



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2023 60 stp**  
NMBU Veterinærhøgskolen

## **Diagnostiske verktøy for måling av cytokiner hos rein (*Rangifer tarandus tarandus*)**

Diagnostic tools for measuring cytokine levels in  
reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*)

**Tuva Løken Frøvoll**

Kjemi og bioteknologi (MSc) - Molekylærbiologi



# Forord

Denne oppgaven ble skrevet ferdig februar 2023, og markerer slutten på min mastergrad i kjemi og bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet med oppgaven ble finansiert av og utført ved Veterinærinstituttet (VI) under satsningen Bio-Direct. Bio-Direct er et tverrfaglig prosjekt som involverer flere fagfelt og seksjoner. Prosjektet har som mål å utvikle veterinærdiagnostikk som kan påvise sykdom raskt og spesifikt ved hjelp av biomarkører, og å etablere organlignende cellemodeller som kan erstatte dyreforsøk.

Fra før jeg startet på studiet hadde jeg som mål at jeg skulle bruke studiet mitt til å jobbe for en bedre dyrehelse, da dette er noe som er viktig for meg personlig. Å kunne skrive min masteroppgave under Bio-Direct har derfor vært midt i blinken og jeg ønsker å takke Maria. K. Dahle for at jeg fikk denne muligheten.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk faglig hovedveileder Kari Lybeck, hovedveileder fra NMBU Hege Lund, og biveiledere Ingebjørg H. Nymo og Siv Klevar for meget god oppfølging gjennom hele året. Under tiden jeg har brukt på dette prosjektet har jeg fått mulighet til å lære av utrolig dyktige forskere og ingeniører. Jeg ønsker å takke Unni Grimholt og biveileder Shokouh Makvandi-Nejad for hjelp til design av primere, Hildegunn Viljugrein for statistikkhjelp, og Inger Austrheim Heffernan, Krister Lundgård og Randi Faller for god opplæring og veiledning på lab.

Jeg har følt meg veldig velkommen og har også fått være med når de har holdt på med andre prosjekter. Jeg setter også veldig pris på at jeg fikk dra til Tromsø for å være på dyreavdelingen ved UiT – Norges Arktiske Universitet (UiT), for å hjelpe til med å stille rein samt ta prøver av disse til mitt eget arbeid.

*Tuva Løken Frøvoll*

---

Tuva Løken Frøvoll

Ås, februar 2023

# Sammendrag

**Bakgrunn for studien:** Det finnes i dag ingen kommersielle metoder for deteksjon av cytokiner hos rein (*Rangifer tarandus tarandus*). Økt smittepress i forbindelse med at tamreinen oftere føres og holdes i gjerde, har medført et større behov for diagnostiske verktøy for å kartlegge reinhelsen.

**Mål:** Målet med studien var å kartlegge om, og i hvor stor grad, en kulebaserte multipleks cytokinanalyse beregnet til storfe, kunne brukes på prøver fra rein, og vurdere potensialet til de ulike cytokinene som biomarkører. I tillegg ville det bli designet primere for å måle genuttrykket for de samme cytokinene, som et sammenligningsgrunnlag for den multiplekse cytokinanalysen.

**Metoder:** Perifere mononukleære celler (PBMC) fra rein og storfe (*Bos taurus*) ble isolert fra blod, og stimulert *in vitro* med mitogenene pokeweed mitogen (PWM), phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (ConA), lipopolysakkard (LPS), staphylococcal enterotoxin B (SEB) og phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) i kombinasjon med ionomycin (I) i 6 eller 24 timer for å indusere cytokinrespons. Cytokinnivåene for interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, IL-17, tumor nekrose faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) og interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ble målt ved bruk av den kulebaserte multiplekse analysemetoden, MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Resultatene ble sammenlignet mot genuttrykket målt ved sanntids-polymerase kjedereaksjon (qPCR). For å kunne utføre qPCR ble det designet primere til både rein og storfe for IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ , med beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) som referanseggen.

Cytokinnivåer ble også målt i serumprøver fra to tidligere utførte eksperimentelle smitteforsøk på rein, med hhv. Orf-virus (ORFV) (Tryland et al., 2013) og cervid herpesvirus 2 (CvHV2) (das Neves et al., 2009a).

**Resultater:** Resultatene indikerte at cytokinene IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  detekteres i prøver fra rein med MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Stimulering med PMA-I viste seg å være mest optimal for å aktivere cytokinproduksjon, og ga signifikant økt konsentrasjon av IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ , for både rein og storfe. Det var generelt noe lavere cytokinnivåer hos rein enn storfe, og dette gjaldt spesielt TNF- $\alpha$ . Cytokinkonsentrasjonene var stort sett høyere etter 24 timer stimulering, sammenlignet mot 6

timer. I serumprøver fra smitteforsøk var det målbare nivåer av IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ , men kun nivået av IFN- $\gamma$  økte signifikant etter infeksjon, og da bare ved smitte med CvHV2. Alle primere til rein så ut til å fungere godt basert på funn ved gelelektroforese og PCR-effektivitet. Sekvensering av PCR-produkt var imidlertid ikke vellykket for IL-17, og burde gjentas for å sikre at rett sekvens amplifiseres. Det ble også designet primere for storfe, men PCR-effektivitet, gelelektroforese og sekvensering, tilsier at flere av primerne ikke var optimale, og genuttrykket for storfe må derfor tolkes med forsiktighet.

***Konklusjoner og potensiell relevans:*** Resultatet av denne studien tyder på at den multiplekse cytokinanalysen kan brukes for å måle konsentrasjonen av IL-10, IL-17, og IFN- $\gamma$  i prøver fra rein, og de fleste primere som ble designet kan benyttes for å måle genuttrykk ved qPCR hos denne arten. Det ble observert gjentatte problemer knyttet til standardkurven for IL-8, slik at målte nivåer ikke alltid kunne konverteres til konsentrasjonen. IL-6 ble ikke påvist i prøver fra rein, men siden stimulering med mitogener også førte til lav produksjon av dette cytokinet i prøver fra storfe, kan det ikke utelukkes at den multiplekse analysemetoden likevel kan brukes for å påvise IL-6 hos rein.

Selv om ytterligere undersøkelser i større prøvesett er påkrevd, viser denne studien potensialet av den multiplekse analysemetoden, og qPCR, som diagnostiske verktøy for å måle cytokiner i rein.

# Abstract

**Reason for performing study:** There are currently no commercial methods for detecting cytokines in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Increased infection pressure due to semi-domesticated reindeer being kept in fenced areas and fed more often has led to a greater need for diagnostic tools to map out reindeer health.

**Objectives:** The aim of the study was to decide whether, and to what extent, a bead-based multiplex cytokine assay intended for cattle could be used on samples from reindeer, and to assess the potential of the various cytokines as biomarkers. In addition, primers would be designed to measure the gene expression of the same cytokines, as a basis of comparison for the multiplex cytokine analysis.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from reindeer and cattle (*Bos taurus*) were isolated from blood and stimulated *in vitro* with the mitogens pokeweed mitogen (PWM), phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (ConA), lipopolysaccharide (LPS), staphylococcal enterotoxin B (SEB) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in combination with ionomycin (I) for 6 or 24 hours to induce cytokine response. Cytokine levels for interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were measured using the bead-based multiplex assay method, MILLIPLEX® Bovine Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel 1. The results were compared with gene expression measured by real-time polymerase chain reaction (qPCR). In order to perform qPCR, primers were designed for both reindeer and cattle for IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , with beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) as reference gene.

Cytokine levels were also measured in serum samples from two previously carried out experimental infection trials on reindeer, with Orf virus (ORFV) (Tryland et al., 2013) and cervid herpesvirus 2 (CvHV2) (das Neves et al., 2009a).

**Results:** The results indicated that the cytokines IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  can be detected in samples from reindeer with the MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Stimulation with PMA-I proved to be most optimal for activating cytokine production and resulted in significantly increased concentrations of IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , for both reindeer and cattle. There were generally lower cytokine levels in reindeer compared to cattle, and this particularly applied to TNF- $\alpha$ . Cytokine concentrations

were generally higher after 24 hours of stimulation, compared to 6 hours. In serum samples from infection trials, there were measurable levels of IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , but only the level of IFN- $\gamma$  increased significantly after infection, and only when infected with CvHV2. All reindeer primers appeared to work well based on gel electrophoresis findings and PCR efficiency. However, sequencing of the PCR product was not successful for IL-17 and should be repeated to ensure that the correct sequence is amplified. Primers for cattle were also designed, but PCR efficiency, gel electrophoresis and sequencing indicate that several of the primers were not optimal and the gene expression for cattle must therefore be interpreted with caution.

***Conclusions and potential relevance:*** The results of this study suggest that the multiplex cytokine assay can be used to measure the concentration of IL-10, IL-17, and IFN- $\gamma$  in samples from reindeer, and that most of the primers that were designed can be used for measuring gene expression by qPCR in this species. Repeated methodological problems related to the standard curve for IL-8 were observed as measured levels of fluorescence could not always be converted to the concentration. IL-6 was not detected in samples from reindeer, but since stimulation with mitogens also led to low production of this cytokine in samples from cattle, it cannot be ruled out that the multiplex analysis method can still be used to detect IL-6 in reindeer.

Although further investigations in larger sample sets are required, this study shows the potential of the multiplex analysis method and qPCR as diagnostic tools for measuring cytokines in reindeer.

# Forkortelser

Gjennom studien benyttes det en rekke forkortelser. Forkortelsene skrives fullt ut i teksten første gang de blir nevnt, men for å lettere finne igjen betydningen samles de også her. Enkelte forklaringer er også oversatt til engelsk for å unngå misforståelser mtp. fagterminologi.

| <b>Forkortelse</b>                      | <b>Forklaring</b>   |
|---|---|
| <b>A</b>                                | Adenin  |
| <b>A, Ala</b>                           | Alanin  |
| <b>BLAST</b>                            | Basic Local Alignment Search Tool   |
| <b>BoHV1</b>                            | Bovint herpesvirus 1  |
| <b>bp</b>                               | Basepar   |
| <b>C</b>                                | Cytosin   |
| <b>CCD</b>                              | (engelsk: Charge-Coupled Device)  |
| <b>CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup></b> | (engelsk: Cluster of differentiation 4/8)                                 |
| <b>cDNA</b>                             | Komplementær deoksyribonukleinsyre  |
| <b>ConA</b>                             | Concanavalin A  |
| <b>C<sub>q</sub></b>                    | Kvantifikasjonssyklus   |
| <b>CV</b>                               | Variasjonskoeffisient   |
| <b>CvHV2</b>                            | Cervid herpesvirus 2  |
| <b>d.p.i.</b>                           | Dager post inokulering  |
| <b>DC</b>                               | Dendrittisk celle   |
| <b>DNA</b>                              | Deoksyribonukleinsyre   |
| <b>dsDNA</b>                            | Dobbeltrådet DNA  |
| <b>E</b>                                | PCR-effektivitet  |
| <b>E, Glu</b>                           | Glutaminsyre  |
| <b>EDTA</b>                             | Etylendiamintetraeddiksyre  |
| <b>ELISA</b>                            | Enzymkoblet immunadsorberende analyse                                     |
| <b>F</b>                                | Fremover primer   |
| <b>FI</b>                               | Fluorescensintensitet   |
| <b>FOTS</b>                             | Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem                        |
| <b>G</b>                                | Guanin  |
| <b>gDNA</b>                             | Genomisk DNA  |
| <b>HEV</b>                              | Hepatitt E virus  |
| <b>HTF</b>                              | High-throughput fluidics  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>          | Interferon-gamma  |
| <b>Ig</b>                               | Immunoglobulin  |
| <b>IKC</b>                              | Infeksiøs keratokonjunktivitt   |
| <b>IL</b>                               | Interleukin   |
| <b>K, Lys</b>                           | Lysin   |
| <b>LED</b>                              | Lysemitterende diode  |
| <b>LLOQ</b>                             | Nedre grense for kvantifisering   |
| <b>LPS</b>                              | Lipopolysakkarid  |
| <b>M, Met</b>                           | Metionin  |
| <b>MAFFT</b>                            | Multipel sammenstilling ved bruk av Fast Fourier Transform                |
| <b>MHC</b>                              | Vevsforlikelighetsgenkompleks (engelsk: Major histocompatibility complex) |



---

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>mRNA</b>            | Budbringer RNA  |
| <b>MSA</b>             | Multipel sammenstilling   |
| <b>NCBI</b>            | Nasjonalt senter for bioteknologisk informasjon                   |
| <b>NMBU</b>            | Norges miljø- og biovitenskapelige universitet                    |
| <b>ns</b>              | Ikke signifikant  |
| <b>OOR</b>             | Out of range  |
| <b>ORFV</b>            | Orf-virus   |
| <b>PAMP</b>            | Patogen-assosierte molekulære mønstre                             |
| <b>PBMC</b>            | Perifer mononukleær celle   |
| <b>PBS</b>             | Fosfatbufret saltvann (engelsk: Phosphate-buffered saline)        |
| <b>PCR</b>             | Polymerase kjedereaksjon  |
| <b>PHA</b>             | Phytohemagglutinin  |
| <b>PMA-I</b>           | Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kombinert med ionomycin (I) |
| <b>PRR</b>             | Mønster-gjenkjennende reseptorer                                  |
| <b>PWM</b>             | Pokeweed mitogen  |
| <b>qPCR</b>            | Sanntids-PCR (engelsk: Real-time PCR)                             |
| <b>R</b>               | Revers primer   |
| <b>R<sup>2</sup></b>   | Kvadrert korrelasjonskoeffisient                                  |
| <b>RNA</b>             | Ribonukleinsyre   |
| <b>RT</b>              | Revers transkriptase  |
| <b>RT-PCR</b>          | Revers-transkripsjon PCR  |
| <b>SD</b>              | Standardavvik   |
| <b>SEB</b>             | Staphylococcal enterotoxin B                                      |
| <b>SNO</b>             | Statens naturoppsyn   |
| <b>Streptavidin-PE</b> | Streptavidin-Phycoerthrin   |
| <b>T</b>               | Tymin   |
| <b>T, Thr</b>          | Treonin   |
| <b>TCR</b>             | T-cellereseptor   |
| <b>TGF-β</b>           | Transformerende vekstfaktor-beta                                  |
| <b>Th-celle</b>        | T-hjelpecelle   |
| <b>T<sub>m</sub></b>   | Smeltetemperatur  |
| <b>TNF-α</b>           | Tumor nekrose faktor-alfa   |
| <b>Treg</b>            | Regulatorisk T-celle  |
| <b>UiT</b>             | UiT – Norges Arktiske Universitet                                 |
| <b>ULOQ</b>            | Øvre grense for kvantifisering                                    |
| <b>V, Val</b>          | Valin   |
| <b>VI</b>              | Veterinærinstituttet  |
| <b>xMAP</b>            | x = ukjent analytt, MAP = Multi-Analyte Profiling                 |
| <b>β2M</b>             | Beta-2-microglobulin  |

---

# INNHALDSFORTEGNELSE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FORORD</b>  | <b>I</b>  |
| <b>SAMMENDRAG</b>  | <b>II</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>IV</b> |
| <b>FORKORTELSER</b>  | <b>VI</b> |
| <b>1 INTRODUKSJON</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Bakgrunn for studien .....                                       | 1         |
| 1.2 Rein i Norge .....   | 4         |
| 1.3 Reinhelse .....  | 6         |
| 1.3.1 Munnskurv .....  | 7         |
| 1.3.2 Smittsom øyebetennelse .....                                   | 9         |
| 1.4 Immunforsvaret .....   | 11        |
| 1.4.1 Medfødt immunitet.....   | 12        |
| 1.4.2 Ervervet immunitet.....  | 14        |
| 1.4.3 Cytokiner.....   | 16        |
| 1.5 Bruk av immunologiske metoder på tvers av arter .....            | 21        |
| 1.6 <i>In vitro</i> testsystem for induksjon av cytokinrespons ..... | 22        |
| 1.7 Polymerase kjedereaksjon (PCR).....                              | 23        |
| 1.7.1 Revers-transkripsjon PCR (RT-PCR) for syntese av cDNA.....     | 24        |
| 1.7.2 Sanntids-PCR (qPCR).....                                       | 25        |
| 1.8 Kulebaserte multiplekse analysemetoder .....                     | 25        |
| 1.9 Målet med studien .....  | 29        |
| <b>2 MATERIALER OG METODER</b>                                       | <b>30</b> |
| 2.1 Multiplert sammenstilling og fylogeni for cytokinsekvenser ..... | 30        |
| 2.2 Prøvemateriale og oversikt over studien .....                    | 31        |
| 2.2.1 Blodprøveuttak fra rein og storfe .....                        | 33        |
| 2.2.2 Serumprøver fra smitteforsøk på rein.....                      | 34        |
| 2.3 PBMC.....  | 35        |
| 2.3.1 Isolering av PBMC fra blod .....                               | 35        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.3.2    | <i>In vitro</i> mitogenstimulering av PBMC.....                          | 37        |
| 2.4      | PCR.....   | 38        |
| 2.4.1    | Ekstraksjon av RNA.....  | 38        |
| 2.4.2    | Syntese av cDNA.....   | 39        |
| 2.4.3    | Design av primere.....   | 41        |
| 2.4.4    | Gelektroforese.....  | 43        |
| 2.4.5    | Kvantifikasjon av mRNA ved sanntids-PCR (qPCR).....                      | 44        |
| 2.4.6    | PCR-effektivitet.....  | 45        |
| 2.4.7    | Sekvensering.....  | 47        |
| 2.4.8    | Beregning av genekspresjon.....  | 47        |
| 2.5      | Kulebasert multipleks analyse av cytokiner.....                          | 48        |
| 2.5.1    | Preparering av reagenser og validering før analyse.....                  | 48        |
| 2.5.2    | Utførelse av kulebasert multipleks cytokinanalyse.....                   | 49        |
| 2.5.3    | Håndtering av data fra kulebasert multipleks cytokinanalyse.....         | 51        |
| 2.6      | Statistiske analyser.....  | 52        |
| <b>3</b> | <b>RESULTATER</b>  | <b>54</b> |
| 3.1      | Multipel sammenstilling og fylogeni for cytokinsekvenser.....            | 54        |
| 3.2      | Cytokinspesifikke primere.....   | 57        |
| 3.3      | Deteksjon av cytokiner med kulebasert multipleks analyse og qPCR.....    | 60        |
| 3.3.1    | Utbytte av PBMC isolert fra blod og ekstraksjon av RNA.....              | 60        |
| 3.3.2    | Analyse av celsesupernatant fra pilotforsøk.....                         | 60        |
| 3.3.3    | Analyse av celsesupernatant fra nye prøveuttak.....                      | 62        |
| 3.4      | Analyse av serum fra smitteforsøk.....                                   | 67        |
| <b>4</b> | <b>DISKUSJON</b>   | <b>70</b> |
| 4.1      | Metodologiske utfordringer.....  | 70        |
| 4.1.1    | Bruk av dyremodeller.....  | 70        |
| 4.1.2    | Utfordringer med lavt celle- og RNA-utbytte.....                         | 71        |
| 4.1.3    | Standarder og kvalitetskontroller ved kulebasert multipleks analyse..... | 72        |
| 4.1.4    | Primerdesign og optimalisering av qPCR.....                              | 74        |
| 4.1.5    | Beregning av relative nivåer av mRNA.....                                | 76        |
| 4.2      | Hovedfunn og betydningen av disse.....                                   | 76        |
| 4.2.1    | Potensielle biomarkører: IL-10, IL-17 og IFN- $\gamma$ .....             | 76        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2    | Samsvar mellom nivåer av mRNA og proteiner .....                         | 79        |
| 4.2.3    | Aminosyresekvens og kryssreaktivitet .....                               | 80        |
| 4.2.4    | Multipleksanalyse av serumprøver fra smitteforsøk .....                  | 81        |
| 4.3      | Videre arbeid .....  | 83        |
| <b>5</b> | <b>KONKLUSJON.....</b>   | <b>85</b> |
| <b>6</b> | <b>REFERANSELISTE.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>7</b> | <b>VEDLEGG .....</b>   | <b>94</b> |
| 7.1      | Vedlegg A: Bürker tellekammer .....                                      | 94        |
| 7.2      | Vedlegg B: Primer-stockløsning .....                                     | 95        |
| 7.3      | Vedlegg C: Sammenstilling av reads og primere mot referansesekvens ..... | 96        |
| 7.4      | Vedlegg D: Multippel sammenstilling .....                                | 98        |
| 7.5      | Vedlegg E: Smeltekurver etter qPCR for rein og storfe.....               | 100       |
| 7.6      | Vedlegg F: Signifikans PMA-I stimulering .....                           | 104       |
| 7.7      | Vedlegg G: Prøveoversikt .....   | 105       |
| 7.8      | Vedlegg H: Standardkurver for IL-8 og IL-10.....                         | 106       |
| 7.9      | Vedlegg I: Stimulering med mitogener i oppsett nr. VI.....               | 107       |
| 7.10     | Vedlegg J: Gelelektroforese .....  | 109       |
| 7.11     | Vedlegg K: mRNA fold change .....  | 110       |



Reinflokk samlet i gjerde (Foto: Ingebjørg H. Nymo)

# 1 INTRODUKSJON

## 1.1 Bakgrunn for studien

Reindrift utøves på 40 % av det norske landarealet, og representerer en svært viktig del av samiske kultur og sysselsetting i samiske lokalsamfunn (Søyland et al., 2002). Selv om norsk tamrein generelt har god helse så har tap av beiteareal, som en følge av varmere og mer ustabil klima (Røed et al., 2018) og menneskelige utbygninger (Riseth & Johansen, 2019), ført til at det blir stadig hyppigere behov for at tamrein fôres. Fôring kan være helt nødvendig for å sikre overlevelse, men det øker også smittepresset ved at dyrene blir gående tettere sammen og spiser og drikker av felles mat og vannkilder. I tillegg kan reinen bli stresset i slike situasjoner. Stress kan trigge latente infeksjoner slik at de blusser opp, og disse dyrene kan spre smitte til resten av flokken (Tryland et al., 2022).

Økt smittepress har medført et større behov for å utvikle diagnostiske verktøy slik at man kan kartlegge hvilke smittestoff som påvirker reinhelsen. Et smittestoff kan enten påvises direkte f. eks. ved polymerase kjedereaksjon (PCR), eller indirekte ved å måle antistoffer hovedsakelig i serum. Egnede materiale for påvisning av smittestoff vil variere mellom de forskjellige infeksjonene. En enklere metode for å påvise infeksjon er å detektere antistoffer i blodet. Det har derfor blitt brukt mye ressurser over flere tiår på å utvikle serologiske metoder for produksjonsdyr til overvåking og bekjempelse av smittsomme sykdommer. For rein derimot finnes det få kommersielle immunologiske metoder. Etter at man i 2015 samtykket til EU-direktiv 2010/63/EU om å begrense bruk av forsøksdyr (Regjeringen, 2015) er det blitt enda mer krevende å utvikle gode anti-rein antistoffer som tidligere ble produsert i forsøksdyr. Det er derfor ønskelig også å kunne benytte andre biologiske analyser som diagnostiske verktøy for

å kartlegge reinhelsen, samt undersøke om antistoffer produsert til bruk i tester for andre arter kan benyttes til rein.

Gjennom å kartlegge biomarkører i biologiske prøver, kan man finne ut mer om dyrets helsetilstand (Boby et al., 2017; Coussens et al., 2004; Riva et al., 2020; Smith et al., 2021). Cytokiner, en gruppe signalmolekyler som produseres av immunceller (Alberts et al., 2015) og er sentrale ved opp- og nedregulering av inflammasjon (Turner et al., 2014), kan benyttes som biomarkører (Guerra-Maupome & McGill, 2019). Cytokiner kan måles direkte i prøver, eller etter stimulering av celler med antigen. f. eks. benyttes måling av cytokiner for å kartlegge respons på vaksiner (Guerra-Maupome & McGill, 2019) og ved diagnostikk av visse sykdommer (Wood & Jones, 2001). Måling av cytokiner kan også være en støtte til en sykdomsdiagnose, selv om diagnosen ikke kan stilles basert på cytokinmålingene alene (Monastero & Pentyala, 2017).

Gode metoder for å kartlegge nivåer av cytokiner, er et trinn på veien for å øke forståelsen for hvilken effekt smittestoffer og andre ytre påvirkninger, slikt som stress, har på vertsorganismen. Til nå er det svært lite informasjon tilgjengelig om både fungerende analysemetoder og cytokinproduksjon hos rein (**Tabell 1-1**).

For rein er det i dag ingen kommersielle analysemetoder for deteksjon av cytokiner, og få studier der sanntids-polymerase kjedereaksjon (qPCR) brukes for å måle genuttrykket av cytokiner. Veterinærinstituttet (VI) gjorde i 2021 et pilotforsøk der de induserte cytokinrespons i perifere mononukleære blodceller (PBMC) fra rein og storfe. Celler ble stimulert med mitogener og cytokiner ble analysert ved bruk av en bovin kulebasert multipleks analysemetode. Dette pilotforsøket ga resultater som dannet grunnlag for å foreta de videre undersøkelsene som er foretatt i denne masteroppgaven.

Måling av et bredt spekter av immunmarkører er nødvendig for å fullt ut forstå immunresponser mot patogener som infiserer drøvtyggere. En dypere innsikt i hvilke immunveier som er aktivert under en infeksjon, kan bidra til en bedre forståelse av disse immunresponsene og utvikling av nye medisiner og vaksiner. Flere immunologiske analyser er utviklet for mennesker og dyremodeller (f. eks. mus eller rotter), mens det er et mer begrenset utvalg tilgjengelig for bruk til andre arter (Sassu et al., 2020).

**Tabell 1-1 Utvalg av tilgjengelige publikasjoner som omhandler cytokiner hos rein.** Oversikt over metoder som tidligere er benyttet for å kartlegge genuttrykk for cytokiner eller analysemetoder for deteksjon av cytokiner på proteinnivå.

| Funn   | Metode                          | Referanse                     |
|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Ekspresjonen av gener som koder for interleukinene (IL)-8 og IL-1 $\beta$ , og andre gener assosiert med immunrespons (CCL11, CD33, og IRF4), nedreguleres om våren, når reinen er i dårligst kondisjon.                   | Transkriptomanalyse             | (Weldenegodguad et al., 2021) |
| Designet primerpar for å detektere budbringer ribonukleinsyre (mRNA) som koder for interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) og referansegenet beta-2-microglobulin ( $\beta$ 2M) hos rein.  | qPCR                            | (Harrington et al., 2007)     |
| En antistoffbasert analysemetode for ulike hjortedyr (Cervigam; Prionics) kan brukes til å måle konsentrasjoner av IFN- $\gamma$ i prøver fra rein.  | Deteksjon ved bruk av antistoff | (Waters et al., 2006)         |
| Kvantifiserte $\beta$ 2M, IL-4, IFN- $\gamma$ og tumor nekrose faktor -alfa (TNF- $\alpha$ ) i stimulerte perifer mononukleære celler (PBMC) fra rein ved bruk av primere designet og validert for arter i hjortefamilien. | qPCR                            | (Harrington et al., 2006)     |

## 1.2 Rein i Norge

All rein tilhører slekten *Rangifer* og arten *tarandus*. Det er beskrevet 55 arter og underarter av rein. De mest utbredte underartene er eurasisk tundrarein (*R. t. tarandus*) (**Figur 1-1**), finsk skogsrein (*R. t. fennicus*), Svalbardrein (*R. t. platyrhynchus*), Grant's karibu (*R. t. Granti*) i Alaska, kanadisk skogskaribu (*R. t. caribou*) og Peary karibu (*R. t. pearly*) nord i Canada (Røed et al., 2018). Rein i Norge omtales med mange ulike betegnelser, slik som eurasisk tundrarein, fjellrein, semi-domestisert rein, tamrein og villrein. Disse er alle ulike navn for underarten *R. t. tarandus* (Bevanger, 2015).



**Figur 1-1** Foto av rein (*Rangifer tarandus tarandus*). (A) Noen måneder gammel kalv og (B) voksen simle (Foto: Tuva Løken Frøvoll).

Den største populasjonen av eurasisk tundrarein er i Sibir og består av rundt 750 000 dyr. Bestanden av villrein i Norge er på rundt 30 000 dyr. Disse befinner seg i fjellområdene sør i landet. Vi vet ikke nøyaktig når den norske reindriften oppsto, men den nordnorske høvdingen Ottar forteller på slutten av 800-tallet at han hadde 600 tamme rein (Bratrein, 2005). Den norske reindriften har i dag nesten utelukkende sitt opphav i den samiske befolkningen (Røed et al., 2018) og i 2021/22 var det registrert 217 809 tamrein i Norge (Skogan, 2022).



Reinen har gjennom årtusener tilpasset seg et liv på utmarksbeiter hele året, noe som innebærer god tilgang på mat på sommeren og redusert mattilgang gjennom vinteren. Dyrene vil spise seg godt opp på sommeren og lagre reservoarer i form av fett og muskler som forbrukes gjennom vinteren. Reinen vil derfor bli naturlig magrere i løpet av vinterhalvåret. Det er store topografiske og klimatiske forskjeller mellom de ulike reinbeiteområdene og derfor store variasjoner i driftsmønster. I dag er det kun i noen få områder reinen fortsatt har mulighet til å beite fritt på store avsidesliggende beiter store deler av året (Åhman et al., 2019). Utbygning av slikt som veier, turløyper, snøskuterløyper, hyttefelt, strømledninger og vindmøller gjør at arealene tilgjengelig for reindrifft stadig blir redusert (Landbruks- og matdepartementet, 2019; Riseth & Johansen, 2019).

Om vinteren kan det dannes is på bakken eller inni snøen dersom været er vekslende. Det kan også i enkelte områder komme store mengder nedbør i form av snø, slik at det blir vanskelig å nå ned gjennom den tykke snøen til det underliggende beitet. Med klimatiske endringer vil dette utgjøre et stadig økende problem, som ytterligere reduserer beitetilgangen for reindriften (Eira et al., 2018; Røed et al., 2018). De siste årene har det blitt rapportert om stadig flere krisevintre der is- og snømengder har gitt vanskelige beiteforhold (Bongo & Eira, 2022; Gjerstad, 2018). Vinteren 2021/22 ble det rapportert om den verste beitekrisen på 20 år. Hovedårsaken var da et islag som hindret reinen i å nå ned til maten (Pentha, 2022). Senarioer for klimaendringer predikerer at forekomsten av krisevintre vil øke (AMAP, 2021).

Fôring av rein i korte kriseperioder om vinteren kan bidra til å redusere tapstallene, og gjøre det lettere å planlegge driften. Det har blitt mer vanlig å fôre rein ved forflytning mellom beiter eller hvis dyrene holdes i gjerder, for eksempel i forbindelse med samling, skilling, flytting og slaktning. I perioder med dårlig mattilgang kan tilleggsfôring være nødvendig for å sikre at reinflokken overlever og at simlene får livskraftige kalver. Fôring kan også gjøre arbeidet med flokken enklere ved at reinflokken blir tammere. I tillegg er fôring også et tiltak som kan gjøres for å samle reinflokken, slik at tap til rovvilt reduseres (Åhman et al., 2019).

Ifølge Ressursregnskap for reindriftnæringen 2021-2022 er tapet av kalver opp mot 60 % i enkelte områder og rundt 10 % for voksne dyr. Rein tapes av mange årsaker, hvorav de viktigste, ifølge Ressursregnskapet, er rovdyr, sykdom, ernæringssvikt, reintyverier og trafikkulykker (Skogan, 2022).

### 1.3 Reinhelse

Norsk tamrein anses generelt å ha god helse, men vi har en noe begrenset oversikt over helsetilstanden. Undersøkelse av sykdomstilfeller og oppklaring av dødsårsak, gjøres i liten grad med unntak av undersøkelser for rovdyrskader utført av Statens naturoppsyn (SNO). VI mottar få prøver fra tamrein innsendt fra dyreeiere og privatpraktiserende veterinærer. Det mottas noen prøver fra Mattilsynet (slakteri). Som en del av et overvåkningsprogram, blir et betydelig antall tamrein årlig undersøkt for skrantesjuka. Dette er det eneste overvåkningsprogrammet for sykdom på tamrein i Norge. Obduksjoner, bakteriologi og parasittologi er stort sett de metodene som brukes til diagnostikk på rein i dag. Bruk av større screeninger eller andre metoder er i stor grad knyttet til forskningsprosjekter (Mørk et al., 2021). I årene som kommer kan den nylige opprettede Reinhelsetjenesten ([www.reinhelsetjenesten.no](http://www.reinhelsetjenesten.no)) føre til en endring av denne situasjonen.

I dag er det få kjente, alvorlige infeksjonssykdommer blant norsk rein, med unntak av den dødelige prionsykdommen skrantesjuka, Chronic Wasting Disease (CWD) som til nå kun er påvist hos villrein i Norge (Tranulis et al., 2016). Rein er også utsatt for ulike parasitter, bakterier og virus. Noen av disse mikroorganismene smitter kun rein, f. eks. cervid herpesvirus 2 (CvHV2, se **seksjon 1.3.2**). Andre agens kan smitte fra husdyr til rein, f.eks. parapoxvirus som kan smitte fra sau (*Ovis aries*) og geit (*Capra aegagrus hircus*) og pseudocowpox som kan smitte fra storfe (*Bos taurus*) (Tryland, 2012). Antall agens som kan smitte mellom husdyr og rein er ukjent. Om sommeren kan det være økt kontakt mellom husdyr og rein grunnet sambeiting, noe som medfører at rein blant annet kan eksponeres for parasitter fra sau. Noen patogener som rammer rein, slik som parapoxvirus, kan også smitte over til mennesker (zoonoser) (Tryland, 2012). Gris (*Sus scrofa domestica*) og villsvin (*S. scrofa*) anses å være hovedreservoarene for det zoonotiske Hepatitis E virus (HEV). Basert på observasjoner gjort av Sacristán et al. (2021) sirkulerer HEV blant rein og andre viltlevende klovdyr som elg (*Aces alces*) og moskus (*Ovibos moschatus*) i Norge. Etter funn av HEV-antistoffer i villrein kartla Rinaldo et al. (2021) forekomsten av HEV blant tamrein i Norge og fant antistoffer mot HEV i alle åtte flokker som ble testet.

Som en følge av klimaendringer kan parasitter som hjortelusflue, flått og rundormen *Setaria tundra* spres nordover. Disse kan spres til rein og påvirke reinens helse negativt (Wiklund et al., 2019). Flått observeres stadig oftere på rein i kystnære områder, og flåttbårne sykdommer forventes å bli en utfordring hos tamrein i nær fremtid. I Europa sprer også andre vektorbårne

virussykdommer seg nordover, og kan på sikt gi nye utfordringer for reindriften (Hætta et al., 2020; Tryland & Kutz, 2018).

Det kan oppstå helseproblemer direkte knyttet til tilleggsfôring. Dette er allerede observert i Finland og Sverige hvor tilleggsfôring og hold av rein i gjerde praktiseres i større grad enn i Norge. Sykdomsproblemer kan oppstå som følge av høyere dyretetthet, dårligere hygiene og høyere smittepress. Dyrene kan også få økt stressnivå, noe som kan gi en redusert immunrespons og gjøre dyrene sårbare for sykdomsutbrudd. Det er observert økt forekomst av sykdommer som smittsom øyebetennelse, nekrobasillose (klauvråte), pasteurellose (bakterieinfeksjon med høy dødelighet, forårsaket av bakterien *Pasteurella multocida*), tarmparasitter og munnskurv (se **seksjon 1.3.1**). Tilleggsfôring kan også gi direkte utfordringer som kommer av at reinens fordøyelsessystem ikke er godt nok tilvendt eller tilpasset fôret den får (Tryland & Kutz, 2018).

I oppgaven analyseres serumprøver fra rein som er eksperimentelt smittet med Orf-virus (ORFV) og cervid herpesvirus 2 (CvHV2). Virusene, vertsartene, smitte og sykdomsforløpet til disse to virusene er derfor nærmere beskrevet i underliggende seksjoner.

### 1.3.1 Munnskurv

Smittsom munnskurv (orf, ectyma contagiosa) forårsakes av ORFV. ORFV tilhører slekten Parapoxvirus og er i virusfamilien Poxviridae (koppevirus). Koppevirus er ovale, relativt store, og arvematerialet er dobbeltrådet DNA. Parapoxvirus skiller seg fra andre koppevirus ved at de har en unik spiralformet kappe (Bergqvist et al., 2017).

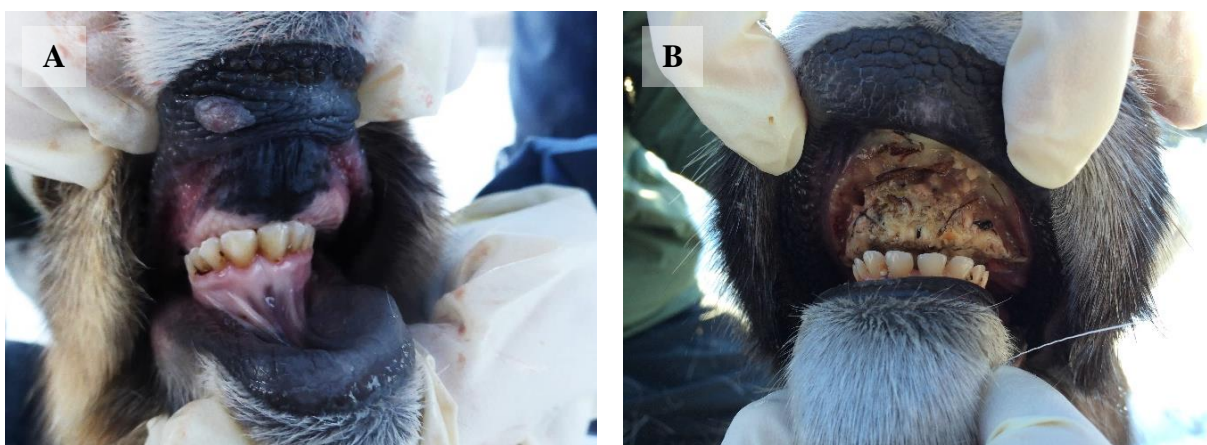
Koppevirus har cytoplasmisk livssyklus. Virusets genom koder for et stort antall proteiner som er nødvendige for å kunne produsere nye viruspartikler. Syntesen av budbringer ribonukleinsyre (mRNA) skjer uavhengig av vertens maskineri siden viruset selv har enzymer som setter i gang mRNA-syntese når den har kommet inn cellen. Viruset er likevel avhengige av å bruke vertens ribosomer for proteinsyntese. Ved at virusene slår ned cellens egenaktivitet blir alle metabolske ressurser tilgjengelig for viruset og cellen mister sin opprinnelige funksjon. ORFV resulterer i osmotisk lysering av cellen (Dimmock et al., 2015).

Det er i hovedsak småfe som sauer og geiter som er bærere av parapoxvirus, men det er også registrert at viruset krysser vertsbarrieren fra sau og geit over til andre arter slik som tamrein (Klein & Tryland, 2005), moskus (Vikøren et al., 2008), hund (*Canis lupus familiaris*), katt

(*Felis catus*), ekorn (*Sciurus vulgaris*), (Spyrou & Valiakos, 2015), dromedar (*Camelus dromedarius*) (Gitao, 1994) og tykkhornsau (*Ovis canadensis canadensis*) (Wilson & McFarlane, 2012). Parapoxvirus kan også bli overført til mennesker ved direkte eller indirekte kontakt med infiserte dyr. Symptomer hos mennesker er lesjoner på hendene, eller i mer sjeldne tilfeller andre steder på kroppen, som forsvinner av seg selv etter 6 til 8 uker (Bergqvist et al., 2017).

Forskning tyder på at munnskurvsmitte hos tamrein har sin opprinnelse sau eller geit, enten via direkte kontakt eller via miljø med f. eks. kontaminert utstyr, felles beiteområder eller dyretransporter (Tryland et al., 2013).

I Finland var det en alvorlig epidemi av smittsom munnskurv vinteren 1992/93 som resulterte i at flere hundre rein døde og siden har det vært jevnlig utbrudd. I Norge ble det i 1999 og 2000 rapportert om utbrudd av parapoxvirus i Nordland, Troms (Tryland et al., 2001) og Finnmark (Tryland et al., 2005). I sistnevnte område ble det i 2000 samlet inn kadaver av tamrein (n=48) fra vinterbeiter og kalvningsområder for to ulike flokker i Finnmark. Obduksjonen viste at 81 % av dyrene hadde dødd av avmagring. Videre analyser av lever, spyttkjertel og/eller lymfeknuter viste funn av parapoxvirus-spesifikt DNA i 13 % av dyrene. En DNA-sekvens fra en leverprøve hadde 99 % likhet med ORFV (Orf-11) opprinnelig isolert fra sau, 98-99 % likhet med ORFV tidligere isolert fra rein i Norge og Finland og 92-93 % likhet med pseudocowpoxvirus isolert fra storfe i Norge (Tryland et al., 2005).



**Figur 1-2 Munnskurv hos rein.** (A) Typiske vortelignende lesjoner. (B) Alvorlig tilfelle av munnskurv med sekundær bakterieinfeksjon (Foto: Ingebjørg H. Nymo).

Feltforsøk på rein har vist at inkubasjonstid etter inokulering av parapoxvirus i lett skåret munnslimhinne er 3-5 dager (Tryland et al., 2013). Omfanget av symptomer varierer, og symptomer hos rein er stort sett de samme som forekommer i andre arter. Det første symptomet er ofte være rødhet som senere kan utvikle seg til blomkål-aktige lesjoner (**Figur 1-2A**). Lesjoner forsvinner vanligvis etter to til fire uker. Munnskurv er vanligvis ikke letalt, men i mer alvorlige tilfeller kan det utvikles sekundære bakterielle infeksjoner (**Figur 1-2B**) eller infestasjoner med fluelarver. Slike komplikasjoner kan gi alvorlige skader i munnhulen, og kan være så vonde at det hindrer voksne individer i å spise eller lam/kalver i å die (Tryland et al., 2019). ORFV-infeksjon kan også lede til mastitt (jurbetennelse) (Spyrou & Valiakos, 2015).

Det finnes ingen behandling mot munnskurv. Det viktigste tiltaket er å isolere smittede rein frem til blemmene forsvinner for å forhindre at smitten sprer seg ytterligere til andre dyr. Sekundære bakterielle infeksjoner kan behandles med antibiotika. Gjennomgått sykdom antas gi kortvarig immunitet, slik som hos sau (Lloyd & Haig, 2004; Tryland et al., 2021)

### 1.3.2 Smittsom øyebetennelse

Smittsom øyebetennelse (infeksiøs keratokonjunktivitt, IKC), er en lidelse som blant annet er et resultat av CvHV2-infeksjon.

CvHV2 er et DNA-virus i alfaherpesvirusfamilien (da Neves et al., 2009e). Genomet til herpesvirus er dobbeltrådet, lineært, stort (130-230 kbp.) og har høy diversitet. Selv om genomet har stor diversitet er det konserverte blokker som antagelig spiller nøkkelroller i virusreproduksjonen (Dimmock et al., 2015).

IKC forårsaket av ulike virus i alfaherpesvirusfamilien har blitt dokumentert hos bla. sau, gemse (*Rupicapra rupicapra*), alpesteinbukk (*Capra ibex*), elg, rådyr (*Capreolus capreolus*) og hjort (*Cervus elaphus*). Ofte er de kliniske tilfellene forårsaket av herpesvirus i kombinasjon med en sekundær bakteriell infeksjon (Tryland et al., 2017). CvHV2 assosieres kun med smitte blant rein (Tryland et al., 2019).

Fra de samme reinkadavrene som det i år 2000 i Finnmark ble gjort funn av parapoxvirus, ble det også gjort funn av antistoffer mot alfaherpesvirus i 10 % av dyrene (Tryland et al., 2005). Viruset CvHV2 ble for første gang isolert fra rein i Norge i 2009 (Tryland et al., 2009). Data indikerer at viruset er vanlig blant rein i Norge, med 4-15 % forekomst blant kalver og 49-77

% blant voksne dyr (das Neves et al., 2009e). Viruset er også vidt utbredt blant flere ulike populasjoner av rein i Fennoskandia og i Nord-Amerika (das Neves et al., 2009d).

Herpesvirus, inkludert CvHV2, gir en livslang latent infeksjon. CvHV2 blitt funnet i *Ganglion trigeminale* hos rein (das Neves et al., 2009c), og når reinen utsettes for stress, slik som ved f. eks. ved innsamling i gjerde, sult eller transport kan infeksjonen blusse opp. Når viruset er reaktivert kan infiserte dyr smitte andre rein, ofte kalver og ungdyr, som ikke har immunitet mot viruset (Tryland et al., 2019). Smitte av CvHV2 kan også spre seg til fosteret i livmoren (das Neves et al., 2009b). Rein inokulert eksperimentelt med CvHV2 har hatt målbare nivåer av nøytraliserende antistoffer 7-10 dager etter infeksjon (das Neves et al., 2009a).

Ofte rammer IKC kun noen få rein, gir mild infeksjon av øyeslimhinnen og milde symptomer som økt tåreproduksjon (**Figur 1-4A**). IKC kan også opptre i en mer alvorlig form, som kan ramme store deler av en flokk. Symptomer kan da inkludere puss og ødemer rundt øynene og i hornhinnen (**Figur 1-4B**). Det kan da også oppstå sår på hornhinnen. Tilstanden kan gå så langt at øyeeplet kollapser og ødeleggelsen av øyet resulterer i permanent blindhet (Romano, 2018).



**Figur 1-3 Ulike stadier av øyebetennelse hos rein.** (A) Tidlig stadium av øyebetennelse hvor hornhinnen blakkes. Dyret har også puss i øyekroken og er fuktig under øyet (Foto: Javier Sanchez Romano). (B) Senere stadium av øyebetennelse med sekundær bakterieinfeksjon og hevelser i og rundt øyet (Foto: Morten Tryland).

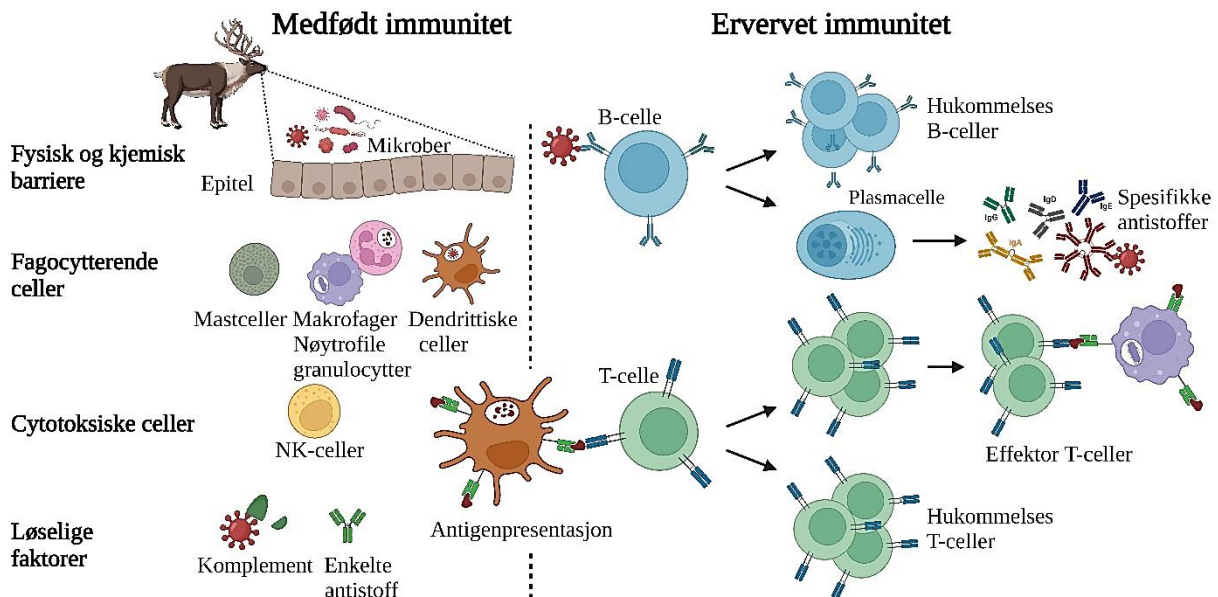
Sår i slimhinnene forårsaket av CvHV2 kan gi grunnlag for sekundære bakterielle infeksjoner. F. eks. kan bakterien *Fusobacterium necrophorum*, som kan gi sykdommen nekrobasillose, etablere seg i slike sår og gi alvorlige betennelsesprosesser, noe som forverrer både symptomer og prognose (Tryland, 2014)

Rens og vask av øynene til smittede dyr er viktig og kan også være tilstrekkelig behandling. Ved sekundære bakterielle infeksjoner kan behandling med antibiotika være nødvendig (Fulton, 2009). Det er praktisk krevende å behandle et stort antall rein mot IKC i felt. Syke dyr kan skille ut store mengder virus som kan smitte andre dyr. Ved utbrudd av IKC bør derfor syke dyr isoleres (I.H. Nymo, personlig kommunikasjon, 12.oktober 2022).

## 1.4 Immunforsvaret

En av immunforsvarets viktigste oppgaver er å oppdage og uskadeliggjøre mikroorganismer som forårsaker sykdom. Det er derfor kritisk for alle dyr å ha et fungerende immunsystem, og kroppen investerer mye i å produsere og aktivere celler og en rekke løselige molekyler som sammen danner immunforsvaret og deltar i bekjempelsen av fremmede mikroorganismer (Parham, 2021). Betegnelsen patogen omfatter mikroorganismene som forårsaker sykdom. Mikroorganismer som vanligvis er harmløse, men som kan gi sykdom når immunforsvaret er svekket eller i ubalanse, kalles opportunistiske patogener (Parham, 2021).

**Figur 1-4** viser en oversikt over komponenter og mekanismer som er en del av immunforsvaret. Immunitet kan grovt deles inn i to kategorier, den medfødte immuniteten og den ervervede immuniteten (Alberts et al., 2015). Den medfødte immuniteten kan respondere umiddelbart på en infeksjon eller en vevskade, mens den adaptive immuniteten behøver tid før en respons utvikles (Abbas et al., 2019). I seksjonene som følger vil mekanismene i det medfødte og ervervede forsvaret bli presentert hver for seg. Til slutt presenteres cytokiner og deres virkemåter.



**Figur 1-4. Mekanismer og komponenter som er en del av den medfødte og den ervervede immuniteten.** Medfødt immunitet omfatter blant annet fysiske og kjemiske barrierer (f. eks. epitelceller i hud og slimhinner) som beskytter mot infeksjoner. Andre mekanismer i det medfødte immunforsvaret utføres av fagocytterende celler slik som makrofager, nøytrofile og dendritiske celler, cytotoksiske celler slik som naturlige drepeceller (NK-celler) og løselige faktorer slik som akutfaseproteiner og proteiner relatert til komplementsystemet. Ervervet immunitet utføres av lymfocytter og deres produkter. Lymfocytterne kategoriseres som B- eller T-lymfocytter (B- eller T-celler). B-celler kan differensiere til hukommelsesceller eller plasmaceller, mens T-celler kan differensiere til hukommelsesceller og effektorceller. Illustrasjonen er modifisert fra Abbas et al. (2019) i BioRender.com.

### 1.4.1 Medfødt immunitet

Hud og slimhinner dekker hele kroppens overflate og fungerer som en mekanisk barriere ved at de er vanskelige å trenge gjennom for mikroorganismer. Dersom huden blir utsatt for skade, slik som f. eks. skrubbsår, stikk eller bitt, eksponeres det sensitive vevet under huden, noe som kan lede til at det oppstår infeksjon. Slimhinnene, som dekker overflaten av respirasjonssystemet, fordøyelsessystemet og urogenitalene, består kun av et enkelt epitelcellelag og er delvis permeable, og derfor er disse områdene utsatt for infeksjon (Parham, 2021). Epitelceller og andre spesialiserte celler i hud og slimhinner produserer og skiller ut kjemiske forbindelser, som forhindrer bakterievekst og danner en beskyttende kjemisk barriere. Disse forbindelsene kan være antimikrobielle peptider som dreper bakterier, sopp og kappekledd virus ved at membranene angripes. Et annet eksempel på en kjemisk beskyttelsesmekanisme er tårer og spytt som inneholder lysozymer, som er enzymer som dreper bakterier ved at celleveggen degraderes (Parham, 2021). Komplementsystemet er involvert i både medfødt og ervervet immunitet. Det består av løselige proteiner som finnes i plasma og ekstracellulære væsker. Disse proteinene binder til overflaten av ekstracellulære patogener og kan enten drepe patogenet direkte eller fasilitere at de blir slukt og destruert av fagocytter. Enkelte komplementproteiner virker også kjemotaktisk (Rus et al., 2005).

Cellene som bidrar til den medfødte immuniteten er monocytter, granulocytter og naturlige dreperceller (NK-celler) i blod, og makrofager, dendrittiske celler (DCer), og mastceller i vev (Lea, 2006). Immuncellene i blodet kan rekrutteres til vev ved en betennelse (Abbas et al., 2019). Et fellestrekk for cellene i den medfødte immuniteten som gjenkjenner patogener, er at de har reseptormolekyler på overflaten som kalles mønstergjenkjennende reseptorer (PRR). PRRer gjenkjenner strukturer som er felles og deles av flere ulike mikroorganismer, som kalles patogen-assosierte molekyllære mønstre (PAMP) (Abbas et al., 2019). Til sammenligning har celler som er en del av den adaptive immuniteten reseptorer mot strukturer som er unike og karakteristiske for hver enkelt bakterie eller virus (Lea, 2006).

Makrofager aktiveres av mikrobielle produkter slik som endotoksiner og cytokiner slik som interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Aktiverte makrofager sluker og bryter ned mikroorganismer, produserer proinflammatoriske cytokiner og presenterer antigener for hjelpe T-celler (Abbas et al., 2019). Nylige funn tyder på at selvfornyelse bidrar til å opprettholde mengden makrofager i vevet. I tillegg har monocytter evnen til å bevege seg ut av blodbanen og inn i vevet hvor de kan utvikle seg til makrofager (Ginhoux & Jung, 2014; Röszer, 2018).

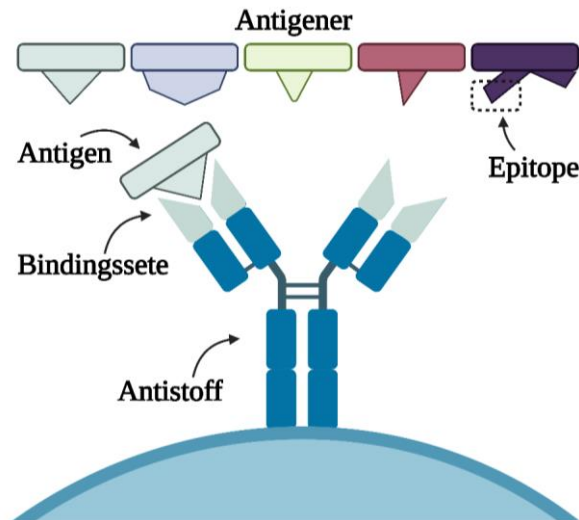


Granulene til eosinofile og basofile inneholder løselige mediatorer, slik som cytokiner, som bidrar til å aktivere immunreaksjoner. De nøytrofile granulocytterne spiller en viktig rolle ved inflammasjon, både for å fjerne patogener og for immunreglering. Som en respons på kjemoattraktanter beveger de seg fra blod til vev, og nøytrofile responderer f. eks. på interleukin (IL)-8 (Geering et al., 2013). Eosinofile er sirkulerende granulocytter som er involvert i bekjempelse av parasitter og bidrar til allergiske reaksjoner (Wen & Rothenberg, 2016).

Mastceller finnes særlig i hud og slimhinner (Krystel-Whittemore et al., 2015) og kan aktiveres via produkter fra mikrober som binder til PRR eller av komponenter i komplementsystemet under den medfødte immunresponsen. Mastceller kan også blant annet produsere proteolytiske enzymer som kan drepe bakterier, og cytokinet tumor nekrose faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) som bidrar til betennelse (Abbas et al., 2019; Krystel-Whittemore et al., 2015).

NK-celler gjenkjenner og dreper stressede celler ved å få dem til å gjennomgå apoptose. Aktivering av NK-celler avhenger av at det er rett balanse mellom binding til aktiverende og inhiberende reseptorer. Det er flere grunner til at en celle kan bli stresset og endre mønsteret av reseptorer. Det kan f. eks. være på grunn av en virus-/bakterieinfeksjon eller DNA-skade. I tillegg til å få celler til å gjennomgå apoptose, utskiller NK-celler ut IFN- $\gamma$  som aktiverer makrofager til å bli mer effektive til å drepe fagocytterte mikroorganismer (Abbas et al., 2019).

Makrofager, DCer og B-celler er antigenpresenterende celler (APCer) som er spesialisert til å presentere prosesserte antigener til T-celler, og initierer på den måten T-celleresponsen (Mann & Li, 2014). APCer fagocytterer og bryter ned mikroorganismer til peptider og presenterer en bit av den fremmede mikroorganismen på vevsforlikelighetsgenkomplekser (MHCer). Dette er nødvendig for at T-cellene, skal gjenkjenne og reagere på fremmed materiale. T-cellene registrerer peptidet presentert på MHCer via sine T-cellerreseptor (TCR) (Abbas et al., 2019). Et antigen defineres som et molekyl med epitop(er) som kan binde til antistoff eller en TCR. Antigener som binder til antistoff inkluderer alle typer molekyler, mens de fleste TCRer binder kun til peptidfragmenter presentert på MHC (Abbas et al., 2019; Lea, 2006). Den delen av et antigen som et antistoff-bindingssete binder til, kalles en epitope. **Figur 1-5** viser et B-cellerreseptor som binder til en epitope på et antigen via sitt bindingssete. Et makromolekyl har flere ulike epitoper som ulike antistoffer kan binde til (Parham, 2021).



**Figur 1-5 Antigen som binder til reseptor på B-celle via bindingssete.** B-cellereseptoren har bindingsseter som kan gjenkjenne og binde til en spesifikk epitope på et antigen. Figuren er laget i BioRender.com.

## 1.4.2 Ervervet immunitet

Det ervervede immunforsvaret aktiveres når det medfødte immunforsvaret ikke klarer å stoppe patogener, og aktiveres av signaler fra det medfødte immunforsvaret. En sentral forskjell mellom den medfødte og den ervervede immuniteten er at den sistnevnte er spesifikk og har evnen til hukommelse. T- og B-celler, i tillegg til deres produkter, står for den ervervede immunresponsen (Abbas et al., 2019).

En av de viktigste egenskapene ved den ervervede immunresponsen er muligheten til å skille mellom kroppens egne strukturer («selv») og fremmede strukturer («ikke-selv») (Gonzalez et al., 2011). Hver enkelt lymfocytt har reseptorer med unike bindingsseter som gjør at de kun kan identifisere en bestemt struktur (en epitope) på en fremmed organisme (Abbas et al., 2019). I kroppen er det billioner av lymfocytter med hvert sitt unike sett av reseptorer som venter på å binde seg til et antigen på et patogen, slik at flest mulig ulike patogene strukturer kan bli gjenkjent. Ved førstegangseksposering for et patogen vil lymfocytene som har spesifikke reseptorer som binder til patogenet proliferere og differensieres slik at det dannes mange identiske patogenspesifikke lymfocytter (kloner) (Parham, 2021). Lymfocytter differensieres til både effektorceller og hukommelsesceller. Effektorcellene slår ned infeksjonen, mens hukommelsesceller sørger for at immunresponsen utvikles raskt og kan bli sterkere, ved neste eksponering av samme mikroorganisme (Lea, 2006). Denne opptreningen av immunforsvaret bidrar til at verten utvikler immunitet (Downs & Stewart, 2014).

T-celler er avhengige av å få patogene antigener presentert på MHC-molekyler for sine TCR, da de ikke selv kan registrere fritt antigen (Lea, 2006). For at T-cellene skal bli aktivert, kreves i tillegg kostimulering ved at visse molekyler på APC gjenkjennes av reseptorer på T-celler, samt stimulering fra cytokiner. T-celler kan deles inn i  $CD8^+$  cytotoksiske T-celler og  $CD4^+$  T-hjelpeceller.  $CD4$  og  $CD8$  er koreseptorer som sammen med TCR gjenkjenner komplekser med antigen på MHC-molekyler. MHC klasse I, som uttrykkes på somatiske celler (Abbas et al., 2019), presenterer antigen for  $CD8^+$  T-celler, mens MHC klasse II, som uttrykkes på APCer presenterer for  $CD4^+$  T-celler (Downs & Stewart, 2014).

At en  $CD8^+$  T-celle er cytotoksisk, vil si at cellens effektorfunksjon er å gjenkjenne og drepe vertsceller som er infisert med virus eller andre intracellulære mikrober, eller kreftceller.  $CD8^+$  T-celler forhindrer spredning av mikrober ved at de får infiserte celler til å gå i apoptose (Abbas et al., 2019). Induksjon av apoptose omfatter proteinene perforin og Granzym B, eller binding av Fas-ligand til Fas på den infiserte cellen. (Bogen & Munthe, 2007). I tillegg til at  $CD8^+$  T-celler har cytotoksisk aktivitet, produserer de  $IFN-\gamma$ , som blant annet er ansvarlig for aktivering av makrofager (Abbas et al., 2019).

At en  $CD8^+$  T-celle er cytotoksisk, vil si at cellens effektorfunksjon er å gjenkjenne og drepe vertsceller som er infisert med virus eller andre intracellulære mikrober, eller kreftceller.  $CD8^+$  T-celler forhindrer spredning av mikrober ved at de får infiserte celler til å gå i apoptose (Abbas et al., 2019). Induksjon av apoptose omfatter proteinene perforin og Granzym B eller binding av Fas-ligand til Fas på den infiserte cellen. Ved at Fas-ligand binder til Fas på målceller, aktiveres målcellens selvmordsapparat, noe som leder til apoptose (Bogen & Munthe, 2007). I tillegg til at  $CD8^+$  T-celler har cytotoksisk aktivitet, produserer de  $IFN-\gamma$ , et cytokin som blant annet er ansvarlig for aktivering av makrofager (Abbas et al., 2019).

$CD4^+$  T-celler kan differensiere til hjelpeceller med ulik funksjon, blant annet T-hjelpecelle 1 (Th1), 2 (Th2) og 17 (Th17), samt regulatoriske T-celler (Treg), ettersom hvilke cytokiner de eksponeres for (Sun & Zhang, 2014). Th1-celler responderer mot intracellulære patogener, mens Th2-celler er viktige for bekjempelse av helminter. Th1-celler produserer  $IFN-\gamma$ , mens Th2-celler produserer blant annet IL-4 (Zhang et al., 2014). Treg regulerer immunresponsen ved at de hemmer effektorfunksjonen til Th1- og Th2-celler (Bogen & Munthe, 2007). Th17-celler som produserer IL-17 er spesielt tilpasset beskyttelse mot ekstracellulære bakterier og sopp (Cunha et al., 2019) og er av betydning ved utvikling av autoimmunitet (Sun & Zhang, 2014).

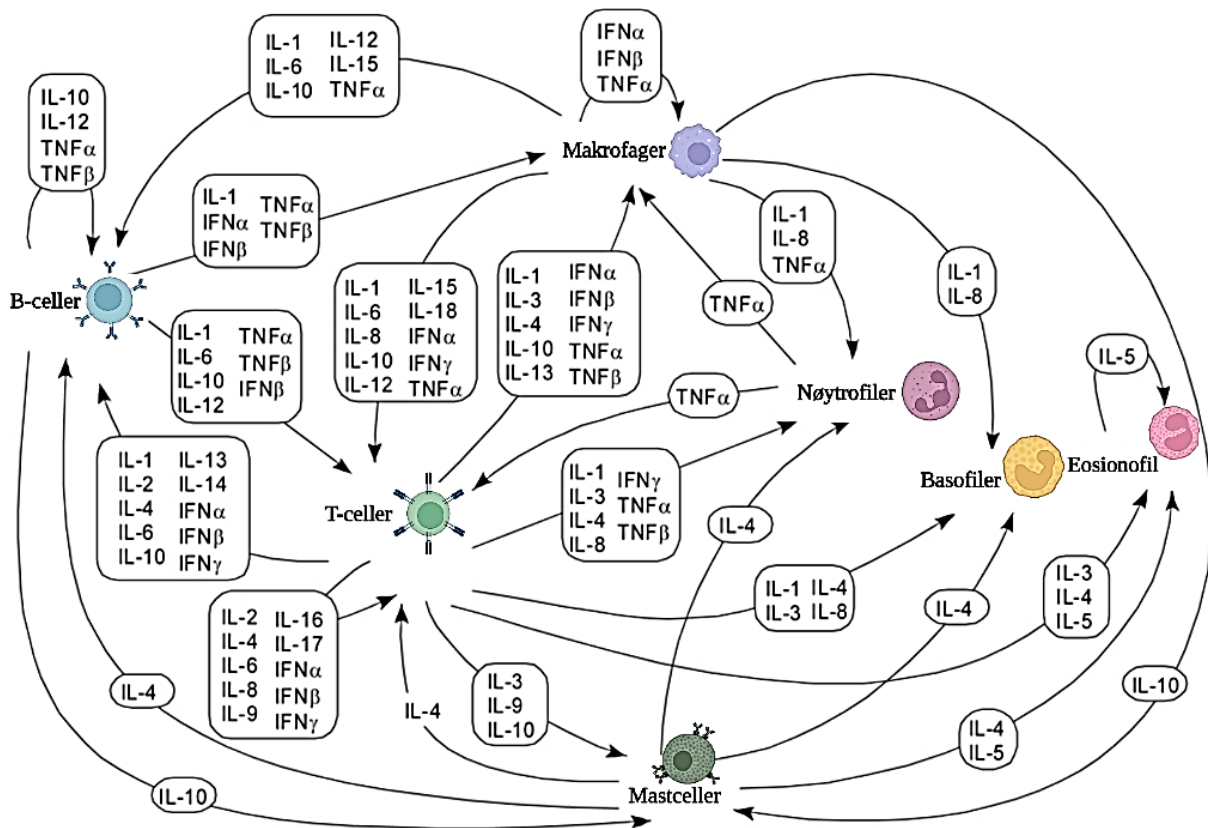
Gamma delta T-celler ( $\gamma\delta$  T-celler) representerer en mindre prosentdel av de perifere lymfocytene hos de fleste dyr, men hos storfekalver kan de utgjøre opp til 60 % av de sirkulerende T-cellene. Trolig er  $\gamma\delta$  T-celler kritiske for immunitet hos storfe, men det er også mulig de er sentrale for immuniteten hos andre arter. I tillegg har  $\gamma\delta$  T-celler både egenskaper fra medfødt immunitet, ved at de kan gjenkjenne PAMP'er, og ervervet immunitet, ved at de kan gjenkjenne antigen via TCR (Guzman et al., 2012).

Humoral immunitet er den delen av immunresponsen som omfatter spesifikke antistoffer produsert av B-celler. B-celler med overflatereseptorer som binder godt til patogene strukturer, differensieres videre til plasmaceller som er i stand til å produsere og skille ut antistoffer. En B-cellerespons er avhengig av hjelp fra T-celler. Antistoffene fungerer som løselige faktorer under immunresponsen, ved at de binder til ekstracellulære patogener med gjenkjennbart antigen (Downs & Stewart, 2014). Det finnes ulike klasser antistoffer/immunoglobuliner (Ig); IgG, IgM, IgA, IgD og IgE, som til dels har ulike effektorfunksjoner. Antistoffer ødelegger ikke mikroorganismene, men kan blokkere og nøytralisere disse, ved å f. eks. hindre tilhefting til vertens celler (Megha & Mohanan, 2021). Ved opsonisering dekkes bakterieoverflaten med komplementproteiner eller spesifikke antistoffer, som bidrar til at fagocytter kan gjenkjenne og fagocyttere bakterien (Lewis et al., 2022).

### 1.4.3 Cytokiner

Hver celle registrerer det intracellulære og ekstracellulære miljøet som omgir den, prosesserer informasjonen og responderer om nødvendig. En effektiv immunrespons krever god kommunikasjon mellom celler. Denne kommunikasjonen utføres av signalmolekyler slik som proteiner, peptider, fettsyrer, steroider og gasser (Heldin et al., 2016). Signalmolekyler binder til hver sine spesifikke reseptorer på målcellene, og initierer en eller flere signalveier eller systemer inne i cellen. Cellens metabolisme, genekspresjon, form og bevegelse kan f. eks. endres som en respons på at signalmolekyler binder til cellen (Alberts et al., 2015).

Cytokiner er en stor familie av små proteiner, glykoproteiner og peptider som blir produsert og sekretert av en rekke immun- og somatiske celler. Cytokiner er sentrale for celledifferensiering, retningsbestemt bevegelse (kjemokiner) og kommunikasjonen mellom celler ved initiering, opprettholdelse og nedregulering av en immunrespons (Alberts et al., 2015). **Figur 2-7** viser en oversikt over utvalgte cytokiner, kjemokiner og celler som er en del av immunforsvaret. Figuren illustrerer hvor komplekst samspillet mellom cytokiner og ulike immunceller er.



**Figur 1-6 Cytokinnettverk.** Oversikt over interaksjoner mellom utvalgte cytokiner/kjemokiner og celler som er en del av immunforsvaret. Figuren er hentet fra Zhang og An (2007) og modifisert i BioRender.com.

Cytokiner kan virke på samme celle som produserte den (autokrint), eller på nærliggende celler (parakrint). Det er sjelden cytokiner virker på fjerntliggende celler (endokrint). Flere forskjellige cytokiner har ofte overlappende effekter, og påvirker hverandres aktivitet. De kan også påvirke produksjonen av andre cytokiner og regulere nivåer av målcellenes membranreseptorer (Lea, 2006). En type cytokin kan ha ulik effekt på ulike målceller (virke pleiotropisk), flere ulike cytokiner kan gi samme effekt på en type målcelle (virke synergisk) eller så kan et cytokin ha motvirkende effekt på et annet cytokin (virke antagonistisk) (Alberts et al., 2015).

Cytokiner kan deles inn og grupperes etter funksjon: interferoner (bla. IFN- $\gamma$ ), interleukiner (IL-1 til IL-28), tumor nekrose faktor-familien (bla. TNF- $\alpha$ ) og kolonistimulerende faktorer som regulerer hematopoiese (Lea, 2006). Cytokinene kan også grupperes i proteinfamilier basert på karakteristiske strukturelle likhetstrekk, slik som antall og rekkefølge på  $\alpha$ -helixer og  $\beta$ -strukturer (Heldin et al., 2016).

I tillegg finnes kjemokiner som er spesielt viktige for styring av immuncellenes vandring i kroppen. Mange av disse har også andre funksjoner slik om å aktivere lymfocytter til proliferasjon, og bidra til økte effektorfunksjoner. Kjemokiner produseres av en rekke forskjellige celletyper som makrofager, endotelceller, epitelceller, fibroblaster og celler i glatt muskulatur og bindevev ved ulike betennelses- og infeksjonstilstander (Lea, 2006).

Inflammasjon initieres av makrofager, DCer, mastceller og andre celler i vevet som produserer cytokiner og andre mediatorer, som en respons på mikrobielle produkter eller ødelagt vev. Noen mediatorer (slik som f. eks. histamin) øker blodårenes permeabilitet slik at plasmaproteiner (f. eks. komplementproteiner) lekker inn i vevet, mens andre (IL-1 og TNF- $\alpha$ ) blant annet øker ekspresjonen av kjemokiner som fører til at leukocytter beveger seg fra blodet og over i vevet og til infeksjonsstedet. I vevet dreper leukocytene mikrober, fjerner ødelagte celler (Abbas et al., 2019).

**Tabell 1-2** viser oversikt over utvalgt cytokiner som er inkludert i analyser i denne oppgaven. Det er beskrevet hva som er de ulike cytokinenes hovedkilde, cellulære mål og hvilken biologisk effekt de har.

**Tabell 1-2 Oversikt over et utvalg av cytokiner.** Tabellen inkluderer deres hovedkilde og cellulære mål, samt viktige biologiske effekter. Tabellen er basert på Abbas et al. (2019), Norian et al. (2015), Parham (2021) og Geering et al. (2013).

| <b>Cytokin</b>   | <b>Hovedkilde</b>  | <b>Cellulære mål og biologisk effekt</b>  |
|--|--|---|
| <b>Interleukin-6 (IL-6)</b>                                | Makrofager, endotelceller og T-celler                                | Lever: syntese av akutfaseproteiner<br>B-celler: proliferering av antistoffproduserende plasmaceller<br>T-celler: differensiering av Th17-celler  |
| <b>Interleukin-8 (IL-8)</b>                                | Makrofager, somatiske celler   | Kjemoattraktant for nøytrofile og T-celler  |
| <b>Interleukin-10 (IL-10)</b>                              | Makrofager, fibroblaster, endotelceller, Th-celler, Treg og B-celler | Makrofager og dendrittiske celler: hemmer produksjon av IL-12 og presentasjon via MHC klasse II   |
| <b>Interleukin-17 (IL-17)</b>                              | CD4 <sup>+</sup> T-celler (Th17)                                     | Epitelceller, makrofager og andre celletyper: økt kjemokin- og cytokinproduksjon som rekrutterer nøytrofile granulocytter   |
| <b>Tumor nekrose faktor-alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b> | Makrofager, NK-celler, T-celler                                      | Endotelceller: aktivering av inflammasjon og koagulasjon<br>Nøytrofile: aktivering<br>Hypotalamus: feber<br>Muskler og fett: kakeksi (avmagring, kraftløshet, sterkt nedsett allmenntilstand og liknende)   |
| <b>Interferon-gamma (IFN-<math>\gamma</math>)</b>          | T-celler (Th1 og CD8 <sup>+</sup> T-celler) og NK-celler             | Makrofager: aktivering og økt evne til å drepe patogener<br>B-celler: isotype switching med produksjon av antistoffer som merker patogener for fagocytose eller for komplementsystemet, T-celler: Th1 differensiering<br>Somatiske celler: Induserer økt prosessering og presentasjon via MHC klasse I for T-celler<br>APC: Induserer økt prosessering og presentasjon via MHC klasse II for T-celler |

Cytokiner påvirker både opp- og nedregulering av medfødte og ervervede immunresponser. De kan klassifiseres som pro- eller antiinflammatoriske, avhengig av om de er involvert i opp- eller nedregulering av en immunrespons (Zhang & An, 2007).

### *Proinflammatoriske cytokiner*

Cytokiner som er involvert i oppregulering av inflammatoriske reaksjoner kalles proinflammatoriske cytokiner. Noen av de viktigste proinflammatoriske cytokinene er TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , ulike kjemokiner og en rekke interleukiner slik som IL-1, IL-6, IL-12, IL-17 og IL-18 (Abbas et al., 2019; Alberts et al., 2015).

IL-6 produseres av en rekke celletyper, men i hovedsak makrofager (Zhang & An, 2007), fibroblaster, endotelceller, T- og B-celler. IL-6 kan virke pleiotropisk og fungerer både pro- og antiinflammatorisk. IL-6 bidrar til å sette i gang feber og andre fysiologiske prosesser som er en del av akutfaseresponsen (Norian et al., 2015). Det er en korrelasjon mellom IL-6 og IL-17. Høyt nivå av IL-6 initierer til differensiering av Th17-celler (Downs & Stewart, 2014). I tillegg stimulerer IL-6 til proliferering av antistoffproduserende plasmaceller (Abbas et al., 2019).

IL-17 produseres av Th17-celler og bidrar til frigjøring av andre cytokiner og kjemokiner, som fører til rekruttering av nøytrofile (Norian et al., 2015).

Hovedkildene til IFN- $\gamma$  er Th1, CD8<sup>+</sup> T-celler og NK-celler. Dette cytokinet har flere egenskaper, blant annet aktivering av makrofager under både den medfødte og ervervede immuniteten. Aktiverte makrofager får økt evne til å drepe fagocytterte patogener (Parham, 2021). I tillegg bidrar IFN- $\gamma$  til at B-celler produserer bestemte antistoffklasser, differensiering av Th1-celler, og at somatiske celler og APCer presenterer antigener på MHC klasse I og II (Abbas et al., 2019).

TNF- $\alpha$  er et cytokin som finnes både transmembrant og i løst form (Horiuchi et al., 2010). Hovedkilden til TNF- $\alpha$  er makrofager, NK-celler og T-celler. Dette cytokinet har pleiotropisk effekt på ulike celletyper, og bidrar blant annet til aktivering av endotelceller (celledød, induksjon av koagulering og produksjon av pro-inflammatoriske cytokiner), aktivering av nøytrofile (Horiuchi et al., 2010) og gir hypotalamus beskjed om å initiere feber (Abbas et al., 2019).



IL-8 fungerer blant annet som en kjemoattraktant som får nøytrofile granulocytter og T-celler til å migrere fra blodet og til vev (Abbas et al., 2019; Geering et al., 2013). IL-8 har også vist seg å spille en viktig rolle ved tumorvekst, angiogenese og metastase (Li et al., 2003).

### *Antiinflammatoriske cytokiner*

Cytokiner som øker i antall mot slutten av en infeksjon, altså når kroppen forteller immunforsvaret at det er på tide å nedregulere inflammasjonen, har antiinflammatoriske egenskaper (Smith et al., 2021).

IL-10 er et antiinflammatorisk cytokin som blant annet produseres av makrofager, fibroblaster, endotelceller, T-celler (Th-celler og Treg) og B-celler (Abbas et al., 2019). IL-10 er viktig for å nedregulere inflammasjon, slik at vevskade forhindres (Iyer & Cheng, 2012). Makrofager og DCer virker å være hovedmålcellene for IL-10 (Abbas et al., 2019), og IL-10 hemmer blant annet antigenpresentasjon via MHC klasse II.

Andre inflammatoriske cytokiner er blant annet IL-4, IL-11 og IL-13 og det veksthemmende stoffet transformerende vekstfaktor-beta (TGF- $\beta$ ) (Elenkov & Chrousos, 2002; Zhang & An, 2007). Disse vil ikke bli omtalt nærmere siden de ikke analyseres for i denne oppgaven.

## **1.5 Bruk av immunologiske metoder på tvers av arter**

Bruk av immunologiske tester på tvers av arter er mulig når proteinet som skal gjenkjennes er tilstrekkelig konserverv mellom artene (Dorneles et al., 2015). Bruk av immunologiske tester er mulig når proteinet som skal gjenkjennes er tilstrekkelig konserverv mellom artene (Dorneles et al., 2015). Analysemetoder og prosedyrer tilpasset storfe er tidligere benyttet på rein (das Neves et al., 2009d; Orro et al., 2004; Romano et al., 2018). Orro et al. (2004) benyttet en kommersiell enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) tilpasset storfe for å måle et akutfaseprotein (serum amyloid-A) i serum fra rein. das Neves et al. (2009d) fant at tre kommersielle bovine ELISAer tilpasset deteksjon av antistoffer mot Bovint herpesvirus 1 (BoHV1) kunne brukes til å detektere antistoffer mot CvHV2 i serumprøver fra rein. Et av disse kittene ble senere brukt av Romano et al. (2018) for å måle spesifikke antistoffer mot CvHV2 i prøver fra rein. Bovine ELISAer har også vist seg å fungere for kvantifisering av IFN- $\gamma$  i hjort (*Cervus elaphus*) (Risalde et al., 2017).

Kommersielle, kulebaserte, multiplekse analysemetoder beregnet til storfe, er tidligere brukt på arter beslektet med storfe, f. eks. sau (Naylor et al., 2021), geit (Ortega et al., 2022) og afrikansk bøffel (*Syncerus caffer*) (Smith et al., 2021). I studien på bøffel var det målbare konsentrasjoner av femten ulike cytokiner i plasma, målt med MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. For geit ble det detektert 12 av 15 cytokiner i serumprøver med samme kit. Samme multipleks analysemetode for storfe ble også benyttet av Naylor et al. (2021) for å måle cytokiner i serum fra lam. Der fant de økte nivå av flere cytokiner etter LPS-injeksjon.

Det er tidligere gjort forsøk på å måle IL-4, IFN- $\gamma$  og TNF- $\alpha$  i supernatant fra rein med ulike Bovine Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher), men dette har ikke vist gode resultater (I.H. Nymo, personlig kommunikasjon, 12. oktober 2022). Selv om bruk av kommersielle analysemetoder har vist seg å være funksjonelle på tvers av arter, er det enda ikke etablert gode metoder for analyse av cytokiner hos rein.

### 1.6 *In vitro* testsystem for induksjon av cytokinrespons

PBMC utgjør hovedandelen av cellene i immunforsvaret. Den cellepopulasjonen som suges av ved tetthetsentrifugering for isolering av PBMC, består av ~70 % T-celler, 5-10 % B-celler, ~15 % monocytter, 10-15 % NK-celler og 0,5-1 % DCer (Lea, 2006).

Mononukleære blodceller er hvilende celler som i utgangspunktet ikke vokser og deler seg (Lea, 2006). For at T- og B-celler skal vokse og utvikle seg til effektorceller, må de stimuleres av en aktivatorsubstans. En slik aktivator kan være forskjellige antigenpreparater, eller det kan være såkalte polyklonale aktivatorsubstanser. Polyklonale aktivatorsubstanser (mitogener) er forbindelser som setter i gang mitose (Lea, 2006). Stimulering av PBMC med mitogener fungerer som et *in vitro* testsystem for å indusere cytokinrespons. Responsen PBMC får av ulike *in vitro* stimuli kan gi innsikt i deres rolle under sykdom, og kunnskapen fra slike forsøk kan bidra til å forstå sykdom og utvikling av behandlingsmetoder (Darwich et al., 2003; Hue et al., 2017). Forbindelser av plante- eller mikrobiell opprinnelse kan brukes for å teste cellers immunrespons (Alberts et al., 2015). En type protein fra planter, lektiner, er ofte gode mitogener. Lektinene pokeweed mitogen (PWM), phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (ConA) brukes ofte i immunologiske undersøkelser, og induserer celledeling av både T- og B-celler. PHA regnes som et mitogen som aktiverer mesteparten av T-cellene, mens ConA ser ut til å stimulere et smalere spekter av T-celler (Lea, 2006). PWM, et lektin isolert fra *Phytolacca*

*americana*, brukes ofte for å trigge B-celler til proliferering og sekresjon av immunoglobuliner (Bekeredjian-Ding et al., 2012). Bakterielle endotoksiner, slik som lipopolysakkarider (LPS) som er en viktig bestanddel i celleveggen til Gram-negative bakterier, anses være kilden til en rekke reaksjoner under en bakteriell infeksjon (Abbas et al., 2019; Orro et al., 2004). Mikroorganismer kan også frigi ulike toxiner. Toxinet staphylococcal enterotoxin B (SEB), som naturlig produseres av *Staphylococcus aureus*, kan utnyttes som mitogen ved at de binder til T-cellereseptoren og former et kompleks som trigger cytokinproduksjon og T-celle proliferering (Cook et al., 2007).

En av de mest vanlige *in vitro* stimuleringsmetodene aktiverer protein kinase C direkte ved bruk av phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) sammen med ionomycin (I). Kombinert stimulering med disse (PMA-I) kan føre til T-celleaktivering og produksjon av en rekke cytokiner, som IL-2, IFN- $\gamma$  og TNF- $\alpha$  (Ai et al., 2013; Foote et al., 2020).

Måling av et bredt spekter av immunmarkører er nødvendig for å fullt ut forstå immunresponser mot patogener som infiserer drøvtyggere. En dypene innsikt i hvilke immunveier som er aktivert under en infeksjon, kan bidra til en bedre forståelse av disse immunresponsene og utvikling av nye medisiner og vaksiner. Flere immunologiske analyser er utviklet for mennesker og dyremodeller (f. eks. mus eller rotter), men mer kunnskap er nødvendig for overføring av denne kunnskapen til andre arter (Sassu et al., 2020).

## 1.7 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Tradisjonell diagnostikk av mikroorganismer inkluderer blant annet mikroskopi, dyrking i kultur og serologi. Det er flere begrensninger ved disse, blant annet knyttet til lav sensitivitet, mikroorganismer som er saktevoksende eller ikke er mulig å dyrke i kultur, kryss-reaksjoner og bakgrunnsstøy (Mackay, 2004). I mange år har PCR vært en godt etablert metode, og et verdifullt alternativ til tradisjonelle deteksjonsmetoder ved mikrobiell diagnostikk. Hastighet, lav nedre deteksjonsgrense, selektivitet, spesifisitet, sensitivitet og potensial for automatisering er blant de viktigste fordelene (Malorny et al., 2003). PCR kan også brukes for å for å kartlegge cytokiners genespresjon ved f. eks. en virusinfeksjon (Gershwin et al., 2005).

PCR kan benyttes til å påvise tilstedeværelse, eller fravær, av spesifikke nukleinsyresekvenser i en prøve. PCR kan amplifisere DNA, eller etter revers transkripsjon, RNA. Revers-transkripsjon PCR (RT-PCR) kan brukes for deteksjon og kvantifikasjon av mRNA (Mackay, 2004). Ved PCR produseres mange kopier av spesifikke nukleotidsekvenser ved hjelp av to primere; en fremover (F) og en revers (R), varmestabil polymerase og nitrogenbasene adenin (A), guanin (G), cytosin (C) og tymin (T) (Kubista et al., 2006). RT-PCR og qPCR er ytterligere forklart i hver sine seksjoner (2.6.1 og 2.6.2) og **Figur 1-8** viser en skjematisk sammenligning av disse to metodene.

Ved PCR kjøres repeterte sykluser med tre ulike temperaturer. Først separeres (denatureres) dobbeltrådet DNA (dsDNA) ved høy temperatur (~95 °C). Deretter senkes temperaturen, (~50-60 °C), slik at primere binder til templatet (hybridiserer). Til slutt økes temperaturen til polymerasens optimaltemperatur (~70-78 °C), slik at polymerasen inkorporerer nitrogenbaser (elongering) (Kubista et al., 2006; Mackay, 2004). I løpet av en syklus gir et DNA-templat opphav til en ny identisk kopi av et område på tråden, avhengig av hvor primerne hybridiserer. Dette gjør at det etter mange sykluser vil være eksponentiell øking av DNA kopiert etter samme DNA-templat. Tiden ved hver inkuberings temperatur og antall sykluser ved hver temperatur, styres av et PCR-instrument (Mackay, 2004).

Primernes smeltetemperatur ( $T_m$ ) er temperaturen som halve DNA-duplekset vil dissosiere og bli enkeltrådet og er en indikasjon på stabilitet (Chuang et al., 2013; Mackay, 2004). Historisk ble elongering utført av det varmestabile enzymet Taq polymerase isolert fra bakterien *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Den har optimumstemperatur på rundt 72 °C og tåler at temperaturen økes til 95 °C, noe som er nødvendig for denaturering av DNA (Saiki et al., 1988). I dagens kommersielle kit blir det brukt enzymer med enda høyere spesifisitet og effektivitet.

### 1.7.1 Revers-transkripsjon PCR (RT-PCR) for syntese av cDNA

Komplementert DNA (cDNA) syntetiseres fra et mRNA-templat via revers transkripsjon, og videre analyse av cDNA vil derfor gjenspeile de sekvensene som aktivt transkriberes av cellen. cDNA er mer stabilt enn fritt RNA og brukes som templat under qPCR, slik at man får informasjon om hvilke gener som er slått på, og om mengden transkripsjon (Oliveira et al., 2017). Ved RT-PCR hybridiserer uspesifikke primere til isolert RNA vha. revers transkriptase (RT), og hver RNA-tråd gir opphav til en RNA-DNA hybrid. RNA-tråden blir deretter degradert av RNase H, slik at det kun gjenstår en enkeltrådet cDNA (Qiagen, 2009).

### **1.7.2 Sanntids-PCR (qPCR)**

Både PCR og qPCR er teknikker for å amplifisere spesifikke nukleinsyresekvenser. Hovedforskjellen mellom de to teknikkene er at qPCR gir ut data i sanntid, noe standard PCR ikke gjør. Ved at qPCR gir ut data i sanntid, er det mulig å beregne opprinnelig konsentrasjon av et templat i en prøve (Oliveira et al., 2017). qPCR er en kraftfull metode for å måle genuttrykk. For at RNA skal kunne kvantifiseres ved bruk av qPCR, blir sekvensene først revers transkribert til cDNA, som beskrevet over.

Ved qPCR legges to elementer til standard PCR, nemlig fluoriserende farge og et PCR-instrument med fluorometer for deteksjon. Et fluoriserende fargestoff som benyttes mye er SYBR Green. Dette binder uspesifikt til dobbeltrådig DNA (dsDNA) og siden fluorescenssignalet øker proporsjonalt med dannelse av dsDNA, er det mulig å kartlegge mengden nukleinsyrer som opprinnelig var i en prøve (Puech et al., 2015).

Alle PCR-metoder har noen begrensninger. For å lage gode primere er man avhengig av kunnskap om organismens genom, og at databaser med nukleotidsekvenser er tilgjengelige. Spesielt hos noen mikroorganismer forekommer det hyppig mutasjoner, noe som kan redusere deteksjonsraten (Mackay, 2004).

## **1.8 Kulebaserte multiplekse analysemetoder**

Cytokinmålinger kan blant annet brukes som biomarkører for å indikere eller overvåke sykdom, eller undersøke responser på vaksiner (Guerra-Maupome & McGill, 2019). For storfe har blant annet IFN- $\gamma$  og IL-17 blitt brukt for å måle respons etter vaksinasjon (Guerra-Maupome & McGill, 2019) og IFN- $\gamma$  for å diagnostisere tuberkuloseinfeksjon (Wood & Jones, 2001).

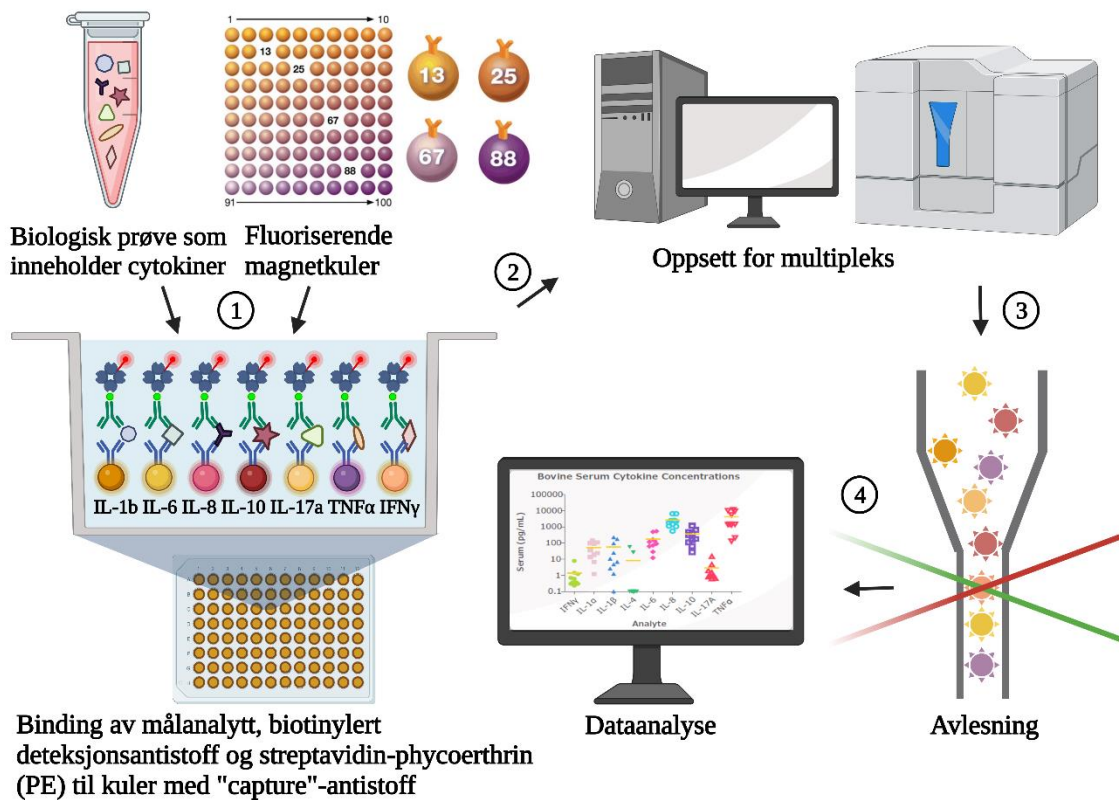
I dag finnes det flere immunologiske metoder som benyttes til å måle cytokiner. Noen av de mest brukte metodene for cytokindeteksjon er ulike varianter av ELISA og kulebaserte multiplekse analysemetoder (Knight et al., 2020). Sammenlignet med ELISA er multiplekse analysemetoder like spesifikke, men mer sensitive, behøver mindre prøvevolum, er tidsbesparende og krever mindre håndtering av prøvene (Houser, 2012). Det er utviklet en rekke kommersielle kulebaserte multiplekse immunologiske analysemetoder for å detektere cytokiner hos mennesker og andre pattedyr som hest (Wagner & Freer, 2009), storfe (Sipka et al., 2022), hund (Lecru et al., 2022) og mus (Hou et al., 2018).

Kulebaserte multiplekse analyser regnes som high-throughput teknologi og muliggjør samtidig deteksjon og kvantifikasjon av flere analytter i en biologisk prøve. Prøvematerialet kan blant annet være serum, plasma eller supernatant fra celle- og vevskulturprøver (Reslova et al., 2017). Analysemetoden kan benyttes til deteksjon av en rekke målanalytter, f. eks. antigen fra mikroorganismer, nukleinsyrer, antistoff, cytokiner og hormoner (Houser, 2012).

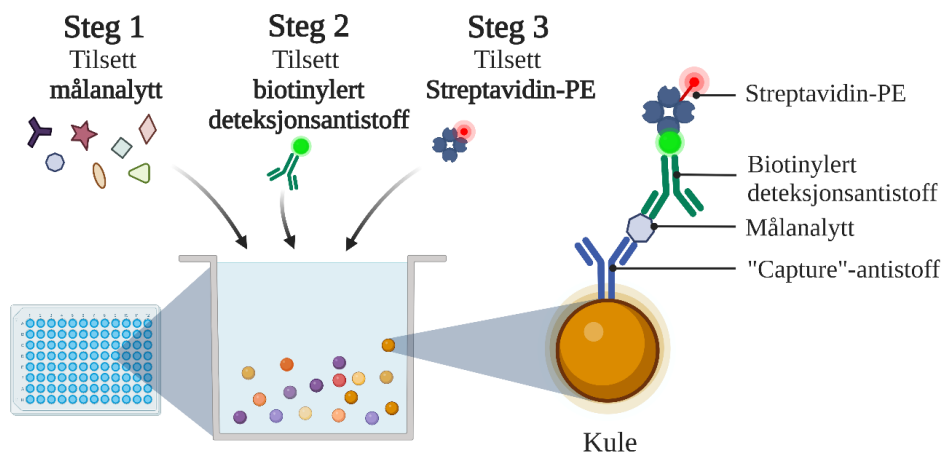
Flere kulebaserte multiplekse analysemetoder baserer seg på xMAP-teknologi (x = ukjent analytt, MAP = Multi-Analyte Profiling). xMAP-teknologien benytter kuler som er merket med ulike mengder av to ulike fluorescerende fargestoff. Dette gir ulike kulesett en unik signatur, og sammen med et tredje fargestoff som brukes for deteksjon av bundet målanalytt, er det mulig å analysere for flere analytter i én prøve samtidig (Reslova et al., 2017). Det er mulig å tilpasse xMAP systemet til ulike typer målanalytter, siden spesifikke ligander kan kobles til kulene. Tilpasningsmulighetene gjør at denne teknologien ofte benyttes både i diagnostiske- og forskningslaboratorier (Dunbar & Li, 2010).

Kulene som brukes kan enten være magnetiske eller ikke-magnetiske. Bruk av magnetiske kuler er nyttig for å separere kulene fra løsninger, noe som forenkler og automatiserer vasketrinn under kopling av ligander til kulen, under analysepreparering og avlesning (Dunbar & Li, 2010). Karboksylgrupper på kuleoverflaten kan gjøres reaktive for kovalent binding av ligander (Dunbar & Li, 2010). Andre kuler har overflate dekket av avidin, et stoff som kan påvise biotinylerede ligander, slik som peptider, uten å ha kjemisk koblet et antistoff på kulen (Dunbar & Li, 2010).

**Figur 1-7** viser en skjematisk oversikt over trinnene i en kulebasert multipleks analyse hvor påvisning av cytokiner er brukt som eksempel. Forklaring er gitt i figurtekst. Binding mellom målanalytt, «capture»-antistoff, biotinyleret deteksjonsantistoff og Streptavidin-Phycoerthrin (PE) er vist i **Figur 1-8** Streptavidin-PE brukes for å detektere mengden målanalytt. Streptavidin binder med god affinitet til biotinet på deteksjonsantistoffet, og PE er et fluorescerende reportertermolekyl (Reslova et al., 2017).



**Figur 1-7 Skjematisk oversikt over trinnene i en multipleksanalyse.** (1) Målanalytt i prøven, her illustrert med cytokiner, binder til fluoriserende kuler dekket av spesifikke ligander, i dette tilfellet antistoffer. Biotinylert deteksjonsantistoff og Streptavidin-PE tilsettes slik at komplekset vist i **Figur 1-10** dannes. Dette gjøres i 96-brønners Brett. (2) Plateoppsett legges inn i Bio-Plex Manager software. (3) Målanalyttene i prøvene avleses. (4) Til slutt utføres datanalyse. Illustrasjonen av de fluoriserende magnetkulene er hentet fra Houser (2012). Figuren er inspirert av Animal Health Diagnostic Center (u.d.) og laget i BioRender.com.



**Figur 1-8 Binding av målanalytt, deteksjonsantistoff og reportertermolekyl.** (1) Målanalytter tilsettes brønner med kuler koblet til «capture»-antistoff. Målanalytter binder til antistoffene. (2) Biotinylert deteksjonsantistoff binder til målanalyttene. (3) Reportertermolekylet Streptavidin-phycoerthrin (PE) binder til det biotinylerte deteksjonsantistoffet. Figuren er laget på BioRender.com

xMAP teknologi bruker to metoder for deteksjon; enten flow-cytometri eller identifisering ved bruk av Charge-Coupled Device (CCD)-detektor. Ved flow-cytometri blir kulene ført gjennom en passasje hvor to lasere benyttes; den ene brukes for å identifisere kulene, og den andre for å kvantifisere analyttkonsentrasjonen (Reslova et al., 2017). Kule-identifikasjonen gjøres av en rød laser (635 nm), som eksiterer fluoriserende farge i kulene, og analyttkonsentrasjonen kvantifiseres ved at en grønn laser (532 nm) som eksiterer det fluoriserende reportermolekylet (Dunbar & Li, 2010). Ved CCD-identifisering blir kulene holdt i et lag ved bruk av en magnet og det benyttes også her to lysemitterende diode (LED) lyskilder; 635 nm benyttes til å eksitere fluorokromer for å indentifisere kulene, og en annen 525 nm til å kvantifiserer reportermolekyler (Reslova et al., 2017).

EMD Millipore corp., produsenten av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1, bruker xMAP teknologi. Denne kulebaserte multiplekse analysemetoden benytter antistoffer som detekterer cytokinene IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, makrofag inflammatorisk protein (MIP)-1 $\alpha$ , IL-36 reseptor antagonist (RA), IP-10, makrofag kjemoattraktant protein 1 (MCP)-1, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , og vaskulær endotelial vekstfaktor A (VEGF-A) i prøver fra storfe.



### 1.9 Målet med studien

Målet med denne studien er å teste ut bruk av en kommersiell bovin multipleks cytokinanalyse, spesifikt MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (EMD Millipore Corp.), til bruk på prøver fra rein. I denne uttestingen inkluderes cytokinene IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og INF- $\gamma$ . Resultatene fra rein sammenlignes med resultater fra storfe.

Under uttestingen vil jeg:

- ❖ Kartlegge om, og i hvor stor grad, de ulike cytokinene kan detekteres ved bruk av den kommersielle bovine multiplekse cytokinanalysen i cellesupernatanter fra mitogenstimulerte PBMC isolert fra rein og strofe.
- ❖ Beregne relativt genuttrykk for de samme cytokinene med qPCR i mitogenstimulerte PBMC isolert fra rein og strofe. Spesifikke primere designes for hvert av cytokinene og referansegenet  $\beta$ 2M i forbindelse med dette.
- ❖ Undersøke og beskrive ekspresjonen av cytokiner for to relativt vanlig forekommende reinsykdommer. Til dette brukes serum fra to tidligere utførte eksperimentelle smitteforsøk på rein med hhv. ORFV (Tryland et al., 2013) og CvHV2 (das Neves et al., 2009a).
- ❖ Vurdere potensialet til de ulike cytokinene som biomarkører hos rein. Som et trinn i dette vil jeg tilegne meg kunnskap om reinhelse og virusinfeksjoner.

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 Multippel sammenstilling og fylogeni for cytokinsekvenser

Bindingssetet på et «capture»- antistoff og deteksjonsantistoff er tilpasset cytokiner fra storfe, kan også binde til cytokiner fra rein, dersom den epitopen som passer i antistoff-bindingssetet også forekommer på reincytokinet. Den genetiske informasjonen lagret i DNAet, beskriver kun proteinets primærstruktur, nærmere bestemt rekkefølgen av aminosyrer i polypeptidkjeden. Proteinets tredimensjonale struktur, og dermed hvilke epitoper som finnes på overflaten, avhenger av denne primærstrukturen (Creighton, 1990).

Aminosyrerekkefølgen ble sammenlignet for å få en indikasjon på hvor likhet proteinenes tredimensjonale struktur kunne forventes å ha hos rein og storfe. Aminosyresekvenser fra rein, storfe, sau, hjort og menneske for spesifikke cytokiner, ble sammenstilt og brukt til å lage fylogenetiske trær. Dette ble gjort for cytokinene IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ .

Multippel sammenstilling (MSA) for de overnevnte cytokinene og artene ble laget for å vise konserverte, og ikke konserverte, områder i cytokinenes aminosyrerekkefølge. MSA ble laget i Unipro Ugene (Okonechnikov et al.), ved bruk av Multippel sammenstilling og Fast Fourier Transform (MAFFT) (Katoh et al., 2002) med standard innstillinger. Aminosyresekvenser for de aktuelle proteinene ble hentet fra Uniprot (UniProt Consortium, 2019).

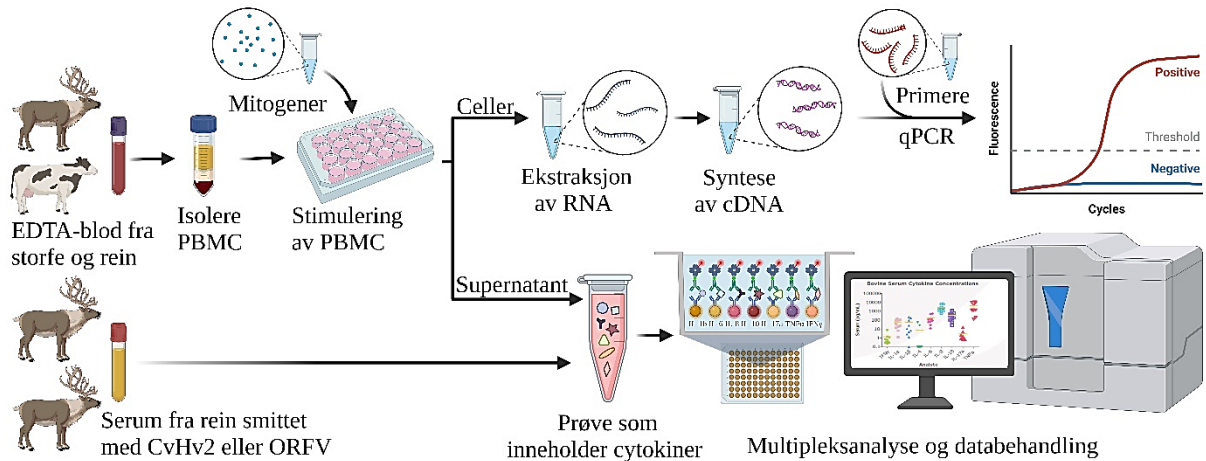
Slektskapsforholdet mellom gener kan fremstilles grafisk ved å lage rotede fylogenetiske trær. For denne oppgaven ble det laget fylogenetiske trær med bootstrap-metoden, på grunnlag av aminosyresekvensen til de nevnte proteinene og artene i programmet MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al., 2018). Bootstrap innebærer regenerering av data for å lage fiktive datasett. Disse regenererte dataene kalles bootstrap-replikater, og har samme størrelse som det opprinnelige datasettet. Data ble organisert i MSA av  $n = 5$  arter med  $n$  residuer. Det genereres «en skog» av bootstrap-trær, og det treet som oftest forekommer, er det som til slutt vises som fylogenetisk tre. Ved bruk av denne metoden oppgis bootstrap-verdier ved enkelte av forgreiningene til det fylogenetiske treet. Bootstrap-verdier under 60 % anses som usikre og vises derfor ikke. Bootstrap-verdien indikerer hvor mange ganger den samme grenen blir observert på samme sted ved alle regenereringene. Plasseres samme art på samme sted to av tre ganger, vil bootstrap-verdien være 66 % (Mariadassou et al., 2019).

## 2.2 Prøvemateriale og oversikt over studien

Under pilotforsøket i 2021 ble cytokinene IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  analysert ved bruk av MILLIPLEX® Bovine cytokine/chemokine magnetic bead panel 1 (EMD Millipore Corp.) i supernatant fra stimulerte PBMC isolert fra rein (n=4) og storfe (n=2 eller 3, avhengig av stimulering). Forsøkene ble utført etter samme prosedyre som i resten av studiet, eventuelle spesifikasjoner i prosedyren for disse oppsettene, er merket med «pilotforsøk (storfe/rein)».

For å ytterligere teste ut analysemetoden på rein, ble det på nytt undersøkt om, og i hvor stor grad, de samme cytokinene som ble påvist under pilotforsøket, kunne måles i supernatant og serumprøver ved bruk av samme cytokinkit. En oversikt over studiet er vist i **Figur 2-1**. PBMC ble isolert fra etyldiamintetraeddiksyre (EDTA)-blod fra friske rein (n=9) og storfe (n=9) (**Tabell 2-1**). Videre ble PBMC stimulert vha. mitogner og deres supernatant ble brukt til multipleksanalyse og RNA ble ekstrahert fra cellene. RNA ble deretter revers transkribert til cDNA, og brukt som templat for kvantifikasjon ved qPCR. Multipleksanalyse av serumprøver fra rein inokulert med ORFV (n=6) (Tryland et al., 2013) og CvHV2 (n=5) (das Neves et al., 2009a) ble utført for å undersøke hvilke cytokiner som kunne påvises, og om det var noen endringer i cytokinnivåer før og etter inokulering. Oversikt over serumprøver er vist i **Tabell 2-2**. Det ble ikke utført qPCR på serumprøvene, siden disse ikke inneholder celler og derfor heller ikke RNA.

Data fra prøver på rein ble sammenlignet mot data fra storfeprøver behandlet på samme måte. Resultater fra den multiplekse analysemetoden for kvantifikasjon av proteiner ble også sammenlignet med resultater fra qPCR.



**Figur 2-1 Oversikt over studiet.** Cytokinkonsentrasjoner ble målt ved kulebasert multipleks analyse. Cytokiner ble målt i serum fra rein smittet med CvHV2 eller ORFV, og i supernatant fra mitogenstimulerte perifere mononukleære celler (PBMC) isolert fra EDTA-blod fra storfe og rein. Relativt genuttrykket for cytokiner etter stimulering av PBMC, ble funnet ved sanntids-PCR (qPCR). Figuren er laget i BioRender.com.

**Tabell 2-1 Oversikt over storfe og rein brukt til blodprøvetaking.** Tabellen viser dato og metode for prøvetakning (halsvene eller ved avblødning etter bedøvelse med boltepestol). Noen prøver fra rein ble eksponert for kulde etter uttak, hvilket påvirket cellene (se kommentar).

| Individer <sup>a</sup>            | Blodprøvetaking |                |                            |
|-----------------------------------|-----------------|----------------|----------------------------|
|                                   | Dato            | Metode         | Kommentar                  |
| <b>Pilotforsøk rein (n = 4)</b>   | 21.01.21        | Halsvene       |                            |
| <b>Pilotforsøk storfe (n = 3)</b> | 26.10.20        | Halsvene       |                            |
| <b>Storfe 1-3</b>                 | 01.02.22        | Halsvene       |                            |
| <b>Storfe 4-6</b>                 | 05.04.22        | Halsvene       |                            |
| <b>Storfe 7-9</b>                 | 06.10.22        | Halsvene       |                            |
| <b>Rein 1+2, 3, 4</b>             | 14.02.22        | Ved avblødning | Prøver eksponert for kulde |
| <b>Rein 5</b>                     | 23.02.22        | Ved avblødning | Prøver skjermet for kulde  |
| <b>Rein 6-8</b>                   | 31.08.22        | Halsvene       |                            |
| <b>Rein 9</b>                     | 05.10.22        | Halsvene       |                            |

<sup>a</sup> Rein 1+2: Samleprøve fra to individer (et ≤1 år og et >1 år). To prøver ble slått sammen siden det var for få celler isolert fra hvert individ. Alle storfe va > 1 år. Syv av 14 rein var > 1 og resterende var ≤1 år.

**Tabell 2-2 Oversikt serumprøver.** Utvalg av serumprøver fra forsøk der rein ble smittet med ORFV og CvHV2. Alder og antall er oppgitt, d.p.i. = dager post inokulering.

| Virus | Identifikasjon | Alder               | Antall | Prøvetaking<br>(d.p.i.) | Referanser                |
|-------|----------------|---------------------|--------|-------------------------|---------------------------|
| ORFV  | Rein A1-6      | 1 år                | 6      | 0, 5, 12                | (Tryland et al., 2013)    |
| CvHV2 | Rein B1-5      | 2-6 år <sup>a</sup> | 5      | 0, 4, 7, 10             | (das Neves et al., 2009a) |

<sup>a</sup>Drekte simler.

### 2.2.1 Blodprøveuttak fra rein og storfe

Bruk av forsøksdyr (**Tabell 2-1**) ble utført i henhold til EU og Norge sitt lovverk for forsøksdyr og er godkjent av Mattilsynet Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem, FOTS ID 24386 og 29626.

Prøvetakningen av storfe ble gjort ved Produksjonsdyrklubben ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Dyr som oppstalles ved NMBU har kommet inn grunnet en sykdomstilstand, men de prøvetatte dyrene var klinisk friske ved blodprøvetaking. Blodet ble tappet fra halsvenen (*Vena jugularis externa*) direkte i EDTA-rør (VACUETTE®EDTA-K3). Disse rørene er sprayet innvendig med EDTA, en syre som inneholder fire karboksylsyregrupper og to aminogrupper som frie elektroner, som binder til kalsium og metallioner. Kalsium er nødvendig for et bredt spekter enzymreaksjoner i koaguleringskaskaden, og ved at dette blir utilgjengelig forhindres det at blodet koagulerer i oppsamlingsrøret (Banfi et al., 2007). Storfeprøver ble arbeidet videre med på lab samme dag som de ble tappet.

Prøvetakningen av rein ble gjennomført ved dyreavdelingen ved UiT – Norges arktiske universitet (UiT). Reinen ved UiT er forsøksdyr som inngår i ulike typer ikke-smertevoldende dyreforsøk i regi av UiT eller andre institusjoner. Blod fra rein ble tatt på to ulike måter; ved avblødning etter bedøvelse med boltepestol eller ved blodprøve via halsvenen. Ved prøvetaking fra halsvenen ble dyrene samlet i et lite kve slik at det var lettere å fange dyrene og holde dem fast. Dyrene ble fiksert av kvalifisert personale og blodprøvene ble tatt av veterinær (**Figur 2-2**). Ved blodprøvetaking ble blodet tappet fra halsvenen direkte i EDTA-rør, som for storfe. Blodprøver ved avblødning ble tatt ved avkutting av halsvenen. Blodet ble først samlet i 50 mL-rør og raskt overført til EDTA-rør. Prøvene tatt ved avblødning ble tappet utendørs. For enkelte av prøvene (Rein 1-3) var det -10 °C, og prøvene ble forsøkt skjernet fra

kulden. Blodprøve fra Rein 4 ble også tatt utendørs i kulden ved avblødning, men ble umiddelbart lagt i isoporeske med varmeelement. Prøver fra rein ble sendt med ekspress over natt ved romtemperatur, og arbeidet videre med dagen etter.



**Figur 2-2 Blodprøvetaking av reinkalv.** Prøvene ble tatt av veterinærene Ester Malmström og Ingebjørg H. Nymo. Foto: Emma Vangen.

### 2.2.2 Serumprøver fra smitteforsøk på rein

Oversikt over serumprøver fra smitteforsøk der grupper av rein ble smittet med ORFV (Tryland et al., 2013) og CvHV2 (das Neves et al., 2009a) er vist i **Tabell 2-2**. Forsøkene er beskrevet nedenfor. I begge forsøkene ble dyrene klinisk undersøkt, og det ble tatt blodprøver ved flere tidspunkt før, ved og etter virusinokulasjon. Serumprøver fra dyreforsøk ble lagret ved -20 eller -80 °C frem til analyse.

Serumprøver fra seks friske uvaksinerte rein inokulert med ORFV ble analysert for cytotokiner med den multiplekse analysemetoden. For analyse ble prøver fra inokuleringsdagen (0 dager post inokulering, d.p.i.) og 5 og 12 d.p.i. inkludert.

Det opprinnelige smitteforsøket besto av 14 rein, som var ett år gamle. Før inokulasjon fikk dyrene en tilvenningsperiode på fire uker, for å tilpasse seg miljøet i inngjerdingen der de fikk høy, lav og vann. Åtte av dyrene ble inokulert med ORFV isolert fra rein. Inokuleringen foregikk ved at et område på omtrent 2 cm × 1 cm ble lett raspet med sandpapir (kornstørrelse 80) før løsning med virus ble applisert på det raspede området med en bomullspinne. Forsøket

inkluderte også seks kontrolldyr som ikke ble inokulert, men ble holdt i samme inngjerding og delte fôr og vann med de åtte inokulerte dyrene. Blant de fem inokulerte dyrene valgt ut til den multiplekse analysen, fikk et av dyrene en liten hvitaktig lesjon på inokulasjonsstedet og i kanten av leppen 5 d.p.i. Fire av disse seks utvalgte dyrene utviklet lesjoner på leppene 12 d.p.i. Alle dyrene ble avlivet i perioden 26-29 d.p.i.

Prøver fra rein eksperimentelt smittet med CvHV2 er fra et forsøk utført av das Neves et al. (2009a). Under dette forsøket ble seks drektige rein (2-6 år gamle) uten antistoffer mot CvHV2 kjøpt inn fra en reinflokk i Finnmark. Reinen fikk en tilvenningsperiode på tre uker for å tilpasse seg miljøet i inngjerdingen der de fikk høy, lav og pelletert reinfôr og vann.

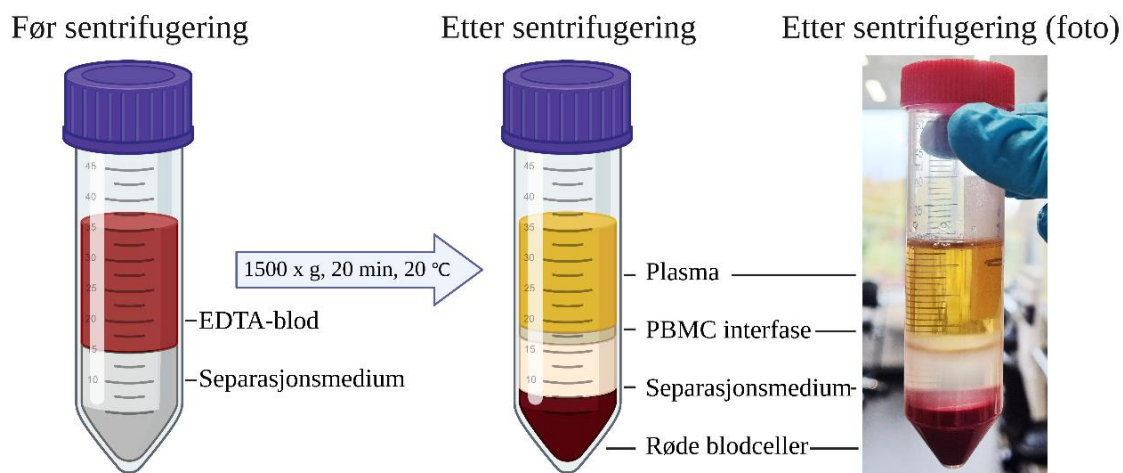
Under eksperimentet ble to rein inokulert intratrakealt og to intravaginalt med CvHV2. For kontroll ble to individer inokulert (enten intratrakealt eller intravaginalt) med sterilt vann. Hos de inokulerte dyrene ble det observert mild feber og betydelig utflod fra skjeden og nesen. Det ble ikke registrert noen aborter, men en kalv døde kort tid etter fødselen. Inokulerte dyr serokonverterte 7-10 d.p.i. (das Neves et al., 2009a).

Serumprøver fra fem dyr, fire rein inokulert med CvHV2 og et kontrolldyr inokulert intratrakealt med sterilt vann (Rein B1), ble analysert med multipleks for å påvise cytokiner. Prøver fra 0, 4, 7 og 10 d.p.i. ble inkludert i denne analysen.

## 2.3 PBMC

### 2.3.1 Isolering av PBMC fra blod

PBMC ble høstet fra EDTA-blod ved tetthetsentrifugering. Separasjonsmediet Lymphoprep ble lagt under EDTA-blod, slik at det ble dannet ulike sjikt etter sentrifugering (**Figur 2-3**). PBMC danner en interfase som legger seg mellom plasmasjiktet og sjiktet med separasjonsmedium. PBMC har lavere tetthet enn separasjonsmediet, og vil legge seg på toppen av dette sjiktet. Granulocytter (nøytrofile, eosinofile og basofile) og røde blodceller har en høyere tetthet enn mononukleære celler, og vil sedimentere gjennom laget med separasjonsmedium under sentrifugering (Kleiveland, 2015; Lea, 2006).



**Figur 2-3 Isolering av PBMC ved tetthetsentrifugering.** Før sentrifugering legges separasjonsmedium under blodet med stålkanyle. Etter sentrifugering separeres plasma, PBMC, separasjonsmediet og røde blodceller. Granulocytter havner i samme sjukt som de røde blodcellene. PBMC-interfasen kan pipetteres ut (Kleiveland, 2015). Foto: Tuva Løken Frøvoll. Figuren er laget i BioRender.com.

Isolering av PBMC ble utført ved at 12 mL EDTA-blod ble fortynnet i 7 mL fosfatbufret saltvann (PBS) m/2 mM EDTA, før 10 mL Lymfoprep separasjonsmedium (STEMCELL Technologies) ble lagt under blodet med stålkanyle. Prøvene ble så sentrifugert (1500 x g, 20 min, 20 °C) uten brems ved bruk av Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter, CA, USA). Celler i interfasen ble forsiktig suget av ved bruk av pipette og overført til et annet rør. Røret med celler ble fylt med PBS m/2 mM EDTA før ny sentrifugering (500 x g, 5 min, 20 °C). Etter sentrifugering ble supernatant helt av, før cellepelleten ble ristet løs. Vask ble gjentatt tre ganger med PBS uten EDTA.

Bürker tellekammer (Karl Hecht™ Assistent™) og mikroskop (Nikon Eclipse TS100) ble brukt for finne konsentrasjonen (mill. celler/mL) av isolerte celler. Celler ble løst i RPMI 1640 medium (Biowest), og fortynnet (1:2 - 1:10) i PBS og Trypan blå (Thermo Fisher Scientific). Deretter ble cellene applisert på tellekammeret, og talt ved bruk av mikroskop (forstørrelse 20x). Trypan blå gir en indikasjon på om cellene i prøven er levende eller døde, da døde celler farges mørkeblå. Bürker tellekammer har et inngravert rutenett som løste celler appliseres på, og ved å telle antallet celler over et visst antall ruter og ved hjelp av en bestemt formel, gis et estimat på totalt antall celler som befinner seg i prøven (se **Vedlegg A** for detaljer).

PBMC ble fortynnet med RPMI 1640 medium (Biowest) med 10 % føtalt kalveserum og 1 % Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, 10000 enheter penicillin og 10 mg streptomycin per mL i 0.9 % NaCl) til konsentrasjoner vist i **Tabell 2-3**.



### 2.3.2 *In vitro* mitogenstimulering av PBMC

Celler ble løst i RPMI til riktig konsentrasjon (**Tabell 2-3**), før de ble overført til reaksjonsbrett (Costar Corning, USA). Brønnene ble deretter tilsatt mitogener. **Tabell 2-3** viser oversikt over stimuleringsoppsett I til VII og mitogenkonsentrasjoner er angitt i **Tabell 2-4**. Prøvene ble så inkubert ved 37,0 °C i 6 eller 24 timer (5 % CO<sub>2</sub>) (Thermo Scientific™, Heracell™ VIOS 160i). Prøver fra hvert dyr og hvert oppsett ble også inkubert uten mitogener (ustimulerte prøver).

Mitogenene som ble benyttet var: ConA (Sigma-Aldrich), LPS, PHA og PMA-I (Thermo Fisher Scientific). Tabellen inkluderer også pilotforsøket hvor det i tillegg ble stimulert med SEB og PWM (Sigma-Aldrich).

Etter inkubasjonen separeres PBMC, som skal brukes til RNA-ekstraksjon, fra supernatanten som inneholder løselige ekstracellulære proteiner (inkludert cytokiner). Celler og supernatant separeres ved at platene sentrifugeres (1500 x g, 5 min, 5 °C) slik at cellene legger seg på bunnen av platen. Supernatant overføres til Micronicrør (Micronic, Lelystad, Nederland), og fryses ved -80 °C frem til multipleks cytokinanalyse. Celler overføres til eppendorfrør for lysering og RNA ekstrahering.

**Tabell 2-3 Oversikt over stimuleringsoppsett I til VII.** Tabellen viser hvilke prøver som ble inkludert i de ulike oppsettene (individer beskrevet i **Tabell 2-1**).

| Oppsett    | Mitogenstimulering            |            |   | Stiulerings-tid | Inkluderte dyr                                  |
|------------|-------------------------------|------------|---|-----------------|---|
|            | Konsentrasjon (celler per mL) | Volum (mL) | Mitogener <sup>a,b</sup>                                |                 |   |
| <b>I</b>   | 1 × 10 <sup>6</sup>           | 0,5        | PHA, ConA, SEB, PWM                                     | 24 t            | Pilotforsøk: Rein (n=4)<br>Storfe (n=2 eller 3) |
| <b>II</b>  | 1 × 10 <sup>6</sup>           | 1          | PHA, ConA, LPS  | 24 t            | Storfe 1-3                                      |
| <b>III</b> | 1 × 10 <sup>6</sup>           | 1          | PHA, ConA, LPS  | 24 t            | Rein 1+2, 3, 4                                  |
| <b>IV</b>  | 1,5 × 10 <sup>6</sup>         | 1          | PHA, ConA, LPS  | 24 t            | Rein 5  |
| <b>V</b>   | 2 × 10 <sup>6</sup>           | 1          | PHA, ConA, LPS  | 24 t            | Storfe 4-6                                      |
| <b>VI</b>  | 2 × 10 <sup>6</sup>           | 1          | PHA <sup>b</sup> ,<br>ConA <sup>b</sup> , LPS,<br>PMA-I | 6 og 24 t       | Rein 6-8  |
| <b>VII</b> | 2 × 10 <sup>6</sup>           | 2          | PMA-I   | 6 og 24 t       | Storfe 7-9<br>Rein 9                            |

<sup>a</sup> PHA = phytohemagglutinin, Con A = concanavalin A, LPS = lipopolysakkarid, PMA-I = PMA og ionomycin, SEB = staphylococcal enterotoxin B, PWM = pokeweed mitogen.

<sup>b</sup> PHA og ConA ble benyttet ved 6 t stimulering, ikke 24 t.

**Tabell 2-4 Mitogenkonsentrasjoner brukt ved stimulering.** Mitogenene ble fortynnet med PBS til brukskonsentrasjon. Sluttkonsentrasjon er konsentrasjon av mitogen etter de er tilsatt celler løst i RPMI 1640 medium med 10 % føtalt kalveserum og 1 % Penicillin-Streptomycin.

| <b>Mitogen<sup>a</sup></b><br><b>(Utgangskonsentrasjon)</b> | <b>Brukskonsentrasjon</b> | <b>Sluttkonsentrasjon</b> |
|---|---------------------------|---------------------------|
| PHA (1 mg/mL)   | 125 µg/mL                 | 2,5 µg/mL                 |
| ConA (1 mg/mL)  | Ufortynnet                | 10 µg/mL                  |
| LPS 1 (5 mg/mL)   | 200 µg/mL                 | 2 µg/mL                   |
| LPS 2 (2,5 mg/mL)   | Ufortynnet                | 5 µg/mL                   |
| PMA-I (500X)  | Ufortynnet                | 1X                        |
| SEB (100 µg/mL)   | Ufortynnet                | 5 µg/mL                   |
| PWM (1 mg/mL)   | 125 µg/mL                 | 2,5 µg/mL                 |

<sup>a</sup> PHA = phytohemagglutinin, Con A = concanavalin A, LPS = lipopolysakkarid, PMA-I = Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kombinert med ionomycin (I), SEB = staphylococcal enterotoxin B, PWM = pokeweed mitogen.

## 2.4 PCR

### 2.4.1 Ekstraksjon av RNA

Lysering av PBMC og ekstraksjon av totalt RNA ble utført med RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland), i kombinasjon med QIAshredder spinn kolonner (Qiagen). Stimulerte PBMC i eppendorfrør ble sentrifugert (300 x g, 5 min, 5 °C, Heraeus Pico 21 microcentrifuge, Thermo Scientific). Deretter ble supernatanten forsiktig fjernet med pipette, og cellepelletten ble tilsatt 350 µL RLT buffer med β-mercaptoethanol (β-ME), for å lysere cellene slik at RNAet blir tilgjengelig. Et vasketrinn med PBS ble lagt til protokollen før tilsetning av RLT-buffer, som et forsøk på å øke RNA-utbyttet ved forsøk VII. Pellet og buffer ble blandet godt med pipette, før det ble overført til en QIAshredder spinn kolonne plassert i et 2-mL-rør. Prøvene ble så sentrifugert (13000 x g, 2 min, romtemperatur) slik at celler homogenises når de går gjennom kolonnen. Homogenisert lysat ble oppbevart ved -80 °C frem til ekstraksjon av RNA.

Direkte etter lysering og homogenisering av PBMC, ble totalt RNA ble ekstrahert ved RNeasy Mini Kit. Det ble utført DNase-behandling med DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen) direkte i RNeasy Mini spin kolonnen for å bryte ned genomisk DNA (gDNA) som kan være krysskontaminerende under PCR-reaksjoner (Sannasiddappa, 2016). Totalt RNA ble eluert fra membranen i RNase-fritt vann og kvantifisert ved spektrofotometri. Ekstraksjon av totalt RNA

ble gjort ved at homogenisert lysat ble tilsatt 350  $\mu\text{L}$  70 % etanol. Lysat og etanol ble blandet godt med pipette før løsningen ble overført til en RNeasy Mini spin kolonne plassert i et 2-mL-oppsamlingsrør. Prøven ble sentrifugert (10000 x g, 15 s, romtemperatur) før flow-through ble kastet. Videre ble kolonnen tilsatt 350  $\mu\text{L}$  Buffer RW1 og sentrifugert (10000 x g, 15 s, romtemperatur) før flow-through ble kastet. Deretter ble gDNA brutt ned ved at 80  $\mu\text{l}$  DNase I inkuberingsløsning (70  $\mu\text{L}$  Buffer RDD tilsatt 10  $\mu\text{L}$  DNase I stock løsning) ble applisert på membranen i kolonnen. Dette ble så inkubert (15 min, romtemperatur). Videre ble kolonnen tilsatt 350  $\mu\text{L}$  Buffer RW1 og sentrifugert (10000 x g, 15 s, romtemperatur), før flow-through ble kastet.

Etter at gDNA var brutt ned, ble kolonnen tilsatt 500  $\mu\text{L}$  Buffer RPE og sentrifugert (10000 x g, 15 s, romtemperatur), før flow-through ble kastet. Deretter ble 500  $\mu\text{L}$  Buffer RPE tilsatt kolonnen før den ble sentrifugert (10000 x g, 2 min, romtemperatur). For å tørke membranen ble kolonnen overført til et nytt 2-mL-oppsamlingsrør og sentrifugert (13000 x g, 1 min, romtemperatur).

RNA ble eluert fra membranen ved at kolonnen ble overført til et 1,5-mL eppendorfrør og 30/40  $\mu\text{L}$  RNase-fritt vann ble applisert direkte på membranen, før rørene ble sentrifugert (10000 x g, 1 min, romtemperatur).

Konsentrasjonen av ekstrahert RNA ble målt ved bruk av mySPEC spektrofotometer (VWR, Leuven, Belgia). Prøve ble applisert på linsen til spektrofotometeret. Det ble målt absorbans ved 230, 260 og 280 nm for å finne konsentrasjon ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) og renhet av ekstrahert totalt RNA. RNA ble ansett å ha god kvalitet når A260/230- ratioen var 1,8-2,2 og A260/280-ratioen 1,8-2,1 (VWR, 2016). Ekstrahert RNA ble oppbevart ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4.2 Syntese av cDNA

Før RT-PCR ble totalt RNA fortynnet i RNase-fritt vann til en konsentrasjon på 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , for at prøvene skulle ha lik konsentrasjon av cDNA ved senere qPCR. Prøver med konsentrasjon lavere enn 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  av totalt RNA ble, brukt uten fortynning (**Tabell 2-5**).

Totalt RNA ble revers transkribert til cDNA ved bruk av QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) etter produsentens protokoll. Før RT-PCR ble utført fjernes gDNA for å unngå krysskontaminasjon under qPCR. Dette ble gjort siden primere også kan binde til og amplifisere sekvensene i gDNA, i tillegg til cDNA, slik at det kan se ut som det er høyere nivåer av produkt

enn det er i virkeligheten. DNA eliminasjonsreaksjon ble utført ved at gDNA Whipeout Buffer ble blandet med templat RNA og RNase-fritt vann, og inkubert (2 min, 42 °C) på en 96-Well Fast Thermal Cycler (Veriti, Thermo Fisher) (**Tabell 2-5**).

**Tabell 2-5 Reagenser for DNA eliminasjonsreaksjon.** I tilfeller der isolert RNA hadde lavere konsentrasjon enn 20 µg/mL, ble det benyttet 12 µL templat.

| Reagenser                    | Konsentrasjon<br>ekstrahert RNA:<br>20 µg/mL | Konsentrasjon<br>ekstrahert RNA:<br>< 20 µg/mL |
|------------------------------|--|--|
|                              | Volum/reaksjon (µL)                          | Volum/reaksjon (µL)                            |
| gDNA Wipeout Buffer, 7x      | 2  | 2  |
| Templat RNA                  | 10   | 12   |
| RNase-fritt vann             | 2  | -  |
| <b>Totalt reaksjonsvolum</b> | <b>14</b>                                    | <b>14</b>                                      |

Etter DNA eliminasjonsreaksjon ble cDNA syntetisert ved RT-PCR. Templat RNA ble tilsatt RT Master Mix (**Tabell 2-6**) og inkubert (96-Well Fast Thermal Cycler) i 30 min ved 42 °C for å aktivere enzymet Quantiscript Reverse Transcriptase, som utfører revers transkripsjon. Reaksjonen ble avsluttet ved inkubasjon i 3 min ved 95°C slik at enzymet inaktiveres. Til sist ble temperaturen senket til 4 °C. cDNA ble oppbevart ved -20 °C frem til qPCR.

**Tabell 2-6 Reagenser for revers-transkripsjon PCR (RT-PCR).** Templat er prøve med RNA der gDNA har blitt eliminert for å unngå krysskontaminering.

| Reagens                            | Volum/reaksjon (µL) |
|------------------------------------|---------------------|
| <b>RT Master Mix:</b>              |                     |
| Quantiscript Reverse Transcriptase | 1                   |
| Quantiscript RT Buffer (5X)        | 4                   |
| RT Primer mix                      | 1                   |
| <b>Templat:</b>                    |                     |
| RNA 20 µg/mL                       | 14                  |
| <b>Totalt reaksjonsvolum</b>       | <b>20</b>           |

### 2.4.3 Design av primere

For rein og storfe ble det designet seks primerpar for å kvantifisere cytokintranskripter (IL-8, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) og referansegenet  $\beta$ 2M. Før design av primere ble det hentet ut mRNA-sekvenser som koder for exoner i de aktuelle proteiner. IFN- $\gamma$ -primere til rein ble hentet fra Harrington et al., 2007. Det ble også forsøkt å designe primere for IL-6, men det ble ikke gått videre med disse da de ikke så ut til å fungere hos rein.

I denne oppgaven fant vi nukleotidsekvenser (exoner) for IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  og  $\beta$ 2M for rein ved hjelp av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-søk av gensekvenser for storfe mot reingenom (*Rangifer tarandus tarandus*, GCA\_902712895.1) i genbanken til Nasjonalt senter for bioteknologisk informasjon (NCBI). BLAST er en kraftfull metode for å søke i store databaser etter sekvenser som er like en referansesekvens (Lesk, 2016). Nukleotidsekvens (exon) for IL-17 (NM\_002190.3) ble hentet fra Yarkand hjort (*Cervus hanglu yarkandensis*, GCA\_010411085.1) i søkemotoren Ensembl (<https://www.ensembl.org/>).

Nukleotidsekvenser for storfe (*Bos taurus*, GCF\_002263795.1) ble hentet fra UCSC genom databasen (<https://genome.ucsc.edu/>) ved å søke opp aktuelt gen, velge ut et exon og hente ut nukleotidsekvens for dette exonet. Primere ble designet ved å bruke Primer 3 (4.1.0) Software (<http://primer3.wi.mit.edu/>) (Rozen & Skaletsky, 2000) med standard innstillinger. Primerne ble valgt til å amplifisere segmenter fra 95 til 150 bp.

Før designede primerpar ble bestilt, ble det teoretisk kontrollert at primerne amplifiserer rett fragment, og at de ikke fester seg til hverandre. *In silico* PCR for storfe ble utført på siden <https://genome.ucsc.edu/> (juni 2022). Genomet for rein er ikke publisert i denne databasen for *in silico* PCR.

Primersekvenser for hver av de seks cytokinene ble bestilt og syntetisert fra Eurogentec. Primersekvenser, smeltetemperaturer ( $T_m$ ) og forventet størrelse av PCR-produkt er for rein vist i **Tabell 2-7** og for storfe i **Tabell 2-8**. Primere ble levert som tørrstoff, og ble fortynnet i nukleasefritt vann til primer-stockløsninger (100  $\mu$ M). I **Vedlegg B** er det beskrevet hvordan disse ble laget. Før PCR ble primer-stockløsningene benyttet til å lage bruksløsninger med primerkonsentrasjon på 10  $\mu$ M.

**Tabell 2-7 Oligonukleotidprimersekvenser for polymerase kjedereaksjon (PCR) og sanntids-PCR (qPCR) for amplifikasjon av ulike målgener fra rein (*Rangifer tarandus tarandus*). Sekvenser for de ulike målgenene ligger ikke databaser, og NCBI accession nr. er derfor ikke oppgitt.**

| Målgen <sup>a,e</sup>                      | Oligonukleotidsekvens <sup>b</sup> | T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup> | Størrelse av PCR-produkt (bp) <sup>d</sup> |
|--|------------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>IFN-<math>\gamma</math><sup>e</sup></b> | F: GCGCAAAGCCATAAATGAAC            | 58                               | 98   |
|  | R: CTTCTCTTCCGCTTTCTGAG            | 60                               |  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>             | F: CCAAAAGCATGATCCGGGAC            | 62                               | 111  |
|  | R: GGAGGAAGGAGAAGAGGCTG            | 64                               |  |
| <b>IL-8</b>                                | F: AACACATTCCACGCCTTTCC            | 60                               | 118  |
|  | R: GCAGACCTCTTTTCCGTTGG            | 62                               |  |
| <b>IL-10</b>                               | F: AACCATGGGCCTGAGATCAA            | 60                               | 119  |
|  | R: CGCCTTGCTCTTGTTTTTC             | 60                               |  |
| <b>IL-17</b>                               | F: GGTACCCCTCTGTGATCTGG            | 64                               | 109  |
|  | R: AGGATCTCTTGCTGGATGGT            | 60                               |  |
| <b><math>\beta</math>2M<sup>a</sup></b>    | F: GGATGGGAAGCCAAATCACC            | 62                               | 150  |
|  | R: TGGGACAGCAGGTAGAAAGA            | 60                               |  |

<sup>a</sup> IFN- $\gamma$  = interferon-gamma, TNF- $\alpha$  = tumor nekrose faktor-alfa, IL = interleukin,  $\beta$ 2M = beta-2-microglobulin.

<sup>b</sup> Primere ble designet basert på cytokingener fra databasen NCBI Genomes *Rangifer tarandus tarandus* GenBank accession nr. GCA\_902712895.1. F = fremover, R = revers.

<sup>c</sup> T<sub>m</sub> = Smeltetemperatur, oppgitt av Eurogentec.

<sup>d</sup> bp = basepar.

<sup>e</sup> Harrington et al. (2007)

**Tabell 2-8 Oligonukleotidprimersekvenser for polymerase kjedereaksjon (PCR) og sanntids-PCR (qPCR) for amplifikasjon av ulike målgener fra storfe (*Bos taurus*).**

| Målgen <sup>a</sup>            | NCBI accession nr. | Oligonukleotidsekvens <sup>b</sup> | T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup> | Størrelse av PCR-produkt (bp) <sup>d</sup> |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | NM_174086          | F: CTCTGTGGGCTTTTGGGTTT            | 60                               | 115  |
|                                |                    | R: GCCCACCCTTAGCTACATCT            | 62                               |  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | NM_173966          | F: AGGAGAGAGACAAGCAGCTG            | 62                               | 105  |
|                                |                    | R: TGTGGCAGGGTATGTGAGAG            | 62                               |  |
| <b>IL-8</b>                    | NM_173925          | F: CATTCCACACCTTTCCACCC            | 62                               | 114  |
|                                |                    | R: GCAGACCTCGTTTCCATTGG            | 62                               |  |
| <b>IL-10</b>                   | NM_174088          | F: GTATCCACTTGCCAACCAGC            | 62                               | 105  |
|                                |                    | R: GTAAGCTGTGCAGTTGGTCC            | 62                               |  |
| <b>IL-17</b>                   | NM_001008412.2     | F: GCGAGACAAGTTCATCTGT             | 60                               | 100  |
|                                |                    | R: CCACCAGACTCAGAAGCAGT            | 62                               |  |
| <b><math>\beta</math>2M</b>    | NM_173893          | F: GTTCACTCCCAACAGCAAGG            | 62                               | 109  |
|                                |                    | R: TCTCGATGGTGCTGCTTACA            | 60                               |  |

<sup>a</sup> IFN- $\gamma$  = interferon-gamma, TNF- $\alpha$  = tumor nekrose faktor-alfa, IL = interleukin,  $\beta$ 2M = beta-2-microglobulin.

<sup>b</sup> F = fremover, R = revers. Primere ble designet for *Bos taurus* GCF\_002263795.1

<sup>c</sup> T<sub>m</sub> = Smeltetemperatur, oppgitt av Eurogentec.

<sup>d</sup> bp = basepar

### 2.4.4 Gelelektroforese

Før qPCR-analyse ble gelelektroforese utført for å kontrollere at produkter av rett størrelse ble amplifisert ved bruk av primerne. Kjøringer som ga tydelige bånd av forventet størrelse ble klassifisert som vellykkede PCR-reaksjoner, mens der det ikke var tydelige bånd ble det antatt ikke-fungerende PCR-reaksjoner (Oliveira et al., 2017). Ved ikke-fungerende reaksjoner ble det forsøkt laget nye primere for samme gen.

PCR ble utført ved bruk av KAPA HiFi HotStart ReadyMix kit (KAPA Biosystems) og instrumentet T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA). **Tabell 2-9** viser volum per reaksjon av de ulike komponentene for PCRen, og **Tabell 2-10** viser temperaturer, varighet og antall sykluser. I negative kontroller ble nukleasefritt vann tilsatt istedenfor cDNA.

**Tabell 2-9 Reagenser for PCR.** Volum av reagenser og primere benyttet for PCR (primere i **Tabell 2-7** og **2-8**).

| Reagenser                      | Volum/reaksjon (µL) |
|--------------------------------|---------------------|
| Nukleasefritt vann             | 10                  |
| 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix | 12,5                |
| 10 µM fremover primer          | 0,75                |
| 10 µM revers primer            | 0,75                |
| 20 µg/mL templat DNA (cDNA)    | 1                   |
| <b>Totalt volum</b>            | <b>25</b>           |

**Tabell 2-10 PCR-protokoll.** Varighet, temperatur og antall sykluser for hvert steg.

| Steg                   | Temperatur (°C) | Varlighet | Antall sykluser |
|------------------------|-----------------|-----------|-----------------|
| <b>Aktivering</b>      | 95              | 3 min     | 1               |
| <b>Denaturering</b>    | 98              | 20 sek    |                 |
| <b>Hybridisering</b>   | 60              | 15 sek    | 35              |
| <b>Elongering</b>      | 72              | 20 sek    |                 |
| <b>Sluttelongering</b> | 72              | 1 min     | 1               |
| <b>Hold</b>            | 4               | ∞         | 1               |

Agarosegel 2 % (w/v) ble laget ved å tilsette Agarose I™ (VWR) og GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) til 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer. 1X TBE buffer ble også benyttet i gelelektroforesekaret. PCR-produkt ble blandet med 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific), før 10 µL ble applisert i brønnene på gelen. Gelen ble kjørt på 110 volt i 1 time. For å kunne anslå PCR-produktenes størrelse ble det tilsatt 3 µL GeneRuler 100 bp / 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific) i egne brønner i gelen. Gelen ble så visualisert ved bruk av Azure c150 Gel Imaging System (Azure Biosystems).

Nukleinsyrer har negativt ladete fosfatgrupper, og vil derfor vandre fra negativ til positiv pol i gelelektroforesekaret. Porene i agarosegelen gjør at fragmentene som vandrer i gelen møter motstand og separeres etter størrelse, korte fragmenter vandrer langt og store vandrer kortere (Oliveira et al., 2017).

### 2.4.5 Kvantifikasjon av mRNA ved sanntids-PCR (qPCR)

qPCR for deteksjon av cytokinene IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  ble utført med primerne beskrevet i **Tabell 2-7** og **2-8**.  $\beta$ 2M ble brukt som referansegene.

SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) og instrumentet CFX96 Touch Real-Time PCR system (Bio-Rad) ble benyttet for qPCR. Reaksjonsmiks for qPCR ble laget (**Tabell 2-11**). Vi fant optimal konsentrasjon av templat cDNA ved å utføre qPCR på cDNA i ulike fortyninger (ufortynnet, 1:5 og 1:10). Den konsentrasjonen som ga verdi for et antall kvantifikasjonssykluser ( $C_q$ ) innenfor området for deteksjon, ble benyttet under øvrige kjøring av qPCR. Oppsett for qPCR ble laget Bio-Rad CFX Manager 3.1. Temperaturer, varighet og antallet sykluser er vist i **Tabell 2-12**.

Reaksjonsmiks ble blandet godt før rett volum ble overført i 96-brønners brett og cDNA-templat ble deretter tilsatt. Videre ble platen forseglet med transparent film ved hjelp av PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad), ristet i 30 sek på en IKA MS3 Mini-shaker (Millipore Sigma) og spunnet på en PCR-plate-spinner (VWR) for å samle reaksjonsmiks med templat i bunnen av brønnen.



**Tabell 2-11 Reaksjonsmiks for sanntids-PCR (qPCR).** Templat var cDNA, RNase fritt vann ble brukt som negativ kontroll.

| Reagenser  | Volum/reaksjon (µL) |
|--|---------------------|
| <b>Reaksjonsmiks</b>                                 |                     |
| 2x Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix | 10,0                |
| Fremover primer, 10 µM                               | 0,5                 |
| Revers primer, 10 µM                                 | 0,5                 |
| RNase-fritt vann                                     | 7                   |
| <b>Templat</b>                                       |                     |
| cDNA (fortynnet 1:5)                                 | 2                   |
| <b>Totalt reaksjonsvolum</b>                         | <b>20</b>           |

**Tabell 2-12 Protokoll for sanntids-PCR (qPCR).** Protokollen viser temperatur, varighet og antall sykluser.

| Steg                              | Temperatur (°C)   | Varlighet                | Antall sykluser |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------|
| <b>Aktivering</b>                 | 95                | 30 sek                   | 1               |
| <b>Denaturering</b>               | 95                | 15 sek                   |                 |
| <b>Hybridisering</b>              | 60                | 30 sek                   | 40              |
| <b>Elongering</b>                 | 55                | 5 sek                    |                 |
| <b>Generering av smeltekurve:</b> | Øke fra 55 til 95 | Øke med 0,5 °C per 5 sek |                 |

### 2.4.6 PCR-effektivitet

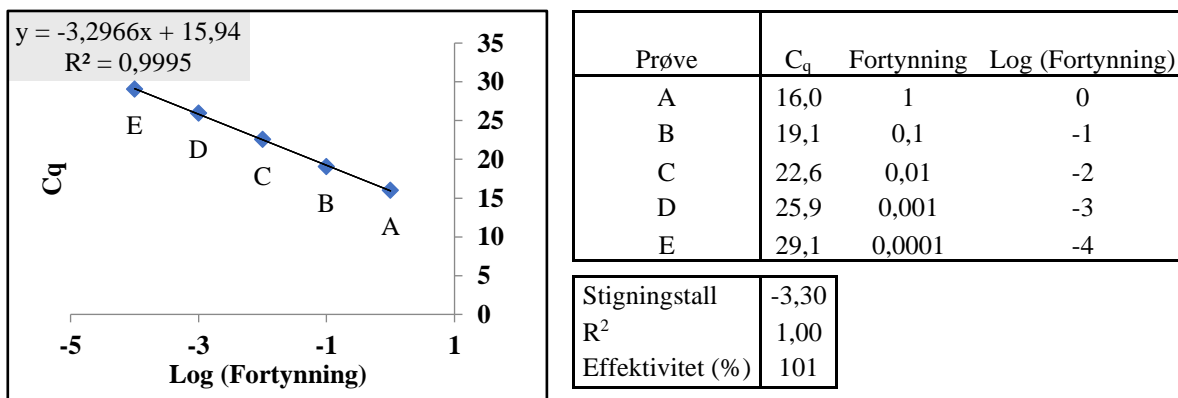
I teorien skal det skje en dobling av amplifiserte produkter for hver PCR-syklus. PCR-effektivitet (E) er definert som fraksjonen målmolekyler som kopieres i en PCR-syklus, og oppgis ofte i prosent (Alvarez et al., 2007). Måling av E er en essensiell del av kvalitetsvurderingen av en PCR. Det tilstrebes en E på 90-110 % (Alvarez et al., 2007). Dersom antallet templatmolekyler mer enn dobles, vil dette gi en  $E > 100\%$ , og dersom antallet templatmer ikke dobles, vil det gi  $E < 100\%$ . PCR-effektivitet avhenger av en rekke faktorer slik som primernes og templatenes sekvens og struktur, prøvematriks (og eventuelle rester fra tidligere steg i prosesseringen), reagensenes konsentrasjoner og konkurrerende reaksjoner (Svec et al., 2015). For høy E kan komme av at ikke-spesifikke produkter amplifiseres. Dette kan kontrolleres ved å analysere PCR-produkter på gel (Alvarez et al., 2007) eller ved

sekvensering. Optimalisering av reaksjonsbetingelsene, som hybridiseringstemperatur, kan øke E. Ved lav E må redesign av primere vurderes.

E ble beregnet ut fra stigningstallet til en lineær trendlinje (standardkurve) basert på punkter der C<sub>q</sub>-verdier ble plottet mot logaritmen av fortynnet templat. C<sub>q</sub>-verdien beskriver det antallet sykluser som må kjøres for at mengden templat skal nå et visst nivå. C<sub>q</sub>-verdier ble funnet ved å utføre qPCR på seriefortynnet templat: Ufortynnet, og fortynningene 1:5, 1:10, 1:100 og 1:1000, hvor alle reaksjoner ble utført i duplikat. Beregninger ble utført i Microsoft Office Excel (**Figur 2-4**). Stigningstallet for denne trendlinjen brukes i beregning av E (%) etter formelen:  $E (\%) = (10^{-(1/\text{stigningstall})} - 1) * 100$  (Kubista et al., 2006). Stigningstallet ble hentet ut fra likningen som beskriver den lineære trendlinjen generert etter punktene A-E.

Et plott av C<sub>q</sub> mot logaritmen av målkonsentrasjon forventes å være lineær og med negativt stigningstall. For en 10-fortynningsserie er E = 100 % når stigningstallet for trendlinjen er -3,33 (Svec et al., 2015). Dette forutsetter en dobling av templatmolekyler under hver PCR-syklus.

Kvadrert korrelasjonskoeffisient (R<sup>2</sup>) er et mål på hvor godt datapunktene passer til standardkurven. R<sup>2</sup> reflekterer lineariteten av standardkurven og skal ideelt være 1 (Life Technologies Corp., 2012). Funksjonen R<sup>2</sup> i Excel returnerer R<sup>2</sup> for den trendlinjen beskrevet tidligere. R<sup>2</sup>-verdien kan tolkes som andelen varians i C<sub>q</sub> som kan tilskrives variansen i logaritmen av fortynningsgraden.



**Figur 2-4 Eksempel på hvordan beregne PCR-effektivitet (E) i Microsoft Office Excel.** Gjennomsnittlige C<sub>q</sub>-verdier skaffes ved å utføre qPCR på seriefortynnet templat (Prøve A – E). C<sub>q</sub>-verdi plottes mot logaritmen av aktuell fortynning, og det trekkes en lineær trendlinje basert på disse punktene. Trendlinjens stigningstall benyttes for å regne ut E (%). Kvadrert korrelasjonskoeffisient (R<sup>2</sup>) fås ved å bruke funksjonen R<sup>2</sup> over C<sub>q</sub>-verdier og Log(Fortynning).

### 2.4.7 Sekvensering

PCR-produkter for cytokinene IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ , for rein og storfe, ble sendt til sekvensering for å kontrollere at primerne benyttet til PCR amplifiserte rett genfragment. Sangersekvensering (Sanger et al., 1977) ble utført ved VIs Seksjon for molekylærbiologi. Det ble kun gjort et forsøk for sekvensering av PCR-produkt for hvert av cytokinene, grunnet tidsbegrensning og økonomi. De valgte PCR-produktene var de som viste tydelig bånd av rett størrelse ved gelelektroforese, og hadde blitt brukt for å beregne E.

Resultater av sekvensering, ble i form av det som kalles *reads*, analysert i programmet Sequencher™ 5.4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA). Sekvenser for referansegene og primere ble lagt manuelt inn i programmet, før de ble sammenstilt mot *reads* i *contigs*. I bioinformatikk er et *contig* overlappende *reads* som er skjøtet sammen til én eller flere sammenhengende sekvenser med eller uten bruk av et referansegen (Degnes, 2019). Output ved Sangersekvensering er kromatogrammer, og ved dårlig kvalitet i 3' og 5'-enden, ble disse trimmet. Trimmede *reads* med kvalitet minimum 50 % og lengde minst 30 bp ble inkludert i analysen. Sammenstillingen ble utført med minimum match på 90 % og minimum overlapp på 20 bp (da primerne er av denne lengden), resterende innstillinger var forhåndsinnstilte.

### 2.4.8 Beregning av genekspresjon

Cytokin-mRNA ble analysert ved qPCR, og videre ble relativt genuttrykk beregnet ved bruk av  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden som beskrevet av Livak og Schmittgen (2001). Denne metoden er egnet for å analysere forandringer i genekspresjon i forhold til et referansegen. Siden  $C_q$  er eksponentiell og ikke lineær, bør statistiske presentasjoner av «rå»  $C_q$  verdier unngås, noe det gjøres ved denne metoden.  $\Delta C_q$ -verdier viser forskjellen i  $C_q$ -verdier mellom genet som skal analyseres og et referansegen, som ikke påvirkes av stimuleringene i forsøket (Livak & Schmittgen, 2001).

For hvert individ ble relativ ekspresjon for hvert av cytokinene beregnet ved å bruke  $C_q$ -verdier for cytokiner og internkontroll (referansegenet  $\beta 2M$  fra ustimulerte celler). Forskjellen i  $C_q$  for målgene og referansegenet gir  $\Delta C_q$ .  $\Delta C_q$  for hvert målgene ble så subtrahert fra  $\Delta C_q$  for internkontroll, denne forskjellen kalles  $\Delta\Delta C_q$ -verdi. Videre beregnes økningen av målgene etter stimulering relativt til referansegenet ved å bruke formelen  $E^{-\Delta\Delta C_q}$ , hvor E er verdien 2 (PCR-effektivitet på 1 (E = 100 %) +1). Alle prøvene får en verdi som sier om og hvor mye

transkripsjonen av de ulike genene øker, eller forblir den samme, etter stimulering gitt som en n-fold forskjell fra ustimulert prøve (Harrington et al., 2006).

Databehandling for qPCR ble utført i Excel og figurer ble laget i GraphPad. Relative nivåer av mRNA oppgis i mRNA fold change med gjennomsnitt  $\pm$  SD.

## 2.5 Kulebasert multipleks analyse av cytokiner

Konsentrasjon av cytokinene IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  ble målt simultant ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1.

### 2.5.1 Preparering av reagenser og validering før analyse

Serumprøver og supernatant fra cellekultur ble analysert i separate oppsett. Disse løsningene har ulik sammensetning og mulige ulike forstyrrende matrikseffekt. Det ble brukt 25  $\mu$ L prøvemateriale/brønn, enten 1:2 fortennet serum eller ufortynnet cellesupernatant. Serumprøver ble applisert i tekniske duplikater, mens cellesupernatanter ble applisert i biologiske duplikater.

Serumprøvene ble tint ved romtemperatur, vortexet og sentrifugert (5 min, 2000 rpm, 5 °C) for å fjerne større partikler, før de ble fortennet 1:2 i Assay buffer. Fortynningen forgikk ved at like volum Assay buffer og serum ble blandet godt. Når serum benyttes som prøvemateriale tilsettes røret som inneholder lysert Serum Matrix 1 mL deionisert vann. Dette ble blandet godt og fikk stå i minst 10 min før bruk. Cellesupernatanter ble tint ved romtemperatur og vendt flere ganger, før de ble sentrifugert.

Det ble brukt magnetkuler som kom fra produsent i individuelle rør for hvert cytokin (ikke forhåndsblandede kuler). Disse ble sonikert (Ultrasonic bath, Grant) i 30 sek før de ble vortexet i 1 min. Mixing Bottle tilhørende kittet, ble tilsatt 60  $\mu$ L av hver av de 6 ulike løste magnetkulene, før 2640  $\mu$ L Assay Buffer ble tilsatt slik at sluttvolumet ble 3000  $\mu$ L, og blandingen ble vortexet.

To kvalitetskontroller følger med i kittet; en høy og en lav. Hver av disse ble tilsatt 250  $\mu$ L deionisert vann, vendt noen ganger og vortexet, og sto på benken i 5-10 min før bruk.

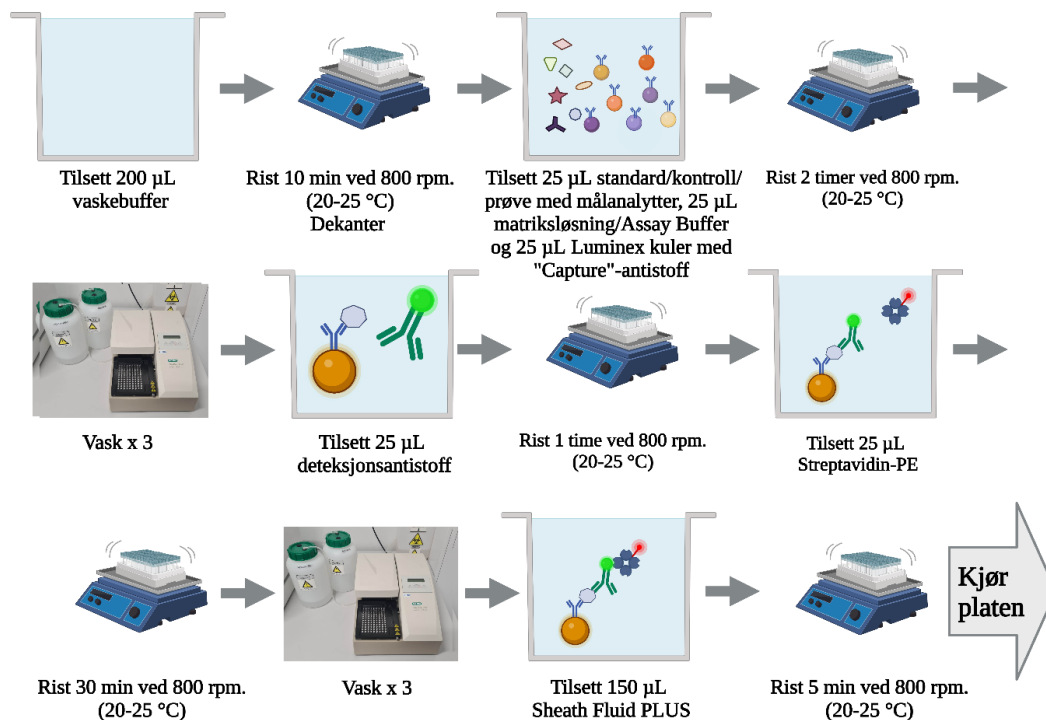
Standarder ble laget ved å løse *Bovine Cyokine/Chemokine Panel 1 Standard* i 250  $\mu\text{L}$  deionisert vann til en stockløsning. Dette røret ble vendt flere ganger, vortexet i 10 sek. Hetteglasset stod så i 5-10 min før løsningen ble brukt til å lage fortynningsrekke. Stockløsningen, Standard 7, brukes som utgangspunkt for de andre standardene.

Bio-Plex 200 systemet må gjennomgå kalibrering og validering før oppsett med prøver kan kjøres. Kalibrering gjøres hver gang prøver kjøres, mens validering gjøres jevnlig. Disse prosedyrene utføres ved å bruke Bio-Plex Calibration Kit og Bio-Plex Validation Kit 4.0, begge fra Bio-Rad. Kittene brukes sammen med Bio-Plex Manager software og en plate med brønner tilpasset dette formålet (Bio-Plex MCV plate IV).

Bio-Plex Calibration Kit inneholder to ulike sett med kuler; Cal1 og Cal2. Disse kulene har stabile fluoriserende signaler, og standardiserer signalene fra dag til dag og fra instrument til instrument (Bio-Rad, u.å.).

## 2.5.2 Utførelse av kulebasert multipleks cytokinanalyse

En oversikt over stegene involvert i utførelsen av kulebasert multipleks cytokinanalyse er vist i **Figur 2-5**.



**Figur 2-5** Oversikt over prosedyre for kulebasert multipleks analyse. Preparering av 96-brønners Brett for kulebasert multipleks cytokinanalyse. Figuren er laget i BioRender.com.

I denne studien ble det analysert prøver på fire 96-brønners brett (Bio-Plex Pro™ Flat Bottom Plate, Bio-Rad), i tillegg til to plater under pilotprosjektet; en med storfeprøver (Plate nr. I) og en med prøver fra rein (Plate nr. II). Tre kjøringar ble utført på supernatant (Plate III-V) og en plate ble utført på serumprøver (Plate VI). Hvilke individer som er inkludert på samme plate under multipleks analyse er vist i **Tabell G-1, Vedlegg G**.

Alle reagenser ble romtemperert (20-25 °C) før bruk. Plateristeren MixMate (Eppendorf) ble benyttet ved 800 rpm i romtemperatur ved all inkubering. Instrumentet Bio-Plex™ Pro Wash Station (Bio-Rad) ble brukt til å vaske kulene etter prosedyren fra produsent (Bio-Plex Pro Wash Stations Quick guide). Prøver ble organisert i 96-brønners brett etter produsentens protokoll. 96-brønners brettet som ble benyttet var Bio-Plex Pro™ Flat Bottom Plate (Bio-Rad).

Først ble alle brønner tilsatt 200 µL vaskebuffer og inkubert på platerister i 10 min. Etter dette ble bufferen dekantert, og for å fjerne rester ble platen dunket forsiktig mot absorberende papir. Videre ble 25 µL 0 pg/mL bakgrunn (Assay Buffer), standarder og kvalitetskontroller tilsatt sine respektive brønner i duplikat. Deretter ble det i de samme brønnene tilsatt 25 µL av passende matriksløsning, det ble brukt ulik matriksløsning ved analyse av serumprøver og supernatant. Ved analyse av serumprøver ble det benyttet Serum Matrix fra kittet, og ved analyse av celledsupernatant ble det benyttet RPMI + 10 % FBS. Til brønner tiltenkt prøver ble det tilsatt 25 µL Assay Buffer og 25 µL celledsupernatant eller 1:2 fortynt serum. Videre ble 25 µL magnetkuler tilsatt brønnene, før platen ble forseglet, dekket med lystett lokk og inkubert på platerister i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble platen vasket tre ganger, før 25 µL deteksjonsantistoff ble tilsatt hver av brønnene. Etter 1 time inkubering på platerister, ble 25 µL streptavidin-PE tilsatt brønnene. Igjen ble platen forseglet, dekket med lystett lokk og inkubert i 30 min på platerister. Platen gjennomgikk tre vasker før 150 µL Sheath Fluid PLUS ble tilsatt i alle brønner. Rett før innkjøring av platen, ble den ristet 5 min for å resuspendere kulene.

Platene ble avlest ved bruk av Bio-Plex™ 200 System med med high-throughput fluidics (HTF, Bio-Rad) (**Figur 2-6**). Dette er et system der avlesningen er basert på samme prinsipper som flow-cytometri (Dunbar & Li, 2010).



**Figur 2-6** Avlesningsinstrument benyttet for kulebasert multipleks cytokinanalyse. Bio-Plex™ 200 System og Bio-Plex™ HTF (Bio-Rad). Foto: Tuva Løken Frøvoll

### 2.5.3 Håndtering av data fra kulebasert multipleks cytokinanalyse

I BioPlex Manager 6.2 software (Bio-Rad) ble rådata for standarder, Assay Buffer + matriksløsning (heretter *bakgrunn*), kvalitetskontroller og øvrige prøver kontrollert, før de ble eksportert til Excel.

Standardkurven brukes for å konvertere fluorescensintensitet (FI) til konsentrasjon oppgitt i pg/mL, og det er derfor viktig at denne kurven er optimal. Standarder optimaliseres og kontrolleres automatisk av programmet, men ble også kontrollert og justert manuelt. Det ble kontrollert at målte verdier for punkter brukt for å generere standardkurven lå i et 70-130 %-intervall fra forventet verdi ved å se på verdier i kolonnen som viser [observert konsentrasjon/forventet konsentrasjon]  $\times 100$  ((Obs/Exp)\*100). Ved behov ekskluderes den ene eller begge av duplikatene for å få punktene i normalkurven til å være innenfor dette intervallet. Øvre (ULOQ) og nedre (LLOQ) grense for kvantifisering avhenger av standardkurven. Konsentrasjoner innenfor standardkurvens kvantifiseringsområde oppgis som *Conc in Range*. Bio-Plex Manager oppgir verdier som måles høyere eller lavere enn dekningsområdet til standardkurven som out of range (OOR).

Kvalitetskontrollene ble kontrollert ved å se at målte konsentrasjoner var innenfor forventede referanseverdier. Det ble også kontrollert at bakgrunnen hadde lav FI. Analysens presisjon ble kontrollert ved variasjonskoeffisient (CV). Grense for % CV ble satt til 30 % (Millipore Sigma, 2017). I tilfeller der  $\%CV \geq 30\%$  for to biologiske eller tekniske paralleller, ble begge parallellene eller den parallellen som var OOR ekskludert.

Etter validering, ble rådata fra Bio-Plex Manager eksportert til Excel og videre dataanalyse ble utført ved å bruke GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA) for grafisk presentasjon. Ved konsentrasjoner OOR ble verdi for ULOQ eller LLOQ satt inn, og dette er markert i figurene. Enkelte prøver ble kjørt to ganger på separate plater, for å undersøke metodens repeterbarhet. For dette ble det brukt FI-verdier, før outliers var fjernet, og %CV ble beregnet mellom de samme prøvene på ulike brett [%CV = standardavvik (SD)/gjennomsnittet x 100 (%)] og oppgis i median.

## 2.6 Statistiske analyser

Alle statistiske analyser ble utført i R versjon 3.6.1 (R Core Team, 2019). Det ble kartlagt hvilke mitogenstimuleringer som ga signifikant endret cytokinproduksjon. Terskel for signifikans var som standard satt til  $P < 0.05$ . Grad av signifikans ble oppgitt ved asteriske symboler: ‘\*\*\*\*’:  $P < 0,001$ , ‘\*\*\*’:  $P < 0,01$ , ‘\*’:  $P < 0,05$ . Ikke signifikant forskjell ble oppgitt med *ns* og den nøyaktige P-verdien ble ført opp i parentes.

I den vanlige formen for lineær regresjon antas det at dataene er uavhengige og normalfordelte. Skjevfordelte data som har medianen lavere enn gjennomsnittet kan modelleres ved hjelp av gammafordeling. Gammafordelingen er fleksibel og egner seg for positive tall (reelle tall større enn null). Det ble kontrollert om dataene var normalfordelte eller skjevfordelte ved å lage boxplott med median. Disse plottene ble kun brukt til å få oversikt over fordelingen av data og er ikke presentert i denne oppgaven. Alle tester ble utført ved å bruke en generalisert lineær modell (*glm*) med gammafordeling og log-link, fordi cytokinkonsentrasjonene generelt viste seg å være skjevfordelte. For å teste om det var signifikante endringer i prøver stimulert med PMA-I i 6 og 24 timer ble det kjørt regresjoner med henholdsvis ustimulerte prøver ved 6 eller 24 timer som referanseverdi. Regresjonene ble kjørt for hvert cytokin og for rein og storfe separat.

Tilsvarende analyser ble kjørt for å sjekke signifikante effekter mellom PHA, ConA, SEB og PMW-stimulerte PBMC i forhold til ustimulert PBMC etter 24 timer.

Samme analyse ble også kjørt for å sjekke eventuelle signifikante effekter av dager etter inokulering med henholdsvis ORFV eller CvHV2. Verdier for FI ble benyttet til denne analysen.



For prøver stimulert med PMA-I i 6 og 24 timer ble også signifikant endring etter mitogenstimulering kartlagt visuelt ved bruk av *ggplot* (Wickham, 2016). Dette ble gjort for å sikre at *glm*-modellen var satt opp rett. Dette ble også gjort i R. For å tydelig få frem forskjellene, ble konsentrasjonsverdier log-transformert. I disse plottene ble predikert gjennomsnitt med 95 % konfidensintervall og punkter for individuelle verdier vist. Forskjellen er signifikant når to konfidensintervaller ikke overlapper. For prøver stimulert med PMA-I i 6 og 24 timer ble det kontrollert at signifikans funnet ved *ggplot* og *glm* samsvarte. For øvrige datasett ble signifikans kun beregnet ved bruk av *glm*.

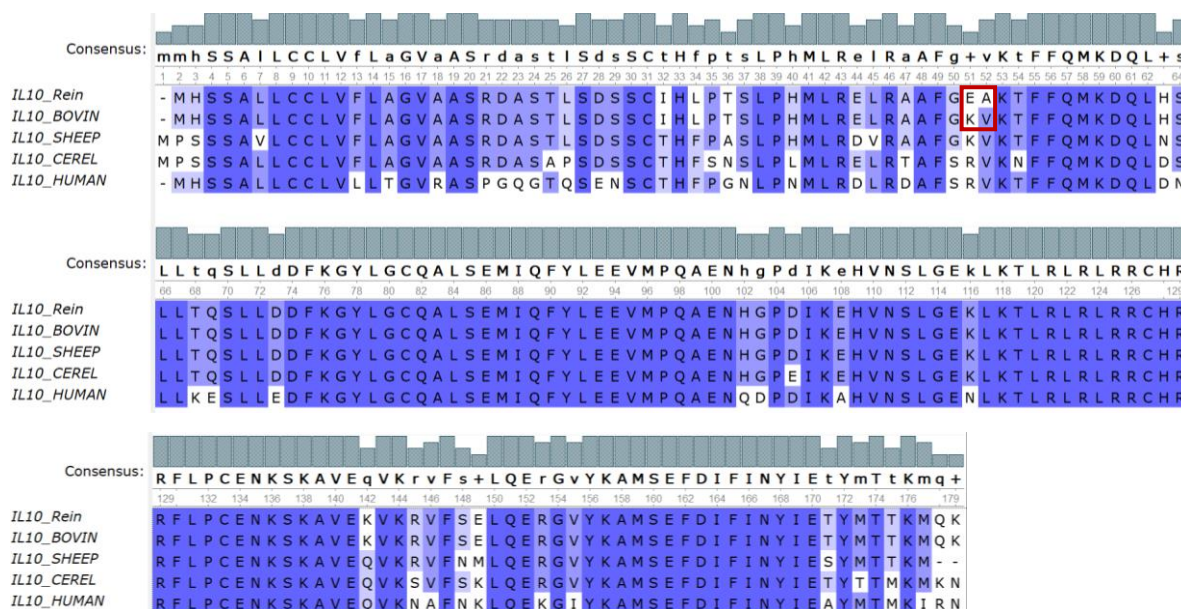
### 3 RESULTATER

Det ble laget figurer som viser gjennomsnitt og standardavvik, og utført statistiske analyser på tross at det kun var få individer som inngikk.

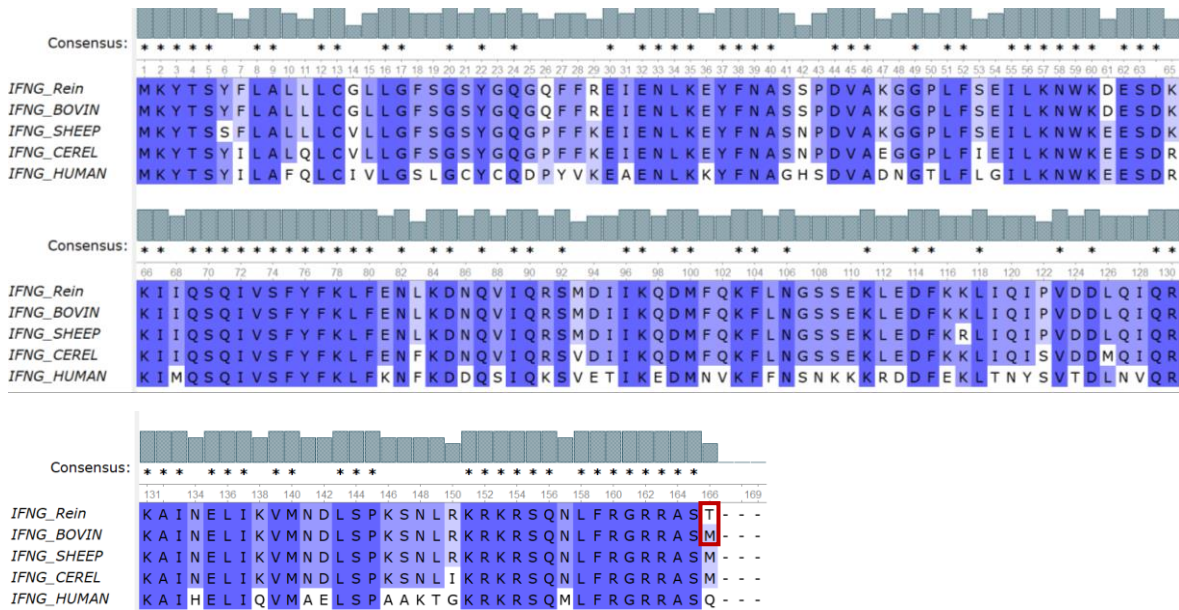
#### 3.1 Multipel sammenstilling og fylogeni for cytokinsekvenser

MSA og fylogeni indikerer høy homologi for aminosyresekvenser fra storfe og rein. MSA for aminosyrerekkefølgene i cytokinene fra rein, storfe, sau, hjort og menneske oppsummerer hvilke områder som er konservert på tvers av arter, og viste at sekvensene for IL-6, IL-8, IL-17 og TNF- $\alpha$  var like for rein og storfe. Videre viste MSA at rein og storfe har ulike aminosyreresiduer i posisjon 51-52 i IL-10 og 166 i IFN- $\gamma$ . MSA for disse to cytokinene er vist **Figur 3-1**, de resterende MSA-resultatene er vist i **Vedlegg D**. I posisjon 51-52 har IL-10 fra rein aminosyreresiduen glutaminsyre (E, Glu) – alanin (A, Ala) og storfe lysin (K, Lys)-valin (V, Val) (**Figur 3-1A**), mens i posisjon 166 har INF- $\gamma$  fra rein treonin (T, Thr) og storfe metionin (M, Met) (**Figur 3-1B**).

##### A: IL-10

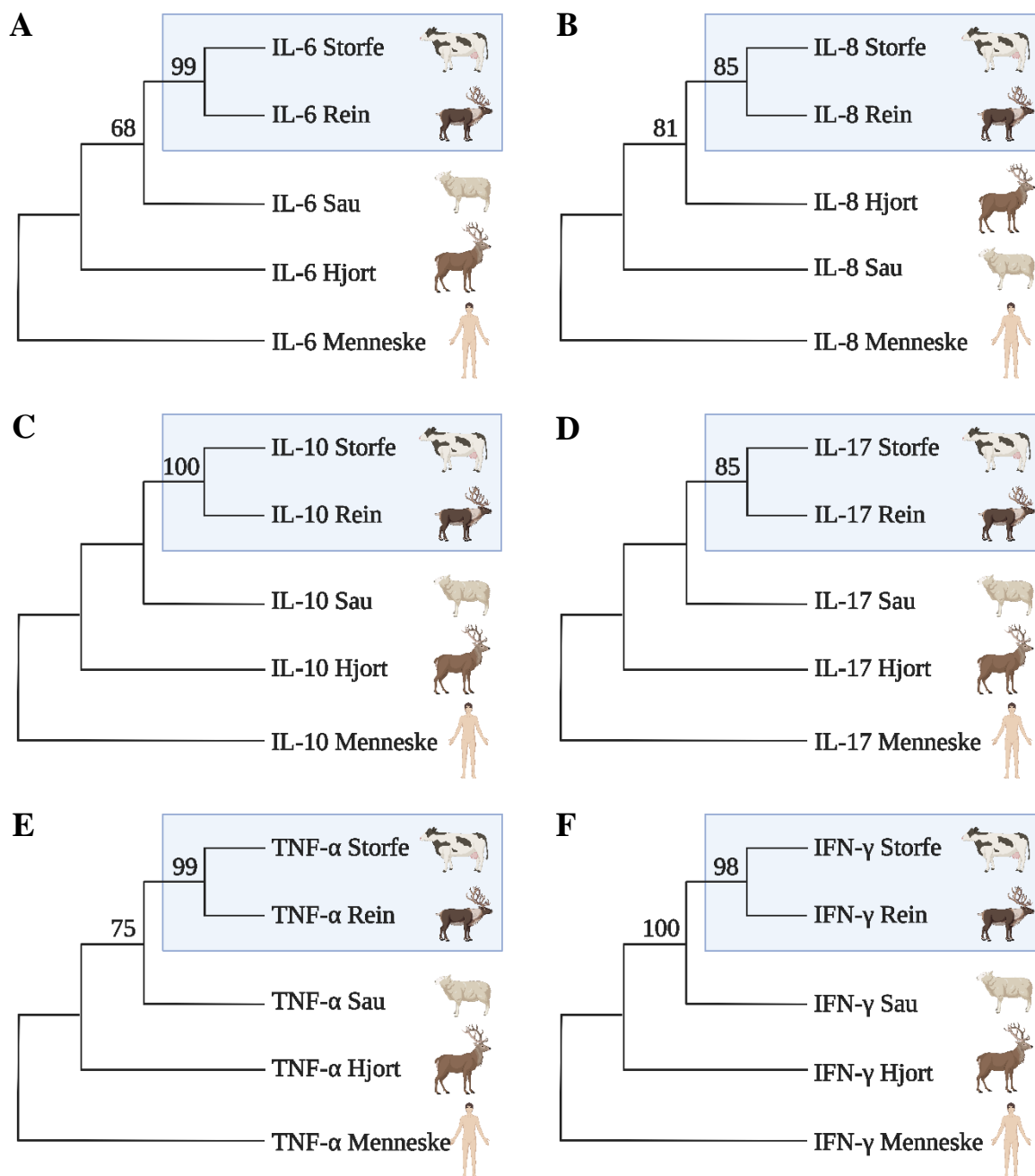


**B: IFN-γ**



**Figur 3-1** Multippel sammenstilling (MSA) for cytokinene IL-10 og IFN-γ. MSA ble utført for sekvenser fra rein, storfe (\*\_BOVIN), sau (\*\_SHEEP), hjort (\*\_CEREL) og menneske (\*\_HUMAN). Mørk blå farge indikerer samme, konserverte aminosyreresiduer for alle artene. Lysere farge indikerer at det er ulike residuer i den bestemte posisjonen for noen av artene, og hvit farge indikerer at en residu skiller seg fra de andre hos denne arten. Forskjeller i sekvens mellom rein og storfe er i tillegg markert med rød firkant (**□**). (A) MSA for IL-10 viste at rein og storfe hadde ulike residuer i posisjon 51-52, mens (B) MSA for IFN-γ viste forskjellige residuer hos disse to artene i posisjon 166.

Fylogenetiske trær ble generert ved bootstrap. Aminosyresekvenser for cytokinene fra storfe og rein har størst likhet, mens cytokinene fra menneske er minst lik de øvrige artene. **Figur 3-1** viser IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF-α og IFN-γ fra rein, storfe, sau, hjort og menneske. Dersom det ikke er oppgitt en verdi, betyr det at de samme forgreningene forekom mindre enn 60 % av gangene.

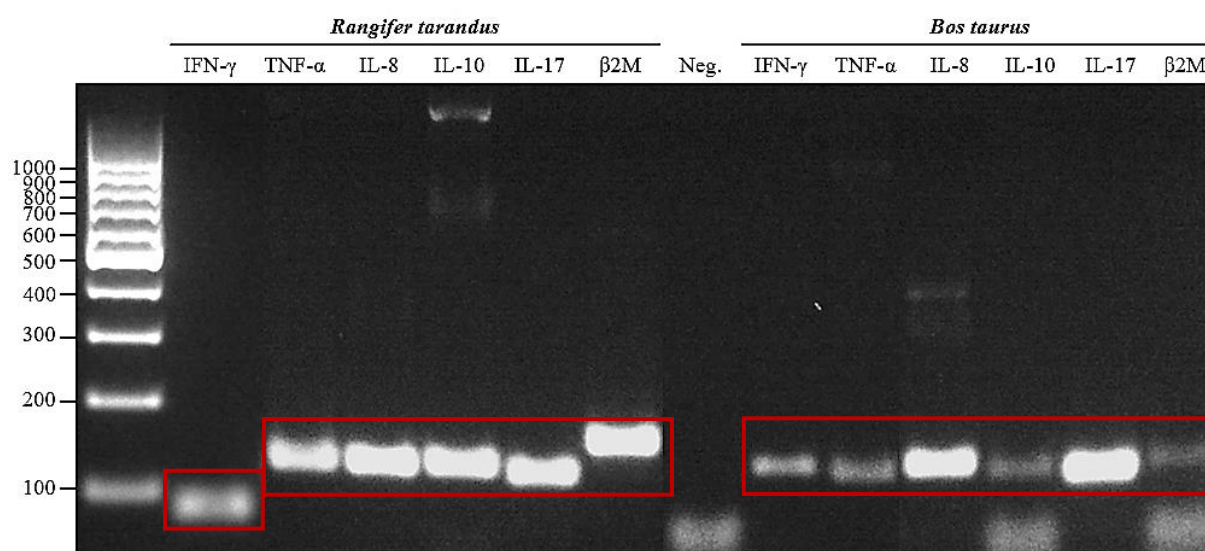


**Figur 3-2. Fylogenetiske trær basert aminosyresekvenser for utvalgte cytokiner.** (A-F) Trærne er basert på aminosyresekvenser hentet fra Uniprot for IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  for storfe, rein, sau, hjort og menneske. Analysen viser at aminosyresekvenser for storfe og rein har størst likhet. Blå ramme viser plassering av storfe og rein. Ved siden av forgreningene vises prosent av replikater som ble clustret sammen ved bruk av bootstrap. Bootstrap-verdier < 50 er ikke vist. De fylogenetiske trærne ble generert i MEGA X, og modifisert i BioRender.com.

### 3.2 Cytokinspesifikke primere

Forventet produktstørrelse av PCR-produkter for IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  og  $\beta$ 2M er 98 til 120 bp for begge arter. Gelelektroforese av PCR-produkter for rein og storfe ga bånd av forventet produktstørrelse for alle cytokiner (**Figur 3-3**). Med unntak av IL-8 og IL-17, var båndene gjennomgående klarere for rein enn storfe, noe som indikerer en høyere mengde PCR-produkt.

Primere for IL-6 til rein (**Tabell J-1, Vedlegg J**) ble forkastet da de ikke så ut til å fungere, siden de amplifiserte uspesifikke PCR-produkter (**Figur J-1, Vedlegg J**). Heller ikke for storfe ble også primere for IL-6 inkludert siden gelen viste kun et svakt bånd (**Figur J-2, Vedlegg J**). Det ble heller ikke forsøkt designet nye primere for dette cytokinet, da multipleks analyse viste lave nivåer. «Skyggene» av produkt nedenfor rød firkant kan være primer-dimer.



**Figur 3-3 Gelelektroforese av PCR-produkter for rein (*Rangifer tarandus*) og storfe (*Bos taurus*).** Det er benyttet egne primere til de to artene (**Tabell 2-7** og **Tabell 2-8**). cDNA var laget fra PBMC stimulert med PMA-I i 24 timer (Rein 9 og Storfe 9). Nukleasefritt vann ble benyttet istedenfor cDNA i negative kontrollprøver (Neg.). Ladder: 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Rød firkant (□) markerer bånd av forventet produktstørrelse.

PCR-effektivitet ble testet en gang per primerpar, med duplikater av de ulike fortynningene. Templat cDNA var fra Rein 9 og Storfe 9, og begge prøver var PMA-I stimulert i 24 timer.  $R^2$ -verdier for rein er 0,99 til 1,00, noe som indikerer god linearitet mellom punktene brukt for å generere lineær regresjonslinje. PCR-effektiviteten var for rein 99-107 %, og innenfor optimalt intervall (90-110 %).  $R^2$ -verdier for storfe indikerte for flere av cytokinene lavere grad av

linearitet mellom punktene, og PCR-effektiviteten for storfecytokiner var innenfor optimalt intervall for  $\beta$ 2M og IFN- $\gamma$ , men for lav for TNF- $\alpha$  (76 %), IL-8 (87 %), IL-10 og IL-17 (89 %) (**Tabell 3-1**). Smeltekurvene viste for det meste en enkelt topp, men for TNF- $\alpha$  for storfe og IL-17 for rein var det antydning til også en mindre topp (**Vedlegg E**).

**Tabell 3-1 PCR-effektivitet.** Kvadrert korrelasjonskoeffisient ( $R^2$ ) og PCR-effektivitet (E) (%) for utvalgte cytokiner og referansegen til rein (*Rangifer tarandus tarandus*) og storfe (*Bos taurus*). For hver av artene er det benyttet egne primere.

| Målgen <sup>a</sup> | Art                   | $R^2$ | E (%) |
|---------------------|-----------------------|-------|-------|
| IFN- $\gamma$       | <i>R. t. tarandus</i> | 1,00  | 101   |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,97  | 95    |
| TNF- $\alpha$       | <i>R. t. tarandus</i> | 1,00  | 100   |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,96  | 76    |
| IL-8                | <i>R. t. tarandus</i> | 0,99  | 105   |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,94  | 87    |
| IL-10               | <i>R. t. tarandus</i> | 1,00  | 107   |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,93  | 89    |
| IL-17               | <i>R. t. tarandus</i> | 1,00  | 100   |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,95  | 89    |
| $\beta$ 2M          | <i>R. t. tarandus</i> | 1,00  | 99    |
|                     | <i>Bos taurus</i>     | 0,97  | 94    |

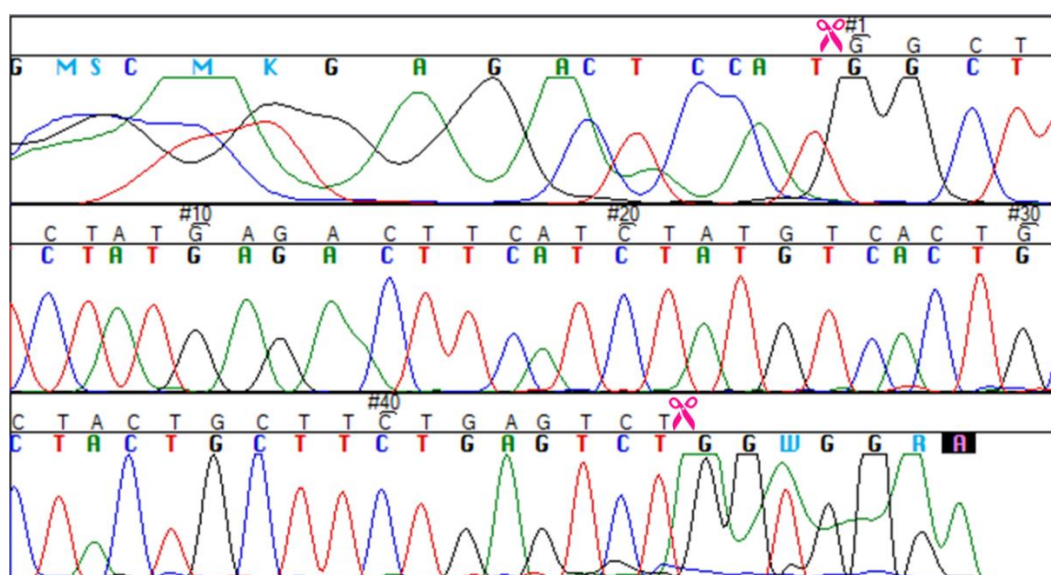
Gelelektroforese av PCR-produkt indikerte at primerne fungerte. PCR-produktene ble likevel sekvensert, da de fleste primerne ikke hadde vært brukt av andre tidligere. Kvaliteten og produktstørrelsen for ulike reads, basert på kromatogrammene genert ved Sangersekvensering, varierte mye. Sammenstillinger av reads mot referansesegen indikerer at primere for IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  og  $\beta$ 2M for rein og IL-8, IL-17 og IFN- $\gamma$  for storfe, amplifiserer rett PCR-produkt. Reads med minimum 90 % identitet mot referansesekvens over et område på minimum 20 bp er vist i **Tabell 3-2** og sammenstillingene er i **Vedlegg C**. Før sammenstilling ble alle reads trimmet, basert på kromatogrammet, for å fjerne delene som uklare og overlappende topper (eksempel vist i **Figur 3.4**).

Enkelte sekvenseringer var ikke vellykket, eller at de ga reads av for liten produktstørrelse og lav kvalitet for å kunne bli brukt til sammenstilling mot referanseggen. Manglende reads fra sekvensering kan derfor ikke brukes for verken å bekrefte, eller avkrefte, at primerne amplifiserer rett PCR-produkt.

**Figur 3-4** viser eksempel på kromatogram hvor endene er trimmet. For dette eksemplet økte trimming kvaliteten fra 67,7 til 81,6 %. Øvrige trimminger av reads er ikke vist.

**Tabell 3-2** Sekvenseringer av PCR-produkter som ga akseptable reads. Reads med minimum match 90 % identitet mellom mot referansesekvens over et område på minimum 20 bp. Reads ble trimmet til en kvalitet  $\geq 50$  % og produktstørrelse  $\geq 30$  bp. Alle disse readsene ga treff mot rett referanseggen ved sammenstilling.

| PCR-produkt |               | Revers                  |                                  | Fremover                |                                  |
|-------------|---------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Art         | Gen           | Kvalitet etter trim (%) | Produktstørrelse etter trim (bp) | Kvalitet etter trim (%) | Produktstørrelse etter trim (bp) |
| Rein        | IL-8          | 66,2                    | 71                               | 52,1                    | 73                               |
| Rein        | IL-10         | 69,0                    | 58                               | 69,2                    | 78                               |
| Rein        | IFN- $\gamma$ | 51,6                    | 31                               | -                       | -                                |
| Rein        | TNF- $\alpha$ | 75,5                    | 53                               | 63,0                    | 54                               |
| Rein        | $\beta$ 2M    | 88,8                    | 98                               | 81,6                    | 103                              |
| Storfe      | IL-8          | -                       | -                                | 75,4                    | 69                               |
| Storfe      | IL-17         | 74,5                    | 47                               | 80,9                    | 47                               |
| Storfe      | IFN- $\gamma$ | 68,3                    | 41                               | 64,9                    | 74                               |



**Figur 3-4** Eksempel på kromatogram fra Sangersequensering av PCR-produkt. Sekvenseringen er av PCR-produkt for  $\beta$ 2M fra rein. Sekvenseringen viser sekvens bak fremover primer. Denne sekvensen er trimmet (lokasjon markert med saks, ✂), noe som økte sekvensens kvalitet fra 67,7 til 81,6 %. Usikre baser er de som er angitt ved andre baser enn A, T, C og G. Den antatte nukleotidsekvens (5' til 3') strekker seg over alle tre linjene; fra venstre til høyre. 5' og 3' enden er trimmet vekk, siden det er uklare og overlappende topper med mye bakgrunnsstøy.

### 3.3 Deteksjon av cytokiner med kulebasert multipleks analyse og qPCR

#### 3.3.1 Utbytte av PBMC isolert fra blod og ekstraksjon av RNA

Det ble tappet 30-36 mL blod fra hvert dyr. Blodprøver tatt av rein i forbindelse med avlivning og som ble utsatt for kulde (Rein 1-4), var delvis koagulert da de ankom laboratoriet. Fra hvert av disse dyrene ble det isolert  $2-8 \times 10^6$  celler. Prøver av Rein 5 ble tatt ved avblødning, men skjermet for kulde. Dette blodet var noe mindre koagulert da det ankom laboratoriet, og  $12 \times 10^6$  celler ble isolert. Det ble isolert et mye høyere antall celler fra blodprøver tatt av levende dyr med ordinær blodprøvetaking, med henholdsvis  $33-110 \times 10^6$  celler fra rein (Rein 6-9) og  $40-103 \times 10^6$  fra storfe (Storfe 1-9). Blod tatt med ordinær prøvetaking og ikke eksponert for kulde, var ikke koagulert.

Ekstrahering av RNA fra mitogenstimulerte PBMC ga lavt utbytte for rein ved bruk av  $1$  og  $2 \times 10^6$  celler ( $17 \pm 14$  og  $19 \pm 14$   $\mu\text{g/mL}$ ). For rein 9 ble utbyttet bedre ved bruk av  $4 \times 10^6$  celler, og det ble da ekstrahert  $73$   $\mu\text{g/mL}$  RNA. Utbyttet av ekstrahert RNA var høyere for storfe, sammenlignet med rein. Antallet celler isolert fra storfe var ved bruk av  $1$ ,  $2$ , og  $4 \times 10^6$  celler  $31 \pm 20$ ,  $66 \pm 43$  og  $100 \pm 40$   $\mu\text{g/mL}$  (**Tabell G-1, Vedlegg G**). Ved de første RNA-ekstraksjonene var A260/280 noe utenfor forventede ratioer, og det ble derfor lagt inn et ekstra vasketrinn av cellepellet med PBS i prosedyren. Etter innføring av ekstra vasketrinn var verdier for A260/280 innenfor akseptable verdier, og indikerte at ekstrahert RNA var rent. Det kun ble gjort qPCR på blod tatt fra levende dyr hvor RNA-utbytte og renhet var akseptabelt.

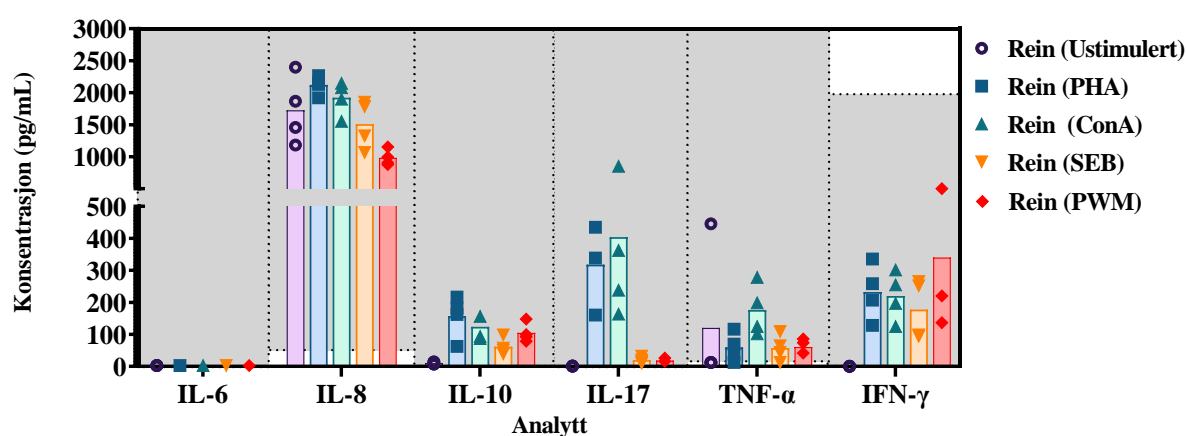
#### 3.3.2 Analyse av cellesupernatant fra pilotforsøk

Ved multipleks analyse av cellesupernatant fra rein under pilotforsøket var ikke standardkurven for IL-8 optimal (**Vedlegg H**). Standardkurven, som brukes for å konvertere FI til konsentrasjon, ble derfor importert i Bio-Plex Manager software fra tilsvarende multipleks analyse av cellesupernatant fra storfe. Disse storfeprøvene var også den del av pilotforsøket og analysekittet hadde samme partinummer. Før eksportering av denne kurven ble det kontrollert at øvrige standardkurver og kvalitetskontroller var innenfor forventende referanseverdier.



Pilotforsøket på rein detekterte alle cytokiner, unntatt IL-6 (**Figur 3-4**). For storfe var også IL-6 lavere enn for de andre cytokinene (**Figur 3-5**). Cytokinnivåene så gjennomgående ut til å være høyere i prøver fra storfe sammenlignet med rein, men det ble ikke utført statistisk analyse for å sammenligne rein og storfe. PHA, ConA, SEB og PWM ga signifikant ( $P < 0,01$  eller  $0,001$ ) økning av IL-10, IL-17 og IFN- $\gamma$  for rein og storfe. For rein ga ingen av stimuleringene signifikant økning av TNF- $\alpha$  eller IL-6, og kun PMW ga signifikant ( $P < 0,01$ ) endring av IL-8 (signifikant nedgang). Alle stimuleringer av PBMC fra storfe ga signifikant økning også av TNF- $\alpha$  og IL-8, mens IL-6 ikke økte signifikant ved noen stimuleringer (**Figur 3-5B** og **3-6B**).

A

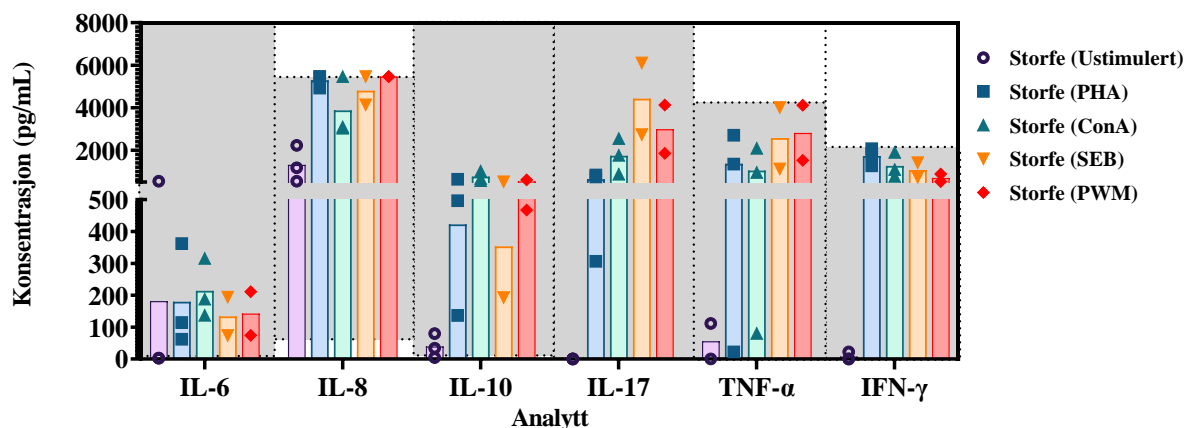


B

| Forsøk                      | Test av signifikans:<br>Stimulering |     |             | IL-6           | IL-8           | IL-10 | IL-17 | TNF- $\alpha$  | IFN- $\gamma$ |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----|-------------|----------------|----------------|-------|-------|----------------|---------------|
| Pilotforsøk<br>rein (n = 4) | Ustim<br>24t                        | mot | PHA<br>24t  | ns<br>(P=0,08) | ns<br>(P=0,16) | ***   | ***   | ns<br>(P=0,31) | ***           |
|                             | Ustim<br>24t                        | mot | ConA<br>24t | ns<br>(P=0,08) | ns<br>(P=0,46) | ***   | ***   | ns<br>(P=0,59) | ***           |
|                             | Ustim<br>24t                        | mot | SEB<br>24t  | ns<br>(P=0,08) | ns<br>(P=0,35) | ***   | ***   | ns<br>(P=0,29) | ***           |
|                             | Ustim<br>24t                        | mot | PMW<br>24t  | ns<br>(P=0,08) | **             | ***   | ***   | ns<br>(P=0,33) | ***           |

**Figur 3-5 Cytokinkonsentrasjoner i supernatant fra rein ved pilotforsøk.** (A) IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  ble analysert ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 supernatant fra ustimulerte og PHA-, ConA-, SEB- og PWM-stimulerte PBMC isolert fra rein (n = 4). Stimuleringstiden var 24 timer. Stolpediagrammene viser gjennomsnitt og punkter viser enkeltmålingene. Området mellom øvre og nedre grense for kvantifisering indikeres av grå bakgrunnsfarge. (B) P-verdier for endring i cytokinnivå etter stimulering av PBMC med PHA, ConA, SEB og PWM i forhold til ustimulerte PBMC etter 24 timer. Signifikanskoder: '\*\*\*':  $P < 0,001$ , '\*\*':  $P < 0,01$ , '\*':  $P < 0,05$ , ns = ikke signifikant. Der forskjellen ikke er signifikant (ns) vises også eksakt P-verdi.

A



B

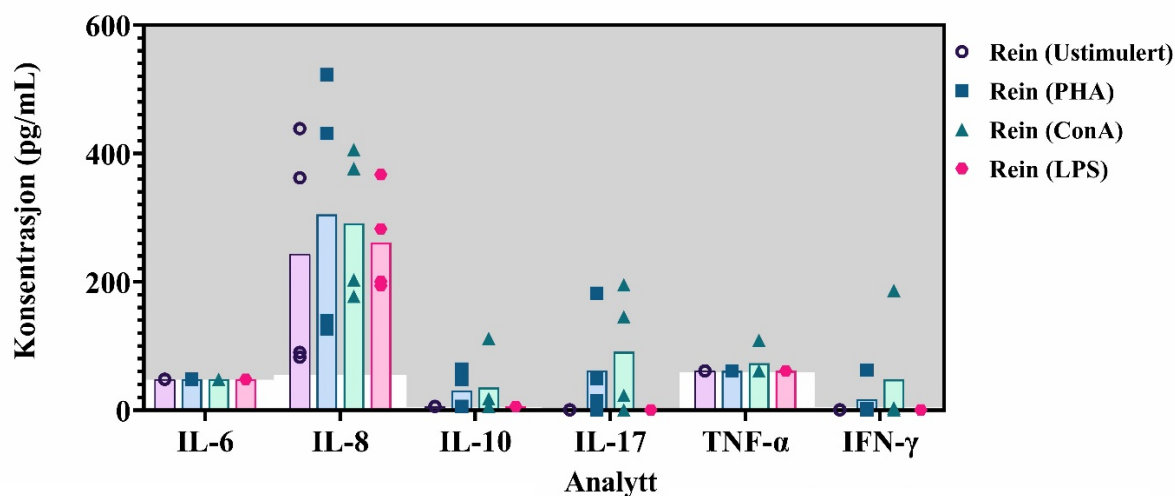
| Forsøk                                   | Test av signifikans:<br>Stimulering |     |             | IL-6           | IL-8 | IL-10 | IL-17 | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ |
|--|-------------------------------------|-----|-------------|----------------|------|-------|-------|---------------|---------------|
|  | Ustim<br>24t                        | mot | Stimulering |                |      |       |       |               |               |
| Pilotforsøk<br>storfe<br>(n = 2 eller 3) | Ustim<br>24t                        | mot | PHA<br>24t  | ns<br>(P=0,76) | **   | **    | ***   | **            | ***           |
|  | Ustim<br>24t                        | mot | ConA<br>24t | ns<br>(P=0,80) | **   | **    | ***   | **            | ***           |
|  | Ustim<br>24t                        | mot | SEB<br>24t  | ns<br>(P=0,99) | **   | **    | ***   | **            | ***           |
|  | Ustim<br>24t                        | mot | PMW<br>24t  | ns<br>(P=0,85) | **   | **    | ***   | *             | ***           |

**Figur 3-6 Cytokinkonsentrasjoner i supernatant fra storfe ved pilotforsøk.** (A) IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  ble analysert ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 supernatant fra ustimulerte og PHA-, ConA-, SEB- og PWM-stimulerte PBMC isolert fra storfe (n = 2 eller 3). Stimuleringstiden var 24 timer. Stolpediagrammene viser gjennomsnitt og punkter viser enkeltmålingene. Området mellom øvre og nedre grense for kvantifisering indikeres av grå bakgrunnsfarge. (B) P-verdier for endring i cytokinnivå etter PBMC stimulering med PHA, ConA, SEB og PWM i forhold til ustimulerte PBMC etter 24 timer. Signifikanskoder: ‘\*\*\*’: P < 0,001, ‘\*\*’: P < 0,01, ‘\*’: P < 0,05, ns = ikke signifikant. Der forskjellen ikke er signifikant (ns) vises også eksakt P-verdi.

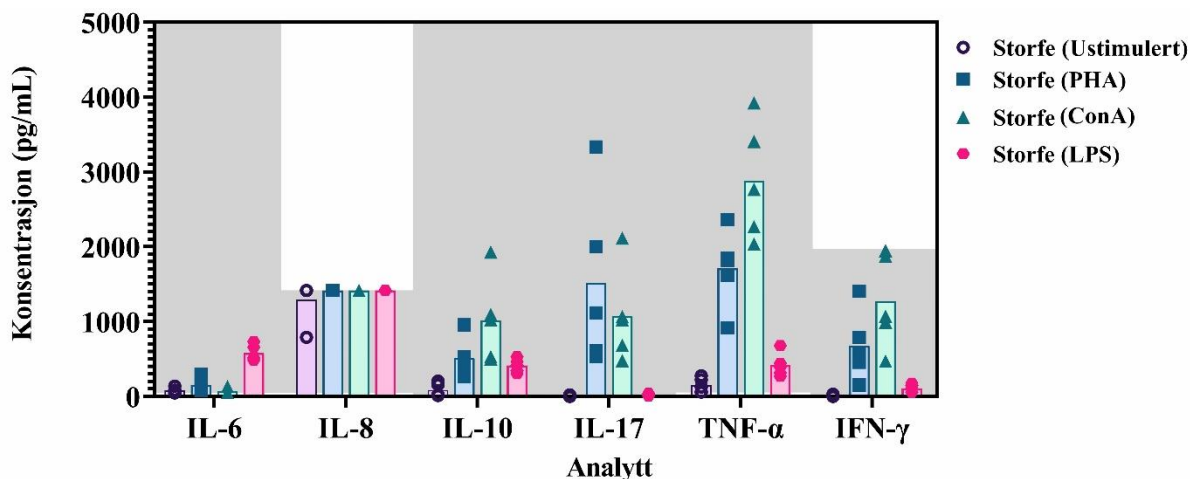
### 3.3.3 Analyse av celledsupernatant fra nye prøveuttak

Ved pilotprosjektet ble celledsupernatanter analysert i duplikater, median % CV for disse målingene var 10 %, før fjerning av outliers. Grunnet kostbare kit ble kun biologiske duplikater analysert ved nye prøveuttak.

PBMC ble isolert fra prøver av rein 1-4 tatt ved avblødning i forbindelse med avlivning, og cytokiner ble målt ved multipleks analyse av cytokiner i supernatant etter 24-timers stimulering med PHA, ConA eller LPS. Resultatene vist en stor andel lave cytokinverdier, eller verdier under analysens nedre deteksjonsgrense (**Figur 3-7**). Både ustimulerte og stimulerede prøver viste høyere nivåer av IL-8 sammenliknet med de andre cytokinene. Blodprøver fra storfe 1-5 ble tatt via halsvenen, og stimulert etter samme prosedyre som prøvene fra rein (**Figur 3-8**). Konsentrasjonen av IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  var generelt høyere etter stimulering med PHA og ConA sammenliknet med rein. Stimulering med LPS resulterte generelt i lavere cytokinkonsentrasjoner, men ga gøyest nivå av IL-6. Som hos rein, var konsentrasjonen av IL-8 høyt både før og etter stimulering. Grunnet lave verdier for cytokiner fra rein ved disse kjøringene, ble det imidlertid ikke utført statistisk analyse av disse dataene. Ved denne kjøringen av prøver fra rein og storfe, var konsentrasjoner for lav kontrollprøve for IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  gjennomgående noe høyere enn maksimal referanseverdi. Standardkurver og høy kvalitetskontroll var tilfredsstillende, og det ble likevel valgt å vise resultatene som konsentrasjon (pg/mL).



**Figur 3-7 Cytokinkonsentrasjoner fra PBMC isolert fra rein (n = 4), multipleks analyse av plate nr. III.** Figuren inkluderer Rein 1+2, 3 og 4 (**Tabell 2-1**) MILLIPLX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 ble brukt for å måle cytokinkonsentrasjonen i supernatant fra ustimulerte og PHA, ConA og LPS -stimulerte PBMC. Stimuleringstid 24 timer. Stolpediagrammene viser gjennomsnitt og punkter viser enkeltmålingene. Området mellom øvre og nedre grense for kvantifisering indikeres av grå bakgrunnsfarge.



**Figur 3-8** Cytokinkonsentrasjoner av fra PBMC isolert fra storfe (n = 5), multipleks analyse av plate nr. III. Figuren inkluderer Storfe 1-5 (Tabell 2-1). MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 ble brukt for å måle cytokinkonsentrasjonen i supernatant fra ustimulerte og PHA, ConA og LPS -stimulerte PBMC. Stimuleringstid 24 timer. Stolpediagrammene viser gjennomsnitt og punkter viser enkeltmålingene. Området mellom øvre og nedre grense for kvantifisering indikeres av grå bakgrunnsfarge.

Grunnet lave cytokinkonsentrasjoner etter stimulering av PBMC fra rein ved prøveuttak under avliving, ble det besluttet å inkludere stimulering med PMA-I, i tillegg til ConA, PHA og LPS ved neste oppsett hvor blod fra både rein og storfe ble tatt av levende dyr. Det ble også bestemt å stimulere i både 6 og 24 timer, for å se om 6-timers stimulering kunne øke konsentrasjonen av noen cytokiner. Det ble valgt å gå videre med prøver stimulert PMA-I, da cytokinnivåene så ut til å øke mest ved denne stimuleringen (Vedlegg I). I **Figur 3-9** vises gjennomsnittlig konsentrasjon (pg/mL) av cytokiner i supernatant fra PMA-I-stimulerte PBMC isolert fra rein (n=4) og storfe (n=3) (A), og relativ ekspresjon av mRNA målt ved qPCR, oppgitt i gjennomsnittlig mRNA fold change (B). Både proteinkonsentrasjon og relativ endring av mRNA er vist for IL-10, IL-17, TNF-α og IFN-γ, mens kun konsentrasjon av protein er vist for IL-6 grunnet mangel på fungerende primere til rein.

PMA-I stimulering førte til en signifikant ( $P < 0,001$ ) økning av IL-10, IL-17, TNF-α og IFN-γ konsentrasjoner i supernatanter fra rein og storfe etter både 6 og 24 timer (**Figur 3-9A, Tabell 3-3**). For prøver stimulert med PMA-I i 6 og 24 timer ble det kontrollert at signifikans funnet ved *ggplot* (**Figur F-1, Vedlegg F**) og *glm* (**Tabell 3-3**) samsvarte, noe det gjorde. Cytokinkonsentrasjonene var oftest høyere etter 24 timer stimulering, sammenliknet med 6 timers stimulering. Økning i cytokinkonsentrasjon etter PMA-I stimulering, så generelt ut til å være større hos storfe enn rein, men det ble ikke gjort statistisk analyse for å sammenlikne økningen hos de to artene.

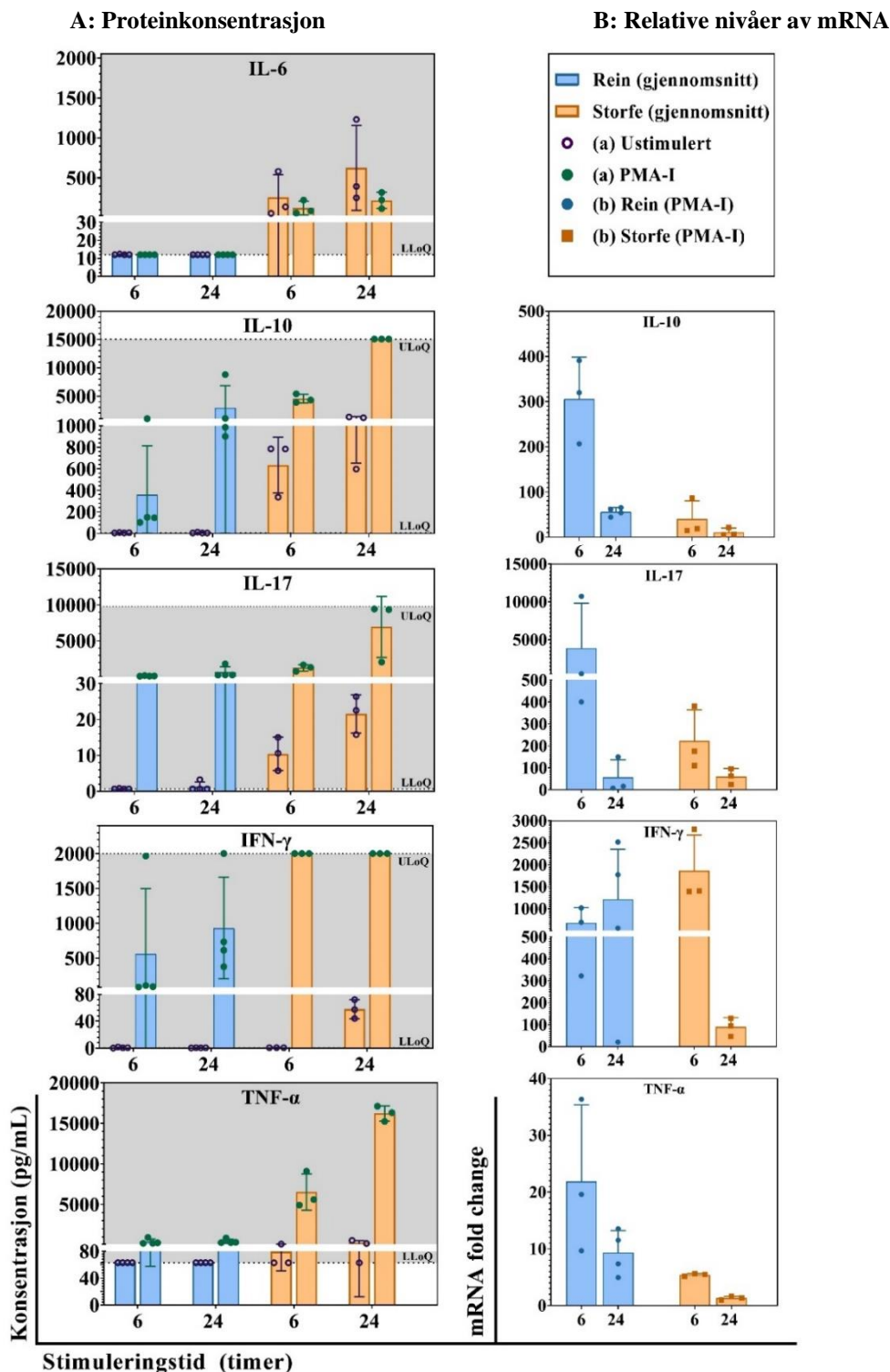
Konsentrasjonen av IL-6 var lav i prøver fra rein, og ga ikke resultater innenfor metodens kvantifiseringsområde. I prøver fra storfe sank gjennomsnittlige konsentrasjonen av IL-6 ved stimulering med PMA-I, men endringen var ikke signifikant (**Figur 3-9A, Tabell 3-3**).

Det var ikke signifikante forskjeller mellom nivåer av IL-8 i ustimulerte og PMA-I stimulerede PBMC for verken rein eller storfe. Standardkurven for IL-8 var ikke av tilfredsstillende kvalitet, derfor presenteres resultater for IL-8 som en del av metodediskusjonen (**Figur 4-1**).

Tendensen for mRNA fold change var at nivåene var høyere etter 6 timers stimulering sammenlignet med etter 24 timer stimulering (**Figur 3-9 B**). Dette gjaldt for både storfe og rein, bortsett fra IFN- $\gamma$  fra rein, der høyest nivå ble målt etter 24 timer. Relative nivåer av mRNA for de ulike cytokinene var generelt høyere for rein, sammenlignet med storfe, med unntak av IFN- $\gamma$ -nivået etter 6 timers stimulering. E ved PCRe er også høyere for rein, sammenlignet med storfe (**Tabell 3-2**).

For rein var gjennomsnittlig mRNA fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdier) etter 6 og 24 timer stimulering med PMA-I høyest for IFN- $\gamma$  (med hhv. 677 og 1217) og IL-17 (med hhv. 3879 og 34). For rein var verdiene lavere for IL-10 (306 og 56), og lavest for TNF- $\alpha$  (21 og 9). For storfe var verdiene også høyest for IFN- $\gamma$  (1868 og 91) og IL-17 (223 og 61), etterfulgt av IL-10 (40 og 11). For storfe var fold change for TNF- $\alpha$  kun 5 og 1 (**Tabell K-1, Vedlegg K**).

Supernatanter fra PMA-I stimulerede PBMC isolert fra rein 5-8 og storfe 7-9 ble analysert på multipleks plate nr. IV og V, for å vurdere metodens repeterbarhet. Median % CV for disse målingene var 16 %, før fjerning av outliers.



**Figur 3-9 Proteinkonsentrasjon og relative nivåer av mRNA etter mitogenstimulering av PBMC, multipleks analyse av plate nr. V.** Stolper viser gjennomsnitt  $\pm$  SD. X-aksen angir stimuleringstid (timer). Rein (n=4, Rein 6-9) er vist i blå stolper og storfe (n=3, Storfe 7-9) i oransje stolper. (A) Proteinkonsentrasjon (pg/mL) i supernatant fra PMA-I stimulerede PBMC isolert fra supernatant målt ved bruk av MILLIPIX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Punkter viser enkeltmålinger for ustimulerte (lilla) og PMA-I -stimulerte (grønn) prøver. Området mellom øvre og nedre grense for kvantifisering indikeres av grå bakgrunnsfarge. (B) Relative nivåer av mRNA, oppgitt ved fold change, beregnet ved å bruke  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden med  $\beta 2M$  i ustimulerte PBMC som referanse. Punkter viser mRNA fold change for rein ved PMA-I stimulering for rein (blå) og storfe (oransje).

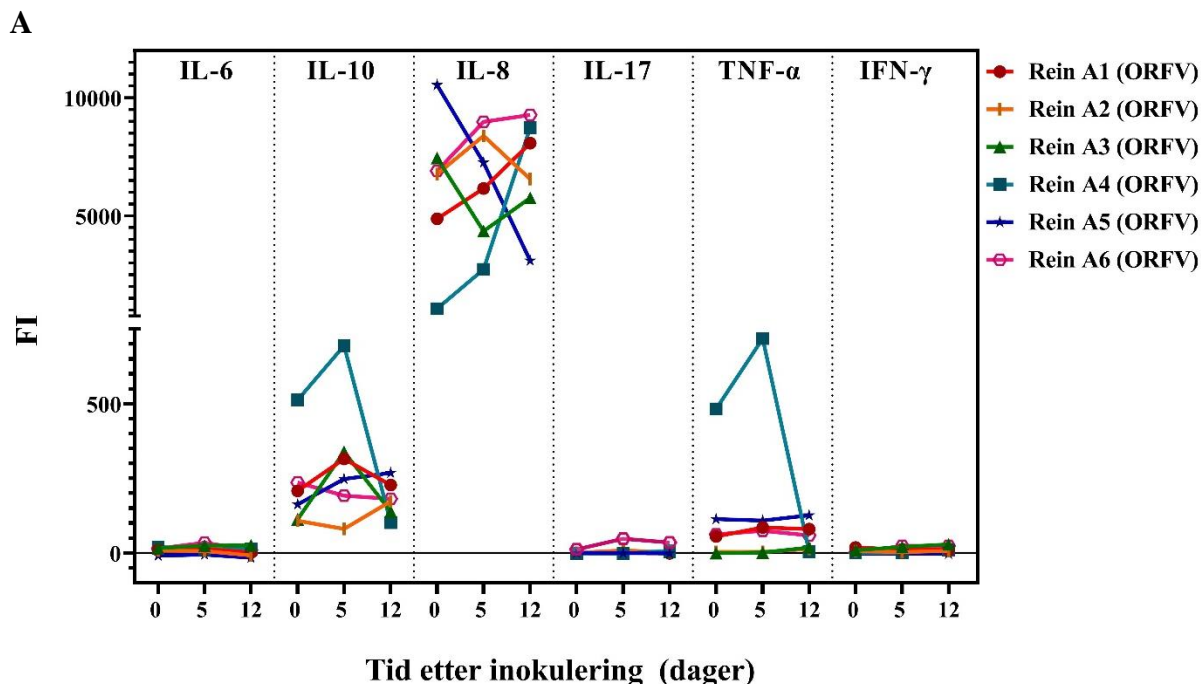
**Tabell 3-3 P-verdier for endring i cytokinkonsentrasjon ved multipleks cytokinanalyse for PMA-I stimulerede PBMC i forhold til ustimulerede PBMC.** Celler ble stimulert i 6 og 24 timer. Signifikanskoder: ‘\*\*\*’:  $P < 0,001$ , ‘\*\*’:  $P < 0,01$ , ‘\*’:  $P < 0,05$ , ns = ikke signifikant. Der forskjellen ikke er signifikant (ns) vises også eksakt P-verdi.

| Identifikasjon    | Tester signifikans:<br>Stimulering | IL-6           | IL-8           | IL-10 | IL-17 | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ |
|-------------------|------------------------------------|----------------|----------------|-------|-------|---------------|---------------|
| <b>Rein 5-8</b>   | Ustim 6t mot PMA-I 6t              | ns<br>(P=0,65) | ns<br>(P=0,10) | ***   | ***   | ***           | ***           |
|                   | Ustim 24t mot PMA-I 24t            | ns<br>(P=1,00) | ns<br>(P=0,07) | ***   | ***   | ***           | ***           |
| <b>Storfe 7-9</b> | Ustim 6t mot PMA-I 6t              | ns<br>(P=0,29) | ns<br>(P=0,05) | ***   | ***   | ***           | ***           |
|                   | Ustim 24t mot PMA-I 24t            | ns<br>(P=0,15) | ns<br>(P=1,00) | ***   | ***   | ***           | ***           |

### 3.4 Analyse av serum fra smitteforsøk

Ved analyse av serumprøver fra smitteforsøk, ble ikke kvalitetskontrollene godkjent, siden konsentrasjonene var lavere enn referanseverdier oppgitt av produsent. Dette var gjennomgående for alle cytokiner, og derfor oppgis cytokinnivåer ved FI, istedenfor konsentrasjon (Breen et al., 2016). Det er verdt å bemerke at samme verdier for FI ikke nødvendigvis vil gi samme konsentrasjoner, siden sistnevnte baserer seg på egne standardkurver per cytokin.

Serumprøver fra rein inokulert med ORFV (Tryland et al., 2013) viste lave nivåer av IL-6, IL-17 og IFN- $\gamma$  ved alle tidspunkter (**Figur 3-10A**). Nivåer av IL-10, TNF- $\alpha$  og IL-8 viste en økning etter ORFV-inokulering for noen av dyrene, men disse økningene var ikke signifikante. Ett dyr skilte seg ut med høyere nivåer av IL-10 og TNF- $\alpha$  (**Figur 3-10B**).

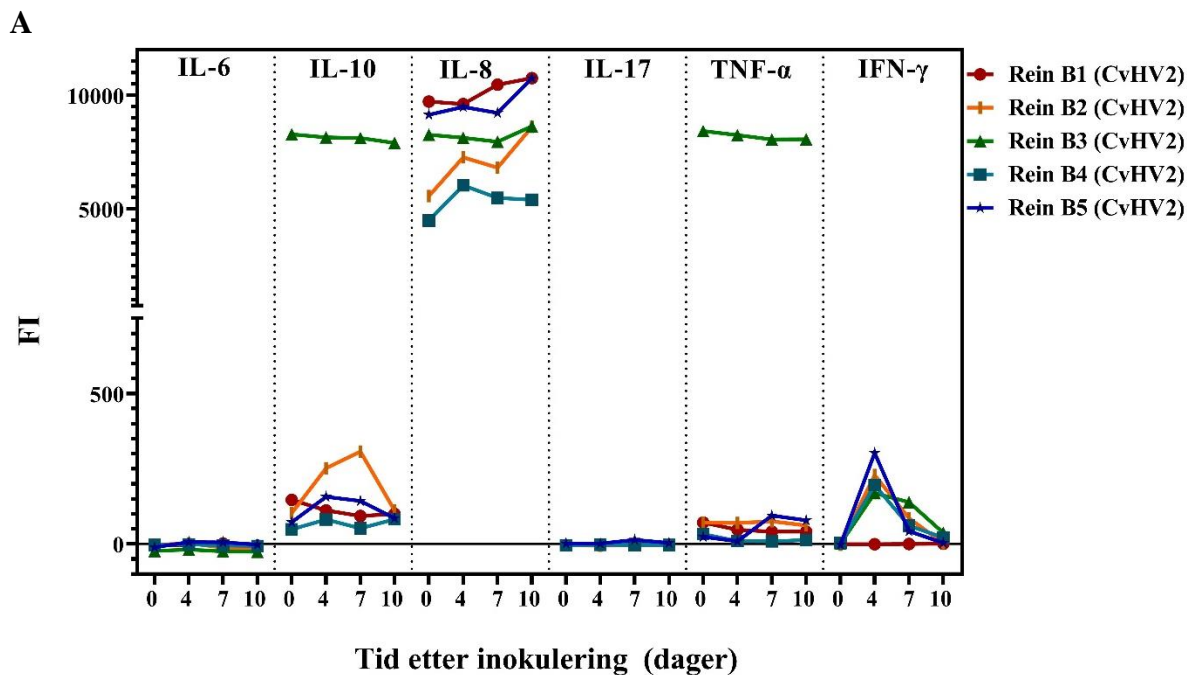
**B**

| Identifikasjon                         | Test av signifikans:<br>Dager post inokulering<br>(d.p.i) | IL-6           | IL-8           | IL-10          | IL-17          | TNF- $\alpha$  | IFN- $\gamma$  |
|--|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|  |   |                |                |                |                |                |                |
| Inokulert med ORFV<br>(Rein A1 til A6) | 0 d.p.i. mot 5 d.p.i.                                     | ns<br>(P=0,63) | ns<br>(P=0,98) | ns<br>(P=0,33) | ns<br>(P=0,34) | ns<br>(P=0,87) | ns<br>(P=0,45) |
|  | 0 d.p.i. mot 12 d.p.i.                                    | ns<br>(P=0,43) | ns<br>(P=0,68) | ns<br>(P=0,56) | ns<br>(P=0,41) | ns<br>(P=0,37) | ns<br>(P=0,21) |

**Figur 3-10 Cytokiner målt i serumprøver fra rein inokulert med ORFV.** (A) Cytokinnivåer (oppgitt ved FI) målt i serumprøver fra rein (n=6) 0, 5 og 12 dager etter inokulering med ORFV (Tryland et al., 2013) ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. For hver cytokin er de ulike dagene for prøvetakning markert. (B) P-verdier for endring i cytokinnivå i serumprøver fra rein 5 og 12 dager etter inokulering (d.p.i.) med ORFV (Tryland et al., 2013) i forhold til 0. Signifikanskoder: ‘\*\*\*’:  $P < 0,001$ , ‘\*\*’:  $P < 0,01$ , ‘\*’:  $P < 0,05$ , ns = ikke signifikant. Der forskjellen ikke er signifikant vises også eksakt P-verdi.

FI målt i serumprøver fra rein (n=5) inokulert med CvHV2 (0, 4, 7 og 10 d. p. i.) (das Neves et al., 2009a) viste signifikant ( $P < 0,001$ ) økning av IFN- $\gamma$  4 og 7 d.p.i. (**Figur 3-11**). Rein B1 skiller seg fra de andre, ved at dette dyret ikke viste forhøyede nivåer av IFN- $\gamma$ . Rein B1 er et kontrolldyr som ble inokulert trakealt med saltvann istedenfor virus. Analysen viste lave nivåer av IL-6 og IL-17 ved alle tidspunkter, og noe høyere nivåer av IL-10 og TNF- $\alpha$ . Nivåer av IL-8 var betydelig høyere enn de andre cytokinene, men det var ingen signifikante forskjeller ved sammenlikning av dag 0 med de ulike tidspunktene etter inokulering (**Figur 3-11B**). Rein B3 skiller seg ut fra de andre, ved at dette individet har høye nivåer av IL-10 og TNF- $\alpha$ .





**Figur 3-11 Cytokiner målt i serumprøver fra rein inokulert med CvHV2 (A)** Cytokinnivåer (FI) målt i serumprøver fra rein (n=5) 0, 4, 7 og 10 dager etter inokulasjon med CvHV2 (das Neves et al., 2009a) ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Kontrollprøver viste konsentrasjoner lavere enn forventede tabellverdier oppgitt av produsent, og deteksjonen er derfor kun oppgitt som FI og ikke konvertert til konsentrasjon (pg/mL). **(B)** 3-7 P-verdier for endring i serumprøver fra rein 4, 7 og 10 dager etter inokulering (d.p.i.) med CvHV2 (das Neves et al., 2009a) i forhold til 0 d.p.i. IFN- $\gamma$  viste signifikant økning 4 og 7 dager etter inokulering med CvHV2. Analyse er basert på FI. Der forskjellen ikke er signifikant (ns) vises også eksakt P-verdi. Signifikanskoder: '\*\*\*': P < 0,001, '\*\*': P < 0,01, '\*': P < 0,05, ns = ikke signifikant.

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Metodologiske utfordringer

Det er få publiserte studier som omhandler cytokiner hos rein og det fins ingen kommersielt tilgjengelige analysemetoder. I databasen NCBI, er det for rein publisert 13 gener som koder for proteiner, og ingen av disse er cytokiner. Til sammenligning ligger 21143 protein-kodende gener for storfe i databasen (30.01.23). NCBI oppgir at data brukt for å generere genomet til rein dekker hele genomet, men at det er deler av sekvensen som ikke er fullstendig kartlagt. Dette gjør det utfordrende å gjøre immunologiske studier, som f. eks. inkluderer primerdesign.

#### 4.1.1 Bruk av dyremodeller

Til denne studien ble det brukt et lavt antall individer av både rein og storfe. Dette antallet kunne med fordel vært høyere, men siden prøvetakingen er en påkjenning for forsøksdyrene og det er tidlig i utprøvningsfasen, ble det ikke inkludert flere dyr av hensyn til dyrevelferd. Det valgte antallet gjør det like fullt mulig å få en oversikt over hvordan den multiplekse analysemetoden fungerer på rein, og gir en god indikasjon på potensialet for videre utprøvning.

Rein fra flokk er krevende å bruke som forsøksdyr, siden de er lite tilgjengelige, genetisk ulike, lever i svært ulike miljøer og er utsatte for ulike påvirkninger. Til sammenligning kan forsøksfisk eller mus være genetisk svært like, og leve i mer kontrollerte miljøer. I dyreavdelingen på UiT er det et kontrollert miljø, men dyrene er fortsatt genetisk ulike. Det vil også kunne være visse forskjeller ved de ulike prøvetakingene, som kan ha innvirkning på resultatene. Tidligere har det f. eks. blitt vist at cytokin-gener identifisert i benvev hos rein ble nedregulert om våren når reinen er i dårligst kondisjon. Dette gjaldt blant annet for genet CXCL8 som koder for proteinet IL-8 (Weldenegodguad et al., 2021).

En annen faktor som kan ha innvirkning på blodets sammensetning er stress. Før prøvetaking av reinen i dette arbeidet, ble de samlet i et lite kve slik at de var lettere å fange og holde fast. Dette kan oppleves som stressende for dyrene. Rehbinder (1990) gjorde forsøk der rein i ulik grad ble stresset før avlivning, og fant at stress fører til en betydelig økning av nøytrofile, lymfocytter og eosinofile i blodet. Det er også vist at mentalt stress kan føre til endringer i

cytokinnivåer i spytt hos mennesker (Maydych et al., 2018). Sammenlignet med storfe, er rein generelt mindre håndtert av mennesker, slik at stress lettere kan ha innvirkning på resultatene.

#### 4.1.2 Utfordringer med lavt celle- og RNA-utbytte

Blodprøver tatt fra rein 1-4 og 5 ved avblødning etter bedøvelse med boltepestol, viste seg å være mindre egnet til analyse. Disse blodprøvene var delvis koagulert da det ankom laboratoriet, på tross av at det ble benyttet EDTA-rør. Fra det delvis koagulerte blodet ble det isolert et lavt antall celler, sammenlignet med prøver tatt med prøvetakning direkte fra halsvenen. Dette kan skyldes uttak etter avlivning, hvor blodet ble overført via plastrør til EDTA-rør, og også i noen grad eksponert for kulde. For å forhindre koagulering er det viktig at EDTA-røret vendes rett etter prøvetaking, og at dette blir gjort mange nok ganger, for å sikre god blanding mellom EDTA og blod. Under prøvetaking av Rein 5 var prøvetaker ekstra påpasselig med temperaturkontroll og vending av EDTA-rørene, men likevel var blodet delvis koagulert da det ankom laboratoriet. Koagulering var ikke et problem når prøvetaking ble gjort fra halsvenen (Rein 6-9). Det finnes lite litteratur om isolering av PBMC fra blod oppsamlet ved avliving, men våre funn tyder på at oppsamling av blod fra rein i plastrør, før overføring til EDTA-rør, vil koagulere raskt og være lite egnet for isolering av PBMC.

I tillegg til lavt utbytte av PBMC, var det problem med lavt utbytte av RNA. Det ble derfor gjort endringer i protokollen. Flere endringer ble gjort samtidig, og det er derfor vanskelig å vite effekten av hver enkelt endring. Ved endret protokoll ble blod tatt fra halsvenen, tilsvarende slik det ble gjort for storfe, og prøvene ble skjermet for kulde. Videre ble antallet celler for ekstrahering av RNA justert fra  $1 \times 10^6$  til  $2 \times 10^6$ , og videre til  $4 \times 10^6$ , og cellepelletten ble vasket en gang i PBS før overføring til QIAshredder-kolonnen. Etter innføring av disse endringene i protokollen, økte utbyttet av ekstrahert RNA. Basert på A260/280-verdien målt spektrofotometerisk, virket også renheten av ekstrahert RNA å øke, etter innføring av det ekstra vaskertrinnet. Renheten forteller ikke noe om kvaliteten av RNA og om det er degradert (Bustin et al., 2009), men basert på resultater fra qPCR, ser det imidlertid ut til at man med de nevnte justeringer, har tilpasset metoden for å isolere PBMC hos rein.

### 4.1.3 Standarder og kvalitetskontroller ved kulebasert multipleks analyse

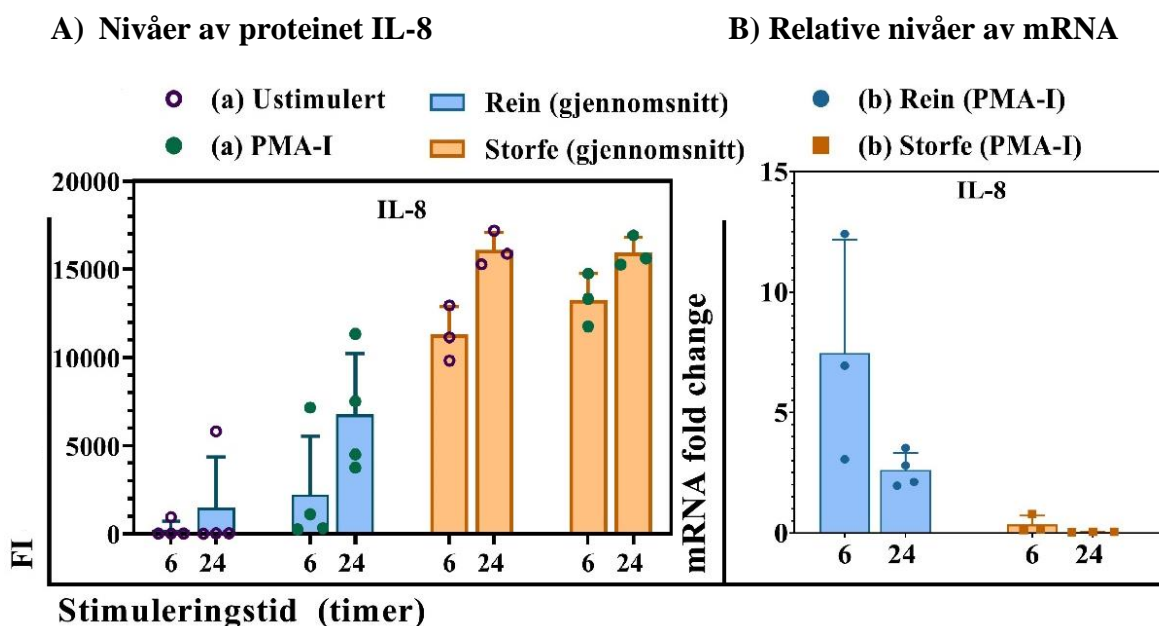
Den genererte standardkurven brukes for å konvertere målte FI-verdier til konsentrasjon. En standardkurve lages basert på verdier fra en seriefortynning av en standardløsning, og for multiplekse analyser inneholder standardløsningen alle cytokiner det analyseres for. Som en videre kvalitetssikring av analysen, inkluderes kontrollprøver (kvalitetskontroller) som skal ha konsentrasjon innenfor forventede tabellverdier.

Standardkurven for IL-8 var ikke av tilfredsstillende kvalitet ved flere av multipleks cytokinanalysene. De avleste verdiene for flere av standardfortynningene var utenfor det ønskede 70-130 %-intervallet (standardens recovery range), og ble derfor ikke godkjent. Dette var tilfellet for standardkurven for IL-8 under analysen av pilotforsøket på rein, og derfor ble standardkurven for dette cytokinet importert fra pilotforsøket på storfe. Ved analyser av supernatant fra PBMC stimulert med PMA-I, ble ingen av IL-8 standardkurvene godkjent, og dette cytokinet ble derfor ikke presentert i **Figur 3-9**. Standardkurven for IL-8 (**Figur H-1, Vedlegg H**) viser at ULOQ for denne kjøringen var lav, og de fleste analyserte prøvene befant seg over denne grenseverdien. Standardkurven for IL-8 fungerte heller ikke under analysen av prøver fra rein tatt i forbindelse med avblødning (**Figur 3-7**), men målte verdier for dette cytokinet ble likevel inkludert i figuren, siden målte FI-verdier var innenfor standardens kvantifiseringsområde og kvalitetskontroller var godkjent.

Foruten IL-8, havnet standardverdier for andre cytokiner godt innenfor 70-130 % recovery range, og standardene ble godkjent. Dette tyder på at fortynningsrekken hadde blitt utført på riktig måte, og at problemene med standardkurven for IL-8 kan komme av en fabrikkasjonsfeil. Andre studier har også hatt problemer knyttet til prøver over og under ULOQ og LLOQ ved cytokinmålinger. Avleste verdier over ULOQ tyder på at prøvene må fortynnes mer for å havne innenfor standardens rekkevidde, men dette forutsetter at analysens standard og kontroller fungerer som de skal. Naylor et al. (2021) benyttet samme bovine multipleks analysemetode, for å måle åtte cytokiner i serum fra lam. Ved dette forsøket var 30 % av målingen for IL-1 $\beta$  under LLOQ, og 30 % av målingene for IL-10 og IL-8 var over ULOQ, og FI-verdier ble derfor brukt ved analysen av disse cytokinene. Breen et al. (2016) har vurdert den statistiske verdien av rå FI-verdier ved Luminex xMAP-baserte multiplekse immunologiske analyser av cytokiner, og konkluderer at det ikke settes noen øvre og nedre grenser for FI, og at FI derfor kan brukes

for målinger under og over standardkurvens kvantifiseringsområde. I denne masteroppgaven ble derfor enkelte resultater presentert med FI istedenfor konsentrasjon, dersom standardkurven ikke oppfylte kvalitetskriterier, men kvalitetskontroller ble godkjent.

Etter 24 timer stimulering med PMA-I, viste FI-verdier målt i cellesupernatant fra stimulerede PBMC fra rein nivåer av IL-8 (**Figur 4-1A**) på omtrent samme nivå som de som ble observert ved analyse av serum fra smitteforsøkene (FI-nivå ca. 5000-10000). FI-verdier for storfe var høyere enn for rein, både før og etter stimulering. Hos begge arter er nivåene i hovedsak høyest etter 24 timer stimulering, men statistisk analyse er ikke foretatt. Relative nivåer av mRNA for IL-8, var lave for både rein og storfe (**Figur 4-1B**).  $C_q$ -verdier for IL-8 var nesten like høye i ustimulerte og ustimulerte celler fra begge arter (ikke vist), noe som resulterte i en lav mRNA fold change for rein PMA-I stimulering i etter både 6 og 24 timer (med gjennomsnittlig fold change på hhv. 8 og 3 (**Tabell K-1, Vedlegg K**)).



**Figur 4-1** Nivåer av IL-8 og relative nivåer av mRNA etter mitogenstimulering av PBMC, multipleks analyse av plate nr. V. Stolper viser gjennomsnitt  $\pm$  SD. X-aksen angir stimuleringsstid (timer). Rein (n=4, Rein 6-9) er vist i blå stolper og storfe (n=3, Storfe 7-9) i oransje stolper. (A) Nivåer av IL-8, oppgitt i FI, i supernatant fra PMA-I stimulerede PBMC isolert fra supernatant målt ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Punkter viser enkeltmålinger for ustimulerte (lilla) og PMA-I -stimulerte (grønn) prøver. (B) Relative nivåer av mRNA, oppgitt ved fold change, beregnet med  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden med  $\beta 2M$  i ustimulerte PBMC som referanse. Punkter viser mRNA fold change for rein ved PMA-I stimulering for rein (blå) og storfe (oransje).

Analyse av pilotforsøk (**Figur 3-5** og **3-6**) viser høye nivåer av IL-8 i supernatant fra ustimulerte PBMC. For rein ga ingen mitogenstimulering signifikant endret produksjon av IL-8, mens PHA, ConA, SEB og PMW ga en signifikant ( $P < 0,01$ ) endret cytokinproduksjon under pilotforsøket på storfe. I tillegg var nivåene av IL-8 langt høyere enn de andre cytokinene i serum fra smitteforsøkene, men det var ingen signifikant øking etter infeksjon (**Figur 3-10** og **3-11**). Dette tyder på at nivåene av IL-8 generelt kan være høye i blodet hos både rein og storfe, uavhengig av stimulering og infeksjonsstatus. I en studie som undersøkte biomarkører for storfetuberkulose, fant de at nivåer av IL-8 i ustimulert plasma var signifikant høyere enn andre målte cytokiner, som IFN- $\gamma$  og IL-17. Stimulering med proteiner fra bakterien resulterte likevel i økte nivåer av IL-8 hos smittede dyr (Gao et al., 2019).

#### 4.1.4 Primerdesign og optimalisering av qPCR

Basert på gelelektroforese, PCR-effektivitet og qPCR-resultater etter stimulering, virker primerne til rein generelt å fungere bedre enn primerne til storfe. Sammenstillingene mellom trimmede reads, primere og referansegen ga treff for IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  og  $\beta$ 2M for rein og IL-8, IL-17 og IFN- $\gamma$  for storfe. Basert på gelelektroforese og PCR-effektivitet, ser det ut til at alle seks primerpar for rein fungerer, men på grunn av manglende reads for IL-17, kan vi ikke vite om rett PCR-produkt amplifiseres. Gelelektroforese viste også bånd for alle primere til storfe, men siden sekvensering kun resulterte i reads for tre cytokiner, er det derfor ikke mulig å vite om rette PCR-produkter amplifiseres for de andre cytokinene. Videre var PCR-effektiviteten dårligere for primerne til storfe enn primerne til rein. Grunnet tidsbegrensning og økonomi ble det kun utført et forsøk på sekvensering av PCR-produkter for hvert av cytokinene. Ved eventuelt ny sekvensering, kunne muligens høyere konsentrasjon av PCR-produkt gitt reads for alle cytokiner. Alle reads ble sammenstilt mot sin referansesekvens, og selv om ikke sekvensering ga reads for alle PCR-produktene, tyder resultatene på at prosedyren for design av primere fører til amplifisering av riktige genfragmenter.

Primerne designet til denne studien amplifiserte sekvenser på ca. 100 bp, og dette kan være grunnen til lav kvalitet/mislykkede sekvenseringer siden en av begrensningene ved Sangersekvensering er den reduserte kvaliteten til de første 15-40 bp. Sangersekvensering er mest effektiv for nukleotidsekvenser fra 100 til 800 bp og ved korte sekvenser kan kvaliteten bli dårlig (Crossley et al., 2020). Ved fremtidige forsøk på Sangersekvensering, kan det bli

designet primerpar som amplifiserer PCR-produkter med noe større produktstørrelse, men under 150-200 bp for å fortsatt være optimale for qPCR (Holm et al., 2021).

Stimulering med PMA-I ga signifikant økning av TNF- $\alpha$  og IL-10 for både storfe og rein ved multipleks cytokinanalyse. De relative nivåene av mRNA for TNF- $\alpha$  og IL-10 var imidlertid lave i prøver fra storfe sammenliknet med rein. PCR-effektiviteten for TNF- $\alpha$  og IL-10 for storfe, viser at primere eller andre spesifikasjoner under PCR ikke var optimale for disse cytokinene.

Gelelektroforese av PCR-produkter for IL-6 til storfe, viste et bånd av forventet størrelse, men det var svakt, noe som kan tyde på lav mRNA-konsentrasjon. Dette kan skyldes blant annet at primerne ikke binder optimalt, eller at det faktisk er lave transkriptnivåer av dette cytokinet, fordi stimuleringene ikke var optimale (Oliveira et al., 2017). For rein viste gelelektroforese flere bånd i ulike produktstørrelser for IL-6, noe som tyder på at flere ulike fragmenter har blitt amplifisert. Primerpar for IL-6 ble ikke forsøkt optimalisert, og qPCR av IL-6 ble ikke inkludert videre i oppgaven, siden kulebaserte multiplekse cytokinanalyser ikke viste målbare konsentrasjoner av dette proteinet i prøver fra rein

Flere av primerne for storfe var ikke helt optimale, og disse kunne blitt forsøkt optimalisert ved å justere temperatur og tider i PCR-oppsettet, eller ved å designe helt nye primere. Dette ble ikke gjort av tidsmessige årsaker. I stedet for de cytokinprimerne som ikke fungerte optimalt for storfe, kunne det blitt brukt primere fra tidligere publikasjoner. Dette kunne gitt et bedre sammenligningsgrunnlag for å vurdere primere og PCR-oppsett, samt resultatet fra den multiplekse analysemetoden for rein. Et av delmålene for studien, var imidlertid å designe primere selv.

Både de fylogenetiske trærne og MSA viste at proteinsekvenser for rein og storfe cytokiner har store likheter. Ved sammenstilling av reads mot referansesekvenser, var det i noen tilfeller også treff i sekvenser for samme cytokin på tvers av artene storfe og rein. Det kan lages primere for områder på gener som er konserverte mellom arter, slik at felles primere kan benyttes på tvers av arter. Bruk av felles primere for beslektede arter er benyttet i andre publikasjoner, blant annet av (Harrington et al., 2007), hvor primerparet for IFN- $\gamma$  ble hentet fra. I denne publikasjonen fungerte dette primerparet for storfe, sau, geit, bison, hjort, elk (*Cervus elaphus manitobensis*), hvithalehjort (*Odocoileus virginianus*) og rein. Siden reingenene ble funnet ved å BLASTE

storfe gener mot reingenomet, og aminosyrerekkefølgen viste seg å være 99-100 % til identisk, er det mulig det kunne blitt designet primere som kunne vært benyttet på både storfe og rein.

#### 4.1.5 Beregning av relative nivåer av mRNA

PCR-effektiviteten for flere av cytokinene til storfe var lav, noe som betyr at antallet templatere ikke doblet seg for hver syklus.

Ved beregning av relative nivåer av mRNA ved  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden, oppgis nivåene relativt til et referansegenet. Det er derfor kritisk at metoden for måling av referansegenet er av tilfredsstillende kvalitet. Livak og Schmittgen (2001) oppgir at referansegenet  $\beta 2M$  er ideelt å bruke for internkontroll, og dette er tidligere brukt i andre studier (Harrington et al., 2006; Harrington et al., 2007). Dette genet er en del av MHC-klasse I molekylet som vanligvis presenterer antigen fra somatiske celler (Abbas et al., 2019).

En svakhet ved  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden, er at den baserer seg på antakelsen at PCR-effektiviteten er 100 % for alle prøver, selv om det oppgis at  $E = 90-110$  % ansees som godt nok og derfor kan benyttes (Livak & Schmittgen, 2001). Effektiviteten for primerne benyttet i denne oppgaven, lå for rein i intervallet 99-107 %, og var derfor akseptabel, men for storfe var  $E$  for lav for flere av reaksjonene (76-95 %). For storfe ga ikke sekvensering reads for  $\beta 2M$ , men PCR-effektiviteten var akseptabel. Det var videre bånd av riktig størrelse ved gelelektroforese, selv om det var noe svakt. Det kan likevel ikke helt utelukkes at suboptimale primere eller PCR-betingelser for  $\beta 2M$ , kan ha påvirket qPCR-resultatene hos storfe.

## 4.2 Hovedfunn og betydningen av disse

### 4.2.1 Potensielle biomarkører: IL-10, IL-17 og IFN- $\gamma$

Pilotforsøket i 2020/2021 ga grunnlag for videre testing, siden MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 ga målbare konsentrasjoner av alle cytokiner, unntatt IL-6. Det var imidlertid ikke en signifikant økning av TNF- $\alpha$  etter stimulering av PBMC fra rein, slik det var for de andre cytokinene, noe som tyder på lavere grad av kryssreaktivitet. Cytokinnivåene hos rein var ellers generelt lavere enn hos storfe, men funnene var likevel lovende nok til å foreta videre undersøkelser. Mitogenstimuleringene som ga best respons, ble benyttet videre ved prøveuttakene som ble gjennomført i denne oppgaven. I tillegg ble LPS inkludert, for å få høyere nivåer av IL-6 og TNF- $\alpha$  (Fischer et al., 1999).



Ved første prøveuttak av rein i denne studien, ble blod tappet ved avblødning i forbindelse med avlivning. Stimulering med PHA, ConA og LPS i 24 timer ga lite endringer i cytokinnivåer. Det ble antatt at disse resultatene skyldtes delvis koagulert blod, og at dette hadde påvirket cellenes evne til å produsere cytokiner. Det ble derfor utført ny blodprøvetaking av rein, der blod ble tatt fra halsvenen. På grunn av de lave cytokinnivåene hos rein målt ved første prøveuttak, ble det også besluttet å stimulere med PMA-I, samt å stimulere både i 6 og 24 timer. Mitogenene som ble benyttet både i pilotforsøk og ved første prøveuttak i denne studien, hadde induisert lav produksjonen av IL-6 også hos storfe, og vi ønsket å undersøke om PMA-I kunne øke IL-6-nivåene hos begge arter.

Stimulering med PMA-I viste seg å være mest optimalt for å aktivere cytokinproduksjon hos rein, og stimulering resulterte i signifikant økte cytokinkonsentrasjoner for fire av seks cytokiner (IL-10, IL-7, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ ) hos både rein og storfe. Nivåene målt ved multipleks analyse tyder på at antistoffene tilpasset deteksjon av storfecytokiner har høy kryssreaktivitet, og kan brukes til å detektere disse cytokinene i prøver fra rein. Disse funnene gjør at IL-10, IL-17 og IFN- $\gamma$  kan vurderes brukt som potensielle biomarkører i rein. Til tross for at rein viste de samme tendensene som storfe, var cytokinnivåene jevnt over noe lavere for rein. Det bør påpekes at det ikke ble utført statistisk analyse for å sammenlikne økning i cytokinnivå hos rein og storfe etter stimulering av PBMC. I en studie der en bovin multipleks analysemetode ble benyttet for å måle cytokiner i serum fra afrikansk bøffel, ble det gjort liknende funn; alle cytokiner ble detektert, men nivåene var gjennomgående lavere for bøffel sammenlignet med nivåer målt i storfe (Smith et al., 2021).

I et studie gjort av Sipka et al. (2022), ble IL-10, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  kvantifisert i supernatanter fra LPS, PMA-I og ustimulerte bovine PBMC ved bruk av en multipleks analysemetode med egenkoblede antistoffer. Funnene var i samsvar med resultatene i denne masteroppgaven; PMA-I induerte høyere cytokinproduksjonen enn LPS, og stimulering med PMA-I induerte høy cytokinproduksjon etter 24 timer, sammenlignet med 6 timer. Vi fant i denne studien at konsentrasjonen av IFN- $\gamma$  økte allerede etter 6 timer ved PMA-I stimulering, noe som også var tilfellet i studien til (Sipka et al., 2022).

ConA, PHA og LPS induerte cytokinproduksjonen hos storfe som ved de forutgående prøveuttakene (ikke vist). Cytokinnivåer hos rein var fremdeles lave ved stimulering med ConA, PHA og LPS, selv om det ikke ble benyttet blod tappet ved avblødning (**Vedlegg I**). Blod fra rein ble sendt i posten og ble satt opp til stimulering dagen etter prøveuttak. Dette kan ha ført til lavere cytokinproduksjonen hos rein. Ved undersøkelse for storfetuberkulose med IFN- $\gamma$ -test, er det anbefalt at prøver stimuleres med antigener fra bakterien innen 8 timer, for å unngå at lymfocyttdød fører til lav IFN- $\gamma$ -respons og falske negative resultater (Romero, 2022).

Ingen av stimuleringene resulterte i signifikant endret produksjon av IL-6 hos rein. Dette gjaldt både under pilotforsøk (**Figur 3-5**), for prøver tatt ved avblødning (**Figur 3-7**), ved analyse av supernatant fra PBMC stimulert med PMA-I (**Figur 3-9**) og begge smittforsøkene (**Figur 3-10, 3-11**). For storfe ser det ut til at LPS ga noe økt produksjon av IL-6 (**Figur 3-8**). I en tidligere studie ble det ved ELISA vist at PBMC fra storfe stimulert PWM og PHA i 4 dager produserte IL-6 (Norian et al., 2015). Det er også vist at LPS-stimulering av PBMC fra storfe i fire timer har økt ekspresjonen av IL-6 (Amadori et al., 2018). Det ble ikke utført qPCR for IL-6, noe som gjør det vanskelig å si sikkert om stimulering av celler har fungert, eller om mangel på deteksjon av IL-6 hos rein skyldes at antistoffet ikke binder til dette cytokinet. Muligheten for at stimulering for induksjon av IL-6 ikke var optimal, støttes av at IL-6-nivåene generelt var lave også hos storfe.

Når det gjelder TNF- $\alpha$ , sees noe økning i mRNA-nivå etter PMA-stimulering hos rein. Til tross for signifikant økning etter PMA-I stimulering, var konsentrasjonen av TNF- $\alpha$  detektert ved multipleks cytokinanalyse lavere hos rein enn storfe, noe som tyder på at antistoffet ikke bandt optimalt til dette cytokinet hos rein. TNF- $\alpha$  foreslås derfor ikke som biomarkør til rein ved bruk av denne multiplexe analysemetoden.

Ved mitogenstimulering er det en rekke faktorer som kan påvirke resultatet, slik som cellekonsentrasjon og behandling av celler, mediesammensetning, temperatur, konsentrasjon og type mitogener samt stimuleringstid. Ulike immunceller bruker dessuten ulik tid på å aktiveres, og ulike mitogener bruker ulik tid på å inducere cytokinrespons, og de kan inducere ulike cytokiner. I tillegg kan hvilke forhold som er optimale variere mellom arter og optimale betingelser vil være forskjellig for ulike cytokiner. Når det gjaldt antall stimuleringer og tider, måtte disse begrenses, siden det var et maksimalt antall kit som kunne brukes, og det ble isolert

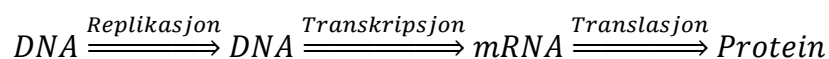
til dels lavt antall celler fra rein. I tillegg var det sentrale spørsmålet i denne studien om, og i hvor stor grad de ulike cytokinene kunne detekteres, ikke hvilke mitogener som induserte størst cytokinrespons.

#### 4.2.2 Samsvar mellom nivåer av mRNA og proteiner

For å kartlegge om de ulike cytokinene kan detekteres ved bruk av den kommersielle bovine multiplekse cytokinanalysen i cellesupernatanter fra mitogenstimulerte PBMC isolert fra rein, var det behov for å ha noe å sammenligne disse verdiene mot. I mangel på kommersielle eller etablerte analysemetoder for deteksjon av cytokiner i prøver fra rein, ble derfor genuttrykket for de samme cytokinene målt ved qPCR. qPCR gir en indikasjon på om cytokiner er til stede eller ikke, selv om nivåene av mRNA og protein ikke er direkte sammenlignbare.

Det er likevel nyttig å undersøke cytokinnivåer både med multipleks analyse og qPCR for å kunne vurdere hvilke stimuleringer som har fungert, og dermed om mangel på deteksjon skyldes lav kryssreaktivitet, eller om stimuleringen ikke ga økning av det aktuelle cytokinet. Ved å sammenligne proteinnivåene mot mRNA-nivåene kan vi se om mitogenet resulterte i økt cytokinproduksjon, og om dette skjedde 6 eller 24 timer etter stimulering. For de fleste cytokinene var nivået av protein høyest etter 24 timer, mens relative nivåer av mRNA var høyest etter 6 timer. Siden ikke alle primerne til storfe virket å fungere optimalt, blir det vanskeligere å bruke qPCR-resultatene til å vurdere hvor godt stimuleringsene og den multiplekse cytokinanalysen fungerte hos rein sammenliknet med storfe.

Det sentrale dogmet i biologi knytter DNA, mRNA og proteiner sammen. Nukleotidsekvensen for et gen bestemmer sekvensen for mRNA-produkt, og mRNA-sekvensen bestemmer aminosyresekvensen for det resulterende polypeptidet som foldes til et protein.



På tross av dette er det ingen direkte sammenheng mellom mRNA- og proteinkonsentrasjon. Liu et al. (2016) konkluderte med at transkripsjonsnivåer alene ikke er nok for å predikere proteinnivåer. Det er flere faktorer som spiller inn på forholdet mellom mRNA og proteinnivå, og RNA-konsentrasjoner målt ved qPCR representerer derfor ikke alltid konsentrasjonene av de aktive proteinene de koder for.

Prosessene for hvordan ekspresjon av mRNA som koder for cytokiner reguleres er ikke fullstendig kartlagt (Kovarik et al., 2017). Faktorer som blant annet tid, og tilgjengelighet og konsentrasjon av energi, ribosomer, translasjonsfaktorer og lokasjon i cellen kan påvirke prosessen. Videre har cytokiner ofte kort halveringstid (Aziz et al., 2016).

Israelsson et al. (2020) fant at det var ca. 5 timers forsinkelse mellom når mRNA og protein-konsentrasjonen var på høyeste nivå for IL-8 og TNF- $\alpha$ . Dette stemmer overens med funnene i denne studien, da nivåer av mRNA var høyest etter 6 timer og hadde sunket etter 24 timer, mens nivåene av protein var høyest etter 24 timer.

### 4.2.3 Aminosyresekvens og kryssreaktivitet

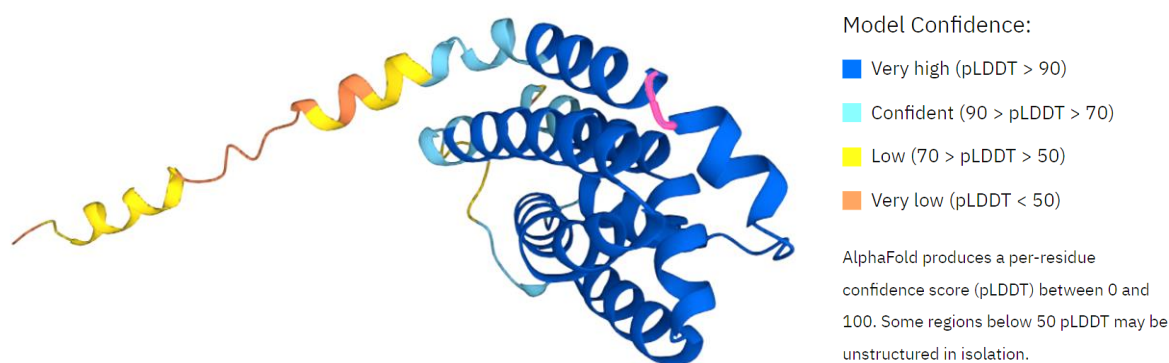
MSA viste at det var høy grad av homologi mellom aminosyresekvenser for rein og storfe. Antistoffene tilpasset deteksjon av storfecytokiner viste kryssreaktivitet, men likevel var det gjennomgående lavere konsentrasjoner for rein, noe som indikere suboptimal binding mellom de spesifikke antistoffene og cytokiner. Slik Goosen et al. (2014) rapporterte, betyr ikke høy predikert av homologi basert på mRNA og aminosyresekvens, automatisk høy grad av kryssreaktivitet. Dette understreker viktigheten av antistoffseleksjon for å optimalisere deteksjon av artsspesifikke cytokiner (Goosen et al., 2014).

Enkelte epitoper på et protein er mer konserverte på tvers av arter enn andre, men deteksjonsantistoffer binder ikke nødvendigvis til disse. Komparative studier der de har testet kryssreaktiviteten for deteksjon av samme cytokin på tvers av arter, har vist at ofte er det en sammenheng mellom likhet mellom aminosyresekvens og kryssreaktivitet, men at dette ikke alltid er tilfellet (Dorneles et al., 2015). Dette kan også gjelde motsatt vei; et antistoff kan på tross av lav likhet, likevel binde til antistoffet dersom rett epitope er konserverte og antistoff-bindingssitet gjenkjenner og binder til dette.

MSA og fylogenetiske trær viste at det er stor likhet i aminosyresekvens mellom rein og storfe, noe som skulle indikert at antistoffer for storfe burde fungert like godt på reincytkokiner. For IL-10 og IFN- $\gamma$  er det noen aminosyreresiduer som er ulike mellom rein og storfe, mens for de andre cytokinene viste ikke MSA noen forskjell i aminosyresekvens mellom cytokinene.

Ved å se på predikert tredimensjonal struktur for bovin IL-10 (**Figur 4-1**) i AlphaFold Protein Struktur Database (AlphaFold DB, <https://alphafold.ebi.ac.uk>), kommer det frem at resiuduene

som skiller rein (Glu-Ala) og storfe (Lys-Val) i posisjon 51 og 52 er mellom to alfa-helixer. Selv om det påvises kryssreaktivitet med et antistoff, kan slike små forskjeller i aminosyresekvens være nok til at proteinets konformasjon endres såpass at bindingen mellom antigen og protein ikke blir helt optimal.



**Figur 4-1 Modellprediksjon av bovin IL-10.** Posisjoner der multipel sammenstilling mellom rein og storfe viste ulike residuer (posisjon 51-52) er markert rosa (■). Modellprediksjon med fargeforklaring er hentet fra AlphaFold.

#### 4.2.4 Multipleksanalyse av serumprøver fra smitteforsøk

Det ble valgt å analysere serum fra tidlige prøvetakingstidspunkt etter smitte av rein med ORFV (0-12 d.p.i) og CvHV2 (0-10 d.p.i), da det ble ansett som mest sannsynlig at eventuelle endringer i cytokinnivåer ville bli påvist i dette tidsrommet. I dagene serumprøvene ble tatt, viste dyrene kliniske i symptomer.

Ferskere prøver kan være mer egnet for måling av cytokiner. Cytokiner fra mennesker lagret ved -80 °C har vist seg å være stabile i to år (de Jager et al., 2009), og ved oppbevaring på -20 °C synker nivåene allerede etter 8 dager (Kordulewska et al., 2021). Manglene funn i serumprøver fra eksperimentelt infiserte rein, kan komme av at prøvene hadde vært oppbevart i flere år, og ferskere prøver vil være sikrere å bruke til analyse av cytokiner. Det ville derfor vært mer optimalt å analysere serum kortere tid etter prøvetaking. I protokollen for den bovine multiplekse cytokinanalyse står det videre at prøver må unngås å tine prøvene > 2 ganger. Da de aktuelle prøvene har vært benyttet til ulike analyser tidligere, og det er en mulighet for at prøvene har vært tint mer enn to ganger.

Få studier beskriver måling av cytokiner i dyr etter virusinfeksjon. Wang et al. (2021) målte sirkulerende cytokiner i serum ved bruk av ELISA ved smitteforsøk av afrikansk svinepest.

Ved forsøket døde flere dyr kun noen dager etter inokulering med virus, men tross alvorlig infeksjon var det ikke målbare nivåer av IFN- $\gamma$ . I serum fra smitteforsøkene analysert i denne masteroppgaven, ble det heller ikke påvist IFN- $\gamma$  ved ORFV-infeksjon, men ved CvHV2 økte nivåene av IFN- $\gamma$  signifikant 4 d.p.i.

I serum fra smitteforsøkene i denne oppgaven ble det målt nivåer av TNF- $\alpha$ , men uten noe klart mønster eller økning etter infeksjon. Hos menneske har infeksjon med Norovirus vist at nivåer av TNF- $\alpha$  og andre cytokiner (IL-6, IL-8, IL-10), er høyest to dager etter infeksjon (Newman et al., 2015). Dette viser at cytokiner slik som TNF- $\alpha$  kan øke ved ulike tider for ulike infeksjoner.

Ved infeksjon av Norovirus var nivåene av IL-10 forhøyet over flere dager ved infeksjon (2-4 dager) (Newman et al., 2015). I smitteforsøkene med ORFV og CvHV2 ble IL-10 detektert, men nivåene var ikke signifikant forskjellig for prøver tatt før og etter inokulering.

I serumprøver fra smitteforsøkene, ble det som i prøvene av celledsupernatant, ikke påvist IL-6. Andre studier har vist at konsentrasjonen av IL-6 kan øke brått ved en virusinfeksjon, enten etter noen dager, eller ved økt alvorlighetsgrad. Ved måling av cytokiner i serum fra skogflåttencefalittvirus-infiserte mus var konsentrasjonen lav frem til dag 7, og økte da til ca. 40 pg/mL, og at etter 9 dager var det svært stor spredning i konsentrasjon av dette cytokinet, med konsentrasjoner fra 20 til 150 000 pg/mL (Pokorna Formanova et al., 2019). En studie der IL-6 ble målt i pasienter med ulik alvorlighetsgrad av COVID-19, viste at det ikke var signifikant forskjell i konsentrasjonen av IL-6 mellom moderate og alvorlig syke pasienter, men mellom moderate og kritisk syke pasienter var det signifikant ( $P < 0,001$ ) forskjell i konsentrasjonen av IL-6 (Han et al., 2020). Oppsummert viser studier som har analysert cytokiner etter virusinfeksjon, at blant annet tidspunkt etter smitte og alvorlighetsgrad er av betydning for hvilke cytokiner og nivåer av disse som påvises. Cytokiner er ekstremt potente mediatorer som er aktive i svært lave konsentrasjoner. De virker i hovedsak på nærliggende celler, og de fjernes i tillegg raskt fra sirkulasjonssystemet (Moldoveanu et al., 2001) og det er kun ved høy produksjon, at de vil komme over i blodet (Israelsson et al., 2020). Dette kan gjøre det utfordrende å ta prøver til riktig tid, for å fange opp en eventuell økning i cytokinproduksjon etter infeksjon. Ideelt sett burde man analysert flere tidspunkter etter smitte. Typen infeksjon og grad av betennelse vil også være av betydning for om og hvilke, cytokiner som påvises etter

smitte. Det kan være at infeksjon med ORFV-infeksjon hovedsakelig var lokal, og dermed ikke førte til at produserte cytokiner kom over i blodet (Haig & Mercer, 1998).

### 4.3 Videre arbeid

Studien indikerer at cytokinene IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  kan detekteres i prøver fra rein ved MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1, men at TNF- $\alpha$  ser ut til å være mindre egnet som biomarkør, siden nivåene for dette cytokinet var lave for rein. Det ble imidlertid analysert et begrenset antall prøver, slik at metoden bør testes ut med flere dyr for å få et bedre statistisk vurderingsgrunnlag.

Blod tatt ved avblødning viste seg være lite egnet til isolering og stimulering av PBMC. I en del tilfeller kan det imidlertid være lettere å få blod fra rein under avblødning, enn ved uttak fra levende dyr. Ved videre arbeid vil det derfor være interessant å teste blod tatt ved avblødning, for å undersøke om det er kulde, transporttid, overføring via plastrør, eller andre faktorer som spiller inn på blodkvaliteten. Under denne studien ble blod fra storfe, arbeidet med samme dag som det ble tappet, mens blod fra rein ble stimulert først neste dag. For å eliminere usikkerheten knyttet til tid fra prøvetaking til analyse, bør det ved fremtidige forsøk tilstrebes å ha like lang tid fra prøvetakingstidspunkt til stimulering hos alle forsøksdyr, og helst stimulere prøver så kort tid som mulig etter uttak.

Lagringstid fra prøvetaking til analyse kan videre ha vært en begrensende faktor for påvisning av cytokiner i serum fra smitteforsøk. Ved cytokinanalyse av serum fra andre smitteforsøk med rein, eller fra dyr med infeksjoner burde analysen skje raskt etter prøvetakning. Dersom man ikke kan analysere prøvene relativt raskt, bør prøvene oppbevares på -80 °C og unngå frysetine sykluser. Det ville også vært interessant å teste ut om primerne designet i denne studien, kan benyttes til å måle genuttrykk i prøver fra smitteforsøk eller fra syke dyr. Det kan også designes primere for flere cytokiner.

Studien har bidratt til optimalisering av blodprøveuttak, mitogenstimulering av PBMC og RNA-ekstrahering for rein, og er et godt utgangspunkt for fremtidige mitogen stimuleringer. Ved videre arbeid kan det også benyttes andre mitogener og flere stimuleringstider og ferskere blod, for å forsøke å indusere produksjon av alle cytokiner. Under denne studien ble kun magnetkuler for enkelte av cytokinene inkludert, og i fremtidige forsøk vil det også være aktuelt

å teste ut den multiplekse analysemetoden for deteksjon av flere cytokiner. Det er også mulig å teste ut bovine ELISA kit, dersom den multiplekse analysen ikke fungerer for noen cytokiner, da ulike kit kan inneholde antistoffer som binder til forskjellige epitoper.

Basert på lovende resultater i denne studien, er det også mulig å teste andre immunologiske metoder hvor bovine antistoffer inngår. En metode som er særlig aktuell til cytokinanalyse, er flow cytometri. Ved flow cytometri kan både cytokiner og overflatemarkører måles samtidig, slik at man kan finne ut hvilke celler som produserer de ulike cytokinene. Dette vil kunne gi flere verktøy til cytokinanalyse hos rein.



## 5 KONKLUSJON

Funn gjort i denne studien tyder på at MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 er egnet for å måle konsentrasjonen av IL-10, IL-17, og IFN- $\gamma$  i prøver fra rein kan, og kan fungere som diagnostiske verktøy for måling av biomarkører i denne arten. Resultatene knyttet til TNF- $\alpha$  er mer ustabile og behøver ytterligere undersøkelser. Stimulering med PMA-I resulterte i signifikant økte cytokinkonsentrasjoner for IL-10, IL-7, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  hos både rein og storfe. Cytokinnivåene var likevel generelt noe lavere for rein enn storfe, dette gjaldt spesielt for TNF- $\alpha$ , noe som kan tyde på lavere kryssreaktivitet for dette cytokinet. Gjentatte problemer knyttet til standardkurven for IL-8, gjorde at cytokinkonsentrasjonen for dette cytokinet ikke alltid kunne oppgis som pg/mL, men nivåene av dette cytokinet kan likevel oppgis i FI. Problemene ble antatt å skyldes en fabrikkasjonsfeil, og understreker viktigheten av grundig uttesting av kommersielle multipleks kit. Analyse av IL-8 viste for øvrig at nivåene av dette cytokinet kan være høyt i prøver fra både rein og storfe, uavhengig av stimulering og infeksjonsstatus. Under denne studien ble ikke IL-6 påvist i prøver fra rein, men siden nivåer av dette cytokinet også var lavt i prøver fra storfe, og nivået av IL-6 ikke ble undersøkt ved qPCR, er det mulig at stimulering av PBMC ikke var optimal. Det kan derfor ikke utelukkes at de bovine antistoffene er kryssreaktive for også dette cytokinet.

For rein har det blitt designet primere, og genuttrykket ble målt for IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ . Sekvenseringen for IL-17 ble ikke vellykket, og man kan derfor ikke vite med sikkerhet at rett produkt ble amplifisert ved PCR. Det ble også designet primere og målt genuttrykk for storfe, men PCR-effektivitet, gelelektroforese og sekvensering, tilsier at flere av primerne ikke var optimale og genuttrykket for storfe må derfor tolkes med forsiktighet.

Selv om disse metodene krever ytterligere undersøkelser i større prøvesett, viser denne studien nytten av den multiplekse analysemetoden, og qPCR, som diagnostiske verktøy for å måle cytokiner i rein.

Studien har også bidratt til optimalisering av blodprøveuttak, mitogenstimulering av PBMC og RNA-ekstrahering fra prøver fra rein.

## 6 REFERANSELISTE

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2019). *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. Sixth edition. utg. Philadelphia: Elsevier.
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L. & Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*, 10 (9): 3834-3842. doi: 10.3390/ijerph10093834.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. 6th utg. New York: Garland Science.
- Alvarez, M. J., Vila-Ortiz, G. J., Salibe, M. C., Podhajcer, O. L. & Pitossi, F. J. (2007). Model based analysis of real-time PCR data from DNA binding dye protocols. *BMC Bioinformatics*, 8 (1): 85-85. doi: 10.1186/1471-2105-8-85.
- Amadori, M., Soares-Filipe, J. F., Riva, F., Vitali, A., Ruggeri, J. & Lacetera, N. (2018). Characterization of the blastogenic response to LPS of bovine peripheral blood mononuclear cells. *PLoS one*, 13 (10): e0204827.
- AMAP, Arctic Monitoring and Assessment Programme. (2021). *Arctic Climate Change Update 2021: Key Trends and Impacts. Summary for Policy-makers*.
- Animal Health Diagnostic Center, (AHDC). (u.d.). *Equine Cytokine 5-plex Assay*. Tilgjengelig fra: <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/testing/protocols/equine-cytokine-5-plex> (lest 24.07.2022).
- Aziz, N., Detels, R., Quint, J. J., Li, Q., Gjertson, D. & Butch, A. W. (2016). Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions. *Cytokine*, 84: 17-24.
- Banfi, G., Salvagno, G. L. & Lippi, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes.
- Bekeredjian-Ding, I., Foermer, S., Kirschning, C. J., Parcina, M. & Heeg, K. (2012). Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. *PLoS One*, 7 (1): e29806.
- Bergqvist, C., Kurban, M. & Abbas, O. (2017). Orf virus infection. *Reviews in medical virology*, 27 (4): e1932.
- Bevanger, K. (2015). *Rein Rangifer tarandus (Linnaeus, 1758)*. Norsk institutt for naturforskning. Tilgjengelig fra: [www.artsdatabanken.no/Pages/179491](http://www.artsdatabanken.no/Pages/179491) (lest 08.08.2022).
- Bio-Rad. (u.å.). *Bio-Plex Validation Kit 4.0*. Instruction Manual Catalog # 171-203001. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110185.pdf> (lest 10.06.22).
- Boby, J., Kumar, H., Gupta, H. P., Jan, M. H., Singh, S. K., Patra, M. K., Nandi, S., Abraham, A. & Krishnaswamy, N. (2017). Endometritis increases pro-inflammatory cytokines in follicular fluid and cervico-vaginal mucus in the buffalo cow. *Animal biotechnology*, 28 (3): 163-167.
- Bogen, B. & Munthe, L. A. (2007). *Immunologi*. 2. utg. utg. Oslo: Universitetsforl.
- Bongo, M. P. & Eira, I. M. G. (2022). Learning by Herding—Transmission of Sámi Reindeer Herding Knowledge and Skills. I: *Reindeer Husbandry: Adaptation to the Changing Arctic, Volume 1*, s. 99-130: Springer International Publishing Cham.
- Bratrein, H. D. (2005). *Ottar i Norsk biografisk leksikon på snl.no*. Tilgjengelig fra: <https://nbl.snl.no/Ottar> (lest 02.02.2023).
- Breen, E. J., Tan, W. & Khan, A. (2016). The statistical value of raw fluorescence signal in Luminex xMAP based multiplex immunoassays. *Scientific reports*, 6 (1): 1-13.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H. & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*, 35 (10): 1541-1549. doi: 10.1007/s10529-013-1249-8.

- Cook, E., Wang, X., Robiou, N. & Fries, B. (2007). Measurement of staphylococcal enterotoxin B in serum and culture supernatant with a capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14 (9): 1094-1101.
- Coussens, P. M., Verman, N., Coussens, M. A., Elftman, M. D. & McNulty, A. M. (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and immunity*, 72 (3): 1409-1422.
- Creighton, T. E. (1990). Protein folding. *Biochemical journal*, 270 (1): 1.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T. & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32 (6): 767-775.
- Cunha, P., Vern, Y. L., Gitton, C., Germon, P., Foucras, G. & Rainard, P. (2019). Expansion, isolation and first characterization of bovine Th17 lymphocytes. *Sci Rep*, 9 (1): 16115-14. doi: 10.1038/s41598-019-52562-2.
- Darwich, L., Balasch, M., Plana-Durán, J., Segalés, J., Domingo, M. & Mateu, E. (2003). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *Journal of General Virology*, 84 (12): 3453-3457.
- das Neves, C. G., Mørk, T., Godfroid, J., Sørensen, K., Breines, E., Hareide, E., Thiry, J., Rimstad, E., Thiry, E. & Tryland, M. (2009a). Experimental infection of reindeer with cervid herpesvirus 2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16 (12): 1758-1765.
- das Neves, C. G., Mørk, T., Thiry, J., Godfroid, J., Rimstad, E., Thiry, E. & Tryland, M. (2009b). Cervid herpesvirus 2 experimentally reactivated in reindeer can produce generalized viremia and abortion. *Virus Res*, 145 (2): 321-328. doi: 10.1016/j.virusres.2009.08.002.
- das Neves, C. G., Rimstad, E. & Tryland, M. (2009c). Cervid herpesvirus 2 causes respiratory and fetal infections in semidomesticated reindeer. *Journal of clinical microbiology*, 47 (5): 1309-1313.
- das Neves, C. G., Roger, M., Yoccoz, N. G., Rimstad, E. & Tryland, M. (2009d). Evaluation of three commercial bovine ELISA kits for detection of antibodies against Alphaherpesviruses in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51 (1): 1-10.
- das Neves, C. G., Thiry, J., Skjerve, E., Yoccoz, N. G., Rimstad, E., Thiry, E. & Tryland, M. (2009e). Alphaherpesvirus infections in semidomesticated reindeer: a cross-sectional serological study. *Veterinary microbiology*, 139 (3-4): 262-269.
- de Jager, W., Bourcier, K., Rijkers, G. T., Prakken, B. J. & Seyfert-Margolis, V. (2009). Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC immunology*, 10 (1): 1-11.
- Degnes, M.-H. H. (2019). Effekt av hybridassembly på genomer med shuffloner og repeterte områder. *Masteroppgave Norges miljø- og biovitenskapelige universitet*.
- Dimmock, N. J., Easton, A. J. & Leppard, K. N. (2015). *Introduction to modern virology*: John Wiley & Sons.
- Dorneles, E. M. S., Araújo, M. S. S., Carvalho, A. T., Martins Filho, O. A. & Lage, A. P. (2015). Cross-reactivity of anti-human cytokine monoclonal antibodies used as a tool to identify novel immunological biomarkers in domestic ruminants.
- Downs, C. J. & Stewart, K. M. (2014). A primer in ecoimmunology and immunology for wildlife research and management. *Calif Fish Game*, 100: 371-395.
- Dunbar, S. & Li, D. (2010). Introduction to Luminex® xMAP® technology and applications for biological analysis in China. *Asia Pacific Biotech*, 14: 26-30.
- Eira, I. M. G., Oskal, A., Hanssen-Bauer, I. & Mathiesen, S. D. (2018). Snow cover and the loss of traditional indigenous knowledge. *Nature Climate Change*, 8 (11): 928-931.
- Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966 (1): 290-303.
- Fischer, W. H., Jagels, M. A. & Hugli, T. E. (1999). Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3adesArg. *The Journal of Immunology*, 162 (1): 453-459.

- Foote, J. B., Sarvesha, S. & Emens, L. A. (2020). *Chapter One - Cytokine profiling of tumor-infiltrating T lymphocytes by flow cytometry*. *Methods in Enzymology*, b. 631.
- Fulton, R. W. (2009). Viral diseases of the bovine respiratory tract. *Food Animal Practice*: 171.
- Gao, X., Guo, X., Li, M., Jia, H., Lin, W., Fang, L., Jiang, Y., Zhu, H., Zhang, Z. & Ding, J. (2019). Interleukin 8 and pentaxin (C-reactive protein) as potential new biomarkers of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 57 (10): e00274-19.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S. & Simon, H.-U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology*, 34 (8): 398-409.
- Gershwin, L. J., Berghaus, L. J., Arnold, K., Anderson, M. L. & Corbeil, L. B. (2005). Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 107 (1): 119-130. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.04.004.
- Ginhoux, F. & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14 (6): 392-404.
- Gitao, C. (1994). Outbreaks of contagious ecthyma in camels (*Camelus dromedarius*) in the Turkana district of Kenya. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 13 (3): 939-945.
- Gjerstad, B. (2018). *Gjennomgang av kriseberedskapen i reindriften*. Reindriftseminaret 2018: Mattilsynet.
- Gonzalez, S., González-Rodríguez, A. P., Suárez-Álvarez, B., López-Soto, A., Huergo-Zapico, L. & Lopez-Larrea, C. (2011). Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Self Nonself*, 2 (1): 19-25. doi: 10.4161/self.2.1.15094.
- Goosen, W. J., Cooper, D., Warren, R. M., Miller, M. A., van Helden, P. D. & Parsons, S. D. (2014). The evaluation of candidate biomarkers of cell-mediated immunity for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 162 (3-4): 198-202.
- Guerra-Maupome, M. & McGill, J. L. (2019). Characterization of local and circulating bovine  $\gamma\delta$  T cell responses to respiratory BCG vaccination. *Sci Rep*, 9 (1): 15996-15. doi: 10.1038/s41598-019-52565-z.
- Guzman, E., Price, S., Poulosom, H. & Hope, J. (2012). Bovine  $\gamma\delta$  T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet Immunol Immunopathol*, 148 (1-2): 161-167. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.013.
- Haig, D. M. & Mercer, A. (1998). Ovine diseases. *Orf. Veterinary research*, 29 (3-4): 311-326.
- Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., Zhang, P., Liu, X., Gao, G. & Liu, F. (2020). Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerging microbes & infections*, 9 (1): 1123-1130.
- Harrington, N. P., Surujballi, O. P. & Prescott, J. F. (2006). Cervine (*Cervus elaphus*) cytokine mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction. *Journal of wildlife diseases*, 42 (2): 219-233.
- Harrington, N. P., Surujballi, O. P., Waters, W. R. & Prescott, J. F. (2007). Development and Evaluation of a Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Gamma Interferon mRNA To Diagnose Tuberculosis in Multiple Animal Species. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (12): 1563-1571. doi: 10.1128/CVI.00263-07.
- Heldin, C.-H., Lu, B., Evans, R. & Gutkind, J. S. (2016). Signals and receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8 (4): a005900.
- Holm, W. V., Ghesquière, J., Boon, N., Verspecht, T., Bernaerts, K., Zayed, N., Chatzigiannidou, I. & Teughels, W. (2021). A viability quantitative PCR dilemma: are longer amplicons better? *Applied and Environmental Microbiology*, 87 (5): e02653-20.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S.-i., Tsukamoto, H. & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49 (7): 1215-1228.
- Hou, S., Yue, L., Xu, R., Zhu, C., Shan, S., Wang, H. & Liu, Q. (2018). *Chlamydia muridarum* plasmid induces mouse oviduct pathology by promoting chlamydial survival and ascending

- infection and triggering host inflammation. *Eur J Dermatol*, 28 (5): 628-636. doi: 10.1684/ejd.2018.3399.
- Houser, B. (2012). Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem*, 118 (4): 192-196. doi: 10.3109/13813455.2012.705301.
- Hue, E. S., Richard, E. A., Fortier, C. I., Fortier, G. D., Paillot, R., Raue, R. & Pronost, S. L. (2017). Equine PBMC cytokines profile after in vitro  $\alpha$ - and  $\gamma$ -EHV infection: Efficacy of a Parapoxvirus ovis based-immunomodulator treatment. *Vaccines*, 5 (3): 28.
- Hætta, L. B., Evertsen, M., Solvang, M. & Eira, M. (2020). *Helsetjeneste for rein*. Avdeling reindrift: Landbruksdirektoratet.
- Israelsson, P., Dehlin, E., Nagaev, I., Lundin, E., Ottander, U. & Mincheva-Nilsson, L. (2020). Cytokine mRNA and protein expression by cell cultures of epithelial ovarian cancer—Methodological considerations on the choice of analytical method for cytokine analyses. *Am J Reprod Immunol*, 84 (1): e13249-n/a. doi: 10.1111/aji.13249.
- Iyer, S. S. & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32 (1).
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. i. & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30 (14): 3059-3066.
- Klein, J. & Tryland, M. (2005). Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Virol J*, 2 (1): 79-79. doi: 10.1186/1743-422X-2-79.
- Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. I: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D. & Wichers, H. (red.) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, s. 161-167. Cham: Springer International Publishing.
- Knight, V., Long, T., Meng, Q. H., Linden, M. A. & Rhoads, D. D. (2020). Variability in the laboratory measurement of Cytokines: A longitudinal summary of a College of American Pathologists proficiency testing survey. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144 (10): 1230-1233.
- Kordulewska, N. K., Topa, J., Tańska, M., Cieślińska, A., Fiedorowicz, E. & Jarmołowska, B. (2021). Stability of interleukin-1 $\beta$ , -4, -6, -8, -10, -13, interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human sera after repetitive freeze-thaw cycles and long storage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 196: 113900.
- Kovarik, P., Ebner, F. & Sedlyarov, V. (2017). Posttranscriptional regulation of cytokine expression. *Cytokine*, 89: 21-26. doi: 10.1016/j.cyto.2015.11.007.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N. & Wood, J. G. (2015). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*, 6: 620-620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2): 95-125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Landbruks-og matdepartementet. (2019). *Reindrift*. Regjeringen.no. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/reindrift/reindrift/id2339774/> (lest 19.01.2022).
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*: Fagbokforlag.
- Lecru, L.-A., Combarros, D., Moog, F., Marinovic, L., Kondratjeva, J., Amalric, N., Pressanti, C. & Cadiergues, M. C. (2022). Multiplex Cytokine Analyses in Ear Canals of Dogs Suggest Involvement of IL-8 Chemokine in Atopic Otitis and Otodectic Mange—Preliminary Results. *Animals*, 12 (5): 575.
- Lewis, A. L., Szymanski, C. M., Schnaar, R. L. & Aebi, M. (2022). Bacterial and Viral Infections. *Essentials of Glycobiology [Internet]*. 4th edition.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J. & Singh, R. K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *The Journal of Immunology*, 170 (6): 3369-3376.
- Life Technologies Corp. (2012). *Real-Time, PCR Handbook*: Life Technologies Corporation.

- Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165 (3): 535-550.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, 25 (4): 402-408.
- Lloyd, J. B. & Haig, D. (2004). Scabby mouth and the ovine immune response *Proceedings of the Australian Sheep Veterinairans 2004 Conference (AVA Canberra)*, 24.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10 (3): 190-212.
- Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 83 (1): 39-48.
- Mann, E. R. & Li, X. (2014). Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20 (29): 9653.
- Mariadassou, M., Bar-Hen, A. & Kishino, H. (2019). *Tree Evaluation and Robustness Testing*.
- Megha, K. & Mohanan, P. (2021). Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169: 28-38.
- Millipore Sigma. (2017). *Tips and Tricks: The Power of Multiplex Biomarker Analysis from the makers of MILLIPLEX® map*. Tilgjengelig fra: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/br1088en\\_ms.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/br1088en_ms.pdf).
- Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J. & Shek, P. N. (2001). The Cytokine Response to Physical Activity and Training. *Sports Med*, 31 (2): 115-144. doi: 10.2165/00007256-200131020-00004.
- Monastero, R. N. & Pentylala, S. (2017). Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. *International journal of inflammation*, 2017.
- Mørk, T., Daidson, R. K. & Nymo, I. H. (2021). *Dyrehelserapporten 2021*. Veterinærinstituttets rapportserie 19-2022.
- Naylor, D., Sharma, A., Li, Z., Monteith, G., Mallard, B., Bergeron, R., Baes, C. & Karrow, N. (2021). Endotoxin-induced cytokine, chemokine and white blood cell profiles of variable stress-responding sheep. *Stress*, 24 (6): 888-897.
- Norian, R., Delirez, N. & Azadmehr, A. (2015). *Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells*. Veterinary Research Forum: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & the UGENE team. *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. *Bioinformatics* 2012 28: 1166-1167.
- Oliveira, C., Aguiar, T. Q. & Domingues, L. (2017). Principles of genetic engineering. I: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, s. 81-127: Elsevier.
- Orro, T., Sankari, S., Pudas, T., Oksanen, A. & Soveri, T. (2004). Acute phase response in reindeer after challenge with Escherichia coli endotoxin. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27 (6): 413-422.
- Ortega, J., de Juan, L., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Roy, Á., Velasco, C., Romero, B., Domínguez, M., Pérez de Val, B., Nebot, C., et al. (2022). Effect of a recent parenteral dexamethasone and ketoprofen administration on the immunological diagnosis of tuberculosis in goats. *Frontiers in veterinary science*, 9: 1042428-1042428. doi: 10.3389/fvets.2022.1042428.
- Parham, P. (2021). *The immune system*. Fifth edition utg.: W.W. Norton & Compan.
- Pentha, S. M. (2022). *Beitekrise skyldes is - ikke mye rein*. Statsforvalteren i Troms og Finnmark. Tilgjengelig fra: <https://www.statsforvalteren.no/troms-finnmark/nyheter/2022/02/beitekrise-pa-grunn-av-is/> (lest 16.11.2022).
- Pokorna Formanova, P., Palus, M., Salat, J., Hönig, V., Stefanik, M., Svoboda, P. & Ruzek, D. (2019). Changes in cytokine and chemokine profiles in mouse serum and brain, and in human neural cells, upon tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of neuroinflammation*, 16 (1): 1-14.

- Puech, C., Dedieu, L., Chantal, I. & Rodrigues, V. (2015). Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. *BMC veterinary research*, 11 (1): 1-14.
- Qiagen. (2009). *QuantiTect Reverse Transcription Handbook*. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en> (lest 16.08.2022).
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*: R Foundation for Statistical Computing. Tilgjengelig fra: <https://www.R-project.org/>.
- Regjeringen. (2015). *Nytt forsøksdyrdirektiv*. EØS-notatbasen. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2008/nov/nytt-forsoksdtyrdirektiv/id2433819/>.
- Reslova, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P. & Kralik, P. (2017). xMAP technology: applications in detection of pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8: 55.
- Rinaldo, C. H., Nymo, I. H., Sanchez Romano, J., Breines, E. M., Murguzur, F. J. A. & Tryland, M. (2021). Serological evidence of hepatitis e virus infection in semi-domesticated eurasian tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in norway. *Pathogens*, 10 (12): 1542.
- Risalde, M. Á., Thomas, J., Sevilla, I., Serrano, M., Ortíz, J. A., Garrido, J., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortázar, C. & Ruíz-Fons, J. F. (2017). Development and evaluation of an interferon gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in red deer experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *BMC Vet Res*, 13 (1): 341-341. doi: 10.1186/s12917-017-1262-6.
- Riseth, J. Å. & Johansen, B. (2019). Inngrepskartlegging for reindrif i Troms fylke (23/2018).
- Riva, A., Gray, E. H., Azarian, S., Zamalloa, A., McPhail, M. J., Vincent, R. P., Williams, R., Chokshi, S., Patel, V. C. & Edwards, L. A. (2020). Faecal cytokine profiling as a marker of intestinal inflammation in acutely decompensated cirrhosis. *JHEP Reports*, 2 (6): 100151.
- Romano, J. S. (2018). *Infectious keratoconjunctivitis in reindeer : the role of the reindeer alphaherpesvirus*. Tromsø: UiT The Arctic University of Norway, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, Department of Arctic and Marine Biology, Arctic Infection Biology Group.
- Romano, J. S., Mørk, T., Laaksonen, S., Ågren, E., Nymo, I. H., Sunde, M. & Tryland, M. (2018). Infectious keratoconjunctivitis in semi-domesticated Eurasian tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*): microbiological study of clinically affected and unaffected animals with special reference to cervid herpesvirus 2. *BMC veterinary research*, 14 (1): 1-11.
- Romero, B. (2022). Diagnosis of tuberculosis infection in bovine animals for using the in vitro gamma-interferon detection assay. . *Visavet Health Surveillance centre*, SOP/006/EURL
- Rus, H., Cudrici, C. & Niculescu, F. (2005). The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic research*, 33: 103-112.
- Røed, K. H., Côté, S., Yannic, G., Nieminen, M. K. U., Riseth, J. Å., Tømmervik, H., Forbes, B. C., Adamczewski, J., Dau, J., Pedersen, Å. Ø., et al. (2018). Introduction. I: Tryland, M. & Kutz, S. J. (red.) *Reindeer and Caribou: health and Disease*.: CRC Press.
- Röszer, T. (2018). Understanding the biology of self-renewing macrophages. *Cells*, 7 (8): 103.
- Sacristán, C., Madslie, K., Sacristán, I., Klevar, S. & das Neves, C. G. (2021). Seroprevalence of hepatitis e virus in moose (*Alces alces*), reindeer (*rangifer tarandus*), red deer (*cervus elaphus*), roe deer (*capreolus capreolus*), and muskoxen (*ovibos moschatus*) from norway. *Viruses*, 13 (2): 224.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Sannasiddappa, D. T. (2016). *Digestion of Genomic DNA During RNA Extraction*.
- Sassu, E. L., Kangethe, R. T., Settypalli, T. B. K., Chibssa, T. R., Cattoli, G. & Wijewardana, V. (2020). Development and evaluation of a real-time PCR panel for the detection of 20 immune markers in cattle and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 227: 110092.

- Sipka, A., Mann, S., Babasyan, S., Freer, H. & Wagner, B. (2022). Development of a bead-based multiplex assay to quantify bovine interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  concentrations in plasma and cell culture supernatant. *JDS Communications*, 3 (3): 207-211. doi: 10.3168/jdsc.2021-0191.
- Skogan, W. (2022). *Ressursregnskap for reindriftsnæringen: Avdeling reindrift*.
- Smith, K., Kleynhans, L., Snyders, C., Bernitz, N., Cooper, D., van Helden, P., Warren, R. M., Miller, M. A. & Goosen, W. J. (2021). Use of the MILLIPLEX® bovine cytokine/chemokine multiplex assay to identify *Mycobacterium bovis*-infection biomarkers in African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Vet Immunol Immunopathol*, 231: 110152-110152. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110152.
- Spyrou, V. & Valiakos, G. (2015). Orf virus infection in sheep or goats. *Veterinary microbiology*, 181 (1-2): 178-182.
- Sun, B. & Zhang, Y. (2014). Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses. *T helper cell differentiation and their function*: 1-13.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W. & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3: 9-16.
- Søyland, V., Forsell, L. & Kjuus, J. (2002). Reindrift. Nye virkemidler, økt verdiskapning. NILF-rapport 2002-9. *Norsk institutt for landbruksøkonomisk forskning (NILF)*. Oslo.
- Tryland, M., Josefsen, T., Oksanen, A. & Aschfalk, A. (2001). Parapoxvirus infection in Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Veterinary Record*, 149 (13): 394-395.
- Tryland, M., Mørk, T., Ryeng, K. A. & Sørensen, K. K. (2005). Evidence of parapox-, alphaherpes- and pestivirus infections in carcasses of semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) from Finnmark, Norway. *Rangifer*, 25 (2): 75-83. doi: 10.7557/2.25.2.255.
- Tryland, M., das Neves, C. G., Sunde, M. & Mørk, T. (2009). Cervid Herpesvirus 2, the Primary Agent in an Outbreak of Infectious Keratoconjunctivitis in Semidomesticated Reindeer. *J Clin Microbiol*, 47 (11): 3707-3713. doi: 10.1128/JCM.01198-09.
- Tryland, M., Klein, J., Berger, T., Josefsen, T. D., das Neves, Carlos G, Oksanen, A. & Åsbakk, K. (2013). Experimental parapoxvirus infection (contagious ecthyma) in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Vet Microbiol*, 162 (2-4): 499-506. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.039.
- Tryland, M. (2014). "Reinpest" og andre epizootier hos rein i Fennoskandia: et historisk tilbakeblikk. *Norsk veterinær tidsskrift. Helse og velferd hos rein*, 126 (2): 154-160.
- Tryland, M., Romano, J. S., Marcin, N., Nymo, I. H., Josefsen, T. D., Sørensen, K. K. & Mørk, T. (2017). Cervid herpesvirus 2 and not *Moraxella bovoculi* caused keratoconjunctivitis in experimentally inoculated semi-domesticated Eurasian tundra reindeer. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59 (1): 1-11.
- Tryland, M. & Kutz, S. J. (2018). *Reindeer and Caribou: Health and Disease*: CRC Press.
- Tryland, M., das Neves, C. G., Klein, J., Mørk, T., Hautaniemi, M. & Wensman, J. J. (2019). Viral infections and Diseases. I: *Reindeer and Caribou Health and Disease*.
- Tryland, M., Sánchez Romano, J., Nymo, I. H., Breines, E. M., Ancin Murguzur, F. J., Kjenstad, O. C., Li, H. & Cunha, C. W. (2021). A Screening for Virus Infections in Eight Herds of Semi-domesticated Eurasian Tundra Reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway, 2013–2018. *Frontiers in veterinary science*, 8: 707787-707787. doi: 10.3389/fvets.2021.707787.
- Tryland, M., Nymo, I. H., Sánchez Romano, J. & Riseth, J. Å. (2022). Husbandry and Diseases of Semi-Domesticated Eurasian Tundra Reindeer in Fennoscandia. I: *The Management of Enclosed and Domesticated Deer*, s. 413-447: Springer.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1843 (11): 2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47 (D1): D506-D515.

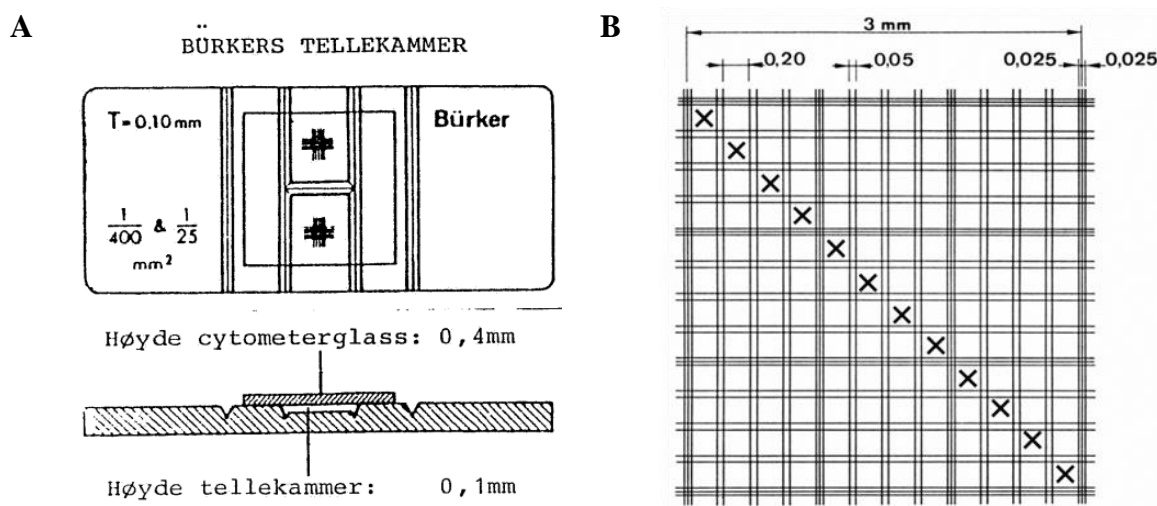


- Vikøren, T., Lillehaug, A., Åkerstedt, J., Bretten, T., Haugum, M. & Tryland, M. (2008). A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox ( *Ovibos moschatus*) population in Norway. *Vet Microbiol*, 127 (1): 10-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.029.
- VWR. (2016). *VWR® mySPEC spectrophotometer Instruction manual* (lest 07.05.2022).
- Wagner, B. & Freer, H. (2009). Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 127 (3-4): 242-248.
- Waters, W., Palmer, M., Slaughter, R., Jones, S., Pitzer, J. & Minion, F. (2006). Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon production by blood leukocytes from *Mycobacterium bovis*-infected reindeer (*Rangifer tarandus*). *Clinical and vaccine immunology*, 13 (1): 37-44.
- Weldenegodguad, M., Pokharel, K., Niiranen, L., Soppela, P., Ammosov, I., Honkatukia, M., Lindeberg, H., Peippo, J., Reilas, T. & Mazzullo, N. (2021). Adipose gene expression profiles reveal insights into the adaptation of northern Eurasian semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus*). *Communications biology*, 4 (1): 1-13.
- Wen, T. & Rothenberg, M. E. (2016). The regulatory function of eosinophils. *Microbiology spectrum*, 4 (5): 4.5. 06.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*: Springer-Verlag New York. Tilgjengelig fra: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wiklund, E., Malmfors, G., Finstad, G. L., Åhman, B., Skuterud, L., Adamczewski, J. & Garner, K. (2019). Meat Quality and Meat Hygiene. I: Tryland, M. & Kutz, S. J. (red.) *Reindeer and Caribou: Health and Disease.*: CRP Press.
- Wilson, D. J. & McFarlane, L. (2012). Contagious ecthyma in a Rocky Mountain bighorn sheep from Utah. *Human-wildlife interactions*, 6 (1): 7-11. doi: 10.26077/pggv-w922.
- Wood, P. R. & Jones, S. L. (2001). BOVIGAMTM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 81 (1-2): 147-155. doi: 10.1054/tube.2000.0272.
- Zhang, J.-M. & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45 (2): 27.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W. & Sun, B. (2014). TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *T helper cell differentiation and their function*: 15-44.
- Åhman, B., Finstad, G. L. & Josefsen, T. D. (2019). Feeding and Associated Health Problems. I: Tryland, M. & Kutz, S. J. (red.) *Reindeer and Caribou: Health and Disease.*: CRC Press.

## 7 VEDLEGG

### 7.1 Vedlegg A: Bürker tellekammer

Rutenettet på Bürker tellekammer består av 9 store kvadrater som igjen er delt opp i mindre kvadrater og rektangler. **Figur A-1A** vi ser en illustrasjon av Bürker tellekammer og **B** viser rutenettet med mål. Kammerets dybde er 0,1 mm. Hver av de 9 store kvadratene har overflateareal  $1 \text{ mm}^2$ , samlet areal er  $9 \text{ mm}^2$ . Hvert av de ni store kvadratene er delt inn i 16 mindre kvadrater av størrelsen  $0,2 \times 0,2 \text{ mm}$ .



**Figur A-1. Illustrasjon av Bürker tellekammer.** (a) Bürker tellekammer med kammerdybde 0,1 mm. (b) 9 store kvadrater der hver har overflateareal  $1 \text{ mm}^2$ , samlet areal er  $9 \text{ mm}^2$ . Hvert store kvadrat er delt inn i 16 mindre kvadrater med areal  $0,2 \text{ mm}^2$ .  $\times$  viser hvilke 12 ruter som ble talt.

*Totalt antall mill celler* =  $n * 0,021 * \text{fortynningsfaktor} * \text{volum løsemiddel}$ , der  $n$  er antall celler i 12 ruter markert ( $\times$ ). Finner antallet celler ved bruk av mikroskop.

- Volum av en rute markert ( $\times$ ):  $(0,20 \text{ mm})^2 * 0,10 \text{ mm} = 0,04 \text{ mm}^3$
- Volum av 12 ruter markert ( $\times$ ):  $12 * 0,04 \text{ mm}^3 = 0,048 \text{ mm}^3$

$$\frac{\text{Antall celler i 12 ruter markert } (\times)}{\text{Volum av 12 ruter markert } (\times)} = \frac{n}{0,048 \text{ mm}^3} = 21 \frac{n}{\text{mm}^3}$$

- Omgjør  $\text{mm}^3$  til mL for å finne antall celler per  $\mu\text{L}$ : Bruker at  $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$

$$\text{Antall celler per } \mu\text{L} = \frac{21000 * n}{1 \text{ mL}}$$

Deler på  $10^6$  for å finne antall millioner celler per mL istedenfor per  $\mu\text{L}$ :

$$\frac{21000 * n}{1 \text{ mL} * 10^6} = n * 0,021 \text{ mill celler per mL}$$

## 7.2 Vedlegg B: Primer-stockløsning

Primere ble levert som tørrstoff og ble fortynnet i nukleasefritt vann. Rørene ble vortexet og sentrifugert før og etter tilsetning av vann. For å lage primer-stockløsning (100  $\mu\text{M}$ ) fortynnes primere med nukleasefritt vann til ønsket konsentrasjon. Volum vann ble beregnet etter på formel (i):

$$(i) \text{ Volum (L)} = \frac{\text{Masse (g)}}{\text{Sluttkonsentrasjon (M)} * \text{Molekylvekt } (\frac{\text{g}}{\text{mol}})}$$

Eksempelvis har fremover primer for interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) molekulvekt 6152,1 g/mol og masse av tørrstoff 195  $\mu\text{g}$ . Fortynnet til ønsket sluttkonsentrasjonen (100  $\mu\text{M}$ ) ved å tilsette volum nukleasefritt vann beregnet av formel (i).

$$\text{Volum (L)} = \frac{195 \mu\text{g}}{100 \mu\text{M} * 6152,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 317 \mu\text{L}$$

Det vil altså være nødvendig å tilsette 317  $\mu\text{L}$  nukleasefritt vann til fremover INF- $\gamma$  primere, dersom ønsket sluttkonsentrasjon er 100  $\mu\text{M}$ . Primernes molekulvekt og masse ble oppgitt av produsent, Eurogentec.

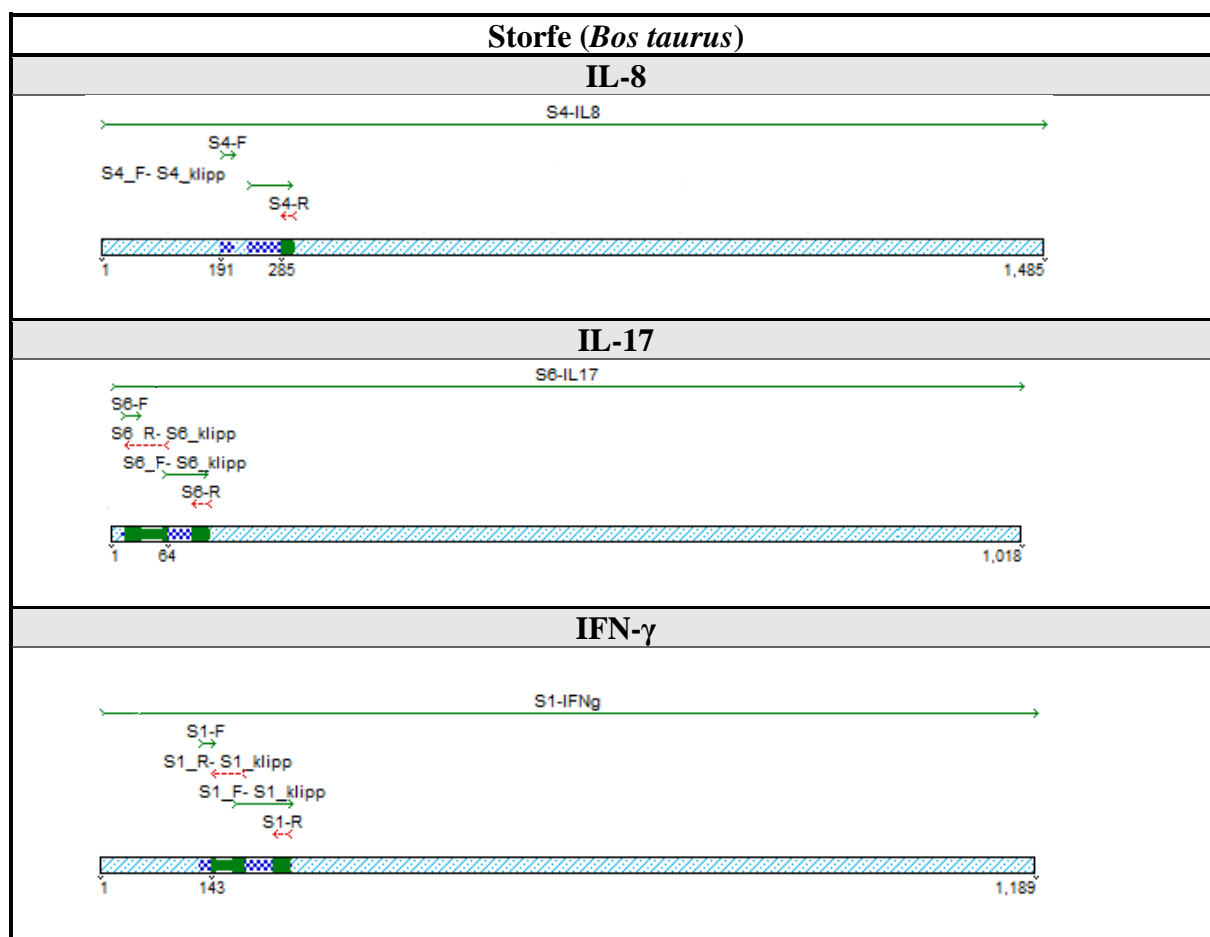
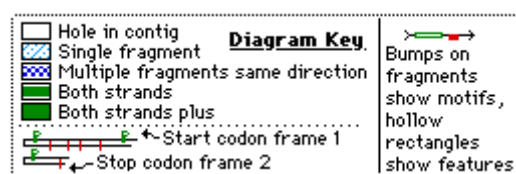
## 7.3 Vedlegg C: Sammenstilling av reads og primere mot referansesekvens

Gjennomgang av sekvenseringsresultater ble utført i Sequencher. Sekvenserte PCR-produkter, *reads*, ble sammenstilt mot referansesekvens og primere, slik det er vist for storfe og rein i **Tabell C-1** og **C-2**. Readsnes kvalitet etter trim og produktstørrelse er oppsummert i **Tabell 3-2**. Assembleringen ble utført med minimum match satt til 90 % og minimum overlapp 20 bp (da primerne er av denne lengden), resterende innstillinger var forhåndsinnstilte.

**Tabell C-1 Sammenstilling av trimmede reads og primere mot referansesekvens for storfe (*Bos taurus*).**

Fargeforklaring er gitt til høyre.

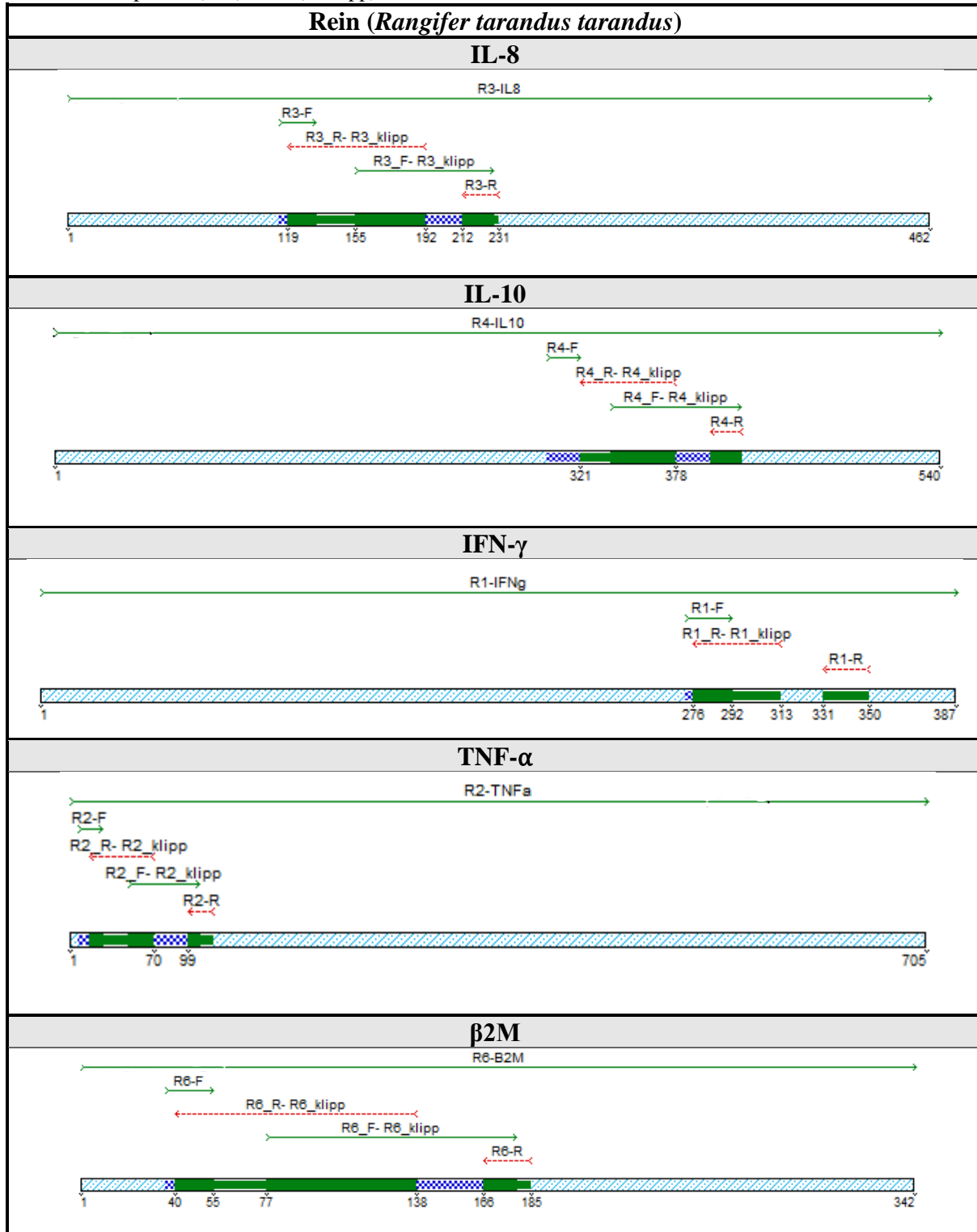
- : Referansesekvens (\*-IL8/IL17/IFNg),  
fremover primer (\*-F), read (\*\_klipp).  
← : Revers primer (\*-R), read (\*\_klipp)



**Tabell C-2 Sammenstilling av trimmede reads og primere mot referansesekvens for rein (*Rangifer tarandus tarandus*). Fargeforklaring er gitt til høyre.**

→ : Referansesekvens (\*-IL8/IL10/IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ /B2M), fremover primer (\*-F), read (\*\_klipp).  
 ← : Revers primer (\*-R), read (\*\_klipp)

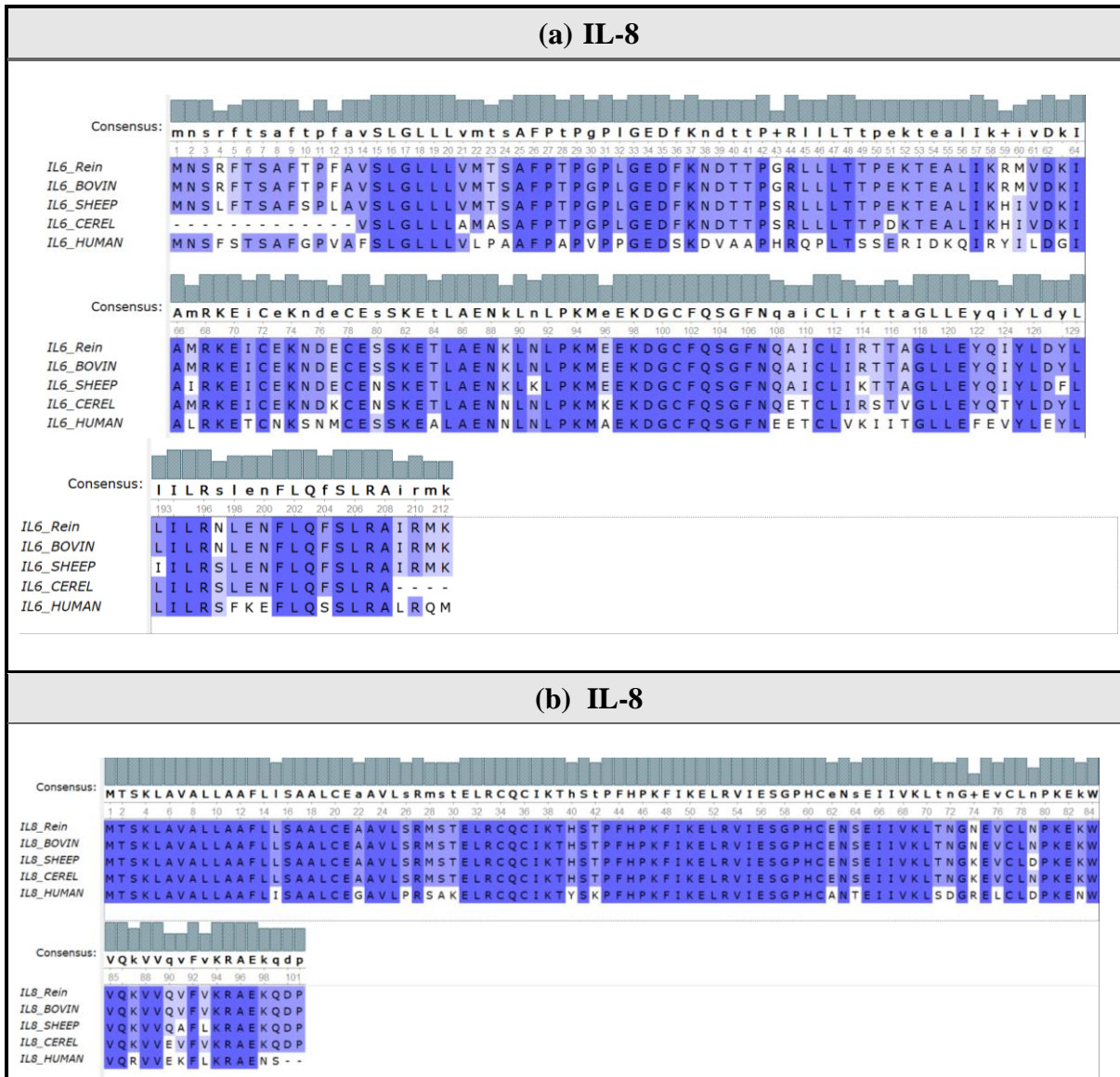
| Diagram Key |   |
|-------------|---|
|             | Hole in contig  |
|             | Single fragment   |
|             | Multiple fragments same direction                               |
|             | Both strands  |
|             | Both strands plus   |
|             | Start codon frame 1   |
|             | Stop codon frame 2  |
|             | Bumps on fragments show motifs, hollow rectangles show features |



## 7.4 Vedlegg D: Multippel sammenstilling

Det ble utført multippel sammenstilling (MSA) mellom aminosyresekvenser for IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$  fra rein, storfe (BOVIN), sau (SHEEP), hjort (CEREL) og menneske (HUMAN). MSA ble laget i Unipro Ugene, ved bruk av MAFFT. Proteinsekvenser ble hentet fra Uniprot. BLAST av storfesekvens ble benyttet på reingenom å finne sekvensene for rein. Multippel sammenstilling for IL-6, IL-8, IL-17 og TNF- $\alpha$  viste ingen forskjell i sekvens mellom rein og storfe (**Tabell D-1**).

**Tabell D-1 Multippel sammenstilling (MSA) for cytokiner.** MSA ble utført for rein, storfe (\*\_BOVIN), sau (\*\_SHEEP), hjort (\*\_CEREL) og menneske (\*\_HUMAN) for cytokinene (**a-d**) IL-6, IL-8, IL-17 og TNF- $\alpha$ . Mørk blå farge indikerer samme aminosyreresiduer på tvers av arter. Lysere farge indikerer at det er ulike residuer i den bestemte posisjonen for noen av artene, og hvit farge indikerer at en residu skiller seg fra de andre hos denne arten.

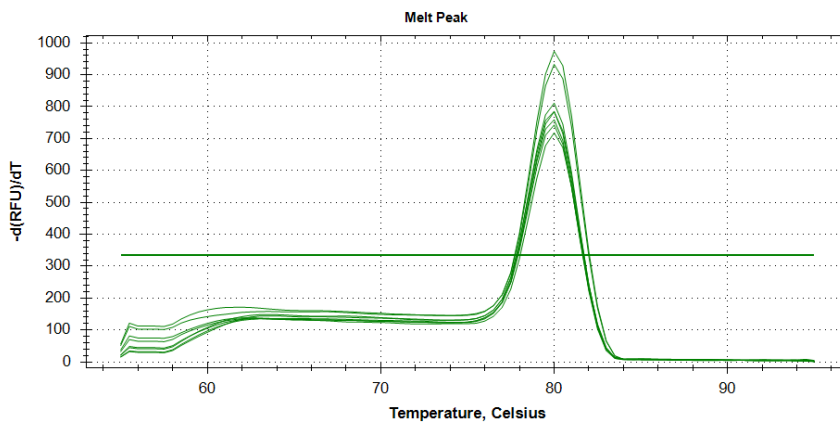




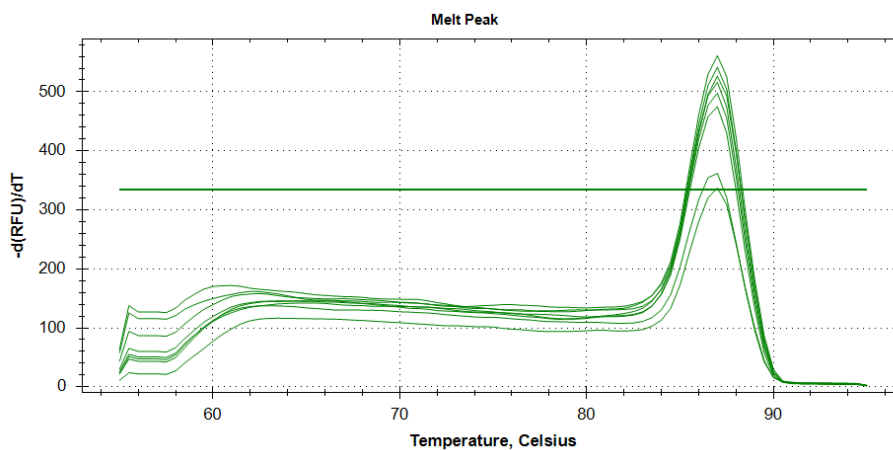
## 7.5 Vedlegg E: Smeltekurver etter qPCR for rein og storfe

### Rein (*Rangifer tarandus tarandus*)

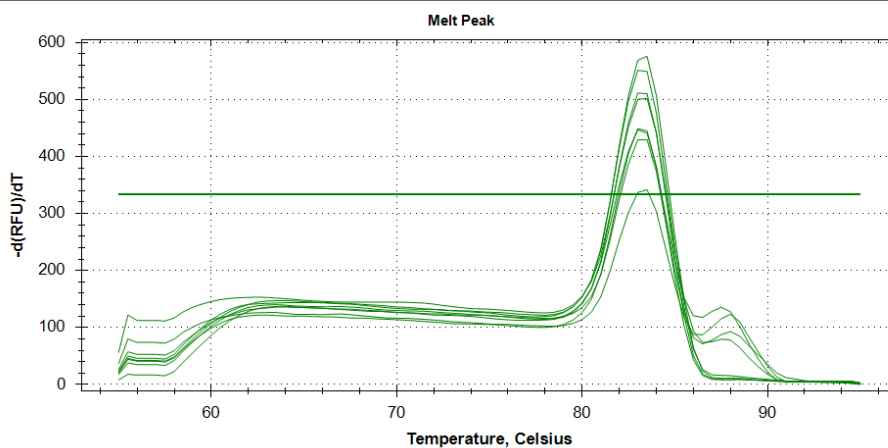
#### IL-8



#### IL-10

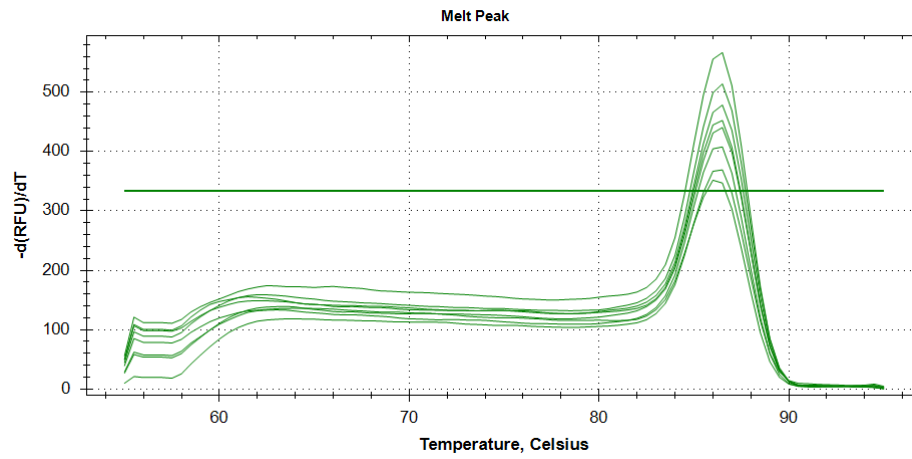


#### IL-17

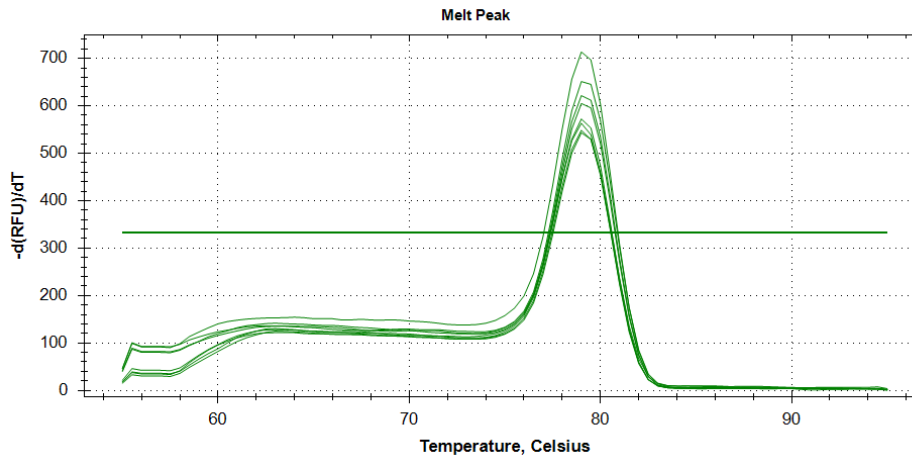




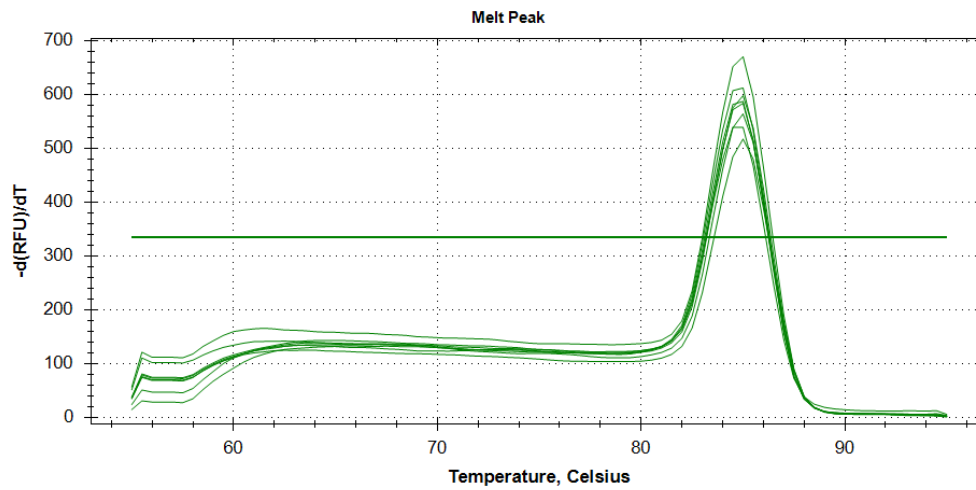
**TNF- $\alpha$**



**IFN- $\gamma$**

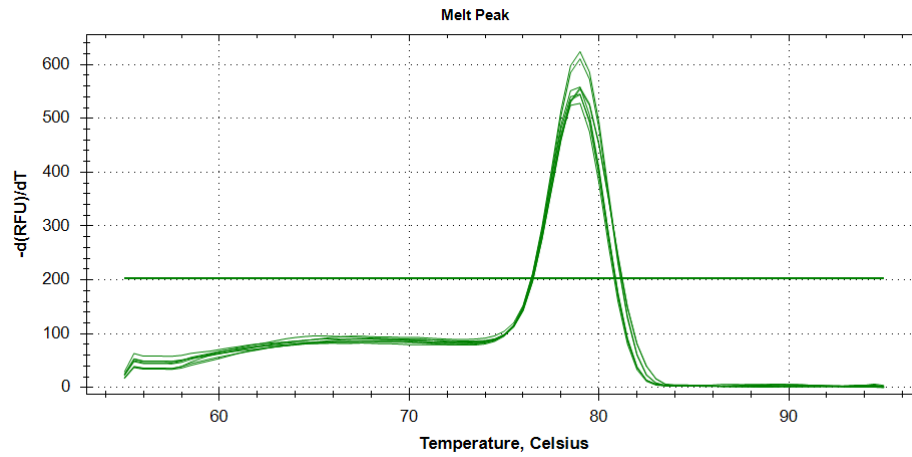


**$\beta$ 2M**

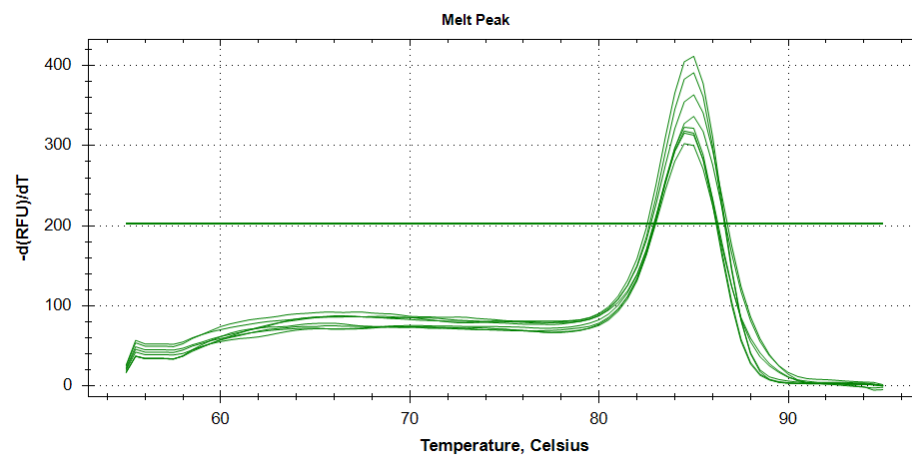


Storfe (*Bos taurus*)

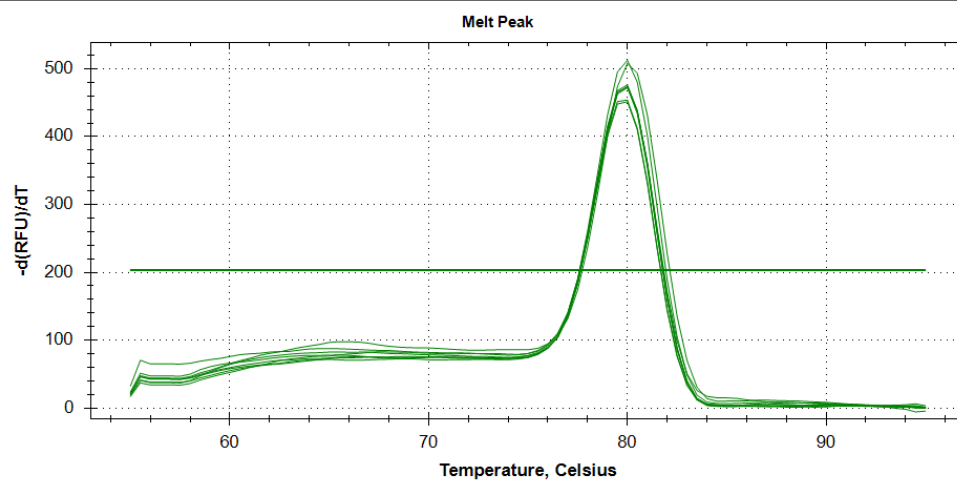
## IL-8

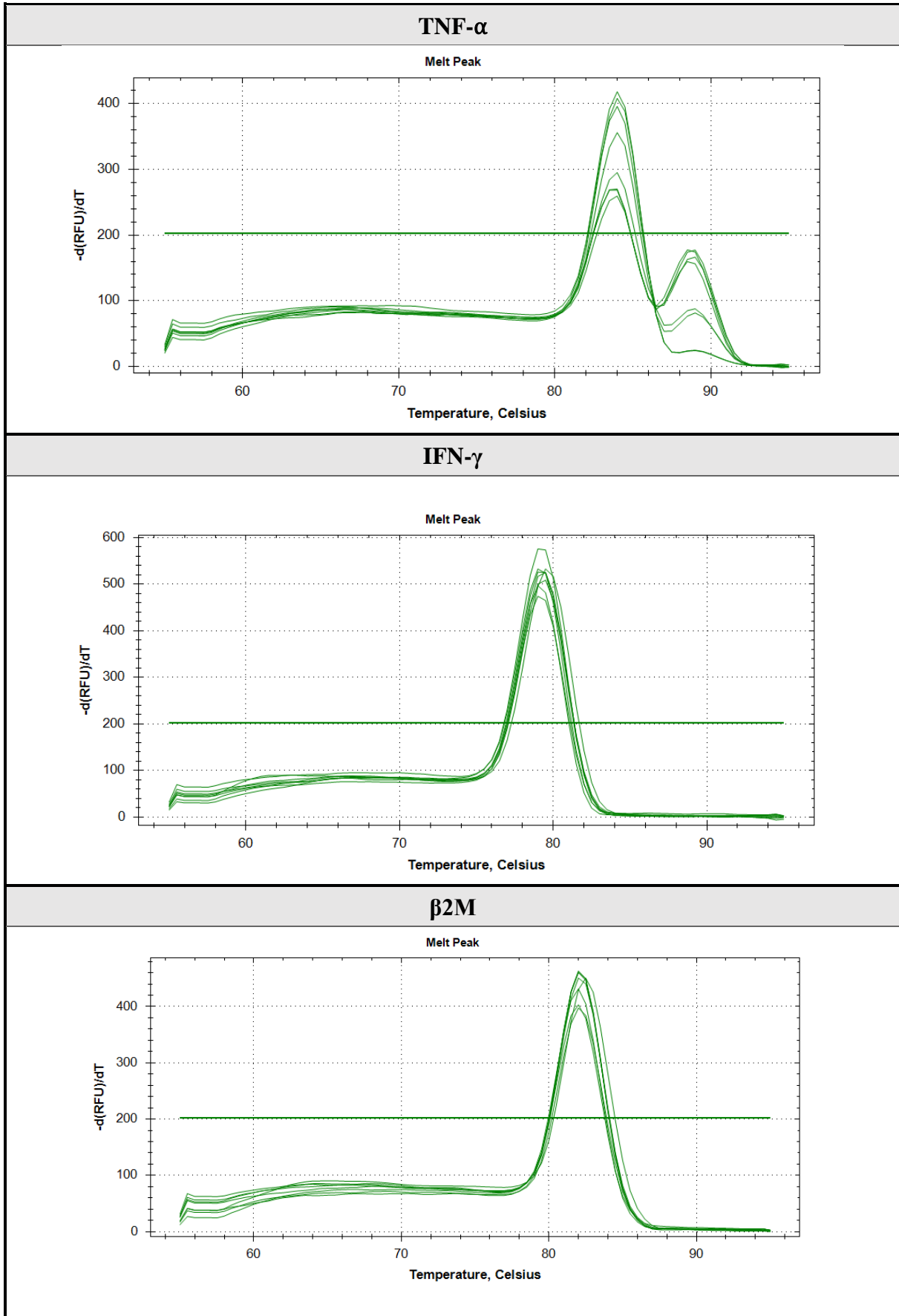


## IL-10



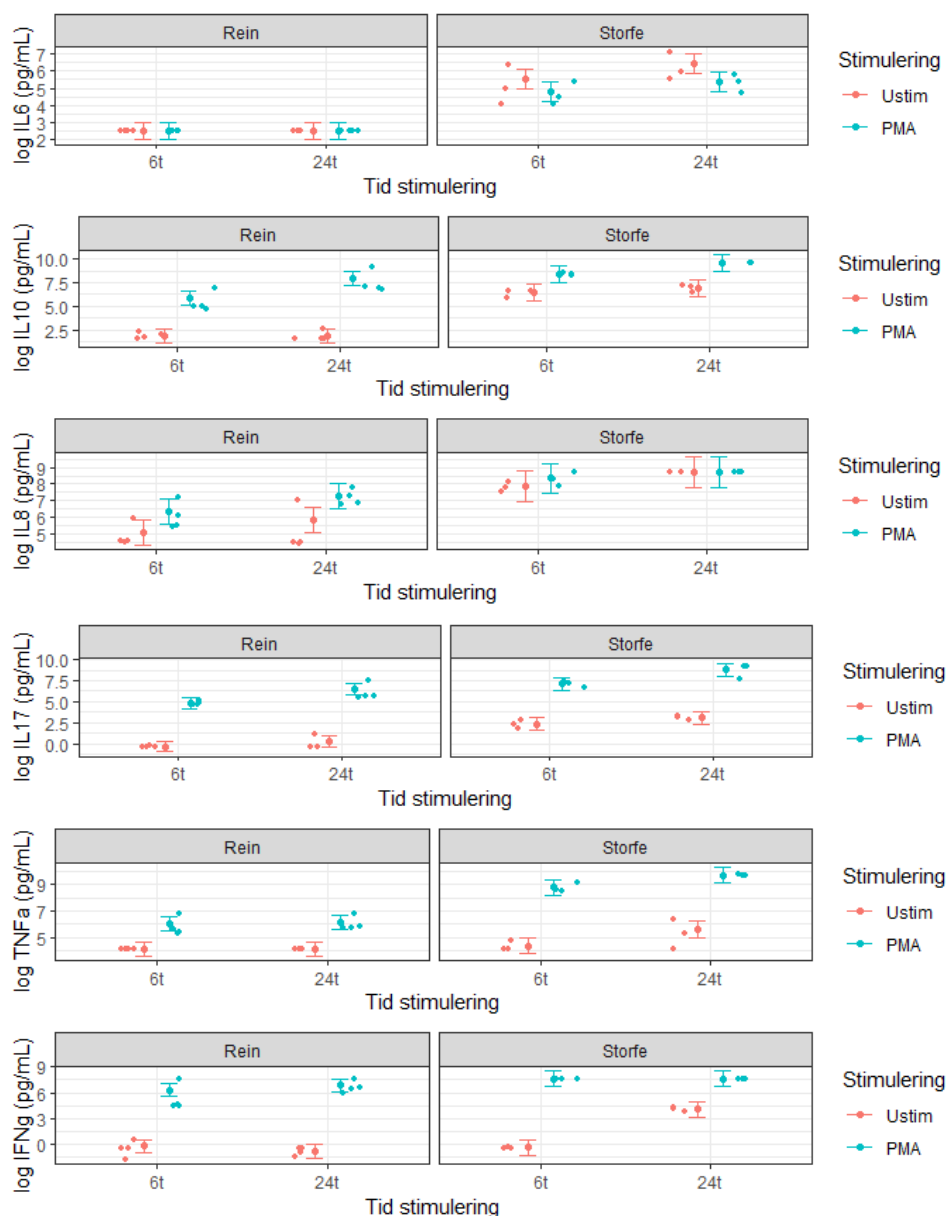
## IL-17





## 7.6 Vedlegg F: Signifikans PMA-I stimulering

I **Figur F-1** er dataene i log-skala for å få tydeligere frem eventuelle forskjeller. Når konfidensintervaller ikke overlapper er det signifikante forskjeller. Dataene er skjevfordelte og positive, derfor ble en regresjonsmodell for gammafordelte data benyttet for å kartlegge signifikans. Modellen ble laget ved bruk av *ggplot* i R.



**Figur F.1 Log-transformerte konsentrasjoner av cytokiner.** Konsentrasjoner (pg/mL) gjennomsnitt  $\pm$  95% CI i log-skala. Cytokiner ble målt ved bruk av MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1. Der det er signifikant forskjell i cytotinkonsentrasjon, er der konfidensintervallet til ustimulerte (—●—) Ustim og PMA-I (—●—) behandlede celler ikke overlapper hverandre. Nøyaktige signifikansnivåer og P-verdier er vist i tabeller i resultatdel. Figuren ble laget ved bruk av *glm* og *ggplot* funksjonen i R.

## 7.7 Vedlegg G: Prøveoversikt

Oversikten (**Tabell G-1**) viser ID, alder, prøvedato, antall PBMC isolert, detaljer for mitogenstimulering, utbytte ved RNA-ekstrahering, hvilke prøver som ble brukt til qPCR, samt hvilke prøver som ble analysert på ulike plater for multiples cytokinanalyse. For serumundersøkelser angis også hvilke dager etter ORFV- og CvHV2-infeksjon prøver ble analysert.

Tabell G-1

| Individ                  | Alder*      | Dato       | Prøvetaking Metode | Kommentar                  | Isolering av PBMC mill. celler/mL | celler/mL totalt | Mitogenstimulering** Kons. (celler/mL) | Volum (mL)            | Elektrahering av RNA Gr. basert på "Oppsett" Gj. snitt (µg/mL) ±SD | qPCR | Multiplex- analyse Plate nr. |          |
|--------------------------|-------------|------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|--|-----------------------|--|------|------------------------------|----------|
| Pilotforsøk rein (n=4)   | >1 år       | 21.01.2021 | Halsvene           |                            | N/A                               | N/A              | I                                      | 1 × 10 <sup>6</sup>   | 0,5  | -    | -                            | II       |
| Pilotforsøk storfe (n=3) | >1 år       | 26.10.2020 | Halsvene           |                            | N/A                               | N/A              | I                                      | 1 × 10 <sup>6</sup>   | 0,5  | -    | -                            | I        |
| Storfe 1                 | >1 år       |            |                    |                            | 21,6                              | 64,9             |  |                       |  |      |                              | III      |
| Storfe 2                 | >1 år       | 01.02.2022 | Halsvene           |                            | 16,8                              | 50,4             | II                                     | 1 × 10 <sup>6</sup>   | 1  | 31   | 20                           | III      |
| Storfe 3                 | >1 år       |            |                    |                            | 13,3                              | 39,9             |  |                       |  |      |                              | III      |
| Storfe 4                 | >1 år       |            |                    |                            | 29,4                              | 88,2             |  |                       |  |      |                              | III      |
| Storfe 5                 | >1 år       | 05.04.2022 | Halsvene           |                            | 26,9                              | 80,7             | V                                      | 2 × 10 <sup>6</sup>   | 1  | 66   | 43                           | III      |
| Storfe 6                 | >1 år       |            |                    |                            | 34,2                              | 102,6            |  |                       |  |      |                              | III      |
| Storfe 7                 | >1 år       |            |                    |                            | 20,0                              | 60,0             |  |                       |  |      |                              | V        |
| Storfe 8                 | >1 år       | 06.10.2022 | Halsvene           |                            | 32,7                              | 98,0             | VIII                                   | 2 × 10 <sup>6</sup>   | 2  | 100  | 40                           | V        |
| Storfe 9                 | >1 år       |            |                    |                            | 26,7                              | 80,0             |  |                       |  |      |                              | V        |
| Rein 1+2                 | Samleprøve* |            |                    |                            | 2,6                               | 7,8              |  |                       |  |      |                              | III      |
| Rein 3                   | >1 år       | 14.02.2022 | Ved avblødning     | Prøver eksponert for kulde | 2,5                               | 7,6              | III                                    | 1 × 10 <sup>6</sup>   | 1  | 17   | 14                           | III      |
| Rein 4                   | >1 år       |            |                    |                            | 2,2                               | 6,6              |  |                       |  |      |                              | III      |
| Rein 5                   | >1 år       | 23.02.2022 | Ved avblødning     | Skjernet for kulde         | 4,1                               | 12,3             | IV                                     | 1,5 × 10 <sup>6</sup> | 1  | -    | -                            | III      |
| Rein 6                   | >1 år       |            |                    |                            | 28,1                              | 84,4             |  |                       |  |      |                              | IV, V*** |
| Rein 7                   | >1 år       | 31.08.2022 | Halsvene           |                            | 36,5                              | 109,6            | VI                                     | 2 × 10 <sup>6</sup>   | 1  | 19   | 14                           | IV, V*** |
| Rein 8                   | >1 år       |            |                    |                            | 22,3                              | 66,8             |  |                       |  |      |                              | IV, V*** |
| Rein 9                   | >1 år       | 05.10.2022 | Halsvene           |                            | 11,0                              | 33,0             | VIII                                   | 2 × 10 <sup>6</sup>   | 2  | 73   | -                            | V        |

\* Rein 1+2: Samleprøve fra to individer (et ≤1 år og et >1 år). To prøver ble slått sammen siden det var for få celler isolert fra hvert individ.

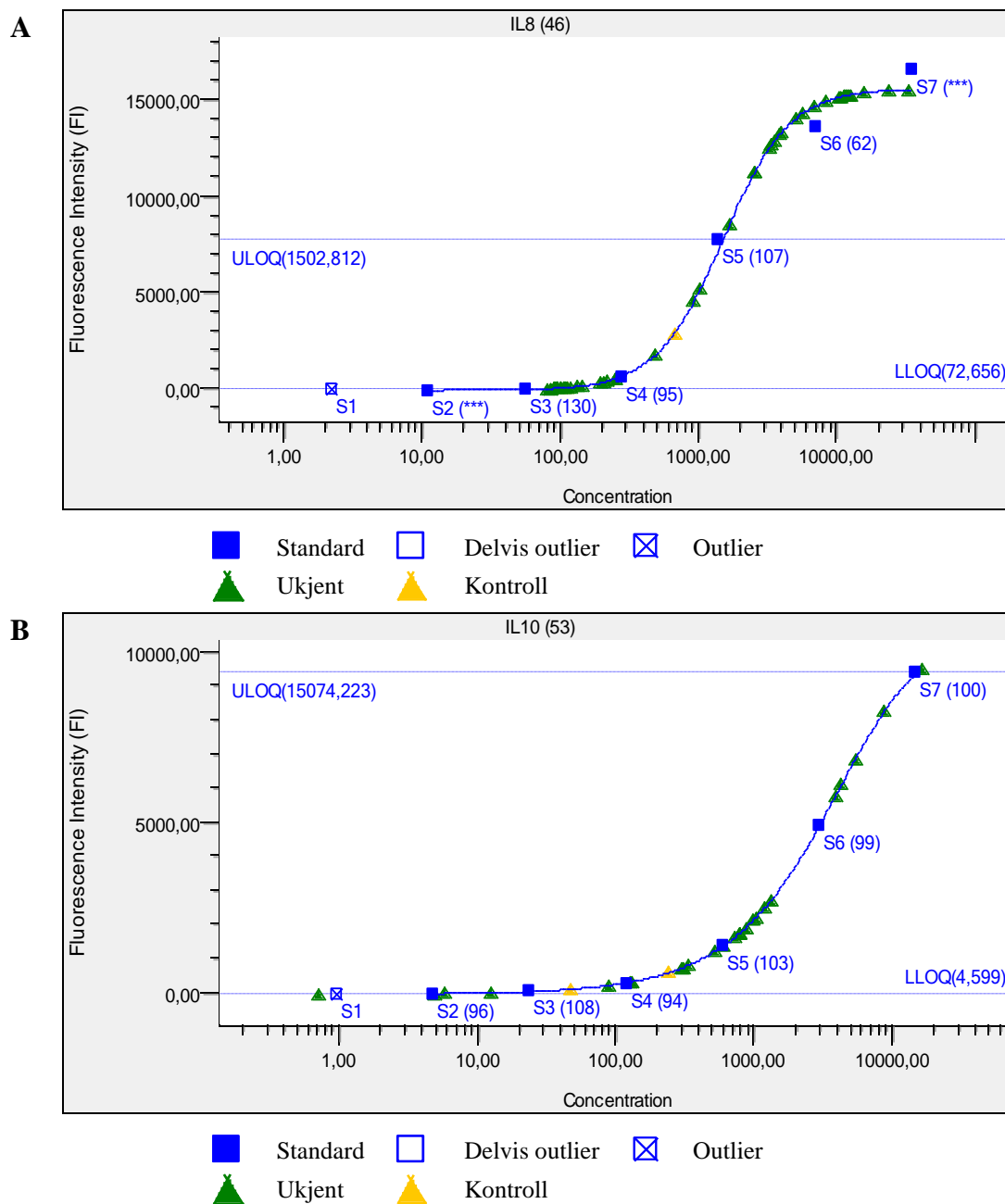
\*\* Se Tabell 2-3 for alle detaljer

\*\*\* Urvalg ble kjørt under multiplexoppsett IV og V. Dette gjaldt ustimulerte og PMA-I-stimulerte prøver (6 og 24 t)

| Serumprøver: |                |         |        |                      |                           |                            |
|--------------|----------------|---------|--------|----------------------|---------------------------|----------------------------|
| Virus        | Identifikasjon | Alder   | Antall | Prøvetaking (d.p.t.) | Referanser                | Multiplexanalyse Plate nr. |
| ORFV         | Rein A1-6      | 1 år    | 6      | 0, 5, 12             | (Tryland et al., 2013)    | VI                         |
| CvHV2        | Rein B1-5      | 2-6 år* | 5      | 0, 4, 7, 10          | (das Neves et al., 2009a) | VI                         |

\* Dekteige simler

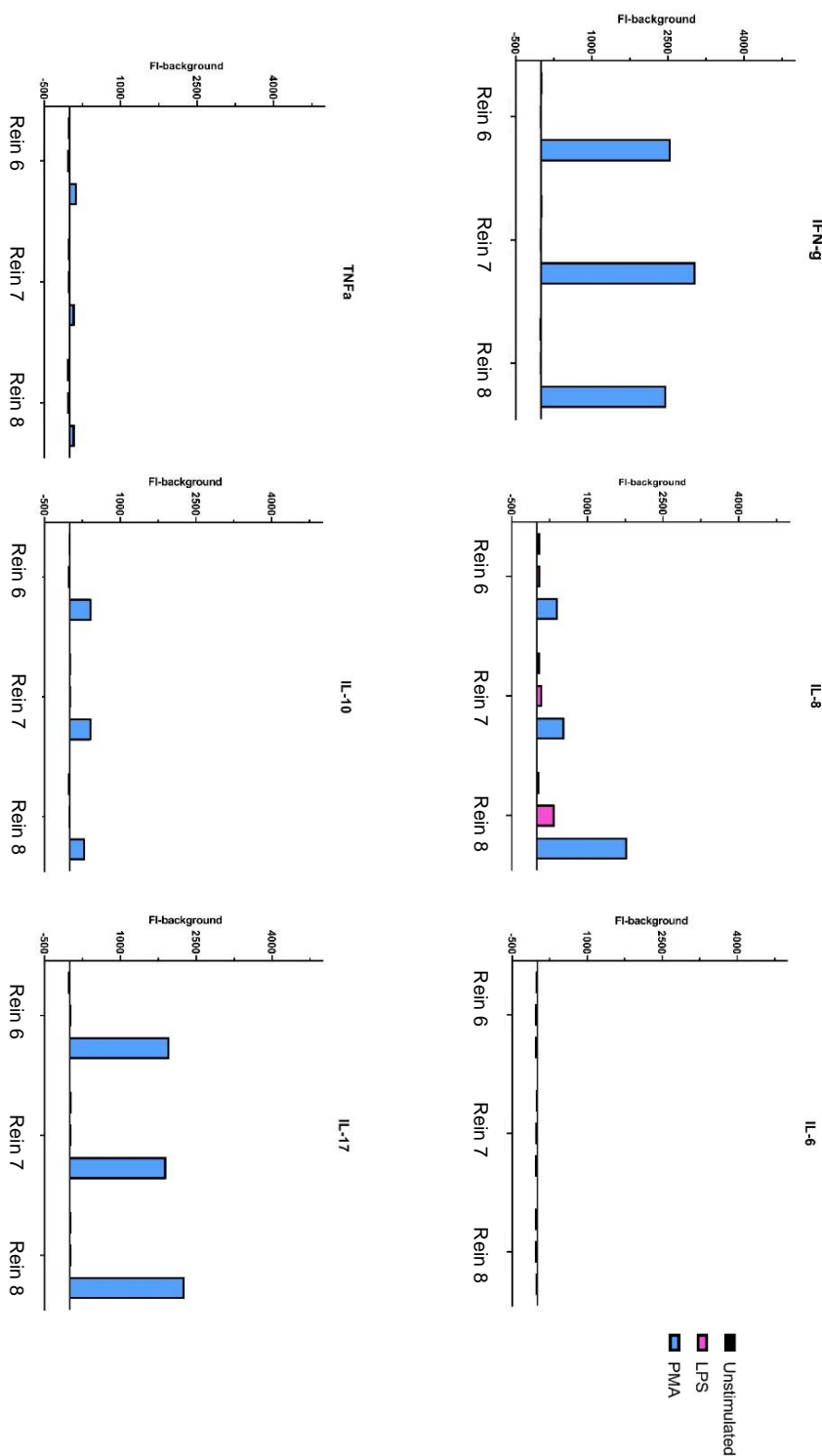
## 7.8 Vedlegg H: Standardkurver for IL-8 og IL-10



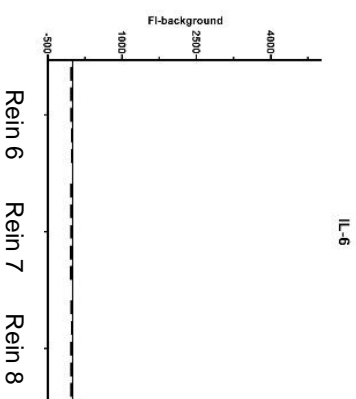
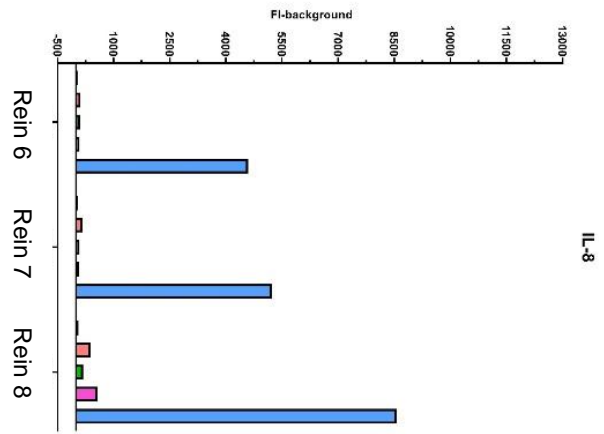
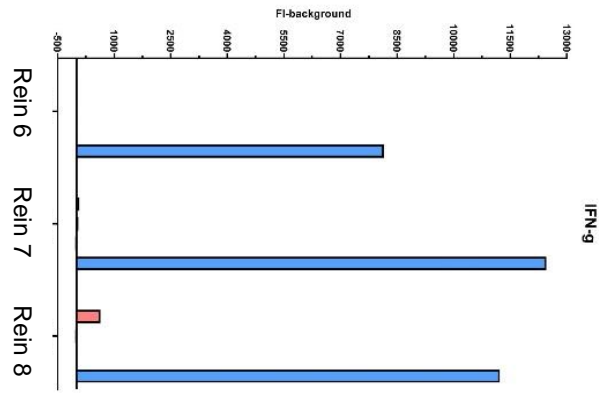
**Figur H-1 Standardkurver av god og dårlig kvalitet.** S1 til S7 er standard i ulike fortynninger.  $(Obs/Exp)*100$  og er optimalt innenfor et 70-130 %-intervall, og er oppgitt i parentes etter hver av standardene. Øvre (ULOQ) og nedre (LLOQ) grense for kvantifisering er markert med stiplede linjer. **(A)** Flere standarder for IL-8 var utenfor optimalt intervall. Dette gjør at ULOQ blir svært lav, og flere ukjente prøver havnet over denne grenseverdien. Resultater for IL-8 ved kulebasert multipleks analyse ble derfor ikke presentert i resultatdel. **(B)** Til sammenligning viser standardkurven for IL-10 at standarder er innenfor optimalt intervall og kontrollprøver og ukjente prøver er innenfor de satte grenseverdiene.

## 7.9 Vedlegg I: Stimulering med mitogener i oppsett nr. VI

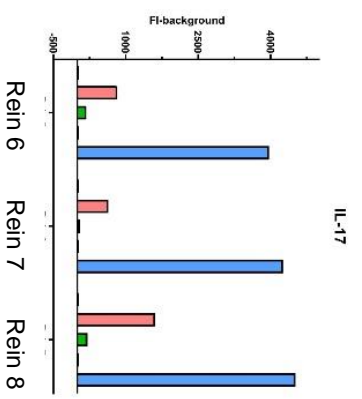
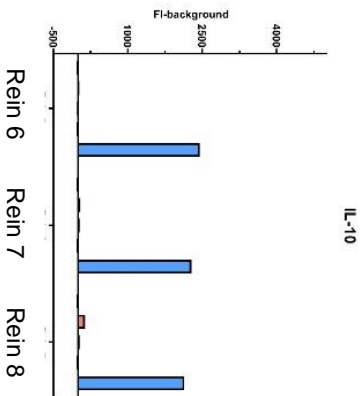
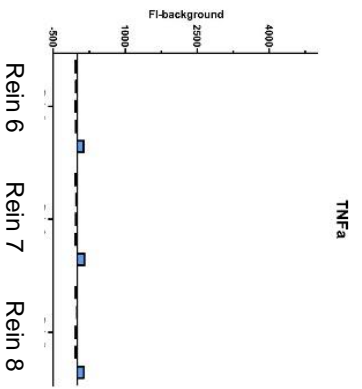
Mitogenstimulering, oppsett VI, rein 6,7 og 8, etter 6 og 24 timer stimulering.



Oppsett VI: Rein 24t



- LPS
- PMA
- ConA
- PHA
- Ustlm.



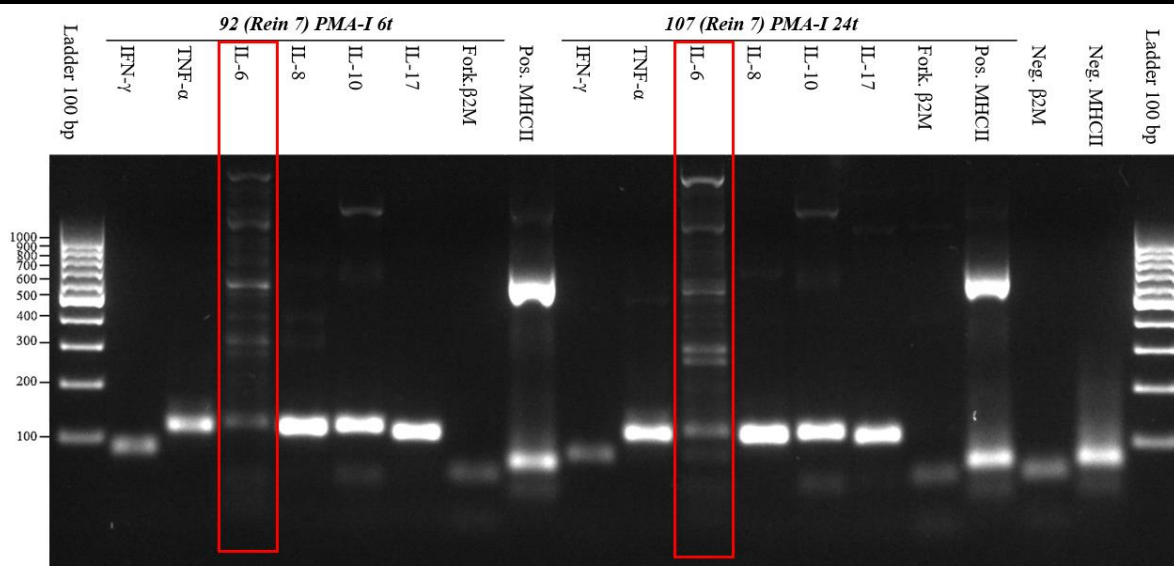


## 7.10 Vedlegg J: Gelelektroforese

Rød ramme viser gelelektroforese av PCR-produkter der det ble benyttet primere for IL-6 for (Figur J-1) rein og (Figur J-2) storfe. Primere benyttet for  $\beta$ 2M under gel Figur J-1 ble forkastet (Fork.).

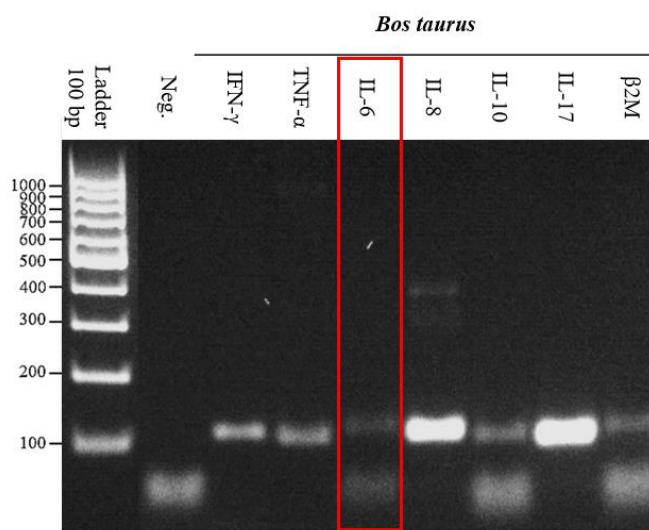
**Tabell J-1: Primere for IL-6.** Disse ble brukt for PCR-produkter i Figur J-1 og J-2.

| Art    | Gen  | NCBI accession nr. | Primersekvens            | PCR-produkt (bp) |
|--------|------|--------------------|--------------------------|------------------|
| Storfe | IL-6 | NM_173923          | F: AAAGAGAGCTCCATCTGCCC  | 119              |
|        |      |                    | R: GGGGTAGGGAAAGCAGAAGT  |                  |
| Rein   | IL-6 | -                  | F: CTCTTCACAAGCGCCTTCAG  | 120              |
|        |      |                    | R: GCTTGGGGTGGTGTTCATTTT |                  |



**Figur J-1: Gelelektroforese PCR-produkter rein.** Brønner der primerpar for IL-6 ble benyttet, er markert med rød firkant. Disse primerne ble forkastet.

**Figur J-2(høyre): Gelelektroforese PCR-produkter storfe.** Brønn der primerpar for IL-6 ble benyttet, er markert med rød firkant.



## 7.11 Vedlegg K: mRNA fold change

**Tabell K-1: mRNA fold change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ). mRNA fold change oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD**

| Cytokin                        | Stimulering | Rein                                   |        | Storfe                                 |       |
|--------------------------------|-------------|--|--------|--|-------|
|                                |             | Gjennomsnitt<br>$2^{-\Delta\Delta Cq}$ | SD     | Gjennomsnitt<br>$2^{-\Delta\Delta Cq}$ | SD    |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | PMA - I 6t  | 677,2                                  | 347,9  | 1868,0                                 | 813,3 |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | PMA - I 24t | 1217,2 <sup>a</sup>                    | 1135,0 | 90,5                                   | 41,4  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | PMA - I 6t  | 21,9                                   | 13,5   | 5,4                                    | 0,2   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | PMA - I 24t | 9,3                                    | 3,9    | 1,3                                    | 0,3   |
| <b>IL-8</b>                    | PMA - I 6t  | 7,5                                    | 4,7    | 0,4                                    | 0,4   |
| <b>IL-8</b>                    | PMA - I 24t | 2,6                                    | 0,7    | 0,0                                    | 0,0   |
| <b>IL-10</b>                   | PMA - I 6t  | 305,7                                  | 93,1   | 39,8                                   | 40,2  |
| <b>IL-10</b>                   | PMA - I 24t | 56,2                                   | 9,3    | 10,8                                   | 9,1   |
| <b>IL-17</b>                   | PMA - I 6t  | 3879,2 <sup>b</sup>                    | 5932,6 | 222,5                                  | 141,0 |
| <b>IL-17</b>                   | PMA - I 24t | 43,6                                   | 71,2   | 61,2                                   | 35,7  |

a: Stor variasjon mellom individer: 21,30 - 1773,44 - 557,07 - 2516,84

b: Stor variasjon mellom individer: 507,89 - 10729,34 - 400,45



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway