN γ for å forhindre skade på grunn av en mulig overdreven inflammatorisk respons (74). Videre har IFN γ vist å styrke respirasjonsaktivitet og nitrogenoksidproduksjon (13, 17), noe som kan være en av de medvirkende årsakene til at gruppe 3 ikke fikk klinisk sykdom. Det var imidlertid uventet at CD4, GranA og IFN γ var såpass oppregulert i den usmittede kontrollgruppen, uten hydrokortison. Dette kan være i følge av en respons på andre mikroorganismer som mulig befant seg i karene.

4.12 Adaptiv antiviral respons i milt

Resultatene fra milt viste ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for CD8 α . Dette indikerer at antallet CD8 T-celler i milt ikke øker i særlig grad under SGPV-infeksjon.

GranA og IFN γ ble imidlertid oppregulert etter 10 dager i den smittede gruppen injisert med hydrokortison. Til tross for at det ikke ble påvist en klar oppregulering av CD8 α ved noen av tidspunktene, kan det ikke utelukkes at CD8 T-cellene er involvert i produksjon av GranA og IFN γ . Milten inneholder mange T-celler i normal tilstand og det er derfor ikke sikkert at antallet CD8 T-celler må øke for å bli aktivert til å produsere GranA og IFN γ . Det kan likevel ikke dras en konklusjon om hvilke celler som produserer GranA og IFN γ uten å undersøke dette nærmere. Dette kunne eventuelt ha blitt gjort ved *in situ* hybridisering ved å bruke flere farger samtidig, eksempelvis med markører som gjenkjenner ulike cytotoksiske celler i sammenheng med GranA og IFN γ .

Videre er det usikkert hvorfor det kun var gruppene injisert med kortisol som viste oppregulering av GranA og IFN γ i milt, da resultatene fra gjelle viste det motsatte. Det er også usikkert hvorfor det produseres GranA med tanke på at det ble detektert lite til ingen virus i milt. Fra tidligere feltutbrudd har det under histopatologiske undersøkelser blitt observert tegn til hemofagocytose i milt (34, 69), og det kan derfor ikke utelukkes at kortisol induserer autoimmunitet i dette organet. Når det er sagt, var det ingen signifikant forskjell på blodnedbrytning mellom gruppene i smitteforsøket.

Det må også legges til grunn at undersøkelsene er gjort på isolert RNA, og at det derfor ikke er sikkert at transkriptene er translatert til protein og representerer reell cytotoksisk aktivitet. Dette er noe som kunne ha blitt undersøkt nærmere med immunhistokjemi.

4.13 Glykoprotein E – Et mulig protein i SGPV

Over halvparten av SGPV's leserammer er kategorisert som hypotetiske proteiner. Det er forventet at mange av disse leserammene koder for proteiner med viktig funksjon for viruset, og derfor ble de hypotetiske proteinsekvensene forsøkt annotert ved å utføre nye søk på liknende proteiner eller proteindomener med kjent funksjon.

Søket fra databasen for konserverte domener (NCBI) fikk treff på flere av poxvirusets proteinsekvenser, der de aller fleste treffene var linket til proteiner funnet i bakterier og større eukaryote organismer. Disse funnene trenger nødvendigvis ikke å være irrelevante, da DNA-virus er i stand til å etterligne vertens funksjon over tid (75). Spesielt er proteinene som er knyttet til immunhemmende responser interessante, da dette er noe som eventuelt kan forklare hvordan viruset klarer å holde seg infektiv i verten. Det er likevel nærliggende å tro at treff hos andre virus som i tillegg hører til i samme taksonomiske gruppe er mest relevante. Dette da oppbygningen av forskjellige virus kan være svært like. Det var kun ett av de nye funnene (fra SGPV038) som var linket til et annet virus; Glykoprotein E (gE) som er et membranprotein med opphav fra Alphaherpesvirus. Dette viruset er i likhet med SGPV et dobbeltrådig DNA-virus.

I epitelceller er gE medvirkende i å spre viruset fra celle til celle uten å lysere cellene (76). Proteinene sitter i den ytre membrankappen som gjør at viruset kan feste seg på vertens membran (77). gE kan opptre alene, men kan også danne et mer stabilt kompleks med glykoprotein I (gI), som sammen danner en heterodimer. Det har tidligere blitt utført forsøk *in vivo* og *in vitro* ved bruk av Bovint herpesvirus for å undersøke betydningen av disse proteinene. Det har vist seg at

verken gE eller gI er essensielle for viruset, men at det blir en signifikant reduksjon i virulens ved delesjon av gE, gI eller begge glykoproteinene (76). Dersom en legger til grunn at dette proteinet også er uttrykt i SGPV, styrker det teorien om at viruset kan spre seg på flere forskjellige måter i tillegg til lytisk formering. Spredning ved hjelp av glykoproteiner kan være relevant i tidlig fase av SGPV-infeksjon.

Resultatet som viste funksjonelle annoteringsdata for alle proteinsekvensene, viste at 49 av 210 sekvenser ble annotert med likhet til cellulære komponenter. Av disse hadde 19 sekvenser opphav fra hypotetiske proteiner. Ut ifra resultatene kan det se ut til at de fleste pox-genene blir uttrykt i membraner. Det må likevel ikke overses at dette nødvendigvis ikke er et representativt utvalg for alle genene, da resultatet kun viser annotering for ≈ 23 prosent av alle genene. Det som imidlertid var interessant var at gen SGPV038 ble annotert som en integrert membrankomponent. Dette er den samme sekvensen som fikk treff hos glykoprotein E under Conserved Domain-søk. Det faktum at sekvensen både fikk treff på et konserverte domene i tillegg til å få annotering som integrert membrankomponent, gir større sikkerhet om hvilken funksjon sekvensen har. Dette kan likevel ikke konkluderes uten å ha gjennomført funksjonelle studier.

4.14 Videre arbeid

Resultatene fra denne studien viste at injisering av hydrokortison påvirket virulens og vertens immunforsvar. Selv om det tidligere har blitt utført stresstudier med injisering av hydrokortison, kan en ikke utelukke at funnene er i følge av en unaturlig høy dose. Det hadde derfor vært interessant å gjennomføre en lignende studie ved å simulere handlinger som har vist å inducere stressreaksjoner i eksempelvis oppdrettsanlegg. Dette kunne blitt oppnådd ved å for eksempel bruke trangere kar, innføre vibrasjoner og lyd eller å håndtere fisken i større grad slik at alt kortisol utelukkende blir produsert av verten på egen hånd. Videre kan man heller ikke vite med sikkerhet om sykdommen utvikler seg i sammenheng med andre mikroorganismer. I dette smitteforsøket ble fisken undersøkt for andre kjente sykdommer ved mikroskopering, men det kunne i tillegg vært nyttig og undersøkt dette nærmere ved for eksempel Multiplex Real-Time PCR. Dette for å utelukke tilstedeværelse av andre agens.

For kvantifisering av viruset er det mulig at en kunne oppnådd tidligere deteksjon ved bruk av gener som blir uttrykt tidlig, eksempelvis B22R. Det hadde også vært fordelaktig å gjennomføre samme type studie med kortere opphold mellom hvert prøveuttak. Dette for å se om det er mulig

å differensiere de ulike tidlige, intermediære og sene genene i SGPV på et tidlig stadium av infeksjonen. Det hadde også vært interessant å gjennomføre *in situ* hybridisering på seriesnitt med ulike prober for forskjellige gener for å kunne visualisere uttrykk i forskjellige faser. Eventuelt kunne det ha blitt utført multiplex analyse på samme snitt med ulik fluorescensfarge for kolokalisering av virus- og vertsgener. Ved bruk av RNAscope® kan dette bli utført med opptil fire målgener på ett og samme snitt (59). *In situ* hybridisering hadde også vært aktuelt å gjennomføre på andre organer, eksempelvis hodenyre og milt, for å validere at virusdeteksjon ved RT-qPCR ikke skyldtes kontaminering.

Det må videre påpekes at alt mRNA ikke nødvendigvis blir translatert til protein, noe som kan ha mye å si for sykdomsgrad. Det kunne derfor vært fordelaktig å validere resultater med immunohistokjemi (IHC). Denne metoden baserer seg på samme prinsipp som *in situ* hybridisering, men istedenfor å detektere mRNA vil man ved bruk av IHC detektere translaterete proteiner. Metoden baserer seg på binding mellom antigen (proteinet av interesse) og antistoff som detekteres med kromogen eller fluorescens (78). Metoden er i tillegg fordelaktig med tanke på lokalisering av proteinene.

Det har videre vist seg at fisk som har overlevd SGPV ikke ser ut til å oppleve akutte utbrudd av samme art som fisk som ikke har vært utsatt for sykdommen. Dette er noe som har blitt observert i oppdrettsanlegg som har opplevd årlige utbrudd av SGPV (32). Disse observasjonene tyder på at fisken reagerer med en adaptiv/sekundær immunrespons. Det har tidligere blitt gjennomført studier på atlantisk laks som har vist Ig-positive lymfocytter blir nedregulert i følge av kortisolinjisering (28). Det kan derfor være interessant å forske mer på faktorer som B-celler og antistoff i sammenheng med stressreaksjoner. Det hadde også vært interessant å strekke smitteforsøket over lengre tid for å se om laksen klarer å kvitte seg med viruset på egen hånd, og om hvordan samme laks reagerer på å bli smittet på nytt. I forbindelse med dette, hadde det vært interessant undersøke antistoffproduksjon ved bruk av for eksempel bioplexkuler coatet med virusantigener.

Forslagene til videre arbeid vil kunne gi en enda bedre forståelse av hvordan viruset uttrykkes i laksen og hvordan laksen påvirkes av viruset. Dette er kunnskap som kan bidra til finne bekjempelsesstrategier mot SGPV i oppdrettsnæringen, som for eksempel vaksiner.

5. Konklusjon

- Dødelighet, klinisk sykdom og mengde SGPV øker i korrelasjon med forhøyet kortisolinnhold i blodplasma.
- Svaber er en god nok metode til å innhente DNA-materiale på i forbindelse med deteksjon av virus i gjelle. Metoden gir tilnærmet samme resultat som analyser utført på homogenisert gjelle.
- Resultatene fra RT qPCR og qPCR viste at mengde RNA og DNA fra SGPV fulgte samme trend gjennom smitteforsøket. Det var gjennomsnittlig mer RNA enn DNA gjennom forløpet.
- B22R var høyere uttrykt enn alle andre tidlige-, intermediære- og sene SGPV-gener etter én dag i smitteforsøket.
- Uttrykk av MX1 korrelerte med økt mengde virus ved virustoppen (14 dager etter infeksjon). I den smittede gruppen injisert med hydrokortison, var det en forsinkelse av MX1-uttrykk i tidlig fase. Dette tyder på at høyt kortisolinnhold hemmer en del av den medfødte immunresponsen.
- IFN γ og GranA ble oppregulert i gjeller etter SGPV-infeksjon. For smittet gruppe injisert med hydrokortison forekom det en forsinkelse av genuttrykket.
- I milt ble IFN γ og GranA kun oppregulert i den smittede gruppen injisert med hydrokortison.
- Glykoprotein E er et mulig membranprotein i SGPV og har i andre virus vist seg å være en del av viruset evne til å spre seg fra celle til celle.

6. Referanseliste

1. Norges Sjømatråd. Sjømateksport for 99 milliarder i 2018. Tilgjengelig fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018>. 2019.
2. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2018. nr 6a/2019. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/fiskehelse-rapporten-2018>.
3. Brun E. Frisk fisk og bærekraft. Akvatiske forsknings- og utviklingsprosjekter på veterinærinstituttet 2019.
4. Snieszko S. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*. 1974;6(2):197-208.
5. World Health Organization. Vaccinating salmon: How Norway avoids antibiotics in fish farming. Tilgjengelig fra <https://www.who.int/features/2015/antibiotics-norway/en/>
6. Noble C, Nilsson J, Stien LH, Iversen MH, Kolarevic J, Gismervik K. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. 3. utgave. 2018.
7. Mowi ASA. Laksens livssyklus. Tilgjengelig fra <http://marineharvest.no/products/seafood-value-chain/>.
8. Kryvi H, Poppe T. Fiskeanatomi. Oslo: Fagbokforlaget; 2016.
9. Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*: Cambridge University Press; 1997.
10. Gjessing MC, Steinum T, Olsen AB, Lie KI, Tavoranpanich S, Colquhoun DJ, et al. Histopathological investigation of complex gill disease in sea farmed Atlantic salmon. *PloS one*. 2019;14(10).
11. Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology* (New York, NY). 2010;12(4):361-79.
12. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utgave. Bergen. Fagbokforlag; 2006.
13. Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008;25(4):326-40.
14. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Third edition. Elsevier Health Sciences; 2006.
15. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*. 96: Academic Press; 2007. p. 41-101.
16. Robertsen B. The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018;80:41-52.

17. Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, Zou J, Jørgensen J, Robertsen B. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of virology*. 2011;85(17):9188-98.
18. Johansen A, Collet B, Sandaker E, Secombes CJ, Jørgensen JB. Quantification of Atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay. *Fish & Shellfish Immunology*. 2004;16(2):173-84.
19. Lee S-H, Vidal SM. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome research*. 2002;12(4):527-30.
20. Kileng Ø, Brundtland MI, Robertsen B. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish & Shellfish Immunology*. 2007;23(2):378-89.
21. Press CM, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*. 1999;9(4):309-18.
22. Koppang EO, Fischer U, Moore L, Tranulis MA, Dijkstra JM, Köllner B, et al. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*. 2010;217(6):728-39.
23. Zwollo P, Cole S, Bromage E, Kaattari S. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *J Immunol*. 2005;174(11):6608-16.
24. Kum C, Sekkin S. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs. *Recent Advances in Fish Farms*. 2011:169-216.
25. Haugarvoll E, Bjerås I, Nowak BF, Hordvik I, Koppang EO. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*. 2008;213(2):202-9.
26. Dalum AS, Griffiths DJ, Valen EC, Amthor KS, Austbø L, Koppang EO, et al. Morphological and functional development of the interbranchial lymphoid tissue (ILT) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Fish & shellfish immunology*. 2016;58:153-64.
27. Schreck CB, Tort L. The concept of stress in fish. *Fish physiology*. 35: Elsevier; 2016. p. 1-34.
28. Espelid S, Løkken GB, Steiro K, Bøgwald J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar*L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 1996;6(2):95-110.
29. Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LOB. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008;24(2):194-204.
30. Gadan K, Marjara IS, Sundh H, Sundell K, Evensen Ø. Slow release cortisol implants result in impaired innate immune responses and higher infection prevalence following experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Fish & Shellfish Immunology*. 2012;32(5):637-44.

31. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2017. Rapport 1a-2018. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2018/fiskehelse rapporten-2017>.
32. Gjessing MC, Weli SC, Dale OB. Chapter 7 - Poxviruses of Fish. In: Kibenge FSB, Godoy MG, editors. *Aquaculture Virology*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 119-25.
33. Gjessing M, Christensen D, Manji F, Mohammad S, Petersen P, Saure B, et al. Salmon gill poxvirus disease in Atlantic salmon fry as recognized by improved immunohistochemistry also demonstrates infected cells in non-respiratory epithelial cells. *Journal of fish diseases*. 2018;41(7):1103-10.
34. Gjessing MC, Yutin N, Tengs T, Senkevich T, Koonin E, Rønning HP, et al. Salmon gill poxvirus, the deepest representative of the Chordopoxvirinae. *Journal of virology*. 2015;JVI. 01174-15.
35. Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*. 2004;85(1):105-17.
36. Organization WH. *Bugs, drugs and smoke: stories from public health*: World Health Organization; 2012.
37. Tryland M. Kopper og koppevirus - 200 år siden første vaksinasjon i Norge. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2001;121(30):3546-50.
38. ViralZone. Poxviridae [Bilde]. Swiss Institute of Bioinformatics. Tilgjengelig fra: https://viralzone.expasy.org/174?outline=all_by_species.
39. NCBI. Salmon gill poxvirus. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US): National Center for Biotechnology Information; 2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/39941>
40. Moss B. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses*. 2012;4(5):688-707.
41. Broyles SS. Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*. 2003;84(9):2293-303.
42. Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Karlsen M, Saether P, Arnesen C, et al. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of virology*. 2008;153(7):1299-309.
43. ViralZone. Poxvirus - Replication cycle [Bilde]. Swiss Institute of Bioinformatics. Tilgjengelig fra: <https://viralzone.expasy.org/4399>.
44. Zhong P, Agosto LM, Munro JB, Mothes W. Cell-to-cell transmission of viruses. *Curr Opin Virol*. 2013;3(1):44-50.
45. Moss B. *Fields Virology*. In: Knipe D.M. HPM, editor. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. Vol. 2. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2905–46.

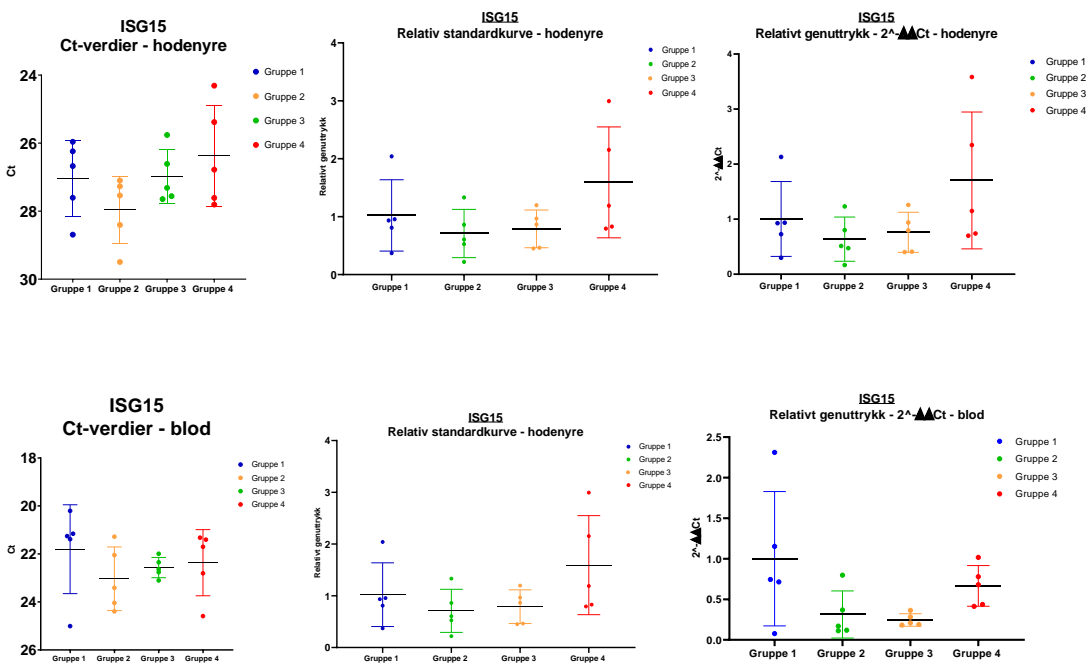
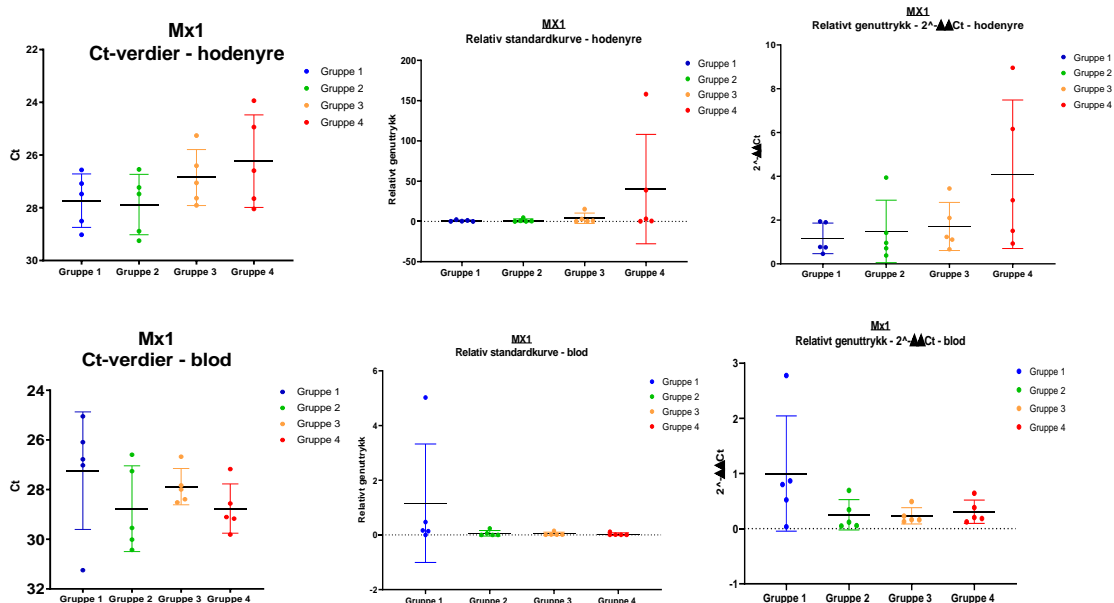
46. J. Eggers H. Principles of Virology, 2nd Edition, S.J. Flint, L.W. Enquist, V.R. Racaniello, A.M. Skalka. ASM Press, Washington DC (2004)
47. Yang Z, Reynolds SE, Martens CA, Bruno DP, Porcella SF, Moss B. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *Journal of virology*. 2011;85(19):9899-908.
48. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1. 0 User Manual. Wilmington, DE. 2009;19810.
49. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2):126-39.
50. Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P. Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clinical Chemistry*. 2000;46(11):1851.
51. Technologies A. Agilent 2100 Bioanalyzer System, 2100 Expert Software User's Guide. Agilent Technologies, Inc. 2018:2000-17.
52. Qiagen. QuantiTect® Reverse Transcription Handbook. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/ca/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
54. Jia Y. Chapter 3 - Real-Time PCR. In: Conn PM, editor. *Methods in Cell Biology*. 112: Academic Press; 2012. p. 55-68.
55. Maddocks S, Jenkins R. Chapter 4 - Quantitative PCR: Things to Consider. In: Maddocks S, Jenkins R, editors. *Understanding PCR*. Boston: Academic Press; 2017. p. 45-52.
56. Olsvik PA, Lie KK, Jordal A-EO, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology*. 2005;6(1):21.
57. Pardue ML, Gall JG. MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1969;64(2):600.
58. Wu X, Wang H-YF, Nan S, Li-Chong W, Luo Y. Ultra sensitive method for in situ detection of nucleic acids. Google Patents; 2014.
59. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2012;14(1):22-9.
60. Advanced Cell Diagnostics Inc. RNAscope® 2.5 HD Detection kit (RED) Quick Guide For FFPE Tissues. 2019. Tilgjengelig fra: <https://acdbio.com/documents/product-documents>

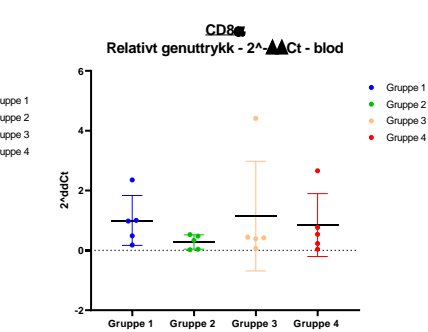
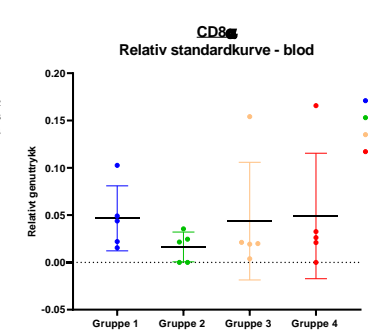
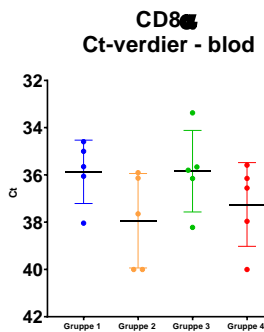
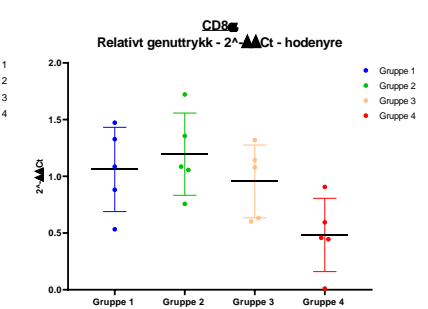
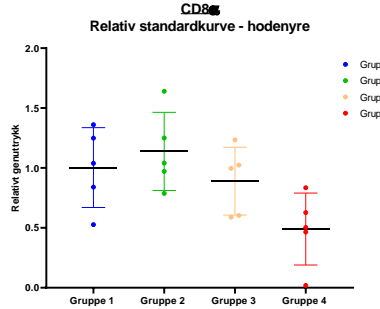
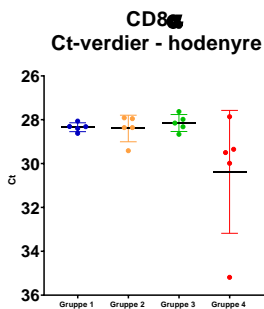
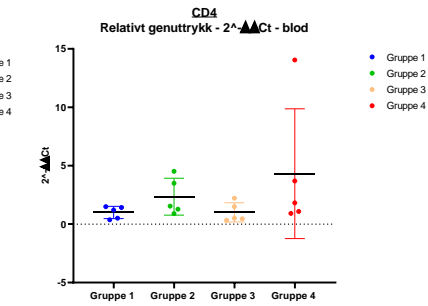
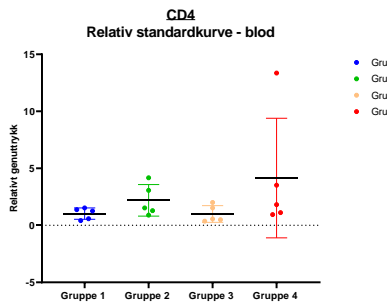
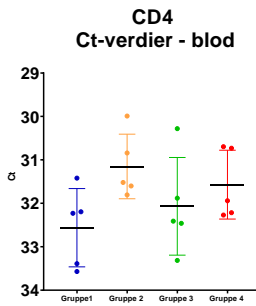
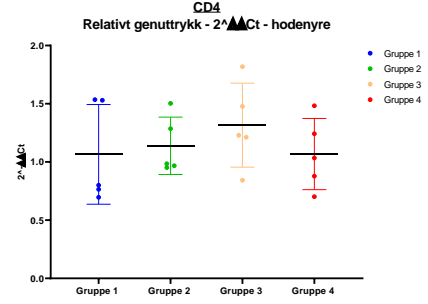
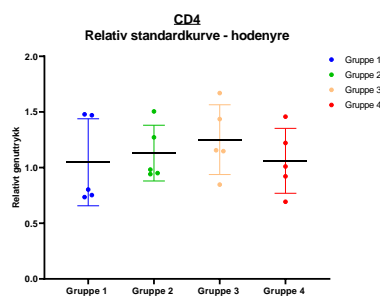
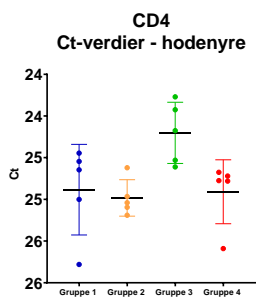
61. Galperin MY. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *Comp Funct Genomics*. 2001;2(1):14-8.
62. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*. 2016;45(D1):D200-D3.
63. Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*. 2008;36(10):3420-35.
64. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;25(2):169-93.
65. Forskrift om bruk av dyr i forsøk: Lovdata; 2015. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2015-06-18-761>
66. Norecopa. The Three R's. Tilgjengelig fra: <https://norecopa.no/alternatives/the-three-rs>.
67. Kruger D, Schneck P, Gelderblom H. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *The Lancet*. 2000;355(9216):1713-7.
68. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014;3:85-.
69. Gjessing M, Thoen E, Tengs T, Skotheim S, Dale O. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater-and seawater-reared Atlantic salmon. *Journal of fish diseases*. 2017;40(10):1253-65.
70. Baldick CJ, Jr., Moss B. Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *Journal of virology*. 1993;67(6):3515-27.
71. Løvoll M, Austbø L, Jørgensen JB, Rimstad E, Frost P. Transcription of reference genes used for quantitative RT-PCR in Atlantic salmon is affected by viral infection. *Veterinary Research*. 2011;42(1):8.
72. Biosystems A. Real-time PCR handbook. USA: Life Thecnologies; 2015.
73. Tseng RJ, Padgett DA, Dhabhar FS, Engler H, Sheridan JF. Stress-induced modulation of NK activity during influenza viral infection: role of glucocorticoids and opioids. *Brain, behavior, and immunity*. 2005;19(2):153-64.
74. Saeij JPJ, Verburg-van Kemenade LBM, van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF. Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. *Developmental & Comparative Immunology*. 2003;27(3):233-45.
75. Weiss RA. Exchange of genetic sequences between viruses and hosts. *Viruses, Genes, and Cancer*: Springer; 2017. p. 1-29.

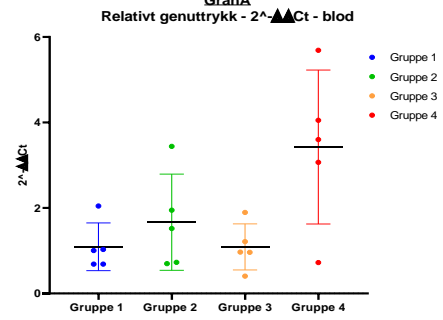
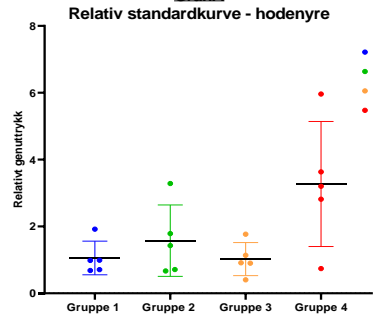
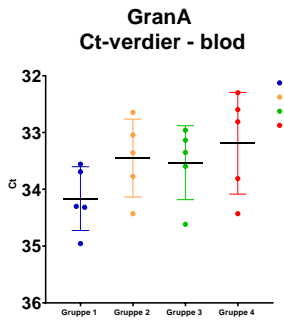
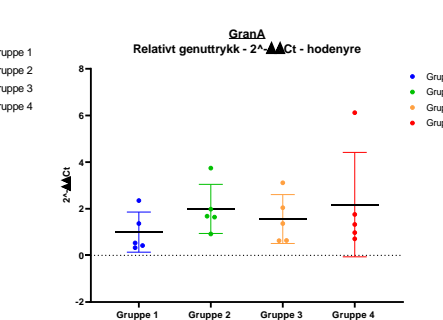
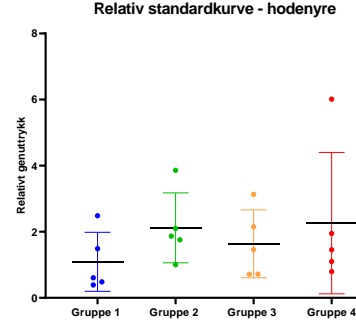
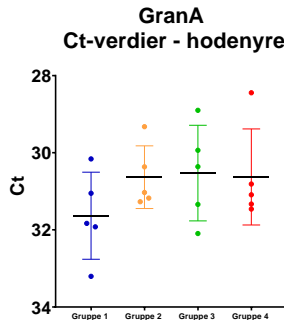
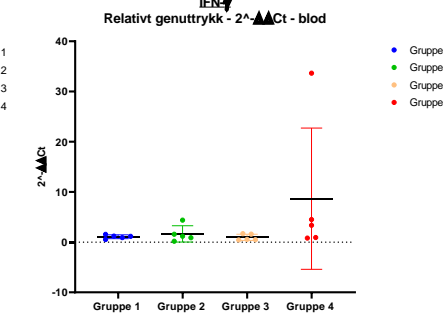
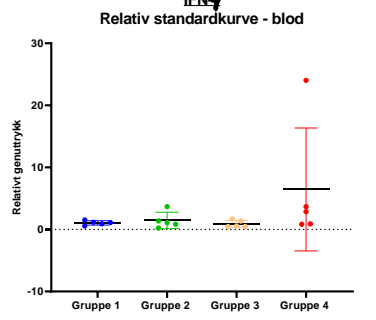
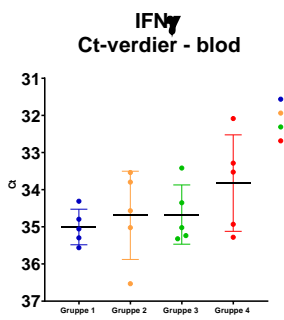
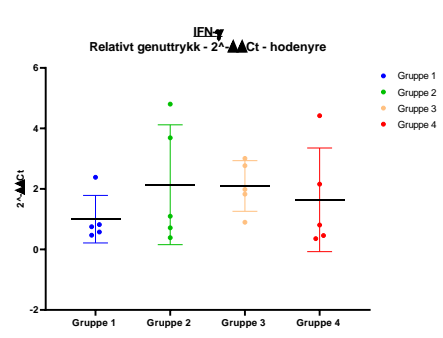
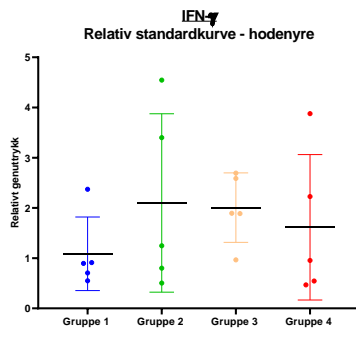
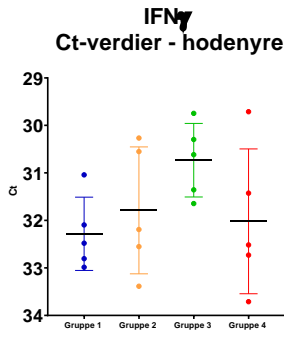
76. Rijsewijk F, Kaashoek M, Langeveld J, Maris-Veldhuis M, Magdalena J, Verschuren S, et al. Epitopes on glycoprotein E and on the glycoprotein E/glycoprotein I complex of bovine herpesvirus 1 are expressed by all of 222 isolates and 11 vaccine strains. *Archives of virology*. 2000;145(5):921-36.
77. Baranowski E, Keil G, Lyaku J, Rijsewijk FAM, Van Oirschot JT, Pastoret P-P, et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Veterinary Microbiology*. 1996;53(1):91-101.
78. Ramos-Vara J. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*. 2005;42(4):405-26.

Vedlegg 1

Ct-verdier og relativt genuttrykk for hodenyre og blod ved virustoppet - 14 dager etter infeksjon. Relativt genuttrykk er vist på to forskjellige måter; ved $2^{-\Delta\Delta Ct}$ og ved relativ standardkurve









Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway