

# **Sammenligning av to varianter av infeksiøs pankreasnekrose-virus – sekvensanalyser og immunresponser**

Masteroppgave i fiskehelse

Av

Marte Føllesø Sønnervik



Institutt for Biovitenskap

Universitet i Bergen

2022

© Marte Follesø Sønnervik

Sammenligning av to varianter av infeksjons pankreasnekrose-virus – sekvensanalyser og immunresponser.

Universitetet i Bergen, 2022

## Forord

Jeg ønsker først og fremst å takke veilederen min Professor Gyri T. Haugland for en spennende oppgave, og god veiledning underveis både med laboratoriearbeidet og i skriveprosessen. Tusen takk for gode råd og innspill gjennom hele prosjektet. Du har alltid hatt et fantastisk engasjement som har vært veldig motiverende.

Retter og en stor takk til medveileder Irene Ørpetveit og Veterinærinstituttet for virusmateriale til oppgaven og gode råd. Jeg ønsker også å takke medveileder Amanuensis Anita Rønneseth for hjelp og støtte både under immuniseringen av laks, og også gode råd underveis gjennom prosjektet.

Jeg vil videre takke Harald S. Lunde og Rebecca Marie Ellul for hjelp på laboratoriet og nyttige tips.

Tusen takk til mine medstudenter som har gitt meg fem fine studieår. Dere har både inspirert og motivert meg. Jeg ser frem til at våre veier krysses igjen.

Til slutt vil jeg takke familie for kjempegod støtte gjennom alle år!

## Sammendrag

Virussykdommer har vært et stort problem i oppdrettsnæringen. Kunnskap om interaksjoner mellom virus og vert er viktig for å forstå hvordan virus kan gi sykdom, og hvilke mekanismer som spiller inn. Infeksiøs pankreasnekrose-virus (IPNV) er et hardført virus som forårsaker infeksiøs pankreasnekrose (IPN) og stor dødelighet hos yngel i startfôringsfasen og ved sjøutsett. Da det ble funnet at resistens mot IPN ble kontrollert av variasjoner i epitel cadherin genen, ble det laget IPN kvantitativ trait locus (QTL) laks. Bruken av IPN QTL-rogn førte til stor nedgang i antall IPN utbrudd. De siste årene har det derimot vært rapportert om økning i antall tilfeller av IPN, som forårsakes av en ny variant av viruset. Denne varianten har vist å gi sykdom også på IPN QTL-fisken, som i utgangspunktet skal være mer resistent mot IPN.

I denne studien ble virus protein 2 (VP2) til to varianter av IPNV, V-1244 og Vir410/18 (forårsaker dødelighet hos IPN QTL-fisk) sekvensert for å undersøke forskjeller på både nukleotid- og aminosyrenivå. Det ble funnet at de to variantene er ulik på både nukleotid- og aminosyrenivå. Vir410/18 hadde de lavvirulente kombinasjonene av aminosyrer definert av Song et al. (2005) som skal være mindre virulent, men med det muligens kan unngå fiskens immunsystem og etablere infeksjon.

I denne studien ble fisk immunisert med de to variantene for å studere og måle produksjonen av antistoffer. Med ELISA ble det vist at det var dannet antistoffer, men at mengden spesifikke antistoffer var noe lav. Dette resultatet gjenspeilte seg i resultatene fra Western blot analysene av antiserumene.

I tillegg ble leukocytter fra hodenyre hos Atlantisk laks smittet *in vitro* med de to variantene av IPN-viruset for å undersøke og måle uttrykk av proinflammatoriske cytokiner og interferoner (IFNer). Ved bruk av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR), ble det målt regulering av de undersøkte cytokinene og interferonene etter virusmitte. I leukocytter smittet med V-1244 ble type I IFNene, IFNa, IFNb og IFNc funnet å være signifikant forskjellig fra 4 timer til 24 timer. I leukocytter smittet med Vir410/18 ble det ikke funnet noe signifikant forskjell for type I IFNer mellom 4 timer og 24 timer. Det ble derimot funnet en signifikant forskjell for Vir410/18 mellom 4 og 24 timer for Interleukin-6. Resultatene viser at immunresponsen er markant forskjellig ved infeksjon med de to variantene, dette kan bidra til å forklare hvorfor Vir410/18 kan gi sykdom hos IPN-resistent laks.

# Innholdsfortegnelse

<b>1.0 Introduksjon.....</b>	<b>1</b>
1.1 Infeksiøs pankreasnekrose-virus (IPNV) .....	1
1.1.1 Oppbygging av IPNV .....	3
1.1.2 Replikasjonssyklus til IPNV .....	7
1.2 Det innate immunsystemet hos fisk .....	8
1.2.1 Toll-like reseptorer.....	9
1.2.2 Retinolsyre induserende gen (RIG)-1 like reseptorer (RLRer).....	10
1.2.3 Interferoner (IFNer) .....	11
1.3 Adaptiv immunitet .....	13
1.3.1 B-celle aktivering.....	13
1.3.2 Antistoffer .....	14
1.4 Målsetning for studiet.....	15
<b>2.0 Material og Metode .....</b>	<b>16</b>
2.1 Virus .....	16
2.2 Dyrking av cellekultur CHSE-214.....	16
2.3 Virustitrering – plaque assay .....	16
2.4 Isolering av leukocytter fra perifert blod og hodenyre .....	18
2.5 <i>In vitro</i> smitte av leukocytter med V-1244 og Vir410/18 .....	19
2.6 Isolering av RNA .....	19
2.7 Analyse av totalt RNA i Nanodrop 2000 spectrophotometer .....	20
2.8 DNase I behandling.....	20
2.9 Nukleinsyre gel-elektroforese.....	21
2.10 cDNA syntese (qScript).....	21
2.11 Kvantitativ PCR (qPCR) .....	22
2.12 Sanger sekvensering .....	24
2.13 «Multi sequence alignment» (MSA) og fylogenetisk analyser.....	27
2.14 Inaktivering av IPNV for immunisering .....	28
2.14.1 Test av inaktivering.....	28
2.15 Forsøksfisk.....	29
2.16 Immunisering av laks med V-1244 og Vir410/18.....	30

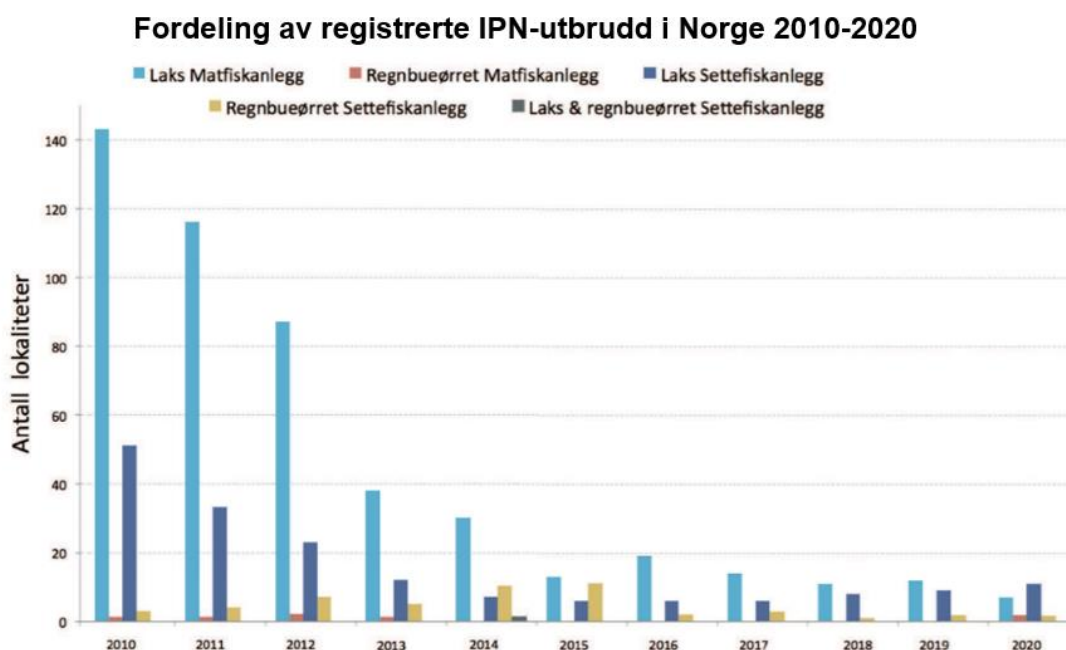
2.16.1 Prøveuttak av immunisert fisk .....	31
2.17 Oppdyrking og frysetørking av V-1244 og Vir410/18 .....	31
2.18 Sonikering av virus.....	31
2.19 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) .....	32
2.20 SDS-PAGE og Sølvfarging .....	34
2.21 Western blot .....	34
<b>3.0 Resultat.....</b>	<b>36</b>
3.1 Sekvensanalyse og fylogeni av VP2 fra ulike varianter av IPNV .....	36
3.2 Cytopatogen effekt av V-1244 og Vir410/18.....	40
3.3 Inaktivering av virus.....	42
3.4 Immunisering av laks .....	43
3.5 Optimalisering av antigenkonsentrasjon for ELISA.....	43
3.6 Deteksjon av spesifikke antistoffer med ELISA .....	45
3.7 Sølvfaring og Western blot.....	47
3.8 Analyse av isolert RNA.....	49
3.9 Nukleinsyre gel elektroforese for validering av SYBR-green assays .....	49
3.10 Immunrespons i HKL smittet med de to IPNV variantene .....	50
<b>4.0 Diskusjon.....</b>	<b>53</b>
4.1 Sekvensering av VP2 proteinet hos IPNV-variantene .....	53
4.2 Immunisering og dannelse av spesifikke antistoffer .....	55
4.3 Deteksjon av IPNV immunogen ved bruk av Western blot.....	56
4.4 Virus IFN-antagonisme og regulering av innat immunrespons .....	56
4.5 Konklusjon.....	60
4.6 Forslag til videre studier .....	60
<b>5.0 Referanseliste.....</b>	<b>61</b>
<b>6.0 Vedlegg .....</b>	<b>71</b>
6.1 Oppskrifter dyrkingsmedium.....	71
6.1.1 Dyrkingsmedium CHSE-214 .....	71
6.1.2 Smittemedium CHSE-214 .....	71
6.1.3 L-15 + medium (100mL) .....	71
6.1.4 Heparin stock løsning .....	71

6.2 Oppskrift løsning.....	72
6.2.1 1 x TAE.....	72
6.2.2 1 % agarosegel.....	72
6.2.3 2 % agarosegel.....	72
6.2.4 A løsning.....	72
6.3 ELISA.....	72
6.3.1 PBS, pH 7,3, 1L 10x.....	72
6.3.2 PBS-Tween.....	73
6.3.3 Blokkeringsløsning (3 % tørrmelk).....	73
6.3.4 0,1M sitronsyre.....	73
6.3.5 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O.....	73
6.3.6 Fosfat-citrat buffer, pH 5,0.....	73
6.3.7 Substratløsning.....	74
6.3.8 Stoppløsning (2,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	74
6.3.9 Konjugat.....	74
6.4 SDS-PAGE.....	74
6.4.1 1,5M Tris HCl, pH 8,8.....	74
6.4.2 0,5M Tris HCl, pH 6,8.....	74
6.4.3 12% Separasjonsgel.....	74
6.4.4 Stacking gel.....	75
6.5 Western blot.....	75
6.4.1 10 x blottebuffer.....	75
6.4.2 10 x TBS 500mL.....	75
6.4.3 1 x Blottebuffer.....	75
6.4.4 1 x TBS (20mM Tris, 500mM NaCl).....	76
6.4.5 TTBS.....	76
6.4.6 Blokkeringsløsning (3 %).....	76
6.4.7 Antistoff buffer.....	76
6.5 Sølvfarging.....	76
6.5.1 Fixative Enhancer solution preparation.....	76
6.5.2 Staining Solution.....	76
6.6 P-verdier etter t-test.....	77
6.7 Tabeller over vekt og lengde av immunisert fisk.....	77

## 1.0 Introduksjon

### 1.1 Infeksiøs pankreasnekrose-virus (IPNV)

Infeksiøs pankreasnekrose (IPN) er en virussykdom, forårsaket av infeksiøs pankreasnekrose-virus (IPNV), som kan gi sykdom hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ved flere stadier i livssyklusen (Hillestad et al., 2021). IPN forårsaker høy dødelighet hos yngel, og fisk like etter plommesekkstadiet, ved startfôringsfasen, er særlig utsatt. Postsmolt kort tid etter sjøutsett er også utsatt for sykdommen (Fig. 1) (Hillestad et al., 2021). Sykdommen ble først rapportert i 1941 fra bekkerøye (*Salvelinus fontinalis* L.) i Canada (M'Gonigle, 1941). IPN ble for første gang påvist i Norge i 1975 i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* L.) i ferskvann (Håstein & Krogsrud, 1976), og var en meldepliktig sykdom fra 1991 til 2008.



*Figur 1: Fordeling av registrerte IPN-utbrudd i Norge 2010-2020. (Sommerset et al., 2022)*

Kliniske tegn på sykdommen er forenelig med typiske tegn for neurotropisk virusinfeksjon som unormal svømmeadferd med spiralsvømming, samt mørk pigmentering, avmagring og ascites i bukhulen (Dopazo, 2020). Patologiske forandringer forenelig med IPN innebærer nekrose av pankreas akinarceller og tarm-mukosa, skade av hepatisk vev, og utstøtt tarmepitel fra gatt (Benkaroun et al., 2021).

På grunn av den økonomiske påvirkningen sykdommen har hatt i oppdrettsnæringen har det vært viktig å få kontroll på IPNV. Fjerning av «husstammer» samt vaksinasjon og selektering

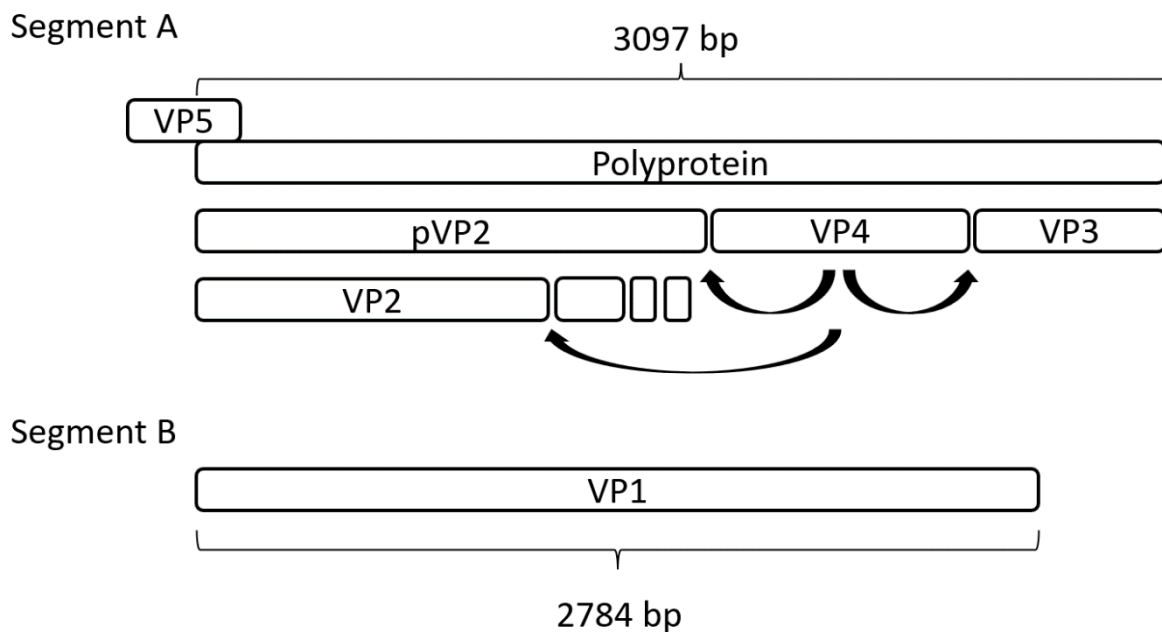


for genetisk resistent laks har vært viktig i bekjempelse av IPN. Et gjennombrudd var da det ble vist at resistens mot IPN hovedsakelig ble kontrollert av variasjoner i et enkelt kvantitativt lokus (QTL) på kromosom 26 (Houston et al., 2008; Moen et al., 2009). Videre studier identifiserte mutasjoner i epitel cadherin gen (*cdh1*) som årsaken til den genetiske variasjonen for IPN-resistens hos Atlantisk laks (Moen et al., 2015). *Cdh1* gen har en antatt funksjonell polymorfisme (SNP4), som er en av polymorfismene sterkest assosiert med IPN QTL. SNP4 ligger i exon 7 i *cdh1*, den proteinkodende sekvensen, tilsvarende det andre ekstracellulære domenet (EC2) til proteinet. EC2 interagerer med EC1 og danner cis-dimerer mellom E-cadheriner lokalisert på samme celle. Cis-dimer er en forutsetning for dannelsen av de mer stabile trans-dimere (Harrison et al., 2011). Det resistente allelet til SNP4 koder for aminosyren prolin, som sannsynligvis øker hydrofobiteten til den delen av EC2-domenet som bindes til EC1 (Moen et al., 2015). Laks som er mer mottakelig for IPN har aminosyren serin i stedet for prolin, og førstnevnte kan finnes i nært beslektede arter som brunørret, men ikke fjernere arter, som regnbueørret. Det er foreslått at prolin representerer en eldre utgave, altså at den IPN-resistent-varianten av proteinet er den eldste varianten (Moen et al., 2015). Det er forventet at i fisk med to ulike alleler (heterogen fisk), så vil det gunstige allelet vise nesten fullstendig dominerende effekt som respons på viruset. Lave virusnivåer i forsøktstestede individer med to gunstige alleler og fraværet av intercellulære IPNV i leverprøver fra disse fiskene, tilsier at genproduktet som ligger til grunn for resistens, fungerer som en reseptor eller en ko-reseptor for viruset, det vil si at proteinet sannsynligvis er et membranprotein (Moen et al., 2015). *Cdh1* gen koder for et klassisk epitel cadherin, som innehar alle funksjonelle domenene nødvendig for dimerisering av naboceller og andre epitel cadheriner på samme celle. Ko-immunopresipitering (Co-IP) assay bekrefter at IPNV binder til cadherin og er en sterk indikasjon på at cadherin er del av cellemaskineriet som viruset bruker ved infeksjon (Moen et al., 2015).

Til tross for en stor nedgang i antall IPN-utbrudd, er det fortsatt registrert utbrudd i Norge (Garseth et al., 2022). De siste årene er det rapportert om en ny variant av IPNV. Denne varianten forårsaker sykdom også hos IPN QTL-fisk, og er ulik IPNV isolater fra felt som forårsaket IPN på 2000-tallet, både på nukleotid- og aminosyrenivå (Garseth et al., 2022; Hillestad et al., 2021). Det er vist at den nye varianten er mer virulent for yngel (Ørpetveit, 2020).

### 1.1.1 Oppbygging av IPNV

IPNV er et dobbeltrådet RNA virus (Baltimore klasse 3) med lineært genom, delt i to segment, kalt A og B. Det er et ikosahedrisk nakenvirus i familien *Birnaviridae* i slekten *Aquabirnavirus* (Moen et al., 2015; Munang'andu et al., 2016). Segment A (ca. 3,1 kb) har to delvis overlappende leserammer. Den største leserammen koder for et stort polyprotein på 106kDa som omfatter pVP2 (en forløper til kapsidproteinet VP2), VP3 og VP4 (Fig. 2). Den andre leserammen koder for et ikke-strukturelt protein, VP5 (Villanueva et al., 2004). Segment B (ca. 2,8 kb) har en leseramme som koder for en RNA avhengig RNA polymerase, VP1 (Julin et al., 2013). VP1 kan binde seg kovalent via en ser-5'-GMP-fosfodiesterbinding til 5'-enden på begge segmentene (Roberts & Pearson, 2005), og kalles i denne formen for VPg, (for å differensiere den fra sin frie VP1 form). Genomet koder altså for fem virusproteiner, hvorav tre av dem, VP1, VP2 og VP3 er strukturelle, mens VP4 og VP5 er ikke-strukturelle protein (Tabell 1) (Dopazo, 2020).



**Figur 2:** De to genomisk segmentene til IPNV koder for totalt fem proteiner (modifisert etter Dobos (1995))

*Tabell 1: Skjematisk oversikt over proteinene til IPNV*

<b>Protein</b>	<b>Størrelse (kDa)</b>	<b>Funksjon</b>	<b>Referanser</b>
<b>VP1</b>	94	RNA avhengig RNA polymerase	(Villanueva et al., 2004)
<b>pVP2</b>	62	Strukturelt	(Munro & Midtlyng, 2011)
<b>VP2</b>	54	hovedkapsidprotein	(Villanueva et al., 2004)
<b>VP3</b>	31	Multifunksjonelt, indre kapsidprotein	(Dobos & Rowe, 1977)
<b>VP4</b>	29	Serine-lysine protease, interferonhemmer	(Villanueva et al., 2004)
<b>VP5</b>	17	Ikke-strukturelt protein med ukjent funksjon	(Hillestad et al., 2021)

VP1 (94 kDa) er en RNA avhengige RNA polymerase som er nødvendig for genomreplikasjon og transkripsjon. Den kan også fungere som en proteinprimer for initiering av RNA syntese (Dopazo, 2020). RNA polymeraser mangler «proofreading»-egenskaper, og dette gir stor sjanse for mutasjoner, noe som er karakteristisk for RNA virus (Julin et al., 2013).

Tidligere studier har identifisert det ytre kapsidprotein VP2 (62 kDa) som hoved-determinanten for IPNV virulens siden det består av alle de nøytraliserende epitopene og cellefestesetene som bestemmer vert- eller celledespesifisitet (Heppell et al., 1995). VP2 består av tre domener: Et sentralt (S) som utgjør skjellet i den subvirale partikkelen, basen (B) som er på innsiden av partikkelen, og spike-proteinene (P) som sitter på utsiden av kapsidet (Coulibaly et al., 2010). VP2 utgjør 62 % av massen til virion proteinet (Dobos et al., 1977).

Santi et al. (2004) har vist at det er posisjon 217 og 221 på VP2 som er hoved-determinantene for virulens på IPNV serotype Sp. I tillegg er posisjon 247 veldig variabel (Dopazo, 2020), men er ikke direkte involvert i virulenskarakteristikken til IPNV. Song et al. (2005) har foreslått at høyvirulente isolater har aminosyrene treonin (Thr) på posisjon 217 og alanin (Ala) på posisjon 221, mens moderate til lav-virulente stammer har aminosyrene prolin (Pro) på posisjon 217 og Ala221. Stammer som har Thr221 er nesten avirulente, uavhengig av forbindelsen på posisjon 217 (Song et al., 2005). Tidligere studier har indikert at en kombinasjon mellom IPNV virulens

og interaksjon mellom vert og patogen som bestemmer utfallet av IPNV infeksjoner (Skjesol et al., 2011). IPNV-isolater varierer i egenskaper knyttet til replikasjonshastighet og evnen til å forårsake vedvarende infeksjoner (Skjesol et al., 2011). Aminosyren på posisjon 221 endrer seg raskt fra alanin til treonin etter noen få cellekulturpassasjer. Denne cellekulturtilpasningen kan være involvert i attenuering (Santi et al., 2004). Aminosyresubstitusjonen med alanin til treonin på posisjon 221 på VP2 er ansvarlig for den raske tilpasningen til viruset i CHSE-celler. Det celle-tilpassede viruset replikerer raskere og produserer større plaque enn de uten aminosyreendringen (Song et al., 2005).

I infiserte celler, kløyves polyproteinet til pVP2, VP4 protease og et indre strukturelt protein, VP3. Videre prosessering av pVP2 til VP2 skjer ved hjelp av vertens protease. (Julin et al., 2015). pVP2 til VP2 omdannelsen involverer kløyving eller kløyvinger av pVP2 nær C-terminus. Epitopen gjenkjent av monoklonale antistoffer (mAbs) ligger ved C-terminus av pVP2 (Heppell et al., 1995). VP2 polypeptidet har fått mye oppmerksomhet fordi det inneholder nøytraliserende epitoper til viruset, og brukes i forbindelse med subenhetsvaksineutvikling (Dobos, 1995). Immersjonsvaksine med lysert *Escherichia coli* (*E.coli*) som uttrykker karboksy-avkortet polyprotein til IPNV serotype Sp (inneholder pVP2 og amino-delen på VP4) var effektiv i induksjon av beskyttende immunitet i regnbueørret-yngel mot levende virusforsøk ved å bruke homologe virus (Manning & Leong, 1990).

VP3 (31 kDa) er et lite multifunksjonelt protein. Det fungerer som et scaffolding protein ved morfogenese, gir beskyttelse mot antivirale responser i cellen og kan indusere apoptose hos fisk (Dopazo, 2020). VP3 anses for å være et indre polypeptid, men viruset har vist å reagere med flere anti-VP2 og anti-VP3 mAbs og i noen tilfeller gav anti-VP3 mAbs en positiv reaksjon, noe som tilsier at i hvert fall deler av VP3 kan være eksponert til overflaten av virionet (Dobos, 1995). VP3 interagerer og med VP1. VP1-VP3 komplekset er viktig i dannelsen av pVP2 komponenter som danner et prekapsid. Proteolyse av pVP2 til VP2 fører til dannelsen av et modent kapsid (Dopazo, 2020).

VP4 (29 kDa) er en serine-lysine protease som kløyver polyproteinet med autoproteolytisk aktivitet (Benkaroun et al., 2021). VP4 fungerer også som en interferon inhibitor (Dopazo, 2020).

VP5 (17 kDa) er et ikke-strukturelt protein med ukjent funksjon (Dopazo, 2020).

Basert på kryss-nøytraliseringstester er *Aquabirnavirus* grovt delt inn i to serogrupper, A og B (Hill & Way, 1995). Serogruppe A består av ni forskjellige serotyper. De fleste isolatene fra USA tilhører serotype A1. A2-A5 inkluderer hovedsakelig isolater fra Europa, og A6-A9 er for det meste isolater fra Canada. Serogruppe B består bare av en gruppe, som ikke er patogen for fisk (Hillestad et al., 2021). *Aquabirnavirus* har og blitt delt inn i seks genogrupper basert på variasjoner i nukleotid og predikerte aminosyresekvenser (Blake et al., 2001). Disse gruppene samsvarer til en viss grad med geografisk opprinnelse og den serologiske klassifiseringen (Tabell 2). Da tilhører serotype A1 og A9 i genogruppe 1, serotype A3 i genogruppe 2, serotype A5 og A6 i genogruppe 3, serotype A7 og A8 i genogruppe 4, serotype A2 i genogruppe 5 og serotype A4 i genogruppe 6 (Hillestad et al., 2021).

*Tabell 2: Oversikt over genogruppe og serotype for Aquabirnavirus. Modifisert etter (Munro & Midtlyng, 2011).*

<b>Genogruppe</b>	<b>Serotype</b>	<b>Opprinnelse</b>
<b>G1</b>	A1	USA
<b>G1</b>	A9	Canada
<b>G2</b>	A3	Danmark
<b>G3</b>	A5	UK
<b>G3</b>	A6	Canada
<b>G4</b>	A7	Canada
<b>G4</b>	A8	Canada
<b>G5</b>	A2	Danmark
<b>G6</b>	A4	UK

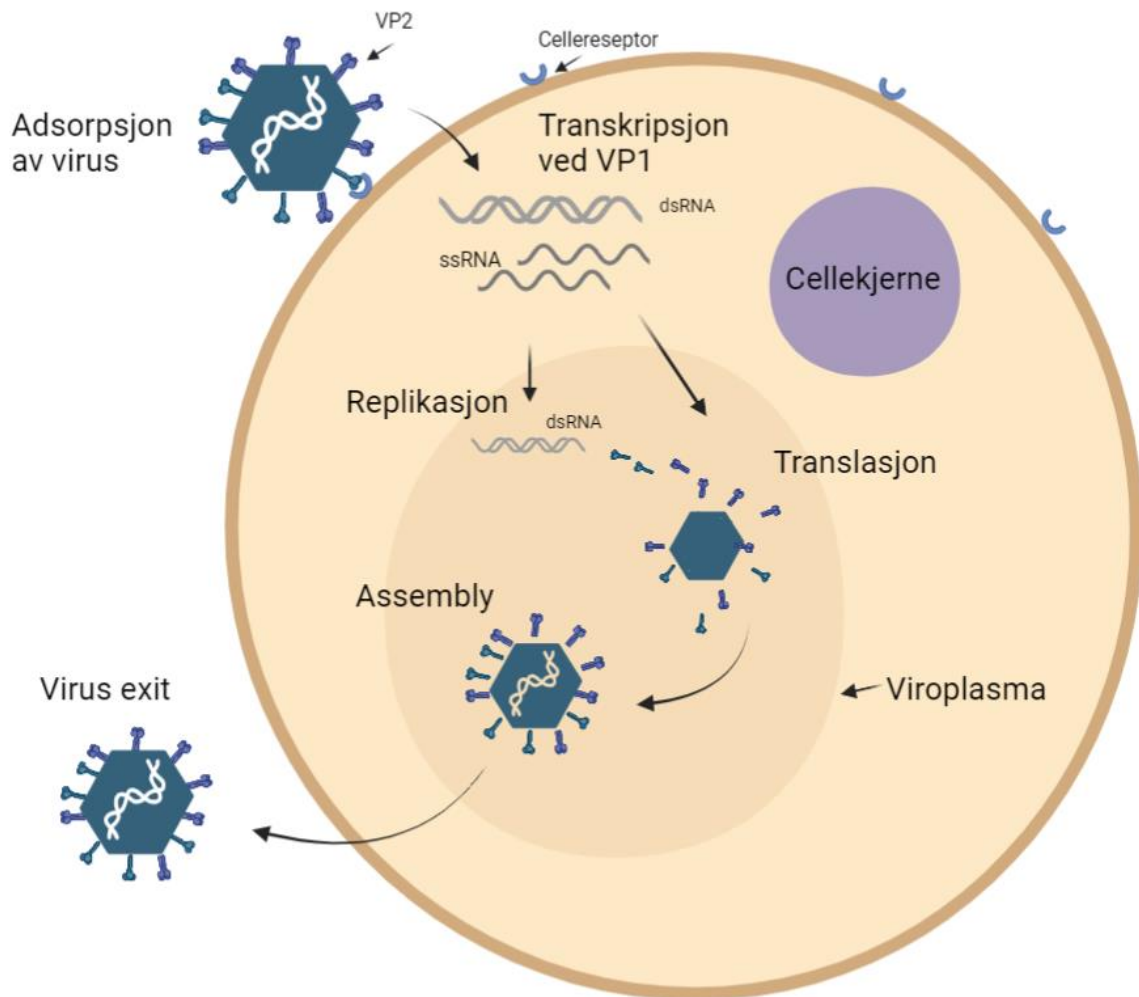
IPNV er et nakenvirus som gjør det stabilt og hardfør mot mange faktorer som varierende temperatur, pH og salinitet. Det kan smitte både vertikalt og horisontalt (Munro & Midtlyng, 2011). Ved horisontal smitte entrer virus via gjeller, tarmepitel og eller gjennom huden. IPNV kan infisere blodleukocytter ved viremisk fase, og dermed unngå vertens immunsystem og drive en lav replikativ profil for å redusere skadeomfanget hos verten (Munro & Midtlyng, 2011). Viruset kan også effektivt smitte vertikalt. Fisk som overlever infeksjon kan bli asymptomatiske

smittebærere, og fungerer som reservoar for viruset. De kan spre viruset i vann via ekskrementer ved stressende perioder, men sprer hovedsakelig virus vertikalt gjennom reproduktive produkter (Dopazo, 2020). Sykdommen forårsaker varierende dødelighet i laksefisk avhengig av alder, helsetilstanden til fisken, ytre miljøfaktorer, stress og virulensen av virusstammen (Julin et al., 2013). IPNV er sensitiv for frysing og tining, særlig i medium som ikke inneholder stabiliserende protein som fetal kalveserum eller storfe serum albumin (Dobos, 1995).

### **1.1.2 Replikasjonssyklus til IPNV**

Replikasjonssyklusen til IPNV har hovedsakelig blitt studert i cellelinje fra fisk. I Chinook salmon embryo celler (CHSE-214) tar en full virusreplikasjon rundt 24 timer ved 15 °C (Levican et al., 2017). Den cytopatiske effekten (CPE) observert er apoptose av celler (Hong et al., 1999; Hong et al., 1998). Etter virus-inntrenging, kan man finne viruspartikler inni vaskulære rom i cytoplasma (Villanueva et al., 2004).

Første steg i replikasjonssyklusen er adsorpsjon av viruset ved hjelp av VP2 (Fig. 3). VP2 har to domener involvert i adsorpsjon, en epitop på toppen av «spiken» for spesifikk binding til cellereseptoren på overflaten av målcellen, og en epitop ved basen (Dobos, 1995), involvert i internaliseringssteget som skjer ved reseptormediert endocytose (Granzow et al., 1997). Adsorpsjon tar ca. 20 minutter, og to timer etter infeksjon kan man detektere nytt syntetisert RNA (Dopazo, 2020). Etter internalisering, vil viruset de første fire timene begynner å bryte ned cellens DNA og proteinsyntese til fordel for sin egen replikasjon (Ortega & Enríquez, 2007). Tilstedeværelsen av dobbeltrådig (ds) RNA og visse virale proteiner vil trigge en cellulær prosess som fører til en kaskade av hendelser (segregering av kromatin, kondensering av cytoplasma, og fragmentering av nukleus, og cytoplasma som produserer karakteristisk «blebbing» til små cellefragmenter som «spises» av makrofager) som ender i «programmert celledød», apoptose (Ortega & Enríquez, 2007). Infiserte celler selv-destruerer til fordel for naboceller for å unngå å spre virus (Dopazo, 2020).

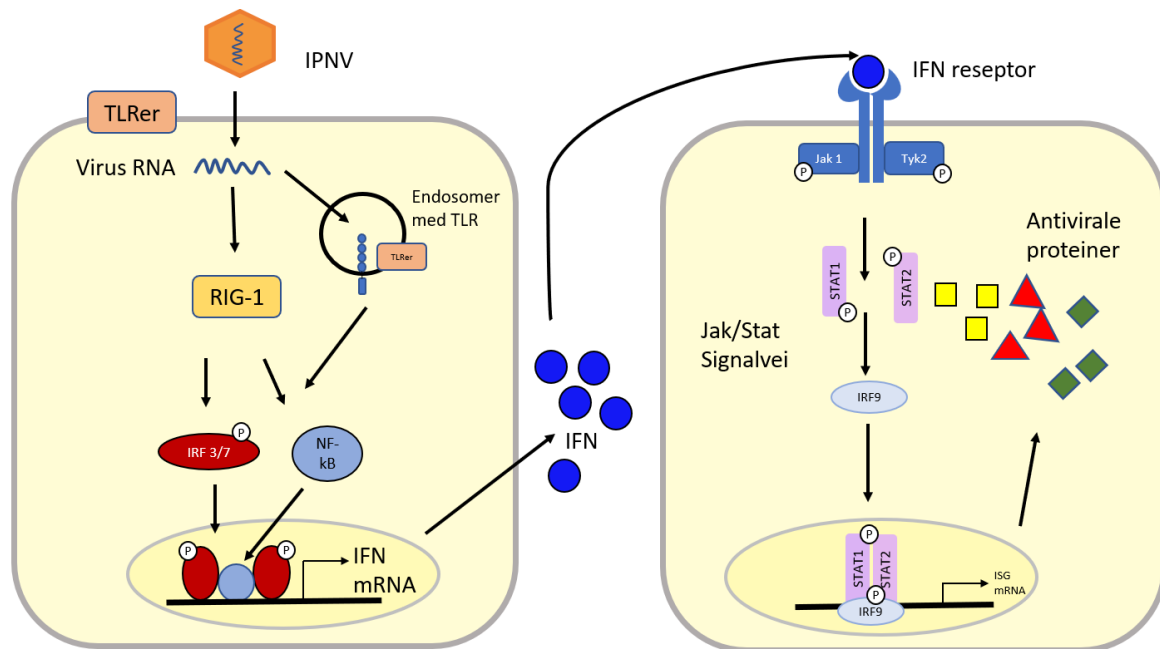


*Figur 3: IPNV adsorberes til celled overflate via VP2 og reseptor på celleoverflate. Inni cellen skjer transkripsjon ved hjelp av den RNA avhengige RNA polymerasen. Genomet replikeres og proteiner translateres i viroplasma før virionet settes sammen, og blir til en infektiv partikkel. Modifisert etter (Villanueva et al., 2004). Figuren er laget i BioRender.com*

## 1.2 Det innate immunsystemet hos fisk

Immunsystemet hos fisk er lignende til pattedyr og er delt inn i en medfødt og en adaptiv del. Det innate immunforsvaret er en fundamental forsvarsmekanisme hos fisk på grunn av deres poikiloterme natur. Det er delt inn i fysiske og kjemiske barrierer, samt en cellulær del. I tillegg har humorale faktorer, som inkluderer blant annet veksthemmere, lytiske enzymer, komplementsystemet, agglutinerer, percipitiner, antistoffer, cytokiner, kjemokiner og antibakterielle peptider, en viktig immunfunksjon (Castro & Tafalla, 2015). Verten gjenkjenner virale komponenter såkalte «pathogen associated molecular patterns» (PAMP), ved hjelp av «pattern recognition receptors» (PRRer). Virale PAMPer er karakteristisk for virus og inkluderer proteiner, dsDNA, dsRNA og ssRNA. Gjenkjenning av PAMP fører til en kaskade av signaler i vertscellen som resulterer i produksjon av type 1 interferoner og

proinflammatoriske cytokiner (Ke & Zhang, 2019). Signaliserings PRRer er involvert i celledisagregasjon for å igangsette riktig immunsignal og finnes som membranbundne både utenpå og inni celler, og også i cytoplasma (Fig. 4). Det finnes fire typer signaliserings PRRer: Toll-like reseptorer (TLR), retinolsyre induserende gen (RIG)-1 like reseptorer (RLR), nukleotid-oligomeriserende domain (NOD)-like reseptorer og C-type lektin reseptorer (Aoki et al., 2013).



**Figur 4:** Antiviral aktivitet av type I interferoner (IFN) gjennom Jak-Stat signalvei, som resulterer i induksjon av transkripsjon av IFN-stimulerende genprodukter. Stat1/Stat2 interagerer med IFN regulatorisk faktor 9 (IRF9), og dette komplekset fører til aktivering av IFN stimulerende gener (ISG). Modifisert etter (Robertsen, 2020).

### 1.2.1 Toll-like reseptorer

I teleoster har flere PRR gener blitt identifisert, inkludert 16 TLRer (Dalmo & Bøggwald, 2022) og 3 RLRer. TLRe, med unntak av en løselig variant av TLR5 i fisk (TLR5S) (Aoki et al., 2013), er membranbundne PRRer som finnes på celleoverflaten og i endosomale rom hvor de gjenkjenner en rekke PAMP. TLRer består av et «leucin-rich repeat» (LRR) domene for ligand-gjenkjenning, et transmembran (TM) domene og en toll/interleukin 1 reseptor (TIR) signaliserings-domene. LRR domenet spiller en viktig rolle i gjenkjenning av PAMP som ssRNA og dsRNA (Aoki et al., 2013). De individuelle TLRe identifiseres basert på variasjoner i sekvens og lengden på LRR (Bell et al., 2003). TLR kan deles inn i to sup-grupper basert på hvilke komponenter de gjenkjenner. Den første gruppen inkluderer TLR1, -2, -4, -5,



-6, -10, og gjenkjenner lipider, proteiner og mikrobielle metabolitter. Den andre gruppen inkluderer TLR3, -7, -8 og -9, som gjenkjenner nukleotid-derivater. TLR3 gjenkjenner dsRNA, som blant annet produseres av mange virus ved replikasjon (Aoki et al., 2013). Noen arter har flere varianter av TLRene, f.eks. TLR22 i torsk (Solbakken et al., 2016), og TLR8 i laks (Lee et al., 2013).

### **1.2.2 Retinolsyre induserende gen (RIG)-1 like reseptorer (RLRer)**

Retinolsyre induserende gen-1 (RIG-1) like reseptorer (RLRer) har en viktig rolle i induksjon av type 1 interferoner (IFN) signalisering og RNA-indusert antiviral respons hos både teleoster og pattedyr. RLR-proteinfamilien består av tre medlemmer: RIG-1 (Yoneyama et al., 2004), melanoma differensierings-assosiert gen 5 (MDA5) (Andrejeva et al., 2004), og «laboratory of genetics and physiology 2» (LGP2) (Rothenfusser et al., 2005). Som hos pattedyr deler RIG-1, MDA5 og LGP2 proteiner en rekke strukturelle likheter hos teleoster (Aoki et al., 2013). RIG-1 og MDA5 har to N-terminale «Caspase activation and recruitment domains» (CARD) som trigger produksjon av interferoner via aktivering av interferon regulerende faktor 3 (IRF3) og NFκB. LGP2 mangler CARD og er foreslått å være en regulator for RIG-1 og MDA5 (Satoh et al., 2010; Zou et al., 2009). Alle tre molekylene har et indre DExD/H-box RNA helikase domene med ATPase aktivitet. Denne aktiviteten, som blir aktivert gjennom ligandbinding, er ikke nødvendig for binding av RNA, men er nødvendig for signalisering (Wilkins & Gale, 2010).

RIG-1 er et DExD/H-box inneholdende RNA helikase som opprinnelig ble identifisert som en forsterker av type I IFN uttrykking i respons til dsRNA poly I:C (Andrejeva et al., 2004). DExD/H-box inneholdende RNA helikaser defineres av deres evne til å tvinne opp dsRNA ved å bruke iboende ATP-ase aktivitet. I tillegg til C-terminal helikase domene inneholder RIG-1 to CARD N-terminalt (Zhang et al., 2000).

MDA5 er et annen DExD/H-box inneholdende RNA helikase som er involvert i sensing av intracellulært dsRNA og induksjon av type I IFN i respons til RNA virus (Andrejeva et al., 2004; Lazarte et al., 2019). Den er nærmest beslektet RIG-1, og har 23 % aminosyrehomologi i N-terminal CARD og 35 % aminosyrehomologi C-terminal helikase domene (Eisenächer et al., 2008).

Produksjon av interferoner nedstrøms for RIG-1 og MDA5 aktivering blir regulert av LGP2 (Yoneyama et al., 2005), samt også av mitokondrie antiviral signaliseringsprotein (MAVS), et protein-innholdende CARD assosiert med mitokondrier (Seth et al., 2005). RIG-1, MDA5 og LGP2 ble analysert gjennom genomsekvensering i et vidt spekter av evertebrater og vertebratgenomer. MDA5 og LGP2 ble indentifisert i alle undersøkte fiskearter, men RIG-1 ble ikke identifisert i moderne fisker tilhørende ordenen *Perciformes*, inkludert japansk kulefisk, tetraodon, medaka, rognkjeks eller stingsild, og kun delvis identifisert i sebrafisk (Brisse & Ly, 2019; Chen et al., 2017; Fond, 2020; Zou et al., 2009).

### 1.2.3 Interferoner (IFNer)

Ved virale infeksjoner er immunsystemets første respons produksjon av type I IFNer, som medierer antiviral og immunmodulerende aktivitet (Skjesol et al., 2011). Type I IFNer spiller en viktig rolle i innate immunresponser mot virusinfeksjoner i pattedyr hvor vertsceller produserer og utskiller IFN- $\alpha/\beta$  og IFN- $\lambda$  ved gjenkjenning av viral nukleinsyrer (Sun et al., 2009). Antiviral aktivitet av type I IFNer skjer gjennom binding til IFN- $\alpha/\beta$ -reseptor (Fig. 4). Binding tigger signaltransduksjon gjennom Jak-Stat signalveien og resulterer i transkripsjon av IFN-stimulerende genprodukter (ISGer), det vil si antivirale proteiner som hemmer virusreplikasjon. Viktige ISGer er Mx-protein, protein kinase R (PKR) og ISG15 (Sun et al., 2009). Pattedyrs type I IFN består av en multigene familie gruppert til IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$  og IFN- $\omega$ . Type I IFN produseres av de fleste celletyper, men IFN- $\alpha$  og IFN- $\omega$  er hovedsakelig produsert av leukocytter og IFN- $\beta$  av fibroblaster (Robertsen et al., 2003). Type I IFNer i teleoster er beslektet, men ikke ekte homologer med IFNene i pattedyr (Liu et al., 2019; Svingerud et al., 2012).

Pattedyr har to hovedveier for IFN induksjon, som er basert på to fundamentalt ulike gjenkjenningssystem for RNA virus infeksjon. De fleste celler produserer IFN ved gjenkjenning av viralt dsRNA eller ssRNA ved RIG-1 eller MDA5 som er RNA helikaser som finnes i cytoplasma (Takeuchi & Akira, 2007). Denne veien fører til induksjon av IFN- $\beta$  (Sun et al., 2009). Plasmacytoide dendrittiske celler (pDC) derimot, er høyt spesialiserte IFN produserende celler som gjenkjenner viralt ssRNA gjennom TLR7 (Liu, 2005; Takeuchi & Akira, 2007). Disse finnes i endosomer og medierer induksjon av både IFN- $\alpha$  og IFN- $\beta$  (Takeuchi & Akira, 2007). RIG-1/MDA5 signalveien kan bli aktivert ved å stimulere celler

med dsRNA poly I:C, mens TLR 7 signalveien kan bli aktivert av imidazoquinoline-derivater som imiquinod og S-27609 (Sun et al., 2009).

Nylige studier har funnet ut at teleoster besitter et lignende innate IFN system som hos pattedyr. Det ser ut til at fisk har lignende IFN induksjonssignalvei som pattedyr fordi de har homologer til pattedyrs RIG-1, MDA5, TLRer og flere andre nedstrøms signaliseringsligander (Sun et al., 2009). Det har blitt identifisert en klynge av 11 interferoner i genomet til atlantisk laks, koblet til veksthormon 1-genet (Sun et al., 2009). Disse genene koder for tre ulike subtyper av type I interferoner: IFN-a (IFNa1 og IFNa3), IFN-b (IFNb1, IFNb2, IFNb3, IFNb4) og IFN-c (IFNc1, IFNc2, IFNc3, IFNc4, IFNc5). Lakse-IFNa2 og -IFNd kodes av et enkelt gen utenfor denne klyngen. IFNa1 og IFNa2 har 95 % sekvenslikhet og veldig lignende promotorstruktur (Robertsen, 2020; Svingerud et al., 2012). Senere studier har vist at laks også har subtypene IFNd, IFNe, IFNf og IFNh (Liu et al., 2020; Robertsen, 2020). Sekvens-likheter tilsier at lakse-IFN er mer beslektet pattedyrs IFN- $\alpha$  enn IFN-  $\beta$  eller type I IFN fra fugler. Fylogenetiske analyser viser imidlertid at lakse- og sebrafisk-IFNer danner en gruppe separert fra mammalske IFN- $\alpha$  og IFN-  $\beta$  og kylling type I IFN. Dette samsvarer med fylogenetiske analyser som antyder at IFN- $\alpha$  og IFN-  $\beta$  oppsto ved et senere stadiet i evolusjon (Robertsen et al., 2003).

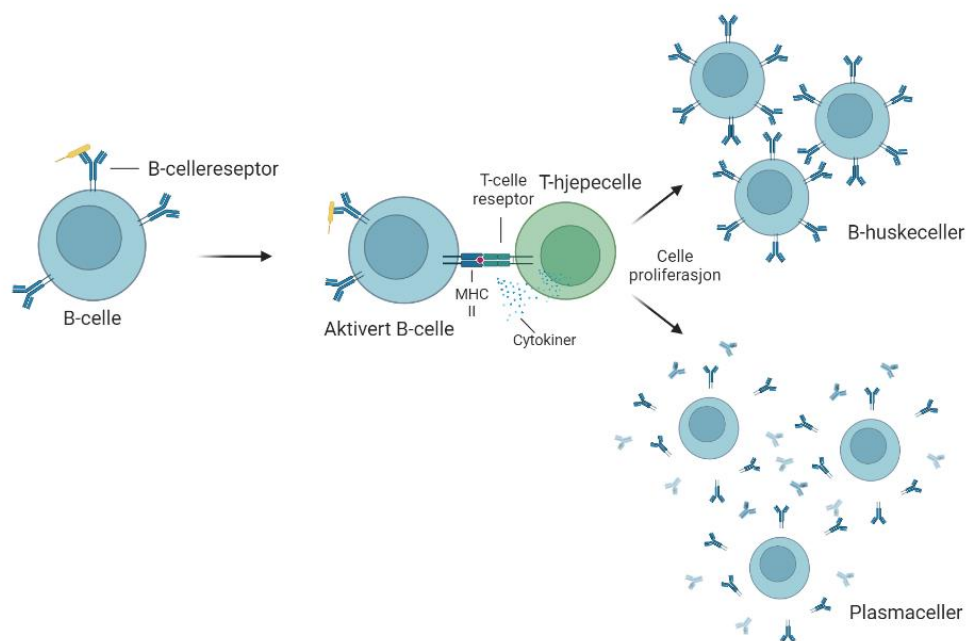
Salmonider og andre fiskearter uttrykker IFNer og ISGer i respons til poly I:C, og TLR7 ligander (Sun et al., 2009). Det er vist at IFNa1 og IFNa2 er hovedsakelig induisert gjennom RIG1/MDA5 signalveien, mens TLR7 signalveien fører til induksjon av IFNb og IFNc (Svingerud et al., 2012). Spesifikke vertseseptorer i endoplasmatisk retikulum (TLR3,7,8) og i cytoplasma (RIG-1/MDA5) gjenkjenner viralt dsRNA og ssRNA, som fører til transkripsjon av IFN-gener (Chang et al., 2011; Nerbøvik et al., 2017). Interferoner blir ikke produsert i uinfiserte celler, kun når det er mye dsRNA til stede i cytoplasma, slik som når cellen er infisert med IPNV. IFNer virker på flere måter: først blir apoptose aktivert i lengre perioder av IFN induksjon. IFNer virker indirekte ved å inducere uttrykking av MHC klasse I gener, og de fører til aktivering av naturlige drepeceller som lyserer av virusinfiserte celler (Dopazo, 2020).

## 1.3 Adaptiv immunitet

### 1.3.1 B-celle aktivering

I det adaptive immunforsvaret skiller antigenreseptorer mellom egne og fremmede antigen. Disse antigenreseptorene, B-celle reseptor (BcR) på B celler, og T-celle reseptor (TcR) på T celler, gjenkjenner spesifikt en rekke substanser (Takano et al., 2010).

Aktivering av B celler er nødvendig for produksjon av immunoglobuliner (Ig) (Fig 5). Immunoglobuliner blir hovedsakelig produsert av plasmablaste (umodne plasma celler) og plasmaceller, og er funnet utskilt i kroppsvæskene (inkludert serum og mukosa) som løselige immunoglobuliner (antistoffer) eller på overflaten av B-celler som B-cellerreseptorer (BcR) (membranbundne immunoglobuliner) (Salinas et al., 2011).



**Figur 5:** B-celle gjenkjenner et antigen og presenterer det til en T-hjelpeselle. Dette aktiverer T-cellen, og stimulerer frigjøring av cytokiner, som aktiverer B-cellen. B-celle prolifererer og differensierer til B-huskeceller og plasmaceller som produserer antistoffer. Figuren er laget i BioRender.com

Immunoglobuliner er heterodimer-proteiner som består av to identiske tunge kjeder (H) og to identiske lette kjeder (L). Hver kjede består av en variabel og en konstant del. Dette gir to identiske antigen-bindingsseter i enden av aminogruppene på hver variabel del på både H- og L-kjeden. Karboksyl-enden på den konstante delen av H-kjeden definerer Ig-isotypen og spesifiserer effektorfunksjonen til immunoglobulinet gjennom binding av deres reseptor til

effektorceller (Salinas et al., 2011). Hver variable del kan splittes i tre sekvensvariable regioner kalt «complementarity-determining regions» (CDRs) og fire relativt sekvensstabile regioner kalt «framework regions». De tre CDRene til de tunge kjedene pares sammen med de tre CDRene til de lette kjedene for å danne antigen-bindingssetet, paratopen. Den konstante delen til den tunge kjeden kan byttes om for å endre effektorfunksjon, og likevel oppdrettholde antigenspesifisitet (Schroeder & Cavacini, 2010).

I teleoster er det blitt identifisert tre klasser av immunoglobuliner, IgM, IgD og IgT (kalt IgZ i sebrafisk (Rønneseth et al., 2015; Sunyer, 2013)). IgM var den første immunoglobulinet oppdaget for flere tiår siden, mens IgD ble oppdaget i 1997 (Wilson et al., 1997) og IgT/IgZ ble funnet i 2005 (Danilova et al., 2005; Hansen et al., 2005). I fisk finnes det to ulike linjer av B-celler basert på tilstedeværelsen av enten IgM eller IgT (IgZ i sebrafisk). Den tredje klassen av immunoglobuliner i fisk, IgD kan uttrykkes sammen med IgM på B-celler, men ikke sammen med IgT (Edholm et al., 2011; Rønneseth et al., 2015). Immunoglobulin-antigen interaksjoner skjer vanligvis mellom paratopen, setet på Ig hvor antigenet bindes, og epitopen, som er stedet på antigenet som bindes. Evnen til å identifisere deler av antigen uavhengig av resten gjør det mulig for B-celler å skille mellom to nært beslektede antigener, hver som kan bli sett på som en samling av epitoper. Det tillater og samme antistoff å binde til ulike antigen som deler identiske eller svært lignende epitoper, et fenomen kalt kryssreaktivitet (Schroeder & Cavacini, 2010).

### **1.3.2 Antistoffer**

Antistoffer har mange funksjoner, blant annet agglutinerer, nøytralisering og opsonisering. De er også med på å aktivere den klassiske veien i komplementsystemet. Agglutinerer er binding og utfelling av partikler slik at det blir færre infektive enheter (Haugland, 2020). Antistoffer kan også virke nøytraliserende ved å binde seg til virus og deres produkter, som hindrer dem til å kunne infisere celler. Dette er den formen for immunitet som fremkalles av de fleste vaksiner (Hovden & Haldorsen, 2008). Noen antistoffer virker som opsonin, det vil si at de binder seg til virus og gjør dem mer gjenkjennelige for fagocytiske celler, som fører til økt fagocytose (Haugland, 2020). Den klassiske veien i komplementsystemet kan aktiveres av både naturlige og spesifikke antistoffer, ved at de bindes til overflaten av mikroben, som fører til en kaskade av reaksjoner som resulterer i utskillelse av proteiner. Antistoff-avhengig celledmediert cytotoxicitet (ADCC) er mekanisme hvor spesifikke antistoffer bindes til både en målcelle og

en effektorcelle (f.eks naturlig drepecelle (NCC)), som fører til utskillelse fra effektorcellen av stoffer som fører til lysis (Haugland, 2020).

Det er kjent at IPNV er immunogen og at VP2 kapsid-proteinet inducerer syntese av nøytraliserende antistoffer (Munro & Midtlyng, 2011). Det er mulig å detektere IPNV nøytraliserende antistoffer i flere uker etter immunisering, og de kan bli detektert etter flere år i overlevende fisk. Det har blitt demonstrert at serum fra immunisert fisk kan beskytte ikke-immunisert fisk mot infeksjoner, men det ser ut som at immunresponsen ikke er sterk nok til å beskytte mot sykdom, siden immunisert fisk kan vise symptomer etter stressende perioder (Julin et al., 2013). Til tross for vaksinerings av norsk Atlantisk laks, er det fortsatt noen utbrudd hvert år (Ørpetveit & Bornø, 2022). Atlantisk laks som overlever en IPNV infeksjon kan bli livslange asymptomatisk bærere. Det har blitt rapportert at viruset kan gjemme seg og replikere inni hodenytreleukocytter fra bærerfisk uten å forårsake lytisk infeksjon, som tilsier at disse cellene kan være stedet for vedvarende infeksjoner (Julin et al., 2015).

#### **1.4 Målsetning for studiet**

De siste årene har det vært meldt om flere tilfeller av til dels hissige utbrudd av IPN. Noe som gjør det enda mer bekymringsverdig er at fisk som blir syk er blant IPN QTL homozygote eller heterozygote IPNV resistente fisk, som skal være mer motstandsdyktig mot IPNV (Hillestad et al., 2021). Det er vist at det er den nye varianten som forårsaker dødeligheten. Det er viktig å få kontroll på IPN fordi det kan gi store konsekvenser både økonomisk og velferdsmessig. Det er lite kunnskap om forskjellene mellom variantene av IPNV, og det er usikkert hvordan den nye varianten greier å infisere IPN QTL-fisk.

Hovedmålet med studiet er å undersøke forskjeller mellom to varianter av infeksjons pankreasnekrose-virus, V-1244 og Vir410/18.

Delmål vil være:

- Sekvensere og undersøke forskjeller mellom de to IPNV variantene både på aminosyrenivå og på nukleinsyrenivå.
- Studere medfødte immunresponser ved å eksponere hodenytreleukocytter (HKL) for IPNV ved *in vitro* stimulering, og måle uttrykkning av cytokiner og interferoner.
- Produsere antistoffer mot V-1244 og Vir410/18 ved å immunisere fisk.

## 2.0 Material og Metode

### 2.1 Virus

IPNV-isolatene ble gitt fra Veterinærinstituttet. De var passert en gang i CHSE-214-celler, og cellesupernatantene var sentrifugert ved 3000 x g i 5 minutter (min) før de ble allikvotert i 2 ml sentrifugerør. Etter ankomst til Bergen, ble virus-supernatantene lagret ved -20 °C. IPNV stammen V-1244 kommer fra et utbrudd hos Atlantisk laks (postsmolt) i Nord-Trøndelag i 2001 (Ramstad & Midtlyng, 2008). Denne varianten tilhører serotype Sp/N1 (Santi et al., 2004). Vir410/18 isolatet er fra et utbrudd i felt i 2018.

### 2.2 Dyrking av cellekultur CHSE-214

CHSE-214, derivert fra *Oncorhynchus tshawytscha* er vist å være en effektiv cellelinje for deteksjon og dyrking av salmonide fiskevirus. Den optimale veksttemperaturen er 21-24 °C, og cellene kan splittes i forhold 1:6 hver 10-14 dag ved 18 °C. CHSE-214 kan overleve minst i ett år ved -65 °C og i minst fem år i flytende nitrogen (Lannan et al., 1984). CHSE-214 celler er en utmerket celletype til å dyrke høye virustiter av IPNV i (Dobos, 1995).

CHSE-214 celler ble dyrket i 25 cm<sup>2</sup> Nunc™ EasYFlask™ celleflasker med 5 ml Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza) supplementert med 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 % L-glutamine, 0,1 % Gentamicin sulfat, og 1 % «Non-essential amino acid» (NEAA) (vedlegg 6.1.1) ved 20 °C med 5,7 % CO<sub>2</sub> og splittet i forhold 1:4 ca. hver 14. dag, avhengig av tetthet i flaskene.

### 2.3 Virustitrering – plaque assay

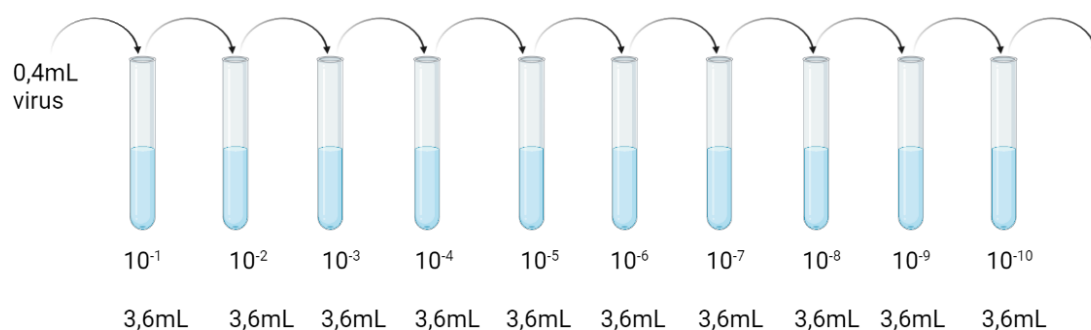
Virusmottakelighet for CHSE-214 cellelinjen ble bestemt ved plaque assay. Virus ble titrert ved en standard fortynnings slutt punktmetode: TCID<sub>50</sub> (Kärber, 1931). Etter 10 dager ble det utifra Formel 1 beregnet mengde virus ved å ta % av antallet av hver fortynning (%/6) anslått, og viruskonsentrasjon beregnet.

*Formel 1: Beregning av viruskonsentrasjon med Kärber metoden*

$$[\text{Negativ logaritme av høyeste viruskonsentrasjon}] - \left( \frac{\text{Sum av \% CPE i brønner}}{100} - 0,5 \right) \times \text{logaritmen av fortynning}$$

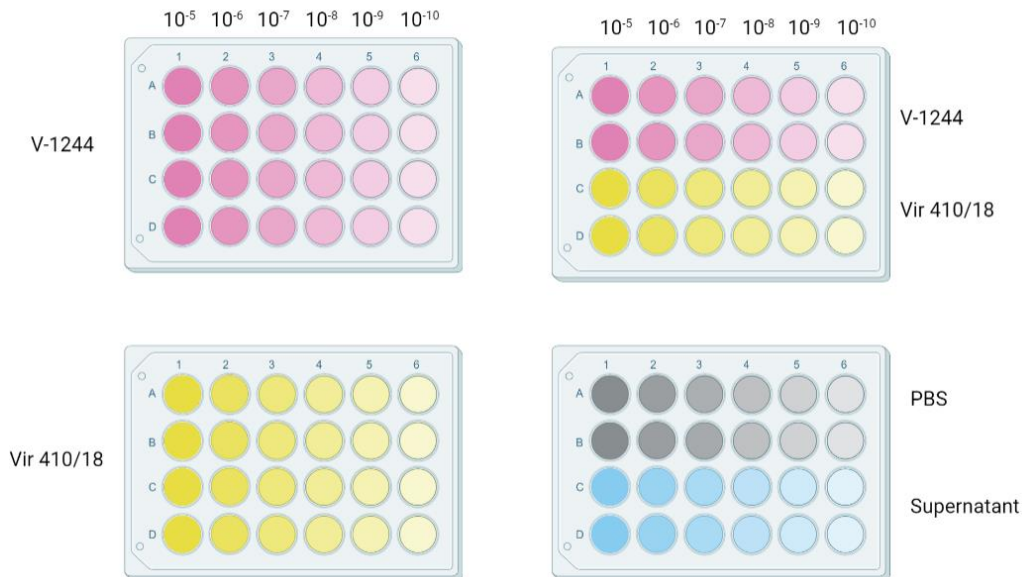
En 75 cm<sup>2</sup> Nunc™ EasYFlask™ celleflaske med CHSE-214 celler ble overført til brønner da cellelaget dekket ca. 80 % av bunnarealet i flasken. Cellelaget ble vasket med 4 ml «Hanks balanced salt solution» (Sigma-Aldrich) ved bruk av 230 mm glasspipette (VWR) og trypsinert med 1 ml trypsin (BioWhittaker® Lonza), før det ble tilført 48 ml dyrkingsmedium. 0,5 ml av celleduspensjonen ble fordelt til hver brønn i fire 24-brønnsbrett. Deretter ble brettene inkubert ved 20 °C og 5,7 % CO<sub>2</sub>. Da cellelaget dekket ca. 80 % av bunnarealet i brønnene ble virus tilsatt brønnene.

To ulike varianter av IPNV ble brukt, kalt V-1244 og Vir410/18. Før titrering ble virus fortynnet ved tifold fortynning (Fig. 6). 3,6 ml Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza) supplementert med 2 % fetal bovine serum (FBS), 2 % L-glutamine, 0,1 % Gentamicin sulfat, og 1 % «Non-essential amino acid» (NEAA) (vedlegg 6.1.2) ble overført til 15 ml falconrør (Becton Dickinson labware Europe). Dyrkingsmedium ble fjernet fra brønner ved hjelp av en glasspipette. Deretter ble fortynningene fra 10<sup>-5</sup> til 10<sup>-10</sup> overført til brønner. 0,5 ml virussuspensjon i hver brønn. Det var seks paralleller av hver virusfortynning, og to paralleller av kontroller, en kontroll med PBS og en kontroll med supernatant fra CHSE-celler som ikke var tilsatt virus (Fig 7). Brettene ble deretter inkubert ved 20 °C i 10 dager til synlig plaque. Virusreplikasjon ble overvåket daglig ved å bruke et omvendt lysmikroskop (Leica) kombinert med «Leica Application Suite» (LAS) til CPE var tydelig.



**Figur 6:** Fortynningsserie ved titrering. Virus ble fortynnet i smittemedium. Det ble tilsatt 0,4 ml virus i første rør, og så ble det overført 0,4 ml bortover i en tifold fortynningsrekke. Figuren er laget i BioRender.com





**Figur 7:** Brønnoppsett for titrering av virus. Brønner med samme farge viser paralleller (seks paralleller per fortytning). To paralleller for hver kontroll. Figuren er laget i BioRender.com

## 2.4 Isolering av leukocytter fra perifert blod og hodenyre

Atlantisk laks (*Salmo salar L.*) ble holdt i kar hos Industrilaboratoriene i Bergen (ILAB) ved Bergen Høyteknologisenteret. Seks fisk ble avlivet med et slag mot hodet. Fisken var rundt 38 cm (gjennomsnittlig lengde var  $38,1 \pm 1,13$  cm) i starten av forsøket. Gjennomsnittlig vekt var  $836,7 \text{ g} \pm 114 \text{ g}$ . Det ble brukt 0,6 ml kanyle (Henke Sass Wolf) til 1 ml luer slip syringe (Becton Dickinson SA) til uttaket. Blodet, tatt fra v. caudalis, ble overført til 4 ml prøverør med heparin (BD Vacutainer) og holdt på is. Det ble også tatt utsnitt av hodenyre ( $420 \text{ mg} \pm 90 \text{ mg}$ ) tilsatt GentleMACS rør med L15+ medium (L15 supplementert med gentamicin, heparin, glutamin og HEPES, justert til 370 mOsm) og homogenisert ved hjelp av gentleMACS dissociator. Blod og nyreprøve ble overført til 11 ml Nunc™ sentrifugerør med gradienter inneholdende 4 ml Percoll- løsnig med tetthet på 1,075 g/ml overlatt med 3 ml Percoll-løsnig med tetthet 1,060 g/ml. Etter sentrifugering ved  $400 \times g$  (Allegra X-15R) i 35 min ble leukocytfraksjonen samlet opp og overført til nye rør. Det ble tilsatt L15+ medium for å vaske leukocytene, og prøvene ble deretter sentrifugert i 10 min på  $200 \times g$ . Supernatanten fra prøvene ble fjernet, og pelleten ble resuspendert i 0,5 ml L15+ medium. Leukocytene ble telt ved hjelp av en CASY celledetektor (Innovatis) ved at 10  $\mu\text{l}$  prøve ble fortynt i 10 ml CASYton-løsnig (OMNI Life Science) før prøvene ble analysert med hensyn på celledetall, overlevelse og aggregeringsfaktor.

## 2.5 *In vitro* smitte av leukocytter med V-1244 og Vir410/18

For å teste innate immunrespons ble isolerte leukocytter tilsatt V-1244 og Vir410/18 for å se på immunrespons etter 4 timer og 24 timer. De isolerte leukocytene ( $2,5 \times 10^6$ -  $5 \times 10^6$ ) i L15+ medium, ble overført til brønner. Deretter ble det tilsatt 0,25 ml virus (MOI = 20 pfu/cell) og de ble inkubert ved 20 °C. For cellene høstet etter 4 timer var det fire paralleller av kontroll, V-1244 og Vir410/18. Det var seks paralleller av kontroll, V-1244 og Vir410/18 for cellene høstet etter 24 timer (Tabell 3). Cellebrønnene ble sentrifugert på 930 x g i 10 min. Supernatanten ble forsiktig fjernet og det ble tilsatt 500 µl lysisbuffer med 1,6 % DTT til hver av brønnene. Lysatene ble oppbevart i frysen på -80 °C og RNA ble isolert som beskrevet i avsnitt 2.6.

*Tabell 3: Oversikt over de ulike gruppene in vitro forsøket.*

Tidspunkt for høsting	Gruppe	Tildelt nummer
4 t	Kontroll	1-3, 10
24 t	Kontroll	11-13, 20-21
4 t	V-1244	4-6, 14
24 t	V-1244	15-16, 23-26
4 t	Vir410/18	7-9, 17
24 t	Vir410/18	18-19, 27-30

## 2.6 Isolering av RNA

Til isolering av RNA ble det brukt GenElute mammalian totalt RNA kit (RTN70, Sigma-Aldrich). De lyserte leukocytene ble overført til GenElute filtreringskolonne og sentrifugert ved 12 100 x g i 2 min. Det ble tilsatt 500 µl 70 % EtOH til det filtrerte lysatet som så ble blandet godt. 500 µl av lysatet/EtOH ble overført til GenElute binding kolonne og sentrifugert ved 12 100 x g i 30 sek. Resterende lysat/EtOH- blanding ble overført til samme GenElute binding kolonne og sentrifugert ved 12 100 x g i 30 sek. Væsken som hadde gått gjennom kolonnen ble fjernet, før kolonne ble satt tilbake i samme oppsamlingsrør. Det ble tilsatt 500 µl vaskeløsning 1 til kolonnen før den ble sentrifugert ved 12 100 x g i 30 sek. Kolonnen ble så overført til et nytt oppsamlingsrør hvor det ble tilsatt 500 µl vaskeløsning 2 (med EtOH), som ble sentrifugert ved 12 100 x g i 30 sek. Det ble tilsatt 500 µl til med vaskeløsning 2 (med EtOH), som så ble sentrifugert ved 12 100 x g i 2 min. Væsken som hadde gått gjennom kolonnen ble fjernet, og oppsamlingsrøret ble deretter sentrifugert ved 12 100 x g i 1 min.

Kolonnen ble overført til et eppendorf-rør, hvor det ble tilsatt 30 µl RNasefritt vann og sentrifugert ved 12 100 x g i 1 min.

## 2.7 Analyse av totalt RNA i Nanodrop 2000 spectrophotometer

For å få informasjon om konsentrasjon av RNA og renhet i prøvene ble det gjennomført måling av nukleinsyre med Nanodrop™ 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific™). Absorpsjonsnivået ble målt ved 260/280 nm og 260/230 nm for å få en indikasjon på renheten av RNAet. Absorpsjonsforholdet mellom 260/280 bør være mellom 1,8 og 2,1. Ved måling av absorpsjonsforholdet 260/230 bør det være rundt 2,0. Før oppstart ble maskinen kalibrert med 1,5 µl DNase og RNase fritt vann (Sigma-Aldrich). Sensoren ble så tørket av og det ble tilsatt 1,5 µl av hver prøve. Mellom hver måling ble sensoren tørket av.

## 2.8 DNase I behandling

Til DNase behandling ble «DNase 1, Amplification grade» (AMPD1, Sigma-Aldrich) brukt. De ulike reagensene (Tabell 4) ble overført til RNase frie PCR-rør. Det ble beregnet mengde RNA og H<sub>2</sub>O, totalt volum av disse er 8 µl. Begrensningen for mulig RNA i en DNase reaksjon er 2500 ng per reaksjon. Ut ifra resultatet fra nanodrop ble det beregnet hvilken reaksjonsmengde som skulle brukes. DNasen er sensitiv for fysisk denaturering og ble derfor håndtert med forsiktighet. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 15 min før det ble tilsatt 1 µl stoppløsning til en 1 x reaksjon. Prøvene ble deretter inkubert i AccuBlock Digital Dry Bath™ (Labnet) på 70 °C i 10 min før de ble avkjølt på is.

*Tabell 4: Tilsetning for DNase-reaksjon*

Tilsetning i en 1 x reaksjon	Mengde (µl)
RNA	Variabelt
H <sub>2</sub> O	Variabelt
10 x dNase buffer	1
DNase	1
<b>Totalt</b>	10

Totalt 8µl

## 2.9 Nukleinsyre gel-elektroforese

Agarose gel elektroforese er en effektiv metode for å separere, identifisere og rense DNA/RNA fragmenter på 0,5-25 kb (Syaifudin, 2021). 1 % agarosegel ble laget av 25 ml 1xTAE blandet med 0,25 g agarose (SeaKem), som ble veid opp og varmet i mikrobølgeovn med løst lokk slik at agarosen smeltet. Det ble etterfylt med milliQ-vann for å erstatte det fordampede volumet. Agarosen ble kjølt ned til 60 °C før det ble tilsatt 2,5 µl GelRed (10000x, Biotium) for å kunne visualisere nukleinsyrene. Agarosegelen ble støpt i en form tilhørende elektroforeseenheten (Amersham Bioscience) med tolvbrønner kam, og satt til tørk i mørket i 30 min for å bli klar til applisering. Den stivnede gelen ble overført til elektroforesekammeret og det ble tilført 1 x TAE buffer til væsken dekket gelen ca. 2mm over bønnene. 2µl av hver DNase-behandlede prøve ble blandet sammen med DNase og RNase fritt vann og 5 x loading buffer (Tabell 5) og applisert i brønnene med pipette. I tillegg til prøvene ble det applisert 2,5 µl molekylvekt-standard (1kb+) (Thermo Scientific™) til første brønn.

Etter applisering ble lokket til elektroforeseenheten satt på slik at katoden lå nærmest prøvebrønnene og elektroforesekammeret ble koblet til en energikilde (PowerPac Basic, Bio-Rad) som ble stilt inn på 90V. Etter 45 min hadde nukleinsyrene vandret mot den positive anoden. Båndene i gelen ble visualisert i G:BOX Geldoc system (Syngene).

*Tabell 5: Oppsett for RNA-prøve til analyse i agarosegel*

Tilsetning	Mengde (µl)
<b>DNase behandlet RNA</b>	2
<b>RNase fritt vann</b>	4
<b>5 x loading buffer</b>	2
<b>Totalt</b>	8

## 2.10 cDNA syntese (qScript)

Til cDNA syntese ble det brukt «qScript cDNA synthesis kit» (Quantabio). Alle komponenter ble tint og oppbevart på is. Totalt volum av RNA + H<sub>2</sub>O er 15 µl. Begrensingen er 1000 ng i 15 µl. Template (RNA) og de ulike reagensene (Tabell 6) ble tilført til RNase frie PCR-rør (0,2 ml) (Axygen®) og inkubert i 2720 Thermal Cycler (Applied biosystems) med program gitt i Tabell 7. Prøvene ble deretter oppbevart ved -20°C.

*Tabell 6: Tilsetninger i en enkel cDNA syntese behandling*

<b>Tilsetning</b>	<b>1 x reaksjon</b>
<b>RNA (&lt;1000 ng)</b>	Variabelt
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Variabelt
<b>5 x reaksjonsbuffer</b>	4 µl
<b>Revers transkriptase</b>	1 µl
<b>Totalt</b>	20 µl

*Tabell 7: Oppsett for innstillinger på PCR-maskin ved syntese av cDNA.*

<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Tid (min)</b>
<b>22</b>	5
<b>42</b>	30
<b>85</b>	5
<b>4</b>	∞

## **2.11 Kvantitativ PCR (qPCR)**

Uttrykking av cytokiner og interferoner i virussmittede leukocytter ble studert med qPCR. qPCR måler genuttrykk ved bruk av fluorescens som f.eks SYBR green (Valasek & Repa, 2005). SYBR Green binder uspesifikt til dsDNA så det er viktig å ha med negative kontroller, en -RT kontroll (cDNA reaksjon hvor det ikke tilsettes revers transkriptase) og en ikke-templat kontroll (NTC), med DNase og RNase fritt vann i stedet for templat, for å sikre at reagensene ikke er kontaminert.

qPCR ble utført ved å bruke SYBR green JumpStart Taq Ready Mix kit» (Sigma-Aldrich) for kvantitativ PCR, og «forward» og «revers» primere for de ulike assayene (Tabell 8), samt DNase og RNase fritt vann. Det ble laget mastermixer som inneholdt 2xSYBR Green JumpStart Taq Ready mix, forward og revers primer og nukleasefritt vann (Sigma-Aldrich), gitt i Tabell 9. Det ble laget tre mastermix per assay. Tre parallelle reaksjoner ble utført for alle gener. Negative kontroller, NTC og -RT, ble inkludert for alle mastermixene. 6 µl av mastermixene

ble fordelt i brønnene på qPCR brettet (BioRad) og deretter ble det applisert 4 µl cDNA prøve til brønnene. qPCR brettet ble dekket med forsegling (BioRad), før det ble sentrifugert (Allegra® X15R Centrifuge) ved 1000 x g i 1 min. Reaksjonene ble termo-cycled i en C1000 Touch Thermal Cycler med CFX96 Real-time system (BioRad) i 5 min på 94 °C, etterfulgt av 44 sykluser på 94 °C i 15 sek og 60 °C i 1 min. Smeltekurveanalyse ble utført for hvert assay (Tabell 10). RPS20 ble brukt som referansegen fordi det er stabilt og har vist å bli lite regulert av immunstimulerende forbindelser (Ingerslev et al., 2006).

*Tabell 8: Oversikt over primere som ble brukt til Real Time RT-PCR*

Gen	Primer	5'- 3'	Str (bp)	Referanse
<b>RPS20</b>	Forward	ATCACCACCAGAAAGACACCCT	122	(Rønneseth et al., 2013)
	Revers	GAGGTGATCTGCTTGACAATCTCA		
<b>IPNV-1</b>	Forward	CCTGACCTACAACAGCCTGATGT	114	(Julin et al., 2009)
	Revers	TCGAACCCTGTTGGTAGATTCA		
<b>IL-6</b>	Forward	TGCTGATAGGGCTGGTCAAAGA	80	(Nerbøvik et al., 2017)
	Revers	AACACGCTTCCTCTCACTGGCA		
<b>IL-1β</b>	Forward	AACCGAGTTCAAGGACAAGGAC	84	(Nerbøvik et al., 2017)
	Revers	GCCGACTCCAACCTCCAACAC		
<b>TNF-α1</b>	Forward	ACAAAATGGAGCCTCAACTGGA	134	(Nerbøvik et al., 2017)
	Revers	AGTGTCAGCGGTAAGATTAGGATTG		
<b>TNF-α2</b>	Forward	ACTCCATCGGGGATAATGCTAATCTA	77	(Nerbøvik et al., 2017)
	Revers	GGAATCAGAAATTACCATACTTTTGTG		
<b>IFNa</b>	Forward	ACTGAAACGCTACTTCAAGAAGTTGA	104	(McBeath et al., 2007)
	Revers	GCAGATGACGTTTTGTCTCTTTCCT		
<b>IFNb</b>	Forward	CTCTCAGATATGGGTGGACTCTTTC	75	(Lagos et al., 2012)
	Revers	AAGATCCTCTGGAAACATTTGTTCTGA		
<b>IFNc</b>	Forward	ATGTATGATGGGCAGTGTGG	118	(Svingerud et al., 2012)
	Revers	CCAGGCGCAGTAACTGAAAT		
<b>IFNd</b>	Forward	TGTCTGGAATGAGAAGAAAGTGGAG	160	Denne studien
	Revers	ATGAGCACTGTATGCCATTCTTTT		

*Tabell 9: Tilsetninger i en enkel PCR-reaksjon*

<b>Tilsetninger</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l), 1 x reaksjon</b>
<b>Templat</b>	4
<b>2 x SYBR</b>	5
<b>Forward primer (10 <math>\mu</math>m)</b>	0,4
<b>Revers primer (10 <math>\mu</math>m)</b>	0,4
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,2
<b>Totalt volum</b>	6

*Tabell 10: qPCR program*

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Varighet</b>	<b>Syklus</b>
<b>Initiell denaturering</b>	94°C	5 min	x1
<b>Denaturering</b>	94°C	15 sek	
<b>Hybridisering og syntese</b>	60°C	1 min	x39
<b>Smeltekurve</b>	60-92°C	1 °C per 5. sek	
<b>Stopp</b>	4°C	~	

## **2.12 Sanger sekvensering**

For å sammenligne V-1244 og Vir410/18 på nukleotid- og aminosyrenivå ble cDNA som koder for VP2 sekvensert ved Sanger sekvensering. 1 ml av virussupernatantene fra Veterinærinstituttet ble tint på is, og deretter filtrert gjennom 47mm Zeta plus™ 1MDS filtre (3M Purification Inc), før filtrene ble lagt i lysisbuffer med 1,6 % DTT. Lysatet (0,70 mL) ble overført til GenElute filtreringskolonne, og renset som beskrevet i avsnitt 2.6, DNase behandlet som beskrevet i avsnitt 2.8 og det ble laget cDNA som beskrevet i avsnitt 2.10

Det ble gjort en PCR for å amplifisere VP2 før det ble sekvensert. cDNA ble blandet med primere (Tabell 11) og andre komponenter (Tabell 12). Prøvene ble overført til en 2720 Thermal Cycler (Applied biosystems) på program gitt i Tabell 13.

Tabell 11: Oversikt over primere brukt i til PCR og Sanger sekvensering (SS)

Navn	Lengde	Sekvens	
IPNV_VP2_1_F	22	CCGTCGATGGCGAAAGCCCTTT	Denne studien
IPNV_VP2-1_R	24	CGGAGCTGACCACTGTGACAACCTG	Denne studien
IPNV_VP2_2_F	25	TCCACGACAGTGACGGGAGACATAA	Denne studien
IPNV_VP2_2_R	22	TGGCGGACTCCAGCCTGTTCTT	Denne studien
A-A5NC	18	<u>TAATACCACTCACTATA</u> GGAAAGAGAGTTTCAACC	(Yao & Vakharia, 1998)
A-SPKPNR	20	GGCCATGGAGTGGTACCTTC	(Yao & Vakharia, 1998)
VP2F1	20	<u>TAATACCACTCACTATA</u> TGGTAACCCACGAGCGGAGA	Denne studien

Tabell 12: Oppsett for PCR for amplifisering av VP2

	V-1244	Vir410/18 – 5'	Vir410/18 – 3'
H <sub>2</sub> O	25,5 µl	25,5 µl	25,5 µl
5 x phusion buffer	10 µl	10 µl	10 µl
10mm dNTP	1 µl	1 µl	1 µl
F-primer (10 µm)	2,5 µl <sup>A-A5NC</sup>	2,5 µl <sup>IPNV_VP2_1_F</sup>	2,5 µl <sup>IPNV_VP2_2_F</sup>
R-primer (10 µm)	2,5 µl <sup>A-SpKpnR</sup>	2,5 µl <sup>IPNV_VP2-1_R</sup>	2,5 µl <sup>IPNV_VP2_2_R</sup>
Phusion DNA polymerase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Templat (ufortynnet)	8 µl	8 µl	8 µl
<b>Totalt</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

Tabell 13: Oppsett for PCR program for å amplifisere opp VP2 med Phusion polymerase

Trinn	Temperatur	Varighet	Syklus
Initiell denaturering	98 °C	5 min	x 1
Denaturering	98 °C	10 sek	
Hybridisering og syntese	56 °C	1 min	x 35
Smeltekurve	72 °C	10 min	
Stopp	4 °C	~	



PCR produktene ble applisert på en 1 % agarosegel for å sjekke at de hadde riktig størrelse. PCR produktet fra V-1244 ble rensset fra agarosegelen ved å bruke «Gel extraction kit» (Omega bio-tek). Den utskjærte gel-biten ble overført til eppendorf-rør tilsatt «Binding buffer (XP2)» og inkubert ved 60 °C med risting til gelbitene var smeltet. Lysatet ble overført til HiBind® DNA mini kolonne og sentrifugert ved 10 000 x g i 1 min. Væsken som hadde gått gjennom kolonnen ble fjernet, før kolonnen ble satt tilbake i samme oppsamlingsrør. 300 µl «Binding buffer (XP2)» ble tilsatt kolonnen før røret ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 min. Filtratet ble fjernet, og kolonnen satt tilbake. Det ble tilsatt 700 µl «SPW Wash buffer» fortynnet med 100 % etanol før sentrifugering ved 13 000 x g i 1 min. Filtratet ble fjernet, og det tomme røret med kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 2 min for å fjerne eventuelle rester av etanol. HiBind® DNA mini kolonnen ble overført til et rent eppendorf-rør, og det ble tilsatt 30 µl DNase og RNase fritt vann. Kolonnen ble inkubert ved romtemperatur i 2 min, før det ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 min. Mengden nukleinsyre ble målt i Nanodrop™ 2000 spektrofotometer (Thermo Scientific™) og det rensede PCR produktet ble sekvensert i 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

PCR produktene for Vir410/18 ble applisert på en 1 % agarosegel for å sjekke at det var blitt dannet riktige bånd. Den ene sekvensen ble rensset fra gelen med «Gel extraction kit» (Omega bio-tek) som beskrevet i forrige avsnitt, og den andre delen av sekvensen ble rensset med GenElute™ PCR clean-up kit (Sigma-Aldrich). Det ble tilsatt 0,5 ml «Column Preparation Solution» til «GenElute plasmid mini spin column», som ble sentrifugert på 12 000 x g i 30 sek, før eluatet ble fjernet. Det ble tilsatt 225 µl «Binding Solution» til 45 µl PCR produkt. Blandingen ble overført til kolonnen og sentrifugert ved 12 000 x g i 1 min. Filtratet ble fjernet, og det ble tilsatt 500 µl vaskeløsning tilsatt EtOH, før røret ble sentrifugert ved 12 000 x g i 1 min. Filtratet ble fjernet, og det tomme røret med kolonnen ble sentrifugert ved 12 000 x g i 2 min for å fjerne eventuelle rester av etanol. Kolonnen ble overført til et nytt eppendorf-rør og det ble tilsatt 30 µl Dnase og RNase fritt vann. Dette ble inkubert ved romtemperatur i 1 min, før det ble sentrifugert ved 12 000 x g i 1 min.

Sekvensene til PCR-produktene ble bestemt ved Sanger sekvensering ved bruk av «Big Dye version 3.1» sekvenseringsprotokoll. Prøvene ble blandet (Tabell 14) og sekvensert i en 2720

Thermal Cycler (Applied biosystems) på program gitt i Tabell 15. Avlesing av sekvens ble utført av DNA sekvenseringslaboratoriet hos UiB administrert av MBI. Det ble tilsatt 10 µl DNase og RNase fritt vann før avlevering.

*Tabell 14: Oppsett for sekvenseringsreaksjon for V-1244 og Vir410/18*

	V-1244	V-1244	Vir410/18	Vir410/18	Vir410/18	Vir410/18
	1	2	1	2	3	4
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
<b>Templat</b>	7 µl	7 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Buffer</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Big dye v.3.1</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Primer</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
	VP2_F1	A- SpKpnR	IPNV_VP2_1_F	IPNV_VP2_1_R	IPNV_VP2_2_F	IPNV_VP2_2_R
<b>Totalt</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

*Tabell 15: Program for sekvensering av VP2*

Trinn	Temperatur	Varighet	Syklus
<b>Initiell denaturering</b>	96 °C	5 min	x 1
<b>Denaturering</b>	96 °C	10 sek	
<b>Hybridisering og syntese</b>	52 °C	1 min	x 35
<b>Smeltekurve</b>	60 °C	4 min	
<b>Stopp</b>	4 °C	~	

## 2.13 «Multi sequence alignment» (MSA) og fylogenetisk analyser

NCBI ble brukt for å finne nukleotidsekvenser av VP2 for flere IPNV varianter. Seks isolater (BG1-BG6) fra et feltutbrudd i Vest-Norge som hadde gitt sykdom i genetisk resistent laks ble bruk i de fylogenetiske analysene (MW496372.1, MW496373.1, MW496374.1, MW496375.1, MW496376.1, MW496377.1) (Hillestad et al., 2021). I tillegg til to virulente stammer, S-IPNV/FS12-01 (DQ536091.1), som var isolert fra pylorusvev hos atlantisk laks fra Norge (Julin et al., 2009), samt Sp122 (AY354521.1), isolert fra et feltutbrudd i Norge som førte til dødelighet av atlantisk lakseyngel og postsmolt (Shivappa et al., 2004). Det ble også brukt

sekvenser fra tidligere publiserte sekvenser med ID-nummer: (OK076707.1 og OK076708.1 (Benkaroun et al., 2021), AF342735.1 og AF343572.1 (Blake et al., 2001), KY548508 (Holopainen et al., 2017), AY780919.1 (Romero-Brey et al., 2009), MH562037.1 (Kristoffersen et al., 2018). Nukleotidsekvensene ble oversatt til aminosyresekvenser ved bruk av Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>). UGENE (Okonechnikov et al., 2012) ble brukt for å lage «multiple sequence alignment» (MSA). Et fylogenetisk tre ble generert ved å bruke «Maximum likelihood»-metoden og JTT matriksbasert modell med 1000 bootstrap i verktøyet MEGAX (Kumar et al., 2018). SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) ble brukt for å sammenligne sekvensene og se på den strukturelle utformingen av aminosyrer som påvirker de antigene variablene. 3IDE (Coulibaly et al., 2010) ble brukt som templat i «SWISS model workspace».

## 2.14 Inaktivering av IPNV for immunisering

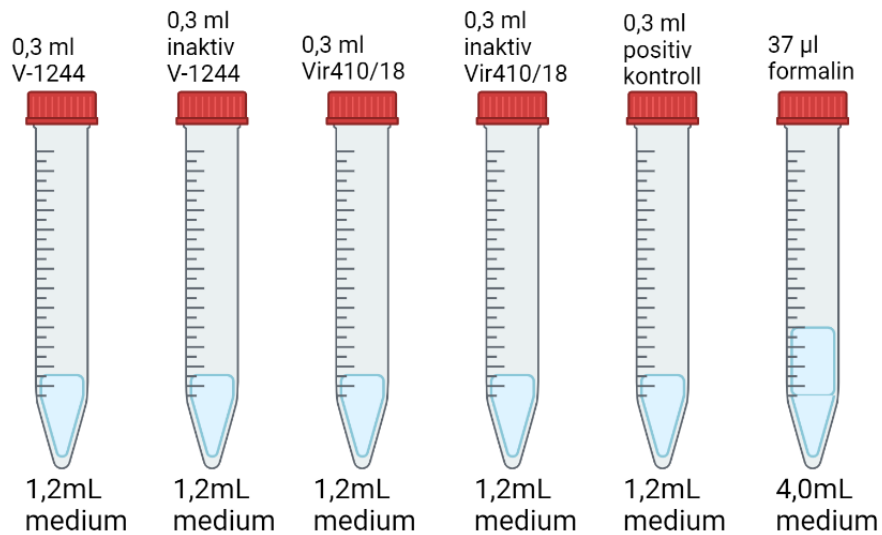
Det ble overført 4 ml virussupernatant til 15 ml sentrifugerør (Sarstedt). Vekten av virussuspensjonen ble brukt til å beregne mengde formalin ved hjelp av Formel 2. Formalin ble tilsatt og rørene ble satt i inkubator ved 20 °C under omrøring i 15 min. Virussuspensjonene ble overført til nye sentrifugerør, og videre inkubert ved 20 °C med omrøring i 75 min. Virussuspensjonene ble så oppbevart i kjøleskap ved 4 °C frem til bruk.

*Formel 2: Utregning for beregning av mengde formalin til inaktivering av virus.*

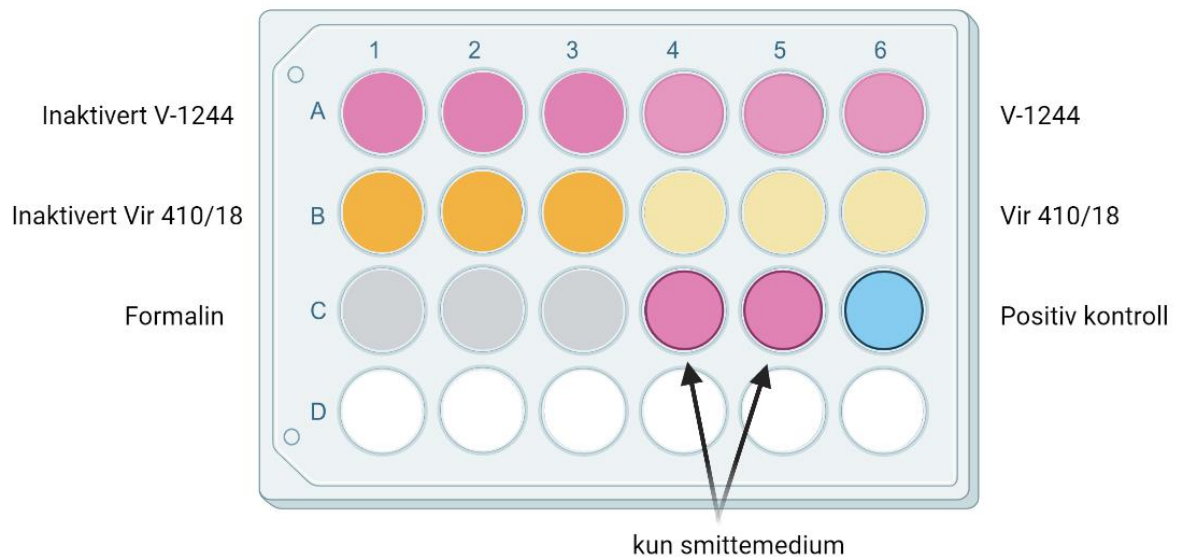
$$\frac{\frac{4,00g}{kg} \times \text{vekt antigen (kg)} \times 100 \%}{\% \text{ formalin konsentrasjon} \times \frac{1,08g}{mL}}$$

### 2.14.1 Test av inaktivering

For å teste at virusene var blitt inaktivert, ble to 25 cm<sup>2</sup> Nunc™ EasYFlask™ celleflasker med CHSE-214 celler (22. passasje) overført til brønner. Virussupernatanten ble fortynnet 1:5 med dyrkingsmedium i 15 ml Falconrør og deretter overført til brønner (Fig. 8). Det ble tilsatt 37 µl formalin i 4 ml dyrkingsmedium som negativ kontroll. I den positive kontrollen ble det tilsatt en annen variant av IPNV (Nerbøvik et al., 2017) fortynnet 1:5. Det ble overført 0,5 ml virussuspensjon i hver av brønnene med oppsett gitt i Fig. 9.



**Figur 8:** Oppsett av virusfortynning for sjekk av inaktivering. Figuren er laget i BioRender.com



**Figur 9:** Brønnoppsett for å sjekke inaktivering av virus. Brønn med samme farge viser paralleller. Figuren er laget i BioRender.com. Pilene viser brønner med kun smitte-medium.

## 2.15 Forsøksfisk

Uvaksinert Atlantisk laks ble holdt i 500 L sirkulære kar hos ILAB ved Bergen Høyteknologisenteret. Lengde og vekt på fisken var 24 cm  $\pm$  0,8 cm og 187 g  $\pm$  14,7 g ved starten av forsøket. Det var ingen tegn på infeksjon eller dødelighet blant laksen. Fisken ble

holdt under optimale forhold gjennom hele forsøksperioden, 12 timer lys:12 timer mørke med vanntemperatur på naturlig sjøtemperatur (8 °C), salinitet 34 PSU og vannstrøm på 300-400 L per time. Fisken ble føret med 3 mm og 4 mm Nutra Olympic av Skretting AS, og sultet 48 timer før hver vaksinerings og før bloduttak.

## **2.16 Immunisering av laks med V-1244 og Vir410/18.**

To monovalente IPN-vaksiner ble brukt til vaksinerings. De inneholdt formalininaktivert virus formulert inn i Freds incomplete adjuvans (Sigma-Aldrich). Oljeadjuvansen ble oppbevart i kjøleskap, og ble tatt ut for å bli romtemperert dagen før immunisering. De inaktiverte virus-variantene ble tatt ut av kjøleskap noen timer før immunisering for å bli romtemperert. 0,6 ml inaktivert virus ble overført til 2 ml rør med kork (VWR). Adjuvans (0,6 ml) ble overført til de samme rørene ved hjelp av sterile engangssprøyter (Bencton Dickinson Plastipak). Vaksinene ble homogenisert i Benchtop homogeniser, Fastprep-24 5G (VWR) i 10 sek på 4 m/sek. Deretter ble 1 ml vaksine trukket ut av mikrotubene ved hjelp av en plastsprøyte (Bencton Dickinson plastipak) med 0,5 mm kanyle (Henke Sass Wolf). Luftbobler i sprøytene ble fjernet ved å dunke forsiktig på sprøyten. Ved vaksinerings ble fisken overført til bedøvelseskar og bedøvet ved bruk av 1 g Finquel dosert i 10 L vann. Kontrollfiskene ble vaksinert med PBS og overført til separate kar. Fisk ble tilfeldig tildelt vaksine med de to IPNV variantene, 10 fisk for hver variant. Bedøvd fisk ble individuelt veid, målt, VIE-merket og manuelt vaksinert med en enkel intraperitoneal (i.p.) injeksjon med 0,1 ml vaksine, før de ble overført tilbake i karet. Vaksinen ble satt ventralt i midtlinjen, 10-20 mm anterior for bukfinnene. Sterile engangsnåler med 0,5 mm kanyle ble brukt for injeksjon. VIE-merket ble satt rett over øyet, blå-farge for V-1244 og gul for Vir410/18. Eventuelle andre bemerkninger ble notert.

Fire uker etter første vaksinerings, ble fisken immunisert med andre dose 0,1 ml vaksine, kun inneholdende inaktivert virus, uten adjuvans. Det ble dosert 1 g Aqui-S i 250 L vann for å berolige fisken før håving til transportkar for å unngå skjelltap. Fisken ble bedøvd i 1 g Finquel i 10 L vann. Fisk ble identifisert via tidligere satt VIE-merke, og målt og veid før immunisering. 24 dager etter andre vaksinerings, ble fisken immunisert med tredje og siste dose 0,1 ml vaksine, inneholdende inaktivert virus og PBS (1:1).

### **2.16.1 Prøveuttak av immunisert fisk.**

To uker etter siste vaksinedose ble det gjort prøveuttak av den immuniserte fisken. Fisk ble avlivet med et slag mot hodet. Fisken ble veid og målt, og identifisert ved hjelp av VIE-merket. Blod for isolering av serum ble tatt ut ved bruk av 6 ml kanyler (Henke Sass Wolf) til 1 mL luer slip syringe (Becton Dickinson SA). Blodet, tatt fra vena caudalis, ble overført til 4 ml prøverør uten antikoagulant (BD Vacutainer) og holdt på is. Rørene ble oppbevart i kjøleskap til blodet hadde koagulert, og ble deretter sentrifugert i Allegra X-15R sentrifuge (Beckman coulter) på 393 x g i 10 min ved 4 °C. Serumet ble overført til 1,5 ml eppendorf-rør (Axygen®) og oppbevart ved -20 °C.

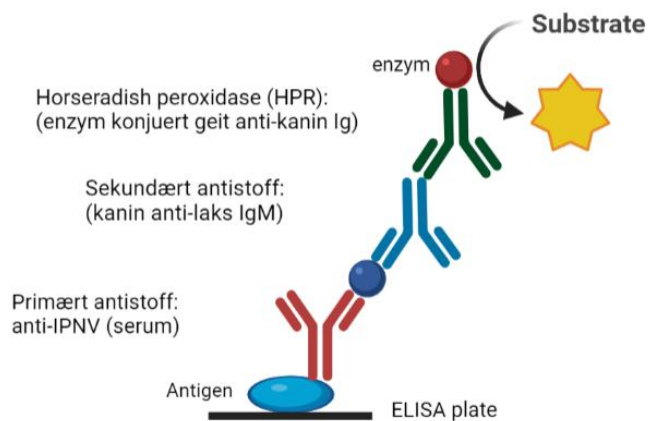
### **2.17 Oppdyrking og frysetørking av V-1244 og Vir410/18**

Åtte 75 cm<sup>2</sup> Nunc™ EasYFlask™ celleflasker med CHSE-214 celler (fire flasker for hver virusvariant) ble smittet med de to IPNV-variantene, V-1244 og Vir410/18 ved ca. 80 % monolag i bunnen av flaskene. Ved smitte ble dyrkningsmedium helt av og overflødig væske ble fjernet med glasspipette. 1 ml virussuspensjon og 1 ml smittemedium ble tilsatt flaskene. Virus ble absorbert i 2 timer før det ble tilsatt 18 ml smittemedium og inkubert ved 15 °C. Etter 11 dager ble supernatanten ble høstet og sentrifugert. Supernatanten ble overført til 50 ml cellstar rør (Greiner Bio-One) og sentrifugert ved 2500 x g i 10 min. Supernatanten ble deretter forsiktig overført til nye 50 ml falkonrør for å unngå få med pelleten i bunn. Supernatanten ble overført til Ultraclear sentrifugerør (Beckman Coulter) og sentrifugert i Optima L-90K Ultracentrifuge (Beckman coulter) i 2 timer ved 25000 x g på 10 °C . Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet forsiktig med en vakuumpumpe for å unngå at pelleten i bunn skulle løses opp. Pelleten ble løst opp i 0,5 ml DNase og RNase fritt vann i oppveide 50 ml falkonrør og oppbevart ved -80 °C. Ultrasentrifugert virus ble frysetørket ved bruk av en Laboratory freeze dryer APHA 1-2 LDplus (CHRIST) på 0,047 mbar i 24 timer.

### **2.18 Sonikering av virus**

Ved sonikering tilføres lydenergi for å agitere partikler i en prøve. Frysetørket virus ble sonikert ved hjelp av Vibra-cell™ (Sonic). Ut ifra vekten av det frysetørkede viruset ble det beregnet mengde PBS med 5mM EDTA (pH 7,3), for å få konsentrasjon til 1 mg/ml. Virus ble satt til sonikering i 3 min, 30 sek på/30 sek av med amplifikasjon 30 %. Etter sonikering ble virusene fortynnet til 1 mg/ml i PBS med 5mM EDTA (pH 7,3), og alikvotert i 1,5 ml eppendorf-rør (Sigma-Aldrich) og oppbevart ved -20 °C.

## 2.19 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)



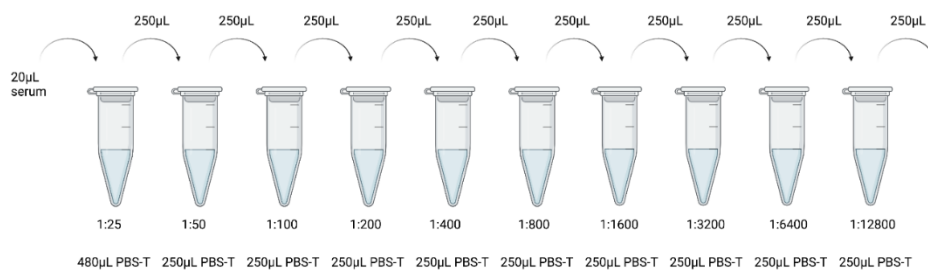
*Figur 10: En diagrammatisk beskrivelse av ELISA metoden. Figuren er laget i BioRender.com*

ELISA er en serodiagnostisk metode som baserer seg på spesifikk antistoff-antigen interaksjoner for å kvantisere og detektere spesifikt antistoff eller antigen. Prinsippet med ELISA er å immobilisere antigen til en solid overflate og detektere det med et spesifikt antistoff. Antigenet blir indirekte detektert med et sekundært antistoff (et antispesifikt antistoff konjugat) bundet til et reporter-enzym. Deteksjon oppnås ved å måle aktiviteten til reporter-enzymet via inkubering med riktig mengde substrat for å få et målbart produkt (Fig. 10).

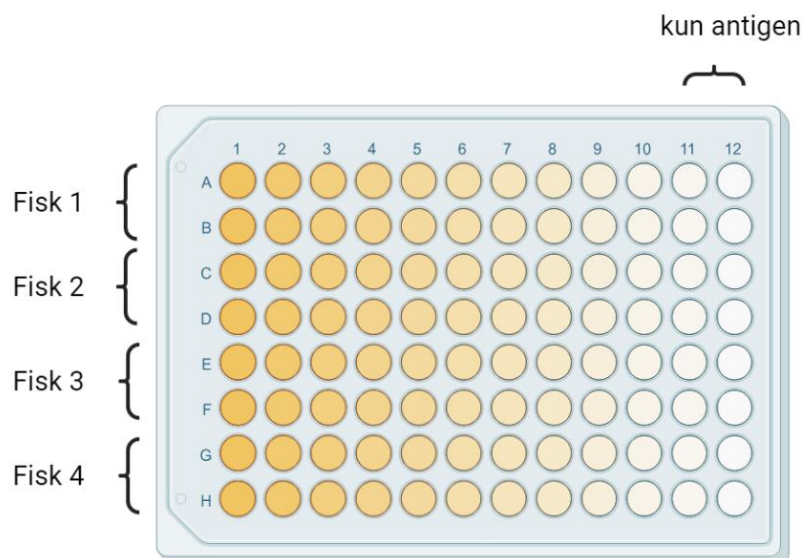
Serum fra Atlantisk laks immunisert med virus ble analysert med ELISA ved å bruke frysetørket virus som antigen. For å finne optimal antigen konsentrasjon til videre ELISA, ble sonikerte virus fortynnet til 50 µg/ml, 10 µg/ml, og 2 µg/ml i PBS, og 150 µl antigensuspensjon ble tilsatt i en 96-brønns immunoplate (Nunc MaxiSorp™). Det ble også brukt virussuspensjon som antigen. Virussuspensjonen ble sentrifugert i Allegra X-15R centrifuge (Beckman coulter) på 2500 x g i 10 min ved 4 °C og deretter filtrert i et 0,2 µl filter (Sarstedt). Brettene ble inkubert ved 4 °C over natten. Dagen etter ble brønnene vasket med 200 µl PBS-T tre ganger ved hjelp av 405 LS microplate vasker (BioTek). Det ble deretter tilsatt 250 µl blokkeringsløsning (3 % (w/v) skummet melkepulver i PBS-T) til brønnene med antigen, før platen ble inkubert i en time ved romtemperatur. Lakseantiserum fortynnet 1:50 og 1:100 i PBS-T ble brukt som primært antistoff. 100 µl serum ble tilsatt tildelte brønner før platen ble inkubert ved 15 °C over natten. Brønnene hvor PBS erstattet serum ble brukt som negativ kontroll/blank.

Det sekundære antistoffet som ble brukt var kanin anti-laks IgM fortennet 1:2000 i PBS-T. Brønnene ble vasket tre ganger med 200  $\mu$ l PBS-T før 50  $\mu$ l av det sekundære antistoffet ble tilsatt og platen ble inkubert i to timer ved romtemperatur. Etter inkubering ble brønnene vasket tre ganger med 200  $\mu$ l PBS-T og 50  $\mu$ l konjugat ble tilsatt. Konjugatet som ble brukt var peroxidase konjugert geit anti-kanin Ig (Dako) fortennet 1:2000 i PBS-T. OD ble lest av ved 492nm i Spectra Fluor microplate reader (Tecan).

Etter å ha funnet optimal antigenkonsentrasjon ble serum fra immunisert fisk fortennet i en tofolds fortynningsrekke (Fig. 11) og testet ved ELISA. Det var to paralleller for hver fortynning (Fig. 12), og brønner med serum fra uvaksinert kontrollfisk ble brukt som negativ kontroll, i tillegg til brønner med PBS i stedet for serum.



**Figur 11:** Oppsett av fortynningsrekken av serum for ELISA. Figuren er laget i BioRender.com



**Figur 12:** Brønnoppsett for ELISA. Det er to paralleller for hvert fiskeserum. Oppsettet er vist for kun fire fisk for bedre oversikt. Brønnene med kun antigen brukes som negativ kontroll. Figuren er laget i BioRender.com



## 2.20 SDS-PAGE og Sølvfarging

Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE) er en metode for å separere proteiner med molekylærmasser mellom 5 og 250 kDa. Ved applikasjon av konstant elektrisk felt vil proteinene migrere mot anoden, med ulik hastighet avhengig av massen. SDS bryter bindingene slik at proteinene denaturer og blir stive polypeptidstaver som dekkes av negativt ladede detergentmolekyler (UiO, 2011).

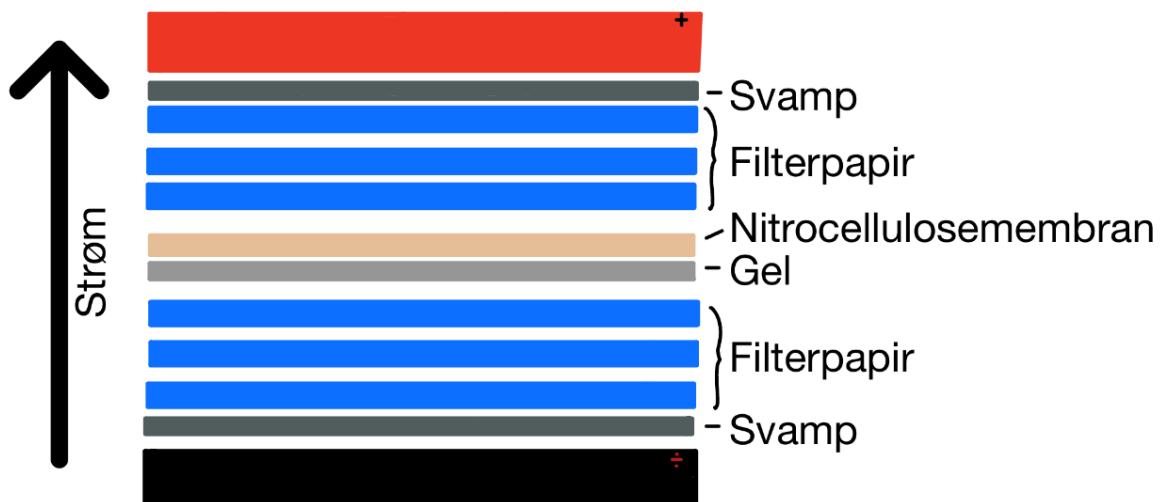
Frysetørket virus ble fraksjonert i en 12 % SDS-polyacrylamid gel ved å bruke en «Mini protean tetra cell» (Bio-Rad). 100 mg/ml av hver virusvariant ble fortynnet 1:1 i en prøvebuffer inneholdende 5 %  $\beta$ -metacaptoethanol (Sigma-Aldrich). «Unstained low range SDS-PAGE» standard ( $M_{low}$ ) (Bio-Rad) ble fortynnet 1:10 i prøvebuffer inneholdende 5 %  $\beta$ -metacaptoethanol. Laks IgM-antigen fortynnet 1:29 i prøvebuffer inneholdende 5 %  $\beta$ -metacaptoethanol ble brukt som negativ kontroll for å teste at det sekundære antistoffet fungerte. Prøvene fortynnet i prøvebuffer ble varmebehandlet ved 96 °C i 10 min. 10  $\mu$ l virusprøve og 10  $\mu$ l  $M_{low}$ , samt 5  $\mu$ l «Precision Plus Protein™ Standard» ( $M_{wb}$ ) (Bio-Rad) og 2  $\mu$ l laks IgM-antigen ble applisert til hver brønn, og elektroforert ved 190V i 45 min. Etter protein separasjon ble proteinene fiksert i 20 min ved å bruke «Fixative Enhancer Solution» (Bio-Rad) og vasket (2x10 min) i de-ionisert vann (milliQ vann). Proteinbåndene ble visualisert ved å bruke «Silver stain plus kit» (Bio-Rad) ihht. produsentens instruksjoner. Når båndene ble synlig, ble «Staining Solution» erstattet med 5 % eddiksyre for å stoppe fargereaksjonen, og gelene ble visualisert i ChemiDoc XRS+ Imaging systems (Bio-Rad).

## 2.21 Western blot

Western blot er en metode for elektroforetisk overføring av proteiner fra polyakrylamidgel til nitrocellulose membran. De immobiliserte proteinene blir detektert ved bruk av antistoff. Uspesifikk binding blir blokkert med overskudd av protein, og deretter blir et spesifikt antistoff bundet, og et sekundært antistoff mot det første antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert til et fluorosens eller en peroksidase (Towbin et al., 1979).

Gelen fra SDS-PAGE og 0,2  $\mu$ m nitrocellulosemembran (Bio-Rad) ble fuktet i 1 x blottebuffer i 30 min. Gelholder, svamper, filterpapir, nitrocellulosemembran og gel ble satt sammen som vist i Fig. 13, og proteinene ble overført fra gel til membranen ved elektroblotting (100V i 1

time). Membranen ble fuktet i TBS og blokkert med 3 % skummet melk i en time på forsiktig risting. Etter blokkering ble membran vasket to ganger i TTBS på risting i 5 min. Tilsatt lakseantiserum (fortynnet 1:50 i antistoffbuffer) ble inkubert i 24 timer på risting, og membran ble vasket to ganger med TTBS på risting i 5 min. Det ble brukt kanin anti-laks IgM (fortynnet 1:1000 i antistoffbuffer) som sekundært antistoff, siden det ikke finnes noe kommersiell anti-laks konjugat. Det ble tilsatt monoklonalt VP2-antistoff fra mus (Dako) på ene blotten i stedet for sekundært antistoff, for å kontrollere at konjugatet fungerte. Etter inkubering i to timer ble det tilsatt HPR-konjugert geit anti-kanin Ig (Dako), som ble fortynnet 1:2000 i antistoffbuffer og inkubert i 90 min. Clarity Western ECL substrat ble brukt for visualisering av bånd på membran i ChemiDoc XRS+ Imaging systems (Bio-Rad).

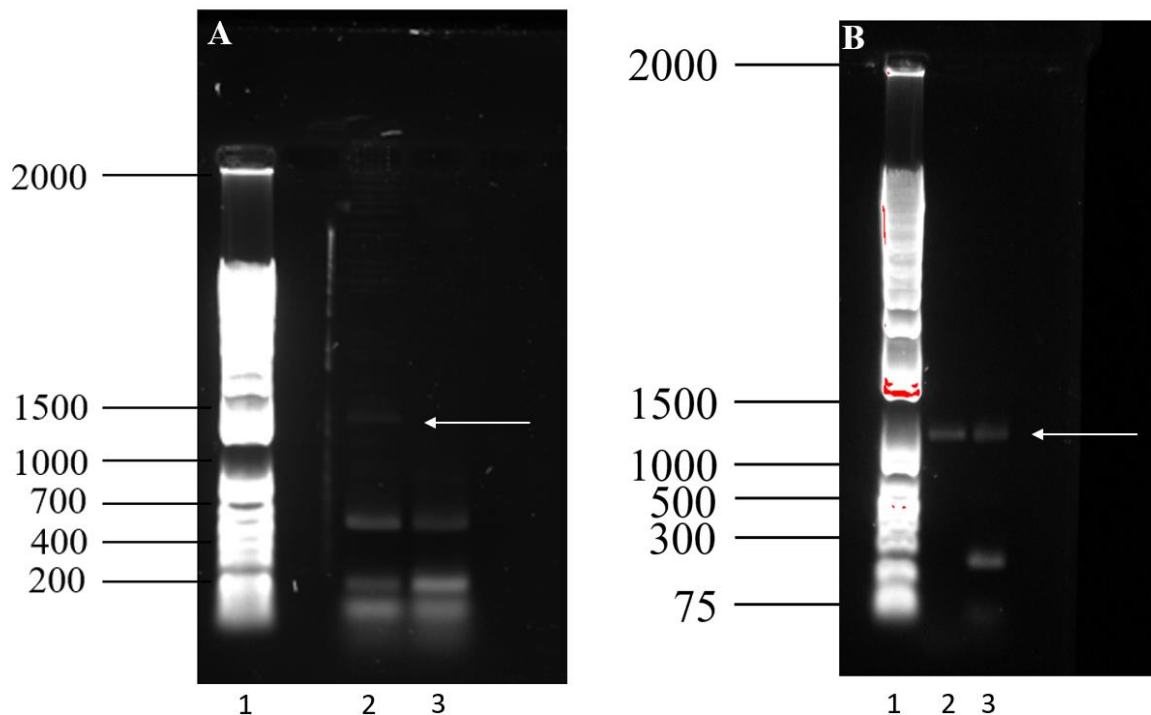


*Figur 13: Illustrasjon av rekkefølgen på montering av Western blot sandwichen*

### 3.0 Resultat

#### 3.1 Sekvensanalyse og fylogeni av VP2 fra ulike varianter av IPNV

For å se på forskjeller på nukleotid- og aminosyrenivå ble VP2 fra V-1244 og Vir410/18 amplifisert opp med PCR og sekvensert. VP2 sekvensen er ca. 1558 bp. V-1244 ble amplifisert opp i ett langt PCR produkt (Fig. 14A). Det ble ikke produkt på Vir410/18, så nye primere ble designet og VP2 ble amplifisert opp i to kortere fragmenter, 5' og 3' segment, som overlappet (Fig. 14B). VP2 segmentet til Vir410/18 ble delt ca. på midten.



**Figur 14:** 1 % agarosegel av IPNV PCR-produkt. A) Brønn 1: molekylvekt markør, brønn 2: V-1244, brønn 3: Vir410/18. Pil peker på PCR produkt renset fra gel. B) Brønn 1: molekylvekt markør, brønn 2: 5' delen av Vir410/18, brønn 3: 3' delen av Vir410/18 sekvensen. Pil peker på PCR produkt renset fra gel.

VP2 sekvensene til V-1244 og Vir410/18 ble sammenlignet på aminosyrenivå både med hverandre og mot andre isolater, og analysene viste flere forskjeller (Fig. 15). Det var flere forskjeller på aminosyrenivå mellom V-1244 og Vir410/18 (Tabell 16). Det var forskjell ved posisjon 247, hvor V-1244 hadde treonin, mens Vir410/18 hadde alanin. På posisjon 217 hadde V-1244 treonin, mens Vir410/18 hadde prolin. Begge variantene hadde treonin på posisjon 221 (Fig. 16).

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72
KYS48508 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
DQ536091.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
V-1244 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
V410/18 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
AY780919.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
AY354521.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
AF342735.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
AF343572.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496372.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496373.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496374.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496375.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496376.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MW496377.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
MH562037.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
OK076707.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
OK076708.1 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
V-1244_Sp_G5 | 1MNTNKATATYLSKIMLPETGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSGLVCFPGAPGSRIGAHYRWVWVQ
71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142
KYS48508 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
DQ536091.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
V-1244 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
V410/18 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
AY780919.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
AY354521.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
AF342735.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
AF343572.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496372.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496373.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496374.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496375.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496376.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MW496377.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
MH562037.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
OK076707.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
OK076708.1 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
V-1244_Sp_G5 | 74TGLFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGLSEVESLTYNSLMSLTTN
141 150 152 154 158 159 160 164 166 168 170 172 174 176 178 180 182 184 188 190 192 194 196 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220
KYS48508 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
DQ536091.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
V-1244 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
V410/18 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
AY780919.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
AY354521.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
AF342735.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
AF343572.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496372.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496373.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496374.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496375.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496376.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MW496377.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
MH562037.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
OK076707.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
OK076708.1 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
V-1244_Sp_G5 | 147PQDKVNNQLVTGKVTVNLNPTGFDKPYVRLLEDETPQGLQSMNGAKMRCRTAAIAPRRYEDLPSQRLPVPATGTA
222 224 226 228 230 232 234 236 238 240 242 244 246 248 250 252 254 256 258 260 262 264 266 268 270 272 274 276 278 280 282 284 286 288 290 292 294
KYS48508 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
DQ536091.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
V-1244 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
V410/18 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
AY780919.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
AY354521.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
AF342735.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
AF343572.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496372.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496373.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496374.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496375.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496376.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MW496377.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
MH562037.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
OK076707.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
OK076708.1 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
V-1244_Sp_G5 | 221YPTIEGADIVNSTVTGDIINFLARQPADETFHFQDLDFMGLDNDVPVVTVVSSALATDNHRGVSAKMTQS
296 298 300 302 304 306 308 310 312 314 316 318 320 322 324 326 328 330 332 334 336 338 340 342 344 346 348 350 352 354 356 358 360 362 364 366 368 370
KYS48508 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
DQ536091.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
V-1244 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
V410/18 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
AY780919.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
AY354521.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
AF342735.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
AF343572.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496372.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496373.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496374.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496375.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496376.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MW496377.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
MH562037.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
OK076707.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
OK076708.1 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
V-1244_Sp_G5 | 295IPFENITKPIIRVRLSKYINQQTADNVATLGTMGPASVFSFSSGNGVPGVLRPITLVAYEKMTPLSILTVAGVS
371 374 376 378 380 382 384 386 388 390 392 394 396 398 400 402 404 406 408 410 412 414 416 418 420 422 424 426 428 430 432 434 436 438 440 442
KYS48508 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
DQ536091.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
V-1244 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
V410/18 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
AY780919.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
AY354521.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
AF342735.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
AF343572.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496372.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496373.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496374.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496375.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496376.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MW496377.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
MH562037.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
OK076707.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
OK076708.1 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA
V-1244_Sp_G5 | 370NVELLPNPELLKNNMVTYRGKYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTVEEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKA

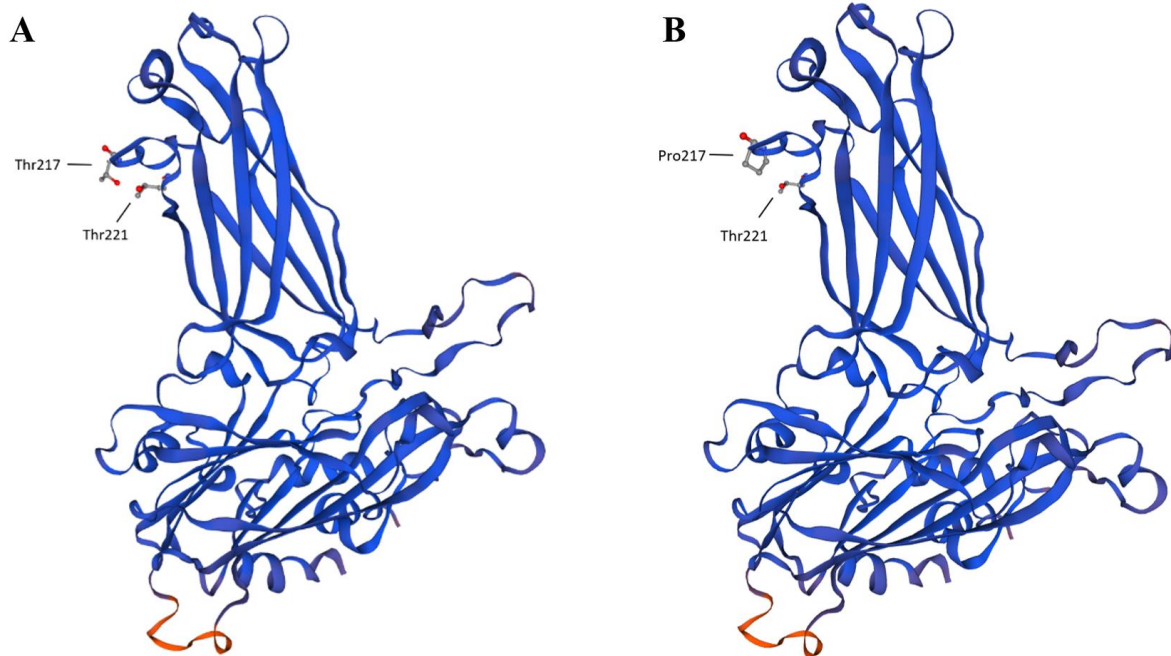
```

Figur 15: Aminosyresekvensen til VP2 til flere IPNV-varianter, med posisjon 217 og 221 markert.



**Tabell 16:** Forskjellene i aminosyresekvens mellom sekvenserte V-1244 og Vir410/18

Isolat	217	245	247	248	252	255	257	278	282	285	321
V-1244	T	S	T	E	V	J	D	V	N	Y	G
Vir410/18	P	G	A	R	D	T	H	A	T	H	D



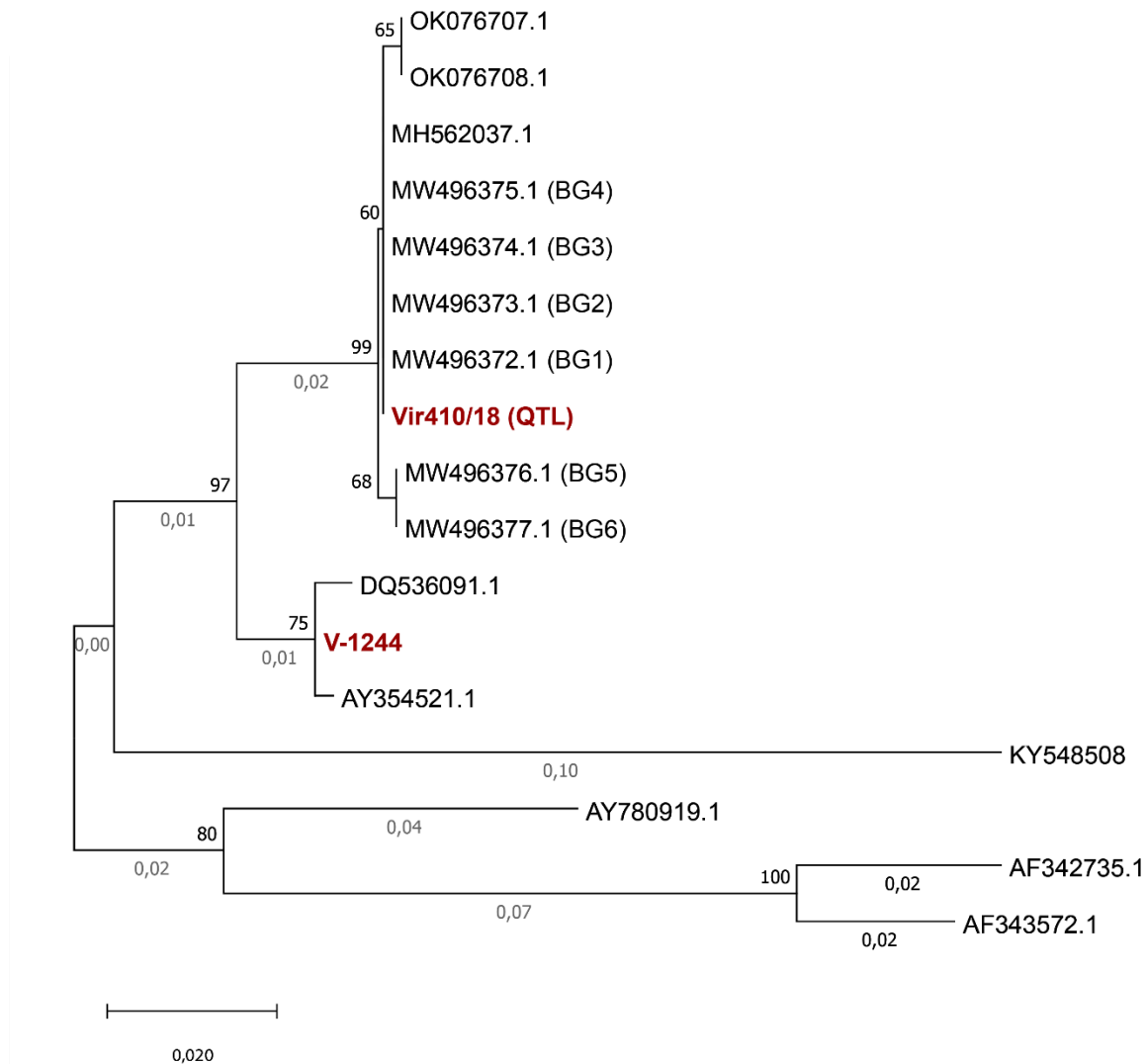
**Figur 16:** Strukturmodell av VP2 for IPNV V-1244 og Vir410/18. A) VP2 med aminosyre Thr217 og Thr221 hos V-1244 som «ball and stick». B) VP2 aminosyre Pro217 og Thr221 hos Vir410/18 som «ball and stick».

Aminosyresekvensene fra BG1 til BG4 var identiske, mens BG5 og BG6 var forskjellig fra disse. BG5 og BG6 hadde endret aminosyre fra glutamat (E) til aspartat (D) på posisjon 47. Den sekvenserte Vir410/18-varianten var identisk til BG1-BG4 på aminosyrenivå, men ikke på nukleotidnivå (Tabell 17).

**Tabell 17:** Forskjeller på nukleotidnivå mellom Vir410/18 og BG1-BG4 fra (Hillestad et al., 2021)

Isolat	261	267	360	414	465	723	1008	1065	1080	1290
BG1-BG4	A	G	G	C	A	C	T	C	G	T
Vir410/18	G	T	T	T	G	T	C	T	C	C

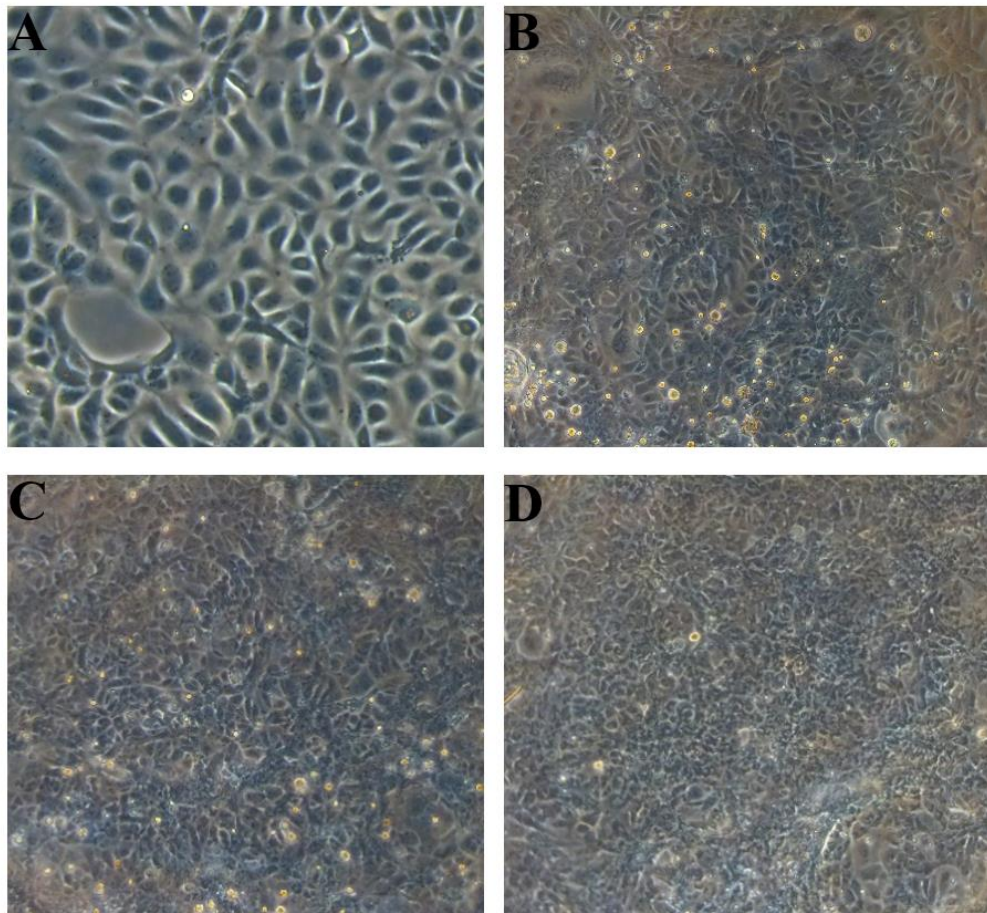
Fylogenetiske analyser av VP2 grupperte Vir410/18 sammen med BG1-BG4 (Fig. 17). V-1244 ble gruppert med S-IPNV/FS12-01 og Sp122. Sekvensen av V-1244 som ble gjort i masteroppgaven, var ulik sekvensen som hadde blitt sekvensert på Veterinærinstituttet, kalt V-1244-SpG. V-1244-SpG hadde Ala221, mens V-1244 hadde Thr221 (Fig. 15). Dette til tross for at den kun var passert en gang i CHSE-celler før det ble sendt over.



**Figur 17:** Maximum likelihood viser det fylogenetiske forholdet mellom VP2 aminosyredata fra forskjellige IPNV-varianter. «Accession ID» til sekvensene er presentert i Figur 15. Prosentandelen der de tilknyttede taxaene samler seg vises på siden av grenene. Det ble brukt Neighbor-join og BioNJ-algoritmer til en matrise med parvise avstander estimert ved bruk av JTT-modellen. Denne analysen involverte 17 aminosyresekvenser. Det var totalt 442 stillinger i det endelige datasettet.

### 3.2 Cytopatogen effekt av V-1244 og Vir410/18

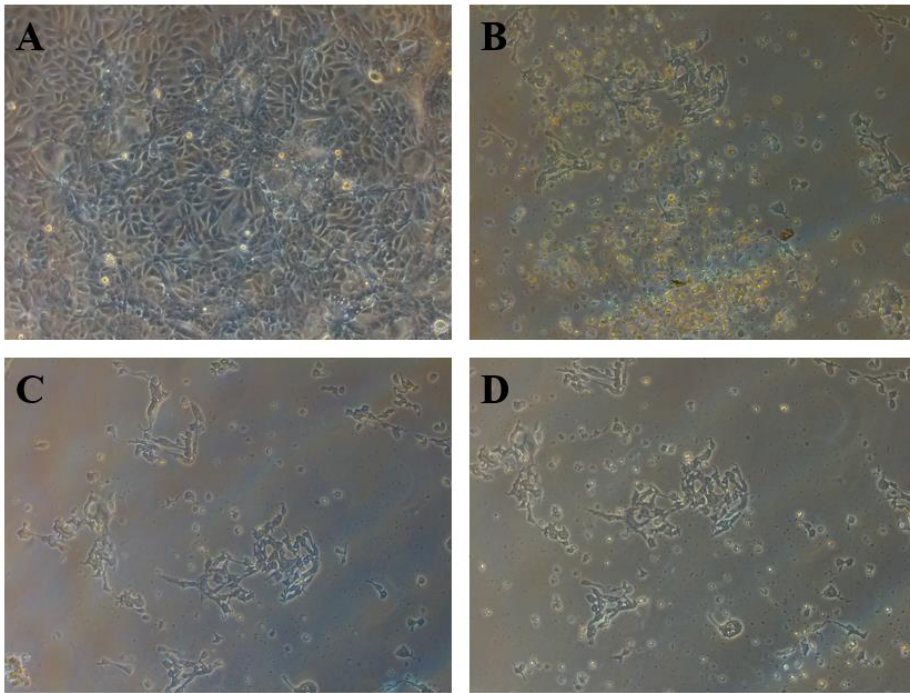
CPE ble studert ved å bruke et omvendt mikroskop over en tidsperiode på 10 dager (Fig. 18).



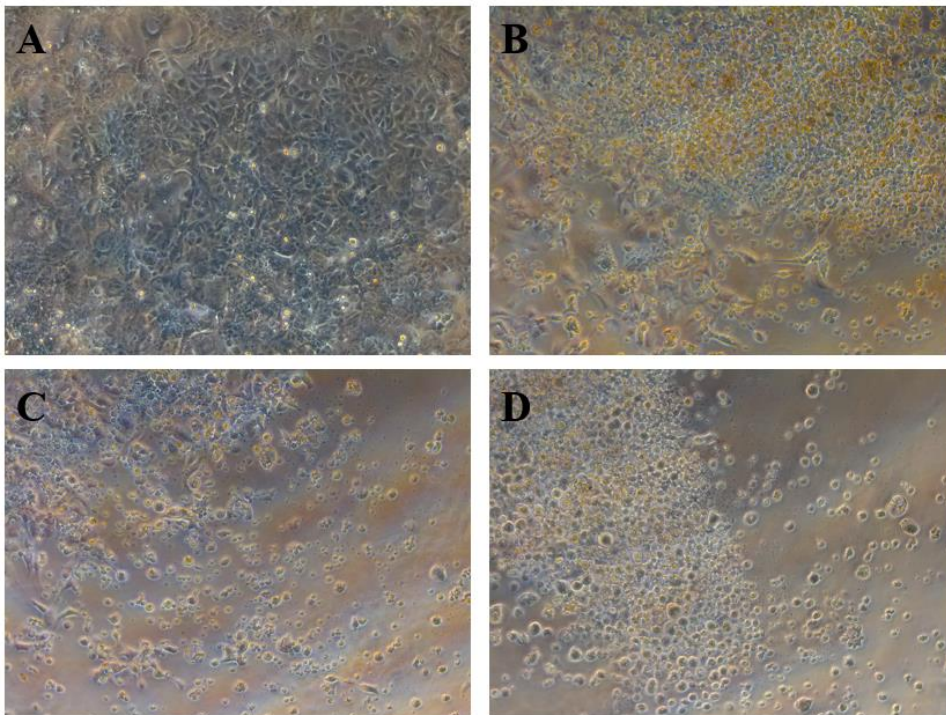
**Figur 18:** Bilder av CHSE-214 celler tatt med 20x objektiv. A: Før smitte. B) Tilsatt PBS som negativ kontroll 3 dager etter smitte. Tilsatt supernatant fra CHSE-celler som negativ kontroll C) 3 dager etter smitte og D) 10 dager etter smitte.

I kontrollbrønnene som ble tilsatt PBS eller supernatant fra CHSE-celler i stedet for virussupernatant, ble cellelaget tetter i løpet av tidsperioden (Fig. 18B-D). Etter ca. en uke, begynte cellene i kontrollbrønnene å bli degradert og frynsete på grunn av mangel på næringsstoffer. I flaskene tilsatt V-1244 ble det observert en gradvis økning av områder med antydning til plakk i tillegg til områder med degraderte celler og/eller fravær av celler (Fig. 19). Det ble observert tendenser til cytopatogen effekt fra dag tre og ble mer tydelig lengre inn i forsøket. Ved dag 10 dominerte plaque cellekulturen, og det var få celler igjen i cellekulturen. Vir410/18 gav raskere tendenser til cytopatogen effekt, men det jevnet seg ut noen dager inn i forsøket (Fig. 20).





**Figur 19:** Bilder av CHSE-celler ved ulike tidspunkt etter smitte med V-1244 tatt med 20x objektiv. A) etter 3 dager, B) etter 5 dager, C) etter 6 dager, D) etter 10 dager



**Figur 20:** Bilder av CHSE-celler ved ulike tidspunkt etter smitte med Vir410/18 tatt med 20x objektiv. A) etter 3 dager, B) etter 5 dager, C) etter 6 dager, D) etter 10 dager



Virus ble titrert ved en standard fortynnings sluttpunktmetode, TCID<sub>50</sub> som beskrevet i metodedelene. TCID<sub>50</sub> representerer dosen som gir cytopatiske endringer til 50 % av den inokulerte kulturen (Tabell 18).

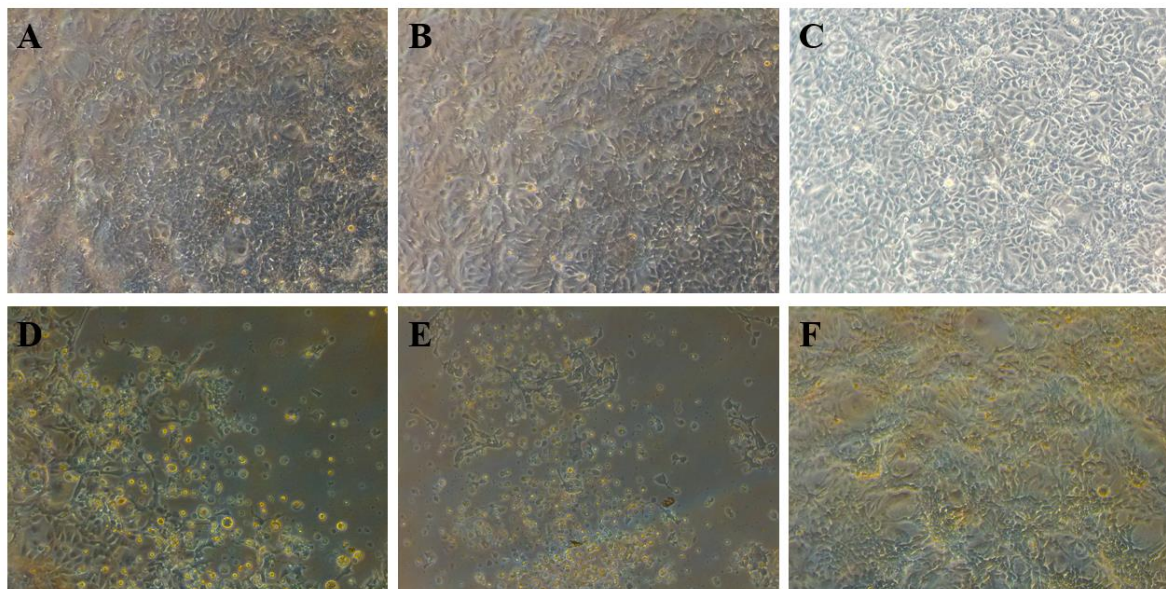
*Tabell 18: Andel av brønner med tydelig plaque av hver fortynning*

<b>% Infiserte brønner</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>	<b>10<sup>-10</sup></b>
<b>V-1244</b>	100 %	100 %	67 %	50 %	-	-
<b>Vir410/18</b>	100 %	100 %	83,3 %	50 %	-	-

Etter utregning ble det gitt at TCID<sub>50</sub> var 10<sup>8</sup> for både Vir410/18 og V-1244.

### 3.3 Inaktivering av virus

I brønnene med ubehandlet virus så man at cellene fort ble degraderte og det ble synlig CPE (Fig. 21D-E). Brønnene med formalinaktiverte virus fikk ingen synlig CPE, og de formalinaktiverte virusene ble brukt til immunisering av laks (Fig. 21A-B).



**Figur 21:** Bilder av CHSE-celler. A) formalinbehandlet Vir410/18, B) formalinbehandlet V-1244, C) CHSE-celler med kun smitte medium, D) ubehandlet Vir410/18, E) ubehandlet V-1244, F) CHSE-celler kun tilsatt formalin

### 3.4 Immunisering av laks

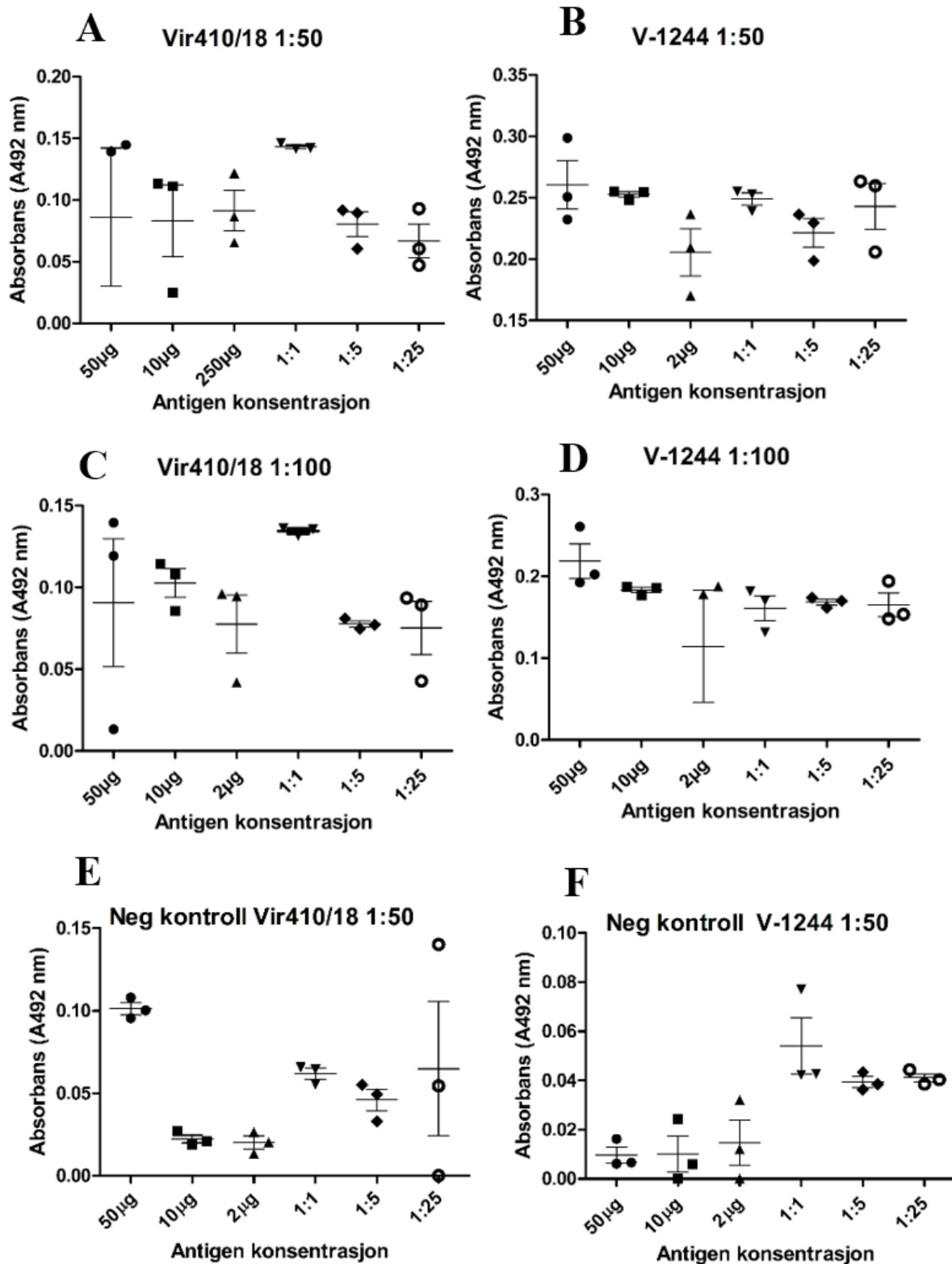
Atlantisk laks ble vaksinert med tre doser av inaktivert virus og det var ikke forskjell i vekst mellom fiskene vaksinert med V-1244 og Vir410/18 (Tabell 19). Det var ingen dødelighet i løpet av vaksineringsperioden, og få bemerkninger. For enkelte fisk var det observert noe skjelltap og finneslitasje. Det ble tappet ca. 6 ml blod fra hver fisk.

*Tabell 19: Oversikt over vekt og lengde ved de 3 vaksineringsrundene for hvert isolat*

Prosedyre	Isolat	Gjennomsnitt vekt (g)	Standard avvik	Gjennomsnitt lengde (cm)	Standard avvik
<b>1.</b> <b>Vaksinering</b>	V-1244	183,1	25,27	24,28	0,087
	Vir410/18	187,8	14,80	23,63	0,80
<b>2.</b> <b>Vaksinering</b>	V-1244	237,6	35,98	26,27	1,04
	Vir410/18	228,5	16,62	26,13	0,56
<b>3.</b> <b>Vaksinering</b>	V-1244	323,0	54,81	28,33	1,31
	Vir410/18	319,90	39,82	27,70	1,05

### 3.5 Optimalisering av antigenkonsentrasjon for ELISA

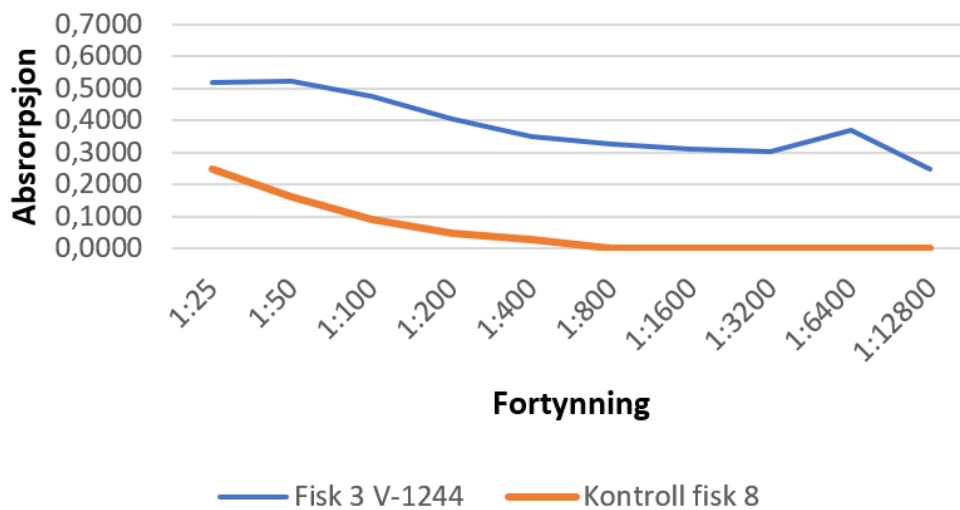
For å kvantitativt måle mengde spesifikke antistoffer etter immunisering med formalininaktivert vaksine, ble det beregnet mengde antigenkonsentrasjon for optimal deteksjon. OD ble avlest på 492 nm. I brønnene hvor det ble brukt serum fra den ikke-immuniserte kontrollfisker var det lavere absorpsjonsnivåer i forhold til brønnene med serum fra immunisert fisk (Fig. 22). I de negative kontrollbrønnene var det høyere absorpsjonsnivåer ved bruk av virussuspensjon som antigen i forhold til frysetørkede virus (Fig. 22E-F). Absorpsjonsnivåene var relativt like ved bruk av virussuspensjon og frysetørket virus som antigen i de andre gruppene (Fig. 22A-D). Det ble målt høyere absorpsjonsnivåer ved bruk av serum fra V-1244-immunisert fisk, både ved fortykning 1:50 og 1:100, i forhold til serum fra Vir410/18-immunisert fisk. Den optimale antigenfortynningen som ble brukt for å detektere spesifikke antistoff ble målt til 10 µg/ml.



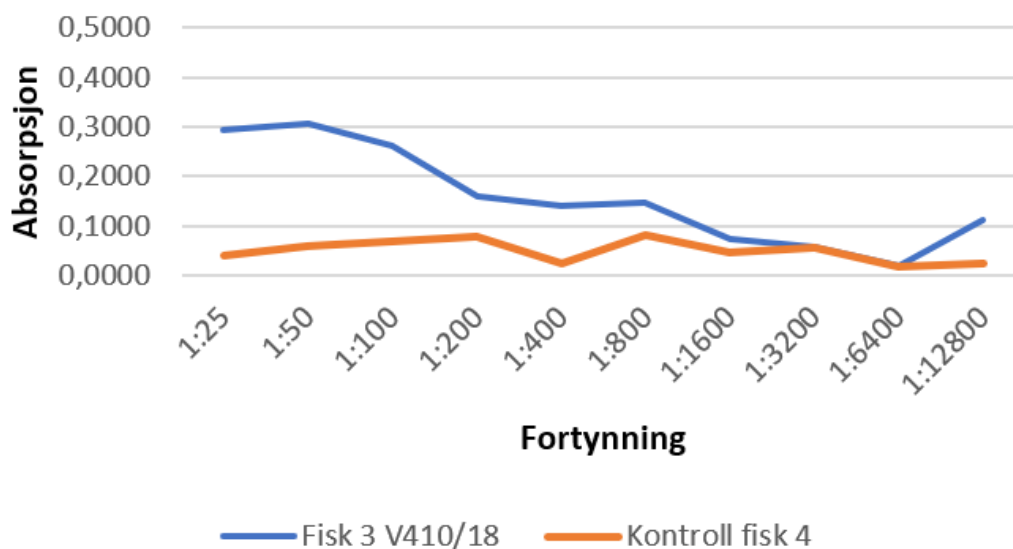
Figur 22: Viser absorbans av ELISA ved ulike konsentrasjon av antigen, både med frysetørket virus som antigen (målt i µg), og med filtrert virussuspensjon (1:1, 1:5, 1:25).

### 3.6 Deteksjon av spesifikke antistoffer med ELISA

Tilstedeværelse av antigen-spesifikke antistoffer to uker etter tredje immunisering ble analysert med ELISA. Resultatene er beskrevet i en kurve med dose-respons forhold, hvor absorpsjonen er satt opp mot fortynningsrekken (dose) (Fig. 23 og 24). Nivåene av antigen-antistoff reaktivitet var forskjellig mellom gruppene, og det var også store individuelle forskjeller innad i gruppene, noen fisk hadde høy respons, mens andre hadde lav respons. Ut i fra kurvene ble det fastsatt at 1:50 fortynningen var den mest optimale.

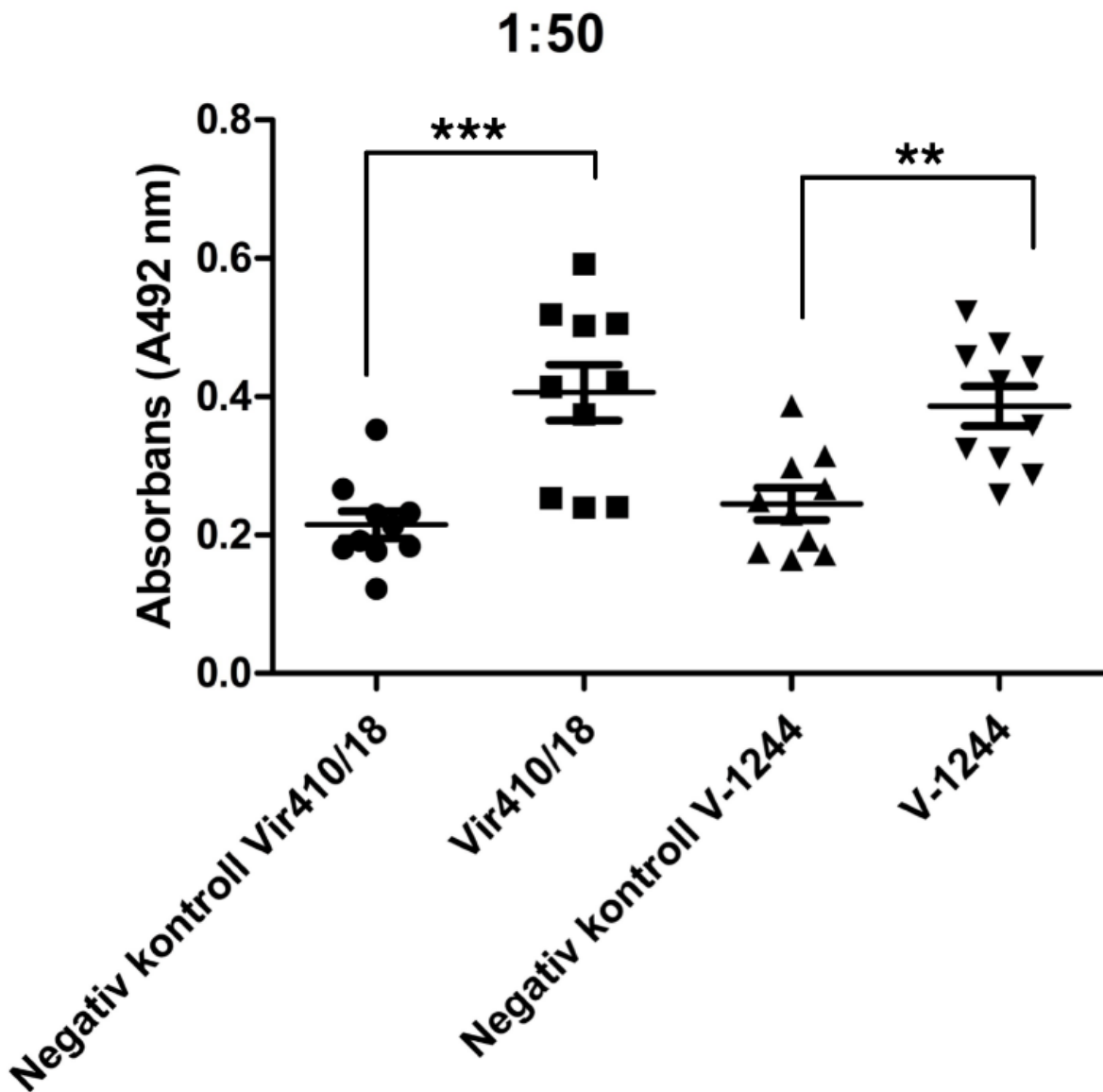


**Figur 23:** Viser gjennomsnittlig antistoff-fortynningskurve for en V-1244-immunisert fisk, mot en kontrollfisk.



**Figur 24:** Viser gjennomsnittlig antistoff-fortynningskurve for en Vir410/18-immunisert fisk, mot en kontrollfisk.

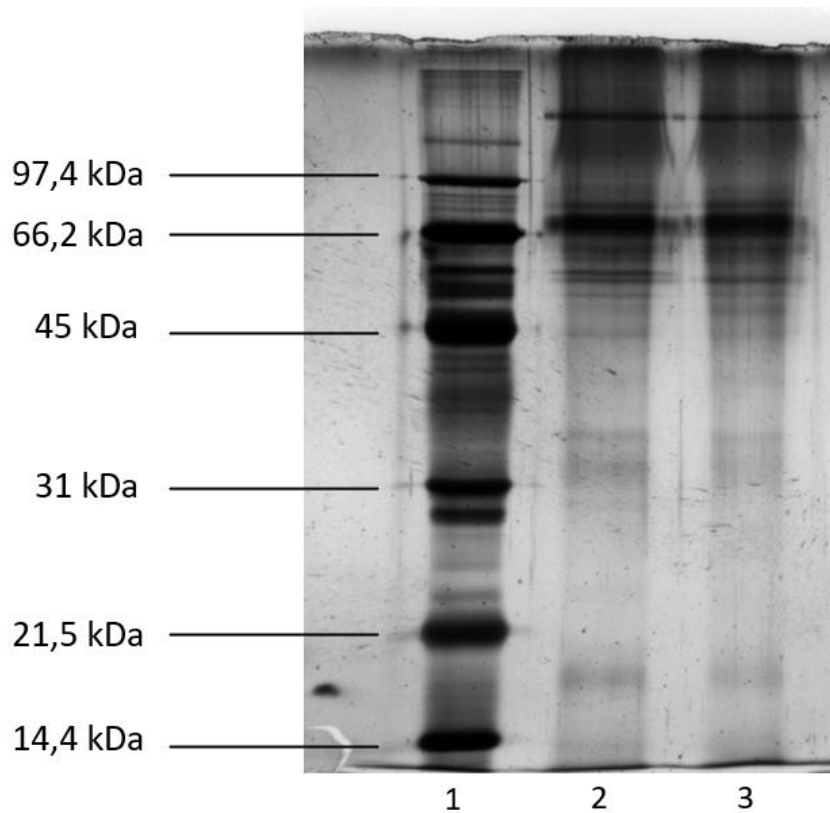
Det ble vist at det var en signifikant forskjell mellom serum fra immunisert fisk og serumet fra kontrollfiskene (Fig. 25). Nivåene av antistoff, målt med ELISA var signifikant høyere i immunisert fisk sammenlignet med kontrollene. For statistiske analyser av ELISA data, ble en two-tailed unpaired t-test utført i Graf-Pad Prism 5. Resultatene ble regnet som signifikat ved  $P < 0,05$ . I prism 5, \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,005$ .



*Figur 25: viser sammenligning av spesifikke antistoffnivåer mellom gruppene i 1:50 fortyningen av ELISA. \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$*

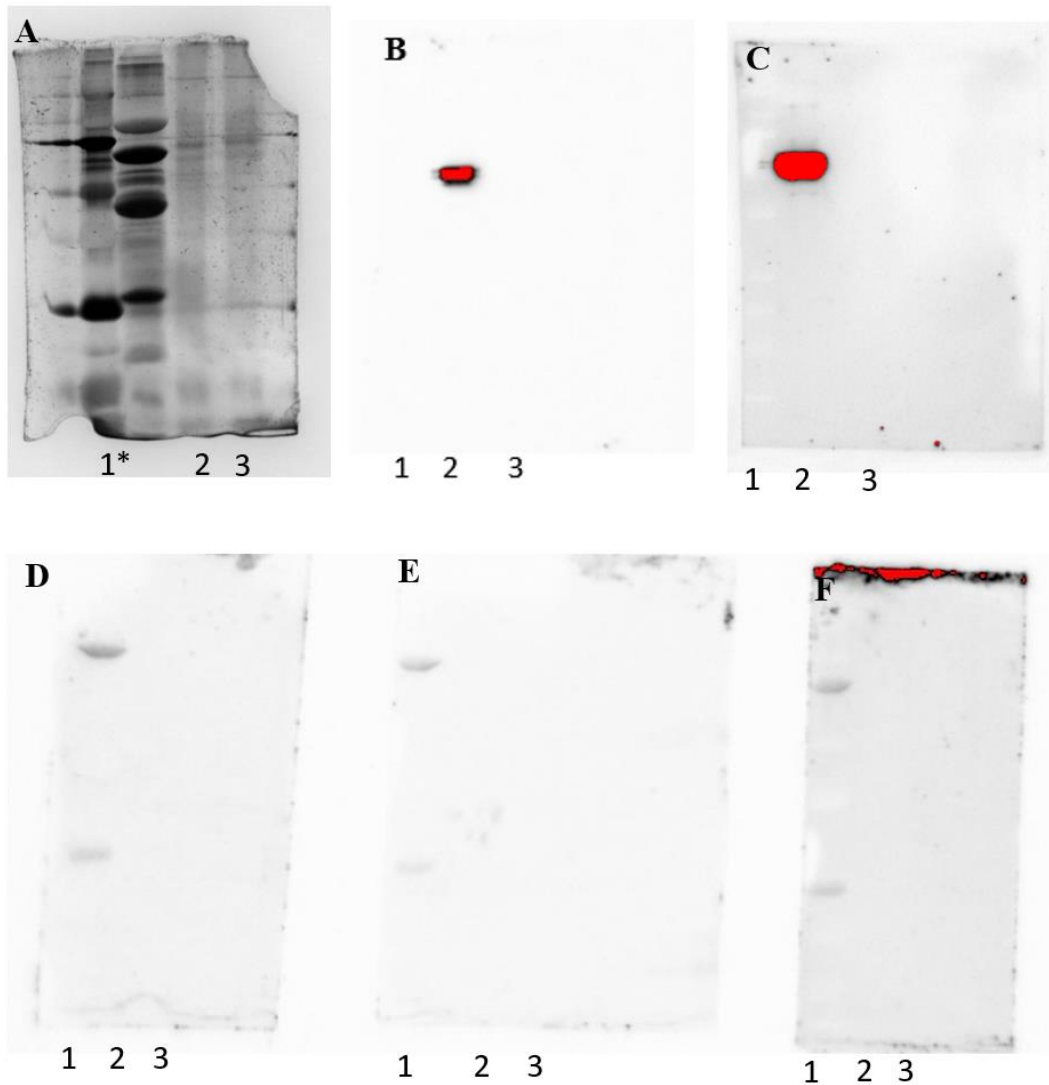
### 3.7 Sølvfaring og Western blot

Proteinprofilen til V-1244 og Vir410/18 ble visualisert med sølvfaring for å sammenlignes (Fig. 26). IPNV har fem proteiner, VP1 (90 kDa), VP2 (54 kDa), VP3 (31 kDa), VP4 (29 kDa) og VP5 (17 kDa), hvorav pVP2 (62 kDa), VP3 og VP4 utgjør polyproteinet på 106 kDa.



**Figur 26:** Sølvfarget SDS-PAGE viser proteinprofil til V-1244 og Vir410/18. Brønn 1 er molekylvektstandarden «SDS-PAGE low range standard». Brønn 2: V-1244, brønn 3: Vir410/18.

For å undersøke hvilke virusproteiner serumet fra immunisert fisk reagerte med, ble det utført Western blot. Det ble ikke observert synlige bånd etter inkubering med serumprøvene fra immunisert fisk (Fig. 27D-F). Det monoklonale VP2-antistoffet gav synlige bånd på V-1244, men ikke på Vir410/18 (Fig. 27B). Laks IgM-antigen ble lagt til som kontroll, og det ble vist at det sekundære antistoffet, kanin anti-laks, fungerte (Fig. 27C).

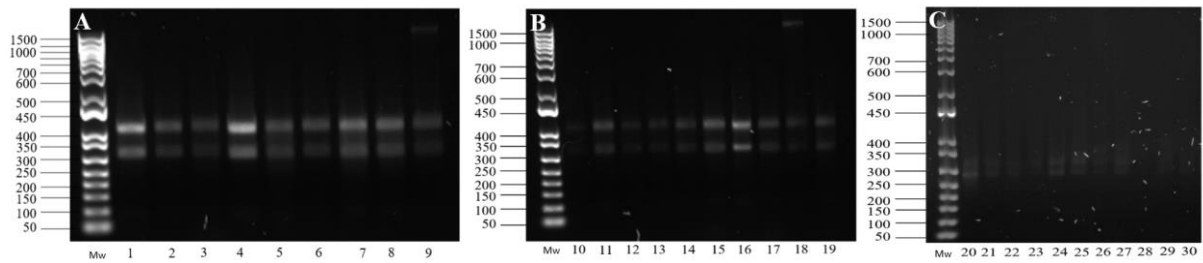


**Figur 27:** Resultat av immunblot og sølvfarging av SDS-PAGE. Brønn 1 er molekylvektstandarden «Precision protein kaleidoscope». Brønn 2: V-1244 antigen, brønn 3: Vir410/18 antigen. A) Sølvfarging etter SDS-PAGE, viser sammenligning av proteinprofil til V-1244 og Vir410/18. Brønn 1\* er «Unstained low range SDS-PAGE» standard. B) Immunoblot med VP2 antistoff fra mus. C) Immunblot med laks IgM som antigen. D) Immunblot med serum fra kontroll fisk. E) Immunoblot med serum fra V-1244-immunisert fisk. F) Immunblot med serum fra Vir410/18-immunisert fisk.



### 3.8 Analyse av isolert RNA

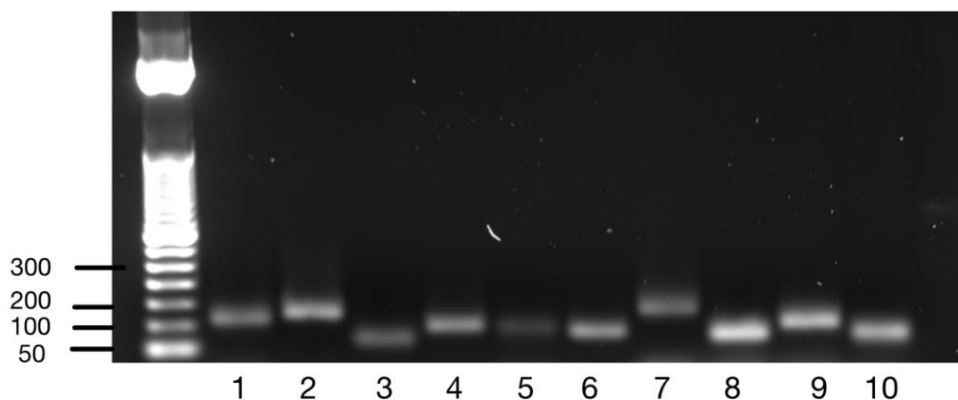
For å kontrollere at det DNase behandlede RNAet var av god kvalitet ble RNA fra alle prøvene analysert på en 2 % agarosegel. God kvalitet på RNA vises som to bånd i agarosegelen (Fig. 28).



**Figur 28:** Agarosegel av DNase behandlet RNA fra V-1244 og Vir410/18 smittede leukocytter. I første brønn vises molekylvektstandard (Mw) 1kb+. A) Prøver fra 4 timer etter smitte i brønn, B) Prøve fra 4 timer (brønn 10, 14 og 17) og 24 timer etter smitte. C) Prøver fra 24 timer etter smitte.

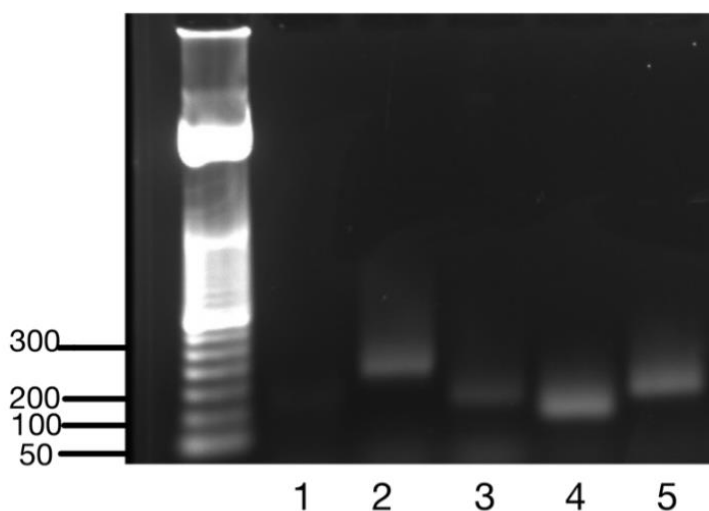
### 3.9 Nukleinsyre gel elektroforese for validering av SYBR-green assays

For å kontrollere at qRT-PCR produktene til referansegene RPS20 og målgenene/cytokinene var av god kvalitet og riktig størrelse ble produktet analysert på 2 % agarosegel etter qRT-PCR av samtlige SYBR-green assay. qRT-PCR produktene hadde forventet størrelse (Fig. 29 og 30)



**Figur 29:** Agarosegel av PCR produkt fra IPNV-smittede leukocytter. Første brønn er molekylvektstandard kb+. 1) IPNV (114bp), 2) RPS (122bp), 3) EF-1 $\alpha$  (59bp), 4)  $\beta$ -actin (91bp), 5) IL-6 (80bp), 6) IL-1 $\beta$  (84bp), 7) TNF- $\alpha$ 1 (134bp), 8) TNF- $\alpha$ 2 (77bp), 9) IFN $\alpha$  (104bp), 10) IFN $\beta$  (75bp)

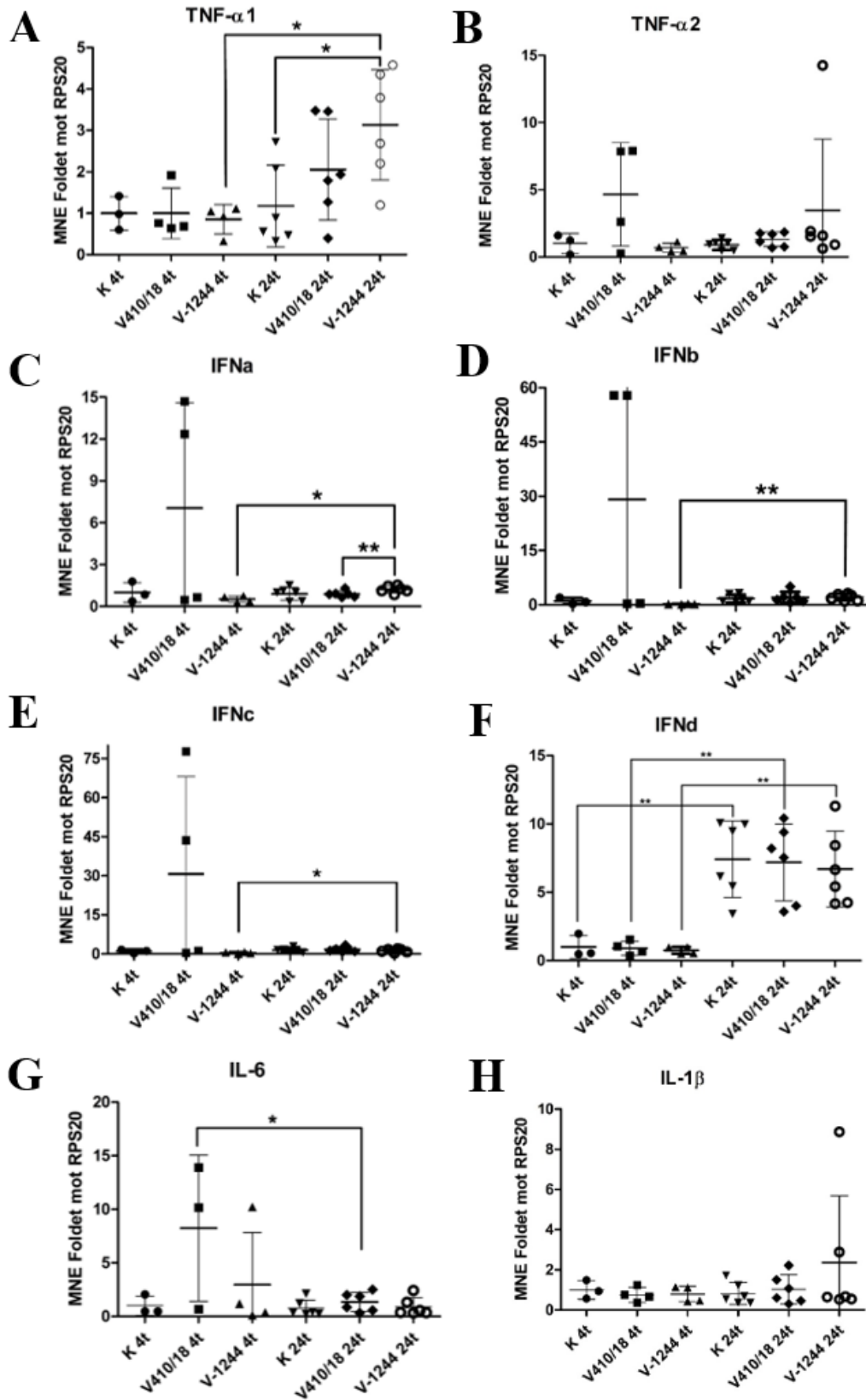




**Figur 30:** Agarosegel av PCR produkt fra IPNV-smittede leukocytter. Første brønn er molekylvektstandard kb+. 1) IFNc (118), 2) IFNd, 3) IL-12 b1 (104bp), 4) IL-12 b2 (81bp), 5) IL-12 c (120bp)

### 3.10 Immunrespons i HKL smittet med de to IPNV variantene

For å få informasjon om produserte cytokiner og interferoner fra de ulike tidsuttakene og fra de ulike virusgruppene ble det utført qRT-PCR for relativ kvantifisering av cytokiner og interferoner (Fig. 31). Alle målingene ble normalisert mot RPS20. Kontroll ble satt til 1. Som forventet var kontrollgruppene for 4 timer og 24 timer relativt like. For flere av gruppene fra 4 timer og 24 timer ble det en signifikant forskjell. Av interferonene ble IFNa, IFNb og IFNc høyest oppregulert ved smitte med Vir410/18 etter 4 timer (Fig. 31C-E). V-1244 viste lave nivåene av IFNa, IFNb og IFNc både ved 4 og 24 timer etter smitte (Fig. 31C-E). IFNd viste en oppregulering etter 24 timer for alle gruppene (V-1244, Vir410/18 og kontroll) (Fig. 31F). Av interleukinene ble det høyest nivåer av IL6 hos Vir410/18 etter 4 timer, som ble nedregulert etter 24 timer (Fig. 31G). IL-1 $\beta$  ble noe oppregulert etter 24 timer i forhold til 4 timer for Vir410/18, mens V-1244 ble i noe høyere grad oppregulert (Fig. 31H). For statistiske analyser av qPCR data, ble en two-tailed unpaired t-test utført i Graf-Pad Prism 5. Resultatene ble regnet som signifikat ved  $P < 0,05$ . I prism 5, \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$  (Tabell 20).



**Figur 31:** Immun-relatert genuttrykk i leukocyter smittet in vitro med to varianter av IPNV. Uttrykking av genene ble evaluert med qPCR etter 4 og 24 timer etter smitte. «Mean normalized expression» er vist, og de uttrykte genene ble normalisert mot RPS20. Statistisk signifikans: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

**Tabell 20:** «Two-tailed unpaired t-test» utført i Graf-Pad Prism 5 for immunrespons etter in vitro virusmitte i leukocyttter. Resultatene ble regnet som signifikant ved  $P < 0,05$ . Statistisk signifikans: \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ .

<b>Gen</b>	<b>Betingelse 1</b>	<b>Betingelse 2</b>	<b>P-verdi</b>	<b>Signifikans</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math>1</b>	V-1244 4t	V-1244 24t	0,0110	*
<b>TNF-<math>\alpha</math>1</b>	Kontroll 24t	V-1244 24t	0,0159	*
<b>IFNa</b>	V-1244 4t	V-1244 24t	0,0020	**
<b>IFNa</b>	Vir410/18 24t	V-1244 24t	0,0390	*
<b>IFNb</b>	V-1244 4t	V-1244 24t	0,0028	**
<b>IFNc</b>	V-1244 4t	V-1244 24t	0,0431	*
<b>IFNd</b>	Kontroll 4t	Kontroll 24t	0,0070	**
<b>IFNd</b>	Vir410/18 4t	Vir410/18 24t	0,0025	**
<b>IFNd</b>	V-1244 4t	V-1244 24t	0,0030	**
<b>IL-6</b>	Vir410/18 4t	Vir410/18 24t	0,0346	*

## 4.0 Diskusjon

IPNV har historisk vært et stort problem i oppdrettsnæringen i Norge. Fisk som overlever sykdom kan utvikle en persistent infeksjon, og bli livslange smittebærere (Dopazo, 2020). Det kan virke som de spesifikke antistoffene ikke er tilstrekkelig for å fullstendig fjerne virus fra fisken. Dette kan ha bakgrunn i virusets evne til å gjemme seg og replikere i lave nivåer inni fiskens leukocytter og dermed unnslippe fiskens immunresponser (Dopazo, 2020). Funnet av en spesifikk genmarkør gjorde det mulig å avle frem IPN-resistent laks og har vært viktig i bekjempelse av sykdommen (Ørpetveit & Bornø, 2022). Nylig er det vist at en ny variant av viruset kan gi sykdom hos IPN-resistent fisk, IPN QTL-laks (Hillestad et al., 2021; Ørpetveit, 2020). IPN oppleves som et økende problem i 2021, og er rangert blant de viktigste tiltakende problemene i settefiskfasen i følge Fiskehelse rapporten 2022 (Ørpetveit & Bornø, 2022). Sykdommen er et økende problem i form av dødelighet, redusert tilvekst og noe redusert velferd (Ørpetveit & Bornø, 2022). Dette kan føre til store økonomiske og velferdsmessige konsekvenser. Dette studiet viser at de to IPNV-variantene er forskjellige både på nukleotid- og aminosyrenivå, og *in vitro* stimuleringsforsøket viste at de to IPNV variantene fremkalte ulike immunresponser i HKL. Dette kan være med på å forklare hvorfor den endrede varianten, Vir410/18 kan gi sykdom hos IPN-resistens laks, mens den andre, V-1244 ikke gir sykdom.

### 4.1 Sekvensering av VP2 proteinet hos IPNV-variantene

*Aquabirnavirus* har stor diversitet, og IPNV eksisterer som en kvasis-art (quasispecies), det vil si at i hver enkel stamme er det et stort utvalg av varianter som kan sameksistere. Dette gjør IPNV veldig tilpassningsdyktig til nye miljø og omgivelser (Munang'andu et al., 2013). Viruset spres via blodet i viremisk fase, som gir en rask distribusjon av IPNV til de fleste organene i fisken, inkludert nyre, milt, pankreas, lever, hjerte og hjerne, samt hud, tarm og gonader (Dopazo, 2020). Det er mange faktorer som spiller inn i virusets evne til å gi infeksjon. Utvikling av sykdom påvirkes av fiskens alder, fysiologiske tilstand, og genetiske karakteristikk (Dopazo, 2020). Evnen verten har til å beskytte seg mot virusinvasjon og proliferasjon, immunresponsen, avhenger i stor grad av fiskens fysiologiske tilstand. Stress er en risikofaktor som kan føre til svekkede forsvarsbarrierer og påvirke utvikling av sykdom (Gadan et al., 2013). Å forstå den varierende mottakeligheten av sykdom på individnivå er mer relatert til genetikk, og det har blitt demonstrert at ulike linjer av fisk av samme art, med samme alder og under samme forhold kan respondere ulikt til infeksjon med samme virusstamme. Dette er knyttet til et QTL på kromosom 26 (Houston et al., 2008; Moen et al., 2009). Det er mutasjoner epitel

cadherin genen (*cdh1*) som er årsak til den genetiske variasjonen for resistens, og det gunstige allelet vil ha dominerende effekt (Moen et al., 2015). Mutasjoner i virusets genom kan medføre aminosyresubstitusjoner som gjør at genmarkøren blir mindre effektiv for IPN-resistens. Dette kan påvirke interaksjonen mellom cadherin og VP2.

De to IPNV isolatene ble sekvensert for å undersøke forskjeller på nukleotid- og aminosyrenivå. VP2 sekvensen til V-1244, men ikke Vir410/18, ble amplifisert opp som ett produkt i PCR. For å sekvensere Vir410/18, ble primere designet for å amplifisere opp to kortere fragmenter. Det er enklere å få flere små produkter i forhold til et stort langt fullstendig. Aminosyrene i posisjon 217 og 221 til VP2 proteinet har vært viktige virulens-determinanter og endringer i disse har vært med på å forklare endring i virulens (Santi et al., 2004). Virus med RNA genom har generelt høyere mutasjonsrater sammenlignet med DNA virus, fordi RNA polymeraser mangler «proofreading»-egenskapen til DNA polymeraser (Julin et al., 2013). De to isolatene fra Veterinærinstituttet, V-1244 og Vir410/18, hadde samme aminosyre på posisjon 221, treonin, men de hadde ulik aminosyre på posisjon 217, V-1244 med Thr217, og Vir410/18 med Pro217. Song et al. (2005) har definert at høyvirulente isolater har aminosyrene Thr217 og Ala221, mens moderate til lav-virulente stammer har Pro217 og Ala221. Stammer som har Thr221 er lav-virulente til avirulente uavhengig av aminosyren på posisjon 217. Da Veterinærinstituttet sekvenserte V-1244 (kalt V-1244-SpG i fylogenetisk analyse), hadde viruset alanin på posisjon 221. Da V-1244 ble sekvensert i denne studien hadde den treonin på posisjon 221, og det antas å ha skjedd en aminosyresubstitusjon. Dette er ikke helt uventet da det tidligere er vist at IPNV kan få endret aminosyre etter gjentatte passasjer i CHSE-celler. Tidligere studier har vist at IPNV isolater har tendens til å miste virulens etter passasje i cellekultur, og at det er aminosyresubstitusjonen Ala221 til Thr221 som forårsaker endringen (Song et al., 2005). De celletilpassede virusene replikerer mye raskere og produserer større plaque i CHSE-celler. Santi et al (2004) har foreslått at alanin til treonin substitusjonen ved posisjon 221 er en molekylær determinant for å etablere en vedvarende IPN infeksjon.

Av de to isolatene brukt i studien var det kun V-1244-SpG som hadde de høyvirulente motivene definert av Song et al. (2005). Både V-1244 og Vir410/18 ble vist å ha Thr221, som tilsvarer nesten avirulente stammer. Det er mulig at Vir410/18 har fått mutasjonsendring som medfører at den blir mindre virulent, men med det lettere kan unngå å aktivere fiskens immunforsvar, og dermed gi sykdom også hos IPN-resistent laks. Det at V-1244 som ble gjort i denne studien

ikke var identisk til V-1244-SpG, til tross for at den kun var passert en gang i cellekultur før den ble sekvensert igjen, kan indikere at V-1244-SpG er en ancestral form av V-1244 (Hillestad et al., 2021).

## **4.2 Immunisering og dannelselse av spesifikke antistoffer**

Atlantisk laks ble immunisert med de to formalininaktiverte variantene av IPNV tre ganger, og antiserum ble samlet inn to uker etter tredje immunisering. ELISA resultatene viste at immunisering av Atlantisk laks gav statistisk signifikante økte nivåer av spesifikke antistoffer sammenlignet med den ikke-immuniserte kontrollfisken. Nivåene av spesifikke antistoffer varierte mellom individer og mellom gruppene. Det er flere faktorer som kan påvirke antistoffresponsen i fisk, som antigenkonsentrasjon, hvilken type antigen, adjuvanser, immuniseringsadministrasjon, størrelse og alder på fisken, genetiske forskjeller, booster-doser og vanntemperatur (Morrison & Nowak, 2002). I en lignende studie gjort av Taksdal et al. (1998) ble postsmolt (ca. 50-60 g) smittet med homogenisert yngel med IPN. De utførte også ELISA for å studiere dannelsen av plasma antistoffer mot IPNV. Det ble det kun funnet antistoffer i en fåtall av plasmaprøvene fra IPNV smittet fisk. Det ble ikke funnet antistoffer i kohabitanter i deres studie. En forklaring til de lave antistoffnivåene kan være at nivåene var under deteksjonsgrensen til assay eller at immunresponsen etter naturlig primær infeksjon var svak eller hovedsakelig cellulær (Taksdal et al., 1998). Bootland et al. (1991) viste at immersjon av bekkeroeye-yngel i IPNV bare fremkalte en svak humoral adaptiv immunrespons i overlevende fisk, sammenlignet med det som var funnet etter injeksjon av IPNV i yngel da de testet for nøytraliserende antistoffer.

Bruk av adjuvans med antigen er vist å gi signifikant overlegen antistoffrespons i fisk. Oljeadjuvanser er de mest effektive ved i.p. injeksjon. I.p. injeksjon av antigen vil fremkalle en antistoffrespons med større omfang og varighet i forhold til immersjonsvaksinering eller oral vaksinering. I noen tilfeller kan intraperitoneal injeksjon være den eneste måte å fremkalle beskyttelse (Morrison & Nowak, 2002). Flere immuniseringer (booster-doser) kan bidra positivt til produksjonen av spesifikke antistoffer, med andre og tredje immunisering produseres spesifikke antistoffer med bedre kvalitet og kvantitet. Med virus er det viktig med antigenpresentasjon på MHC klasse I, noe som ikke fås ved vaksinering med inaktivert virus. Noe av svakheten med en slik vaksine er dermed at man ikke får aktivert cytosolisk pathway. For å bekjempe virusinfeksjoner er det ofte nødvendig med dannelselse av cytotoxiske T-celler.

### **4.3 Deteksjon av IPNV immunogen ved bruk av Western blot**

Western blot analysene viste at serumet ikke var reaktivt mot noen av proteinene, verken i V-1244 eller Vir410/18. I følge resultatene fra ELISA, resulterte immunisering med V-1244 og Vir410/18 med antistoffrespons. For å teste at det ikke var noe feil med det sekundære antistoffet brukt, kanin anti-laks IgM, ble det brukt et laks IgM som antigen. Det ble observert bånd for IgM ved bruk av kanin anti-laks, som tilsier at det sekundære antistoffet fungerte slik det skulle. For å sikre at det faktisk var virus i de frysetørkede virusprøvene, ble det benyttet et monoklonalt VP2-antistoff. Det ble observert bånd med tilsvarende størrelse som VP2 i V-1244 prøven, men ikke på Vir410/18. Det er mulig at endringene hos Vir410/18 er så betydelig at det monoklonale antistoffet ikke lenger gjenkjenner og binder til Vir410/18, og det kan være med å forklare hvorfor Vir410/18 gir sykdom hos IPN QTL-laks, mens V-1244 ikke gjør det. Det er mulig andelen av spesifikke antistoffer er så lav at det ikke gav noe resultat på blotten. Spesifikke antistoffer utgjør bare en mindre andel av total IgM (Rønneseth et al., 2015).

### **4.4 Virus IFN-antagonisme og regulering av innat immunrespons**

Immunsystemets evne til å bekjempe infeksjon påvirker virusets virulens. Den innate immunresponsen ble målt i hodenyreleukocytter. Atlantisk laks har mange type I interferoner (Robertsen, 2020) og det er vist i tidligere studier at flere av disse er involvert i antiviral immunitet både i cellelinjer, leukocytter og ved *in vivo* smitte. Av de foldede verdiene ser man at det er stor variasjon i oppregulering og nedregulering av genuttrykk for de ulike genene. For Vir410/18 var det stor oppregulering særlig de 4 første timene etter smitte, men som ser ut til å falle etter rundt 24 timer. Dette gjaldt for IL-6, TNF- $\alpha$ 2, IFNa, IFNb og IFNc. Det man så var at genuttrykket økte signifikant etter 24 timer for IFNd. Tidligere er det vist at IFNa har betydelig antiviral aktivitet, mens den antivirale aktiviteten til IFNd ikke har blitt vist i salmonider (Svingerud et al., 2012). TNF- $\alpha$ 1 og IL-1 $\beta$  fikk også oppregulert genuttrykk etter 24 timer.

For V-1244 tok det lengre tid for å få et økt genuttrykk, som så ut til å vokse etter 24 timer til sammenligning med Vir410/18. Det ble en signifikant økning fra 4 til 24 timer for TNF- $\alpha$ 1, TNF- $\alpha$ 2 og IFNd. For IL6 var det høyest genuttrykk etter 4 timer, som falt etter 24 timer. For IFNa, IFNb og IFNc ble det bare litt oppregulert fra 4 til 24 timer.

Verdiene for kontrollene holdt seg stabil etter både 4 og 24 timer som forventet, utenom hos IFNd. Hos IFNd var det lave verdier etter 4 timer, men som fikk en signifikant økning etter 24 timer.

Det er kjent at IFN er essensiell for induksjon av antiviral aktivitet i celler. De proinflammatoriske cytokinene ved viral infeksjon er imidlertid også viktig. I en studie gjort av Nerbøvik et al. (2017) hvor de smittet TO-celler *in vitro* med IPNV, var flere cytokiner som ble oppregulert, blant annet TNF- $\alpha$ 2, IL-1 $\beta$  og IL-6. TNF- $\alpha$ 1 var veldig oppregulert, enda mer induert enn IFNa. Det samme gjald i dette forsøket hvor TNF- $\alpha$ 1 ble signifikant oppregulert for V-1244. TNF- $\alpha$  blir uttrykt tidlig i infeksjonsfasen hos fisk, og har en viktig rolle i å regulere betennelse (Nerbøvik et al., 2017). IL-1 $\beta$  er produsert av en rekke celletyper etter aktivering av PRRer via PAMPer (Nerbøvik et al., 2017). IL-1 $\beta$  transkripter har vist å bli konstitutivt uttrykt i hodenyren i fisk uten behandling og kan være forårsaket av miljømikroorganismer som fisken støter på, men som ikke gir sykdom (Reyes-Cerpa et al., 2012). Det er vist at viral i.p. injeksjon gir oppregulerte nivåer av IL-1 $\beta$  i hodenyren (Reyes-Cerpa et al., 2012). I hodenyren er det mange makrofager som kan produsere store mengder IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  er et essensielt proinflammatorisk cytokin som induserer endotelial aktivering for rekruttering av immunokompetente celler fra sirkulasjonen i infisert eller skadet vev (Reyes-Cerpa et al., 2012). Verken TNF- $\alpha$ 2 eller IL-1 $\beta$  ble signifikant oppregulert for noen av virusvariantene i denne studien, men IL-6 ble signifikant oppregulert for Vir410/18. IL-6 er kjent for å stimulere immunresponsen (Nerbøvik et al., 2017) og er viktig for immunoglobulinproduksjon, monocytt- og lymfocytt differensiering og leukocyttemigrasjon (Hirano, 1998). I IPN-mottakelige laksefamilier er det vist at genuttrykket til flere cytokiner og interferoner blir raskt oppregulert og deretter blir nedregulert, mens i IPN-resistente fenotyper blir uttrykking av gener litt oppregulert og bli bevart (Reyes-López et al., 2015).

Tidligere studier har vist at lakse IFNa og IFNc har lignende antiviral aktivitet mot IPNV, hvor det har blitt induert antivirale gener som ISG15 og MX i CHSE-214 celler (Svingerud et al., 2012). IFNb har også antiviral aktivitet, men den maksimale beskyttelsen oppnådd var lavere enn ved IFNa og IFNc (Svingerud et al., 2012). Binding til andre reseptorer eller forskjeller i interaksjoner med samme reseptor kan forklare hvorfor IFNb har mindre antiviral aktivitet *in vitro* sammenlignet med IFNa og IFNc. I motsetning til de andre IFNene har ikke IFNd vist noen antiviral respons i CHSE-celler, som tilsier at lakse IFNd enten mangler antiviral aktivitet eller at bare visse celler har IFNd-reseptorer (Svingerud et al., 2012). Dette samsvarer med



resultatet i denne studien i leukocytter, da både kontrollgruppen og IPN-variantene fikk oppregulert IFN $\delta$ . Siden kontrollgruppen også fikk signifikant oppregulert IFN $\delta$  er det mulig at virusmitte ikke påvirker uttrykking av IFN $\delta$ . IFN $\alpha$  viste lavere immunrespons enn forventet. Flere studier har vist signifikant oppregulering av IFN $\alpha$  etter *in vitro* smitte med IPNV i TO-celler (Nerbøvik et al., 2017; Solheim, 2015). TO-celler er en cellelinje derivert fra atlantisk laks hodenyre leukocytter (Wergeland & Jakobsen, 2001). Det var derfor forventet at IFN $\alpha$  ville bli høyere oppregulert i HKL etter *in vitro* smitte med IPNV.

Forskjellene i immunrespons mellom V-1244 og Vir410/18 kan være med på å forklare hvorfor den ene varianten gir sykdom hos QTL-laks, mens den andre varianten ikke gjør det. Det kan se ut til at viruset får nedregulert immunresponsen for flere interferoner, og dette kan være med på å hindre at verten får bekjempet infeksjonen, og viruset unngår immunsystemet. Det er interessant at det er IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  som blir kraftigst oppregulert hos Vir410/18 etter 4 timer, når det blir lite uttrykt både etter 4 timer og 24 timer hos V-1244. Særlig er det interessant å se at IFN $\beta$ , som tidligere har vist å ha mindre antiviral aktivitet *in vitro* sammenlignet med IFN $\alpha$  og IFN $\gamma$  uttrykkes såpass mye hos Vir410/18.

IFN-systemet antas å spille en viktig rolle i første forsvarslinje mot virusinfeksjoner, og *in vitro* studier har demonstrert at IPNV replikasjon i cellekulturer er effektivt hemmet av lakse IFN- $\alpha$ 1 (Robertsen et al., 2003). Som i artikkelen til Skjesol et al. (2011) ble IFN $\gamma$  nedregulert, men for Vir410/18 ble den først oppregulert veldig etter 4 timer, for så å bli nedregulert. IFN $\gamma$  er foreslått til å ha separat regulering i forhold til IFN $\alpha$  og IFN $\beta$ , og kan bli produsert av andre cellepopulasjoner enn IFN $\alpha$ 1. I deres studie ble ikke IFN $\beta$  detektert eller viste konsekvent lave uttrykningsnivåer. Det samme gjald for V-1244 i denne studien, men ikke for Vir410/18 som uttrykte høye nivåer etter 4 timer, men som var nedregulert etter 24 timer. Skjesol et al. (2011) sin data tilsier at IPNV-kodende proteiner kan være involvert i å svekke IFN signaliseringen. Høye nivåer av virale proteiner kan svekke aktiviteten til IFN-induserte gener, og dermed gi høyere replikasjonsrate, og forårsake mer potent IFN-antagoniserende effekt av Vir410/18. Det kan se ut til at leukocytene først oppregulerer interferonresponsen mot Vir410/18, men at Vir410/18 har noen mekanismer for å svekke aktiviteten av de IFN-induserte genene. Dette kan gjøre at den unngår videre aktivering av immunsystemet. Når man tolker resultater fra levende-patogen forsøk, er det viktig å tenke på kompleksiteten til slike studier, det er ikke alltid lett å si om en observert respons er en strategi fra viruset for sin egen fordel, eller en respons fra verten for å kontrollere viruset (Skjesol et al., 2011).

Lakse-IFN $\beta$  gener er sterkere induisert av TLR7 ligand S-27609 enn av poly I:C, som er et ligand for MDA5 og TLR3 hos fisk (Sun et al., 2009). Det motsatte har blitt observert for lakse-IFN $\alpha$ 1/IFN $\alpha$ 2 gener, som blir sterkere induisert av poly I:C. Lakse-IFN $\alpha$ 1/IFN $\alpha$ 2 gener ble sterkt oppregulert av poly I:C, men svakt oppregulert av S-27609. Dette tilsier at IFN $\beta$  gener hovedsakelig er induisert gjennom RIG-1/MDA5 signalveien. TLR22 har vist å være en dsRNA reseptor unik for fisk, som viser at fisk kan ha andre signalveier for virusgjenkjenning enn pattedyr. IFN $\gamma$  gener har vist uttrykksmønstre forskjellig fra både IFN $\alpha$  og IFN $\beta$ , og var sensitiv for både poly I:C og S-27609 (Sun et al., 2009). Funnene om at IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  og IFN $\gamma$  viste ulike uttrykksmønstre er i overensstemmelse med store forskjeller i promotorregioner. Både IFN $\alpha$ 1 og IFN $\alpha$ 2 promotere har et NF $\kappa$ B sete flankert av to IRF-bindingssteder, som stemmer med induksjon av poly I:C gjennom MDA5 eller TLR3. I motsetning har verken IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  eller IFN $\alpha$ 3 gener NF $\kappa$ B motiver i deres promoter regioner som indikerer at transkripsjonell aktivering av disse genene skjer gjennom andre signalveier enn RIG-1/MDA5 eller TLR3 (Sun et al., 2009). IFN $\alpha$ 1 og IFN $\gamma$  er begge uttrykt i hodenyren, og er induisert av poly I:C. IFN $\alpha$ 1 har vist å gi beskyttelse mot IPNV i salmonide celler (Skjesol et al., 2011). Makrofager fra atlantisk laks stimulert med poly I:C produserer type I IFN-lignende aktivitet, som hemmer replikasjon av IPNV, og induserer Mx-protein i salmonide cellelinjer. IFN-gener ble induisert i levende fisk ved stimuli av dsRNA poly I:C, som er en kjent induserer av type I IFN (Robertsen et al., 2003).

Ses resultatene fra sekvensering og qPCR i sammenheng, kan det se ut til at Vir410/18 medfører en rask immunrespons, som svekkes, og viruset dermed unngår videre aktivering av immunresponser. Dette kan gjøre den mer mottakelig for IPN-resistent laks. IFN-systemet spiller en viktig rolle som første forsvarslinje mot infeksjoner. Det er tidligere vist at IPNV replikasjon i cellekulturer effektivt hemmes av IFN $\alpha$ , men nukleotid- og aminosyreendringer kan medføre at viruset greier å hemme immunresponsen, som samsvarer med resultatene av nedregulert immunrespons etter 24 timer, og gi infeksjon hos Atlantisk laks som skal være resistent.

## **4.5 Konklusjon**

Det er interessant å merke seg forskjellene i antivirale responser mot de to IPNV variantene i denne studien. Endringene i VP2 på aminosyre- og nukleotidnivå kan være med på å forklare hvordan Vir410/18 kan etablere infeksjon i laks som skal være IPN-resistent ettersom disse endringene på aminosyrenivå kan være med å påvirke interaksjonen mellom cadherin og VP2. Resultatene fra ELISA tilsier at formalininaktiverte virus trigger en immunrespons i verten. Resultatene kan belyse viktige punkter i bekjempelsen av en ny IPNV-variant og unngå at den forårsaker nye sykdomsutbrudd. Det er viktig med bedre forståelse av interaksjon mellom virus og vertscelle, for å kunne forstå hvordan virus kan gi infeksjon. Det er også viktig med kunnskap om variasjoner mellom de ulike variantene for å forklare virulens. Kunnskap om gjenkjenning og respons til virusinfeksjon kan bidra til utvikling av mer effektive vaksiner enn de som finnes i dag.

## **4.6 Forslag til videre studier**

I videre studier kunne det vært spennende å brukt polyklonale antistoffer for VP2, og se om de ville bundet til Vir410/18. Videre kunne man gjentatt Western blot analysen med optimaliserte serumkonsentrasjoner for å se hvilke proteiner laksen hadde produsert antistoffer mot. For å avdekke tydeligere forskjeller i den innate immunresponsen mellom de to variantene av IPNV, kunne det vært aktuelt med et smitteforsøk som fikk gå over lengre tid, benyttet andre cellelinjer og/eller målt immunresponsen direkte fra immunisert laks. Det hadde vært interessant å se om de spesifikke antistoffene etter immuniseringen var nøytraliserende og gav lavere dødelighet, både i cellekultur og ved å smitte vaksinert fisk. I videre studier hadde det vært spennende å undersøke om de spesifikke antistoffene til de to IPNV variantene var kryssnøytraliserende og ville beskyttet mot hverandre. Det kunne også vært interessant å lage en mRNA vaksine, og undersøke om man kunne aktivert de cytotoksiske T-cellene.

## 5.0 Referansliste

- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, MDA-5, and inhibit its activation of the IFN- $\beta$  promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17264-17269
- Aoki, T., Hikima, J., Hwang, S. D., & Jung, T. S. (2013). Innate immunity of finfish: primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, *35*(6), 1689-1702
- Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*, *24*(10), 528-533
- Benkaroun, J., Muir, K. F., Allshire, R., Tamer, C., & Weidmann, M. (2021). Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from a Fish Farm in Scotland. *Viruses*, *13*(3), 385
- Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S., & Nicholson, B. L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Organ*, *45*(2), 89-102
- Bootland, L. M., Dobos, P., & Stevenson, R. M. (1991). The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, *10*(1), 13-21
- Brisse, M., & Ly, H. (2019). Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*, *10*
- Castro, R., & Tafalla, C. (2015). Overview of fish immunity. In B. H. Beck & E. Peatman (Eds.), *Mucosal Health in Aquaculture* (pp. 4-36). London, England: Academic Press.
- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J., & Zou, J. (2011). Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*, *85*(16), 8403-8412
- Chen, S. N., Zou, P. F., & Nie, P. (2017). Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) in fish: current knowledge and future perspectives. *Immunology*, *151*(1), 16-25
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Delmas, B., & Rey, F. A. (2010). Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *Journal of Virology*, *84*(4), 1792-1799

- Dalmo, R. A., & Bøgwald, J. (2022). Innate Immunity. In K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology : From Cells and Molecules to Host Protection* (pp. 31-104). Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., & Steiner, L. A. (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology*, 6(3), 295-302
- Dobos, P. (1995). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, 5, 25-54
- Dobos, P., Hallett, R., Kells, D. T., Sorensen, O., & Rowe, D. (1977). Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*, 22(1), 150-159
- Dobos, P., & Rowe, D. (1977). Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *Journal of Virology*, 24(3), 805-820
- Dopazo, C. P. (2020). The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. *Pathogens*, 9(2)
- Edholm, E. S., Bengten, E., & Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1309-1316
- Eisenächer, K., Steinberg, C., Reindl, W., & Krug, A. (2008). The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity. *Immunobiology*, 212(9), 701-714
- Fond, A. (2020). Antiviral immune responses in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) - with emphasis on type I interferons. *Institut for Biovitenskap, UIB*
- Gadan, K., Sandtrø, A., Marjara, I. S., Santi, N., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2013). Stress-Induced Reversion to Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Naïve Fry of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLOS ONE*, 8(2), e54656
- Garseth, Å., Oliveira, V. H. S. d., Grave, K., Helgesen, K. O., Jansen, M. D., Jarp, J., . . . Brun, E. (2022). Endringer i smitterisiko. In I. Sommerset, C. S. Walde, B. B. Jensen, J. Wiik-Nielsen, G. Bornø, V. H. S. d. Oliveira, A. Haukaas, & E. Brun (Eds.), *Fiskehelserapporten 2021* (pp. 18). Veterinærinstituttet.
- Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D., & Enzmann, P. J. (1997). Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *Journal of Fish Diseases*, 20(1), 1-10

- Hansen, J. D., Landis, E. D., & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(19), 6919-6924
- Harrison, O. J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., . . . Honig, B. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure*, *19*(2), 244-256
- Haugland, G. T. (2020). Det medfødte immunsystemet. *Naturen*, *144*(5), 164-169
- Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L., & Arella, M. (1995). Strain Variability and Localization of Important Epitopes on the Major Structural Protein (VP2) of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology*, *214*(1), 40-49
- Hill, B. J., & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, *5*, 55-77
- Hillestad, B., Johannessen, S., Melingen, G., & Moghadam, H. (2021). Identification of a new Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) isolate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) that causes mortality in resistant fish. *Front Genet*, *12*
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its Receptor: Ten Years Later. *International Reviews of Immunology*, *16*(3-4), 249-284
- Holopainen, R., Eriksson-Kallio, A. M., & Gadd, T. (2017). Molecular characterisation of infectious pancreatic necrosis viruses isolated from farmed fish in Finland. *Archives of Virology*, *162*(11), 3459-3471
- Hong, J. R., Hsu, Y. L., & Wu, J. L. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line. *Virus Research*, *63*(1-2), 75-83
- Hong, J. R., Lin, T. L., Hsu, Y. L., & Wu, J. L. (1998). Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology*, *250*(1), 76-84
- Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., . . . Bishop, S. C. (2008). Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics*, *178*(2), 1109-1115
- Hovden, A. O., & Haldorsen, K. (2008). The Seventh Edition of the Janeway's Immunobiology. *Scandinavian Journal of Immunology*, *68*(1), 112-112
- Håstein, T., & Krogsrud, J. (1976). Infectious Pancreatic Necrosis First Isolation of Virus from fish in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *17*(1), 109-111

- Ingerslev, H. C., Pettersen, E. F., Jakobsen, R. A., Petersen, C. B., & Wergeland, H. I. (2006). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, *43*(8), 1194-1201
- Julin, K., Johansen, L.-H., Sommer, A.-L., & Jørgensen, J. B. (2015). Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, *38*(11), 1005-1019
- Julin, K., Johansen, L. H., & Sommer, A. I. (2009). Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *Journal of Virological Methods*, *162*(1), 30-39
- Julin, K., Mennen, S., & Sommer, A.-I. (2013). Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway. *Journal of Fish Diseases*, *36*(2), 89-102
- Ke, F., & Zhang, Q. Y. (2019). Aquatic animal viruses mediated immune evasion in their host. *Fish & Shellfish Immunology*, *86*, 1096-1105
- Kristoffersen, A. B., Devold, M., Aspehaug, V., Gjelstenli, O., Breck, O., & Bang Jensen, B. (2018). Molecular tracing confirms that infection with infectious pancreatic necrosis virus follows the smolt from hatchery to grow-out farm. *Journal of Fish Diseases*, *41*(10), 1601-1607
- Kumar, S., Stecher, G., Li, J., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, *162*(4), 480-483
- Lagos, L. X., Iliiev, D. B., Helland, R., Roseblatt, M., & Jørgensen, J. B. (2012). CD40L- a costimulatory molecule involved in the maturation of antigen presenting cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, *38*(3), 416-430
- Lannan, C. N., Winton, J. R., & Fryer, J. L. (1984). Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In vitro*, *20*(9), 671-676
- Lazarte, J. M. S., Thompson, K. D., & Jung, T. S. (2019). Pattern Recognition by Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 (MDA5) in Teleost Fish: A Review. *Frontiers in Immunology*, *10*

- Lee, P. T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Kanellos, T., & Secombes, C. J. (2013). Identification and characterization of TLR7, TLR8a2, TLR8b1 and TLR8b2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, *41*(2), 295-305
- Levicán, J., Miranda-Cárdenas, C., Soto-Rifo, R., Aguayo, F., Gaggero, A., & León, O. (2017). Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Scientific Reports*, *7*(1), 3068
- Liu, F., Bols, N. C., Pham, P. H., Secombes, C. J., & Zou, J. (2019). Evolution of IFN subgroups in bony fish - 1: Group I-III IFN exist in early ray-finned fish, with group II IFN subgroups present in the Holostean spotted gar, *Lepisosteus oculatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *95*, 163-170
- Liu, F., Wang, T., Petit, J., Forlenza, M., Chen, X., Chen, L., . . . Secombes, C. J. (2020). Evolution of IFN subgroups in bony fish - 2. analysis of subgroup appearance and expansion in teleost fish with a focus on salmonids. *Fish & Shellfish Immunology*, *98*, 564-573
- Liu, Y. J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual Review of immunology*, *23*, 275-306
- M'Gonigle, R. H. (1941). Acute Catarrhal Enteritis of Salmonid Fingerlings. *Transactions of the American Fisheries Society*, *70*(1), 297-303
- Manning, D. S., & Leong, J. C. (1990). Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, *179*(1), 16-25
- McBeath, A. J., Snow, M., Secombes, C. J., Ellis, A. E., & Collet, B. (2007). Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish & Shellfish Immunology*, *22*(3), 230-241
- Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K., & Kjøglum, S. (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*, *10*(1), 368
- Moen, T., Torgersen, J., Santi, N., Davidson, W. S., Baranski, M., Ødegård, J., . . . Lien, S. (2015). Epithelial Cadherin Determines Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon. *Genetics*, *200*(4), 1313-1326
- Morrison, R. N., & Nowak, B. F. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, *11*(1), 46-54



- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Eversen, Ø. (2016). Birnaviruses of Aquatic Organisms. In F. S. B. Kibenge & M. G. Godoy (Eds.), *Aquaculture Virology* (pp. 327-250). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Munang'andu, H. M., Sandtrø, A., Mutoloki, S., Brudeseth, B. E., Santi, N., & Evensen, Ø. (2013). Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLOS ONE*, 8(1), e54263
- Munro, E. S., & Midtlyng, P. J. (2011). Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. In P. T. K. Woo & D. W. Bruno (Eds.), *Fish Diseases and Disorders, Volume 3 : Viral, Bacterial and Fungal Infections* (pp. 1-55). Wallingford, United Kingdom: CABI.
- Nerbøvik, I. G., Solheim, M. A., Eggestøl, H., Rønneseth, A., Jakobsen, R. A., Wergeland, H. I., & Haugland, G. T. (2017). Molecular cloning of MDA5, phylogenetic analysis of RIG-I-like receptors (RLRs) and differential gene expression of RLRs, interferons and proinflammatory cytokines after in vitro challenge with IPNV, ISAV and SAV in the salmonid cell line TO. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1529-1544
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & team, t. U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Retrieved from doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
- Ortega, C., & Enríquez, R. (2007). Factors associated with cellular infection by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 39, 7-18
- Ramstad, A., & Midtlyng, P. J. (2008). Strong genetic influence on IPN vaccination-and-challenge trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 31(8), 567-578
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-López, F. E., Toro-Ascuy, D., Ibañez, J., Maisey, K., Sandino, A. M., & Imarai, M. (2012). IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(2), 291-300
- Reyes-López, F. E., Romeo, J. S., Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Sandino, A. M., Tort, L., . . . Imarai, M. (2015). Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Developmental & Comparative Immunology*, 53(1), 210-221

- Roberts, R. J., & Pearson, M. D. (2005). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 28(7), 383-390
- Robertsen, B. (2020). Medfødt immunitet mot virus- interferonsystemet. *Naturen*, 144(5), 182-188
- Robertsen, B., Bergan, V., Røkenes, T., Larsen, R., & Albuquerque, A. (2003). Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 23(10), 601-612
- Romero-Brey, I., Bandín, I., Cutrín, J. M., Vakharia, V. N., & Dopazo, C. P. (2009). Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*, 32(7), 585-595
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., . . . Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase LGP2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *Journal of immunology*, 175(8), 5260-5268
- Rønneseth, A., Ghebrensae, D. B., Wergeland, H. I., & Haugland, G. T. (2015). Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 132-143
- Rønneseth, A., Haugland, G. T., & Wergeland, H. I. (2013). Flow cytometry detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) within subpopulations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes after vaccination and during the time course of experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1294-1305
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1346-1365
- Santi, N., Vakharia, V. N., & Evensen, Ø. (2004). Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 322(1), 31-40
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., . . . Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1512-1517
- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125, S41-S52
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, 122(5), 669-682

- Shivappa, R. B., Song, H., Yao, K., Aas-Eng, A., Evensen, O., & Vakharia, V. N. (2004). Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis Aquat Organ*, 61(1-2), 23-32
- Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B. N., Jørgensen, S. M., . . . Jørgensen, J. B. (2011). IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal*, 8(1), 396
- Solbakken, M. H., Tørresen, O. K., Nederbragt, A. J., Seppola, M., Gregers, T. F., Jakobsen, K. S., & Jentoft, S. (2016). Evolutionary redesign of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) Toll-like receptor repertoire by gene losses and expansions. *Scientific Reports*, 6(1), 25211
- Solheim, M. A. (2015). Viral gjenkjenning ved de RIG-I-lignende reseptorene RIG-1, MDA5 og LGP2 og immunresponser ved infeksjon av salmonid alfavirus i den salmonide cellelinjen TO. *Institutt for Biovitenskap, UIB*
- Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Wiik-Nielsen, J., Bornø, G., Oliveira, V. H. S. d., . . . Brun, E. (2022). *Fiskehelse rapporten 2021*. Veterinærinstituttet.
- Song, H., Santi, N., Evensen, O., & Vakharia, V. N. (2005). Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of Virology*, 79(16), 10289-10299
- Sun, B., Robertsen, B., Wang, Z., & Liu, B. (2009). Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 547-558
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, 14(4), 320-326
- Svingerud, T., Solstad, T., Sun, B., Nyrud, M. L. J., Kileng, Ø., Greiner-Tollersrud, L., & Robertsen, B. (2012). Atlantic Salmon Type I IFN Subtypes Show Differences in Antiviral Activity and Cell-Dependent Expression: Evidence for High IFN $\beta$ /IFN $\gamma$ -Producing Cells in Fish Lymphoid Tissues. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5912-5923
- Syaifudin, M. (2021). Gel electrophoresis: The applications and its improvement with nuclear technology. *AIP Conference Proceedings*, 2331(1)
- Takano, T., Hwang, S. D., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., & Sano, M. (2010). Evidence of Molecular Toll-like Receptor Mechanisms in Teleosts. *Fish Pathology*, 45(1), 1-16
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*, 220, 214-224

- Taksdal, T., Ramstad, A., Stangeland, K., & Dannevig, B. H. (1998). Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *Journal of Fish Diseases*, 21(3), 193-204
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354
- UiO. (2011). SDS-polyakrylamid gelelektroforese. Retrieved from <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sds.html>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151-159
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdés, J. A., Jashés, M. M., & Sandino, A. M. (2004). Genome Assembly and Particle Maturation of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Virology*, 78(24), 13829-13838
- Wergeland, H. I., & Jakobsen, R. A. (2001). A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis Aquat Organ*, 44(3), 183-190
- Wilkins, C., & Gale, M. (2010). Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Current Opinion in Immunology*, 22(1), 41-47
- Wilson, M., Bengtén, E., Miller, N. W., Clem, L. W., Pasquier, L. D., & Warr, G. W. (1997). A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4593-4597
- Yao, K., & Vakharia, V. N. (1998). Generation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Cloned cDNA. *Journal of Virology*, 72(11), 8913-8920
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., . . . Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology*, 175(5), 2851-2858
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., . . . Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, 5(7), 730-737
- Zhang, X., Wang, C., Schook, L. B., Hawken, R. J., & Rutherford, M. S. (2000). An RNA helicase, RHIV -1, induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is mapped on porcine chromosome 10q13. *Microbial Pathogenesis*, 28(5), 267-278

- Zou, J., Chang, M., Nie, P., & Secombes, C. J. (2009). Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 85
- Ørpetveit, I. (2020). Endringer i IPN-viruset gjør fisken mer utsatt for sykdom. Retrieved from <https://www.vetinst.no/nyheter/endringer-i-ipn-viruset-gjor-fisken-mer-utsatt-for-sykdom>
- Ørpetveit, I., & Bornø, G. (2022). Infeksiøs pankreasnekrose (IPN). In I. Sommerset, C. S. Walde, B. B. Jensen, J. Wiik-Nielsen, G. Bornø, H. S. d. Oliveira, A. Haukaas, & E. Brun (Eds.), *Fiskehelse rapporten 2021* (pp. 77-78): Veterinærinstituttet.

## **6.0 Vedlegg**

### **6.1 Oppskrifter dyrkingsmedium**

#### **6.1.1 Dyrkingsmedium CHSE-214**

10 % fetal bovine serum (FBS) (BioWhittaker® 14-701F)

1 % «Non-essential amino acid» (NEAA) 100x (BioWhittaker®, Lonza) (lot 6MB207)

2 % L-glutamine (BioWhittaker®, Lonza) (lot 9MB054)

0,1 % Gentamicin sulfat (BioWhittaker®, Lonza)

EMEM med EBBS og 25mM Hepes uten L-glutamine (BioWhittaker®, Lonza)  
(lot 0000766406) (lot 0000766406)

#### **6.1.2 Smittemedium CHSE-214**

2 % fetal bovine serum (FBS) (BioWhittaker®14-701F)

1 % «Non-essential amino acid» (NEAA) 100x (BioWhittaker®, Lonza) (lot 0000936776)

2 % L-glutamine (BioWhittaker®, Lonza) (lot 9MB054)

0,1 % Gentamicin sulfat (BioWhittaker®, Lonza)

EMEM med EBBS og 25 mM Hepes uten L-glutamine (BioWhittaker®, Lonza)  
(lot 0000766406) (lot 0000766406)

#### **6.1.3 L-15 + medium (100mL)**

5 ml løsning A

95 ml L-15

100 µl gentamicin

200 µl heparin stock løsning (Sigma-Aldrich)

1 ml 200mM glutamin

1,5 ml HEPES (15mM) (Sigma-Aldrich)

#### **6.1.4 Heparin stock løsning (Sigma-Aldrich):**

50k U heparin løses i 10 ml milliQ vann (dH<sub>2</sub>O)

## **6.2 Oppskrift løsning**

### **6.2.1 1 x TAE**

Milli-Q

Trisbase (Trizma base) (Sigma-Aldrich) (lot SLBV1855)

Acetat (100 % acetic acid) (sodium acetat, S2889-250 g) (Sigma-Aldrich) (lot 011M01101V)

EDTA (0,5M) ED2SS-500G (Sigma-Aldrich) (lot BCBW7247)

### **6.2.2 1 % agarosegel**

25 ml 1xTAE

0,25 g SeaKem® LE Agarose (Lonza) (lot AG918L)

GelRed nucleic acid, 10 000X in water (Biotium) (lot 19G1205)

### **6.2.3 2 % agarosegel**

25 ml 1xTAE

0,50 g SeaKem® LE Agarose (Lonza) (lot AG918L)

GelRed nucleic acid, 10 000X in water (Biotium) (lot 19G1205)

### **6.2.4 A løsning**

100 ml milliQ vann (dH<sub>2</sub>O)

2,4 g NaCl

2,8 g NaHCO<sub>3</sub>

0,66 g glukose

Steriliseres ved filtrering: BD Plastipak 50 ml syringe

Filter: non pyrogenic, steril (lot: 00072103)

## **6.3 ELISA**

### **6.3.1 PBS, pH 7,3, 1L 10x**

7,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) (lot: SZBD2660V)

2,7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) (lot SZBD1630V)

85,0 g NaCl (HoneyWell, Fluka™) (cat. 31434-5KG) (lot: L2180)

dH<sub>2</sub>O til 1000 ml

### **6.3.2 PBS-Tween**

0,05 % Tween 20 i PBS (dvs. 50 µl per 100 ml)

### **6.3.3 Blokkeringsløsning (3 % tørrmelk)**

3 g skummet melkepulver (Sigma-Aldrich) (lot: BCBV5694)

100 ml PBS-Tween

- PBS
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich) (lot: SZBD2190V)

### **6.3.4 0,1M sitronsyre**

21,0 g sitronsyre (Sigma-Aldrich) (lot: SLBV1306)

dH<sub>2</sub>O til 1000 ml

### **6.3.5 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O**

35,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

dH<sub>2</sub>O til 1000 ml

### **6.3.6 Fosfat-citrat buffer, pH 5,0**

24,3 ml 0,1M sitronsyre

25,7 ml 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

50,0 ml dH<sub>2</sub>O



### **6.3.7 Substratløsning**

15 mg (1 tablett) o-Phenyleneidamine (P-4664, Sigma-Aldrich) (lot: SLBK9741V)

27,5 ml fosfatcitrat buffer

15 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **6.3.8 Stoppløsning (2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

6,94 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

93,06 ml dH<sub>2</sub>O

### **6.3.9 Konjugat**

Polyklonalt geit anti-kanin Ig med horseaish peroxidase (HRP) (Dako) (lot: 20027913)

## **6.4 SDS-PAGE**

### **6.4.1 1,5M Tris HCl, pH 8,8**

27,23 g Tris base

80 ml destillert vann

### **6.4.2 0,5M Tris HCl, pH 6,8**

6 g Tris base

60 ml destillert vann

### **6.4.3 12% Separasjonsgel**

MilliQ

1.5M Tris, pH 8,8

10 % SDS

40 % Acrylamide (Sigma-Aldrich)

10 % APS

TEMED

#### **6.4.4 Stacking gel**

MilliQ

0,5M Tris, pH 6,8

10 % SDS

40 % Acrylamide (Sigma-Aldrich)

10 % APS

TEMED

#### **6.5 Western blot**

##### **6.4.1 10 x blottebuffer**

7,57 g Tris

36,0 g Glycin

Destillert vann opptil 250 ml

##### **6.4.2 10 x TBS 500mL**

200 mM Tris (12,11g)

5M NaCl (146,1g)

pH 7,5

Destillert vann opptil 500 ml

##### **6.4.3 1 x Blottebuffer**

100 ml 10 x blottebuffer

200 ml metabol

700 ml vann

#### **6.4.4 1 x TBS (20mM Tris, 500mM NaCl)**

100 ml 10 x TBS

900 ml Destillert vann

#### **6.4.5 TTBS**

700 ml 1 x TBS

350 µl Tween-20 (0,05 %)

#### **6.4.6 Blokkeringsløsning (3 %)**

3,0 g Skummet melkepulver (Sigma-Aldrich) (lot: BCBV5694)

100 ml TBS

#### **6.4.7 Antistoff buffer**

2,0 g Skummet melkepulver (Sigma-Aldrich) (lot: BCBV5694)

200 ml TTBS

### **6.5 Sølvfarging**

#### **6.5.1 Fixative Enhancer solution preparation**

50 % Metanol

10 % Eddiksyre

10 % Fixative enhancer konsentrat

30 % Destillert vann

#### **6.5.2 Staining Solution (Bio-Rad)**

5,0 ml Silver complex solution

5,0 ml Reduction moderator solution

5,0 ml Image Development Reagent

50 ml Development Accelerator Solution

## 6.6 P-verdier etter t-test

*Tabell 21: Two-tailed unpaired t-test utført i Graf-Pad Prism 5 for ELISA. Resultatene ble regnet som signifikant ved  $P < 0,05$ . Statistisk signifikans: \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$*

ELISA	Betingelse 1	Betingelse 2	P-verdi	Signifikans
<b>Vir410/18</b>	Vir410/18	Vir410/18 kontroll	0,0005	***
<b>V-1244</b>	V-1244	V-1244 kontroll	0,0012	**
<b>Vir410/18</b>	Vir410/18	V-1244 kontroll	0,0027	**
<b>V-1244</b>	V-1244	Vir410/18 kontroll	0,0001	***

## 6.7 Tabeller over vekt og lengde av immunisert fisk

*Tabell 22: Oversikt over vekt og lengde samt VIE-merke på fisk ved første immuniseringsdose*

#Fisk	Vekt (g)	Lengde (cm)	Vie-merke	Vaksinevariant
<b>1</b>	177	23,5	Gul	Vir410/18
<b>2</b>	180	23,0	Gul	Vir410/18
<b>3</b>	175	22,5	Gul	Vir410/18
<b>4</b>	174	22,5	Gul	Vir410/18
<b>5</b>	200	24,0	Gul	Vir410/18
<b>6</b>	187	23,5	Gul	Vir410/18
<b>7</b>	182	24,0	Gul	Vir410/18
<b>8</b>	176	24,0	Gul	Vir410/18
<b>9</b>	216	25,3	Gul	Vir410/18
<b>10</b>	211	24,0	Gul	Vir410/18
<b>11</b>	192	23,5	Blå	V-1244
<b>12</b>	242	26,0	Blå	V-1244
<b>13</b>	157	23,5	Blå	V-1244
<b>14</b>	157	24,5	Blå	V-1244
<b>15</b>	167	23,5	Blå	V-1244

<b>16</b>	178	24,3	Blå	V-1244
<b>17</b>	199	24,5	Blå	V-1244
<b>18</b>	156	23,0	Blå	V-1244
<b>19</b>	197	25,2	Blå	V-1244
<b>20</b>	186	24,5	Blå	V-1244

*Tabell 23: Oversikt over vekt og lengde samt VIE-merke på fisk ved andre immuniseringsdose*

<b>#Fisk</b>	<b>Vekt (g)</b>	<b>Lengde (cm)</b>	<b>Vie-merke</b>
<b>1</b>	232	26,0	gul
<b>2</b>	237	26,5	blå
<b>3</b>	211	25,8	blå
<b>4</b>	240	26,0	gul
<b>5</b>	266	26,0	blå
<b>6</b>	211	26,0	blå
<b>7</b>	230	26,0	gul
<b>8</b>	200	25,5	blå
<b>9</b>	260	27,0	gul
<b>10</b>	317	29,0	blå
<b>11</b>	243	26,5	gul
<b>12</b>	199	25,0	blå
<b>13</b>	210	25,8	gul
<b>14</b>	259	27,0	blå
<b>15</b>	215	25,9	blå
<b>16</b>	208	25,0	gul
<b>17</b>	261	26,0	blå
<b>18</b>	204	27,0	gul
<b>19</b>	224	26,0	gul
<b>20</b>	234	26,0	gul

*Tabell 24: Oversikt over vekt og lengde samt VIE-merke på fisk ved tredje immuniseringsdose*

<b>#Fisk</b>	<b>Vekt (g)</b>	<b>Lengde (cm)</b>	<b>Vie-merke</b>
1	247	29,0	gul
2	354	28,5	gul
3	292	28,0	blå
4	275	26,0	gul
5	302	27,0	blå
6	349	30,5	blå
7	266	27,0	blå
8	365	29,0	gul
9	380	28,5	blå
10	321	28,0	gul
11	334	27,0	gul
12	382	26,5	gul
13	253	26,0	blå
14	433	30,0	blå
15	361	28,8	blå
16	304	28,0	gul
17	354	29,0	blå
18	310	28,5	blå
19	289	26,5	gul
20	328	28,5	gul

*Tabell 25: Oversikt over vekt og lengde samt VIE-merke på fisk ved uttak av blod*

<b>#Fisk</b>	<b>Vekt (g)</b>	<b>Lengde (cm)</b>	<b>Vie-merke</b>
1	419	33,0	blå
2	335	30,0	blå
3	353	30,5	gul
4	373	31,5	gul
5	461	32,0	blå
6	378	30,5	gul
7	321	29,0	gul

<b>8</b>	391	31,5	blå
<b>9</b>	399	32,0	gul
<b>10</b>	422	32,0	blå
<b>11</b>	377	30,5	blå
<b>12</b>	508	33,0	blå
<b>13</b>	326	29,0	gul
<b>14</b>	379	30,5	gul
<b>15</b>	336	29,5	gul
<b>16</b>	413	31,5	blå
<b>17</b>	296	29,5	blå
<b>18</b>	418	31,5	gul
<b>19</b>	280	29,0	blå
<b>20</b>	343	29,5	blå