

Studier av Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) i Atlantisk laks (*Salmo salar* L.).

Effekter av Infeksiøs pankreasnekrose virus (IPNV) og vaksinasjon på utviklingen av HSMB *in vivo*, og etablering av primærkultur av hjerteceller for dyrking av Piscine reovirus (PRV) *in vitro*.

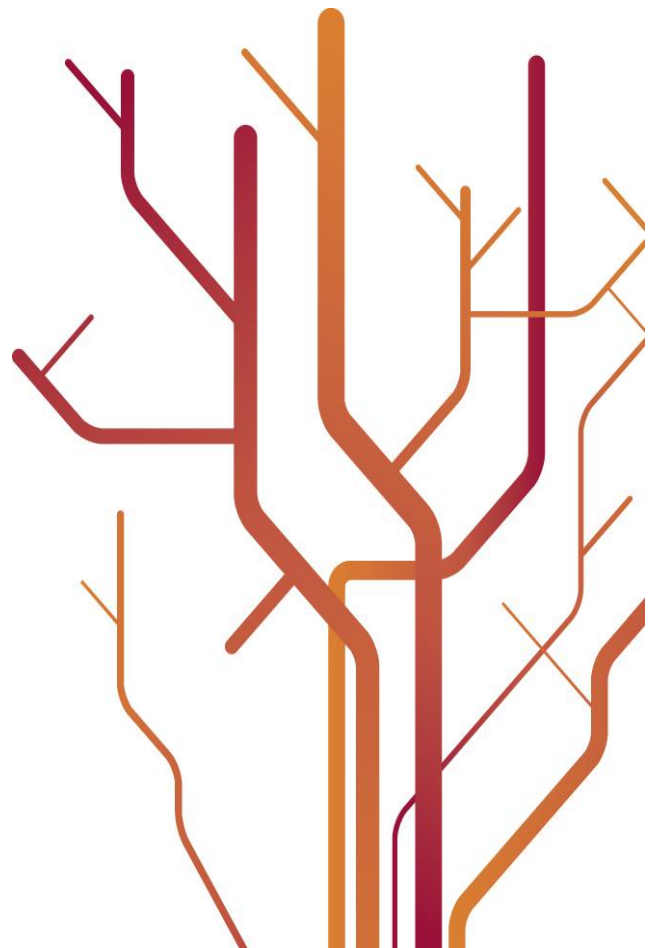


Ingrid Moan

Masteroppgave i fiskehelse

- studieretning fiskehelse

Mai 2013



Forord.

Denne masteroppgaven ble utført ved Nofima, avdeling fiskehelse, og er en del av 2 ulike forskningsprosjekt: Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett, og Verktøy for vaksineutvikling mot hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) i laks. In vivo smitteforsøk ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø AS. Oppgaven ble påbegynt i februar 2012, og avsluttet i mai 2013.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Lill-Heidi Johansen og Ingvill Jensen som har gitt meg en utrolig spennende og interessant oppgave å arbeide med. Takk Lill-Heidi, for at du bestandig har tatt deg tid til å svare på spørsmål og for alle «klapp på skuldra» når jeg har trengt det. Ditt engasjement og gode humør inspirerer! Jeg ønsker også å gi en stor takk til «damene på labben» Kari, Elin og Audny, for god opplæring på laboratoriet og ellers all hjelp og støtte i denne perioden. Takk til alle andre ansatte ved Nofima som har gitt meg innspill på oppgaven, og for et godt arbeidsmiljø.

Torunn Taksdal ved Veterinærinstituttet takkes for utført diagnostikk på HSMB studiet, og Tore Seternes takkes for hjelp ved etablering av primærcellekultur.

Videre vil jeg takke mine medstudenter og andre jeg har blitt kjent med i løpet av min tid her i Tromsø. Takk for alle gode minner og en flott studietid!

Sist, men ikke minst, vil jeg takke mine nærmeste venner og familie. Takk for hjelp til gjennomlesing av oppgaven og for at dere bestandig stiller opp og «har trua» på meg. En ekstra takk til deg Pierrick, for at du er den du er.

Tromsø, 30.mai 2013.

Ingrid Moan

Sammendrag:

Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og infeksjøs pankreasnekrose (IPN) er utbredte sykdommer i norsk lakseoppdrett. IPN er forårsaket av Infeksjøs pankreasnekrose virus (IPNV). Det er kjent at fisk som overlever utbrudd av IPN utvikler en persistent infeksjon og blir bærere av viruset. Virus konsentrasjonen i fisken vil variere over tid og kan påvirkes av ulike fysiologiske faktorer. En IPNV bærertilstand ved lave titer har tilsynelatende liten innvirkning på fisken. Sykdommen HSMB er assosiert med tilstedeværelse av viruset Piscine reovirus (PRV), men viruset har også blitt påvist i fisk som ikke har kliniske tegn på HSMB. Diagnostikk på HSMB gjøres ved påvisning av karakteristiske vevsforandringer i hjertet. Utbrudd av HSMB i oppdrettslaks er ofte observert like i etterkant av et IPN utbrudd, men hvordan en IPNV infeksjon påvirker utviklingen av HSMB er ikke kjent.

Utvikling av fiskevaksiner har bidratt til at Norge i dag er verdensledende på produksjon av Atlantisk laks. Dyrking av virus i cellekultur er et essensielt verktøy blant annet for produksjon av virus til bruk i vaksiner. Det finnes godt etablerte metoder for dyrking av IPNV *in vitro*, men frem til i dag er dette ikke kjent for PRV.

I første del av oppgaven ble det gjennomført et smittetest forsøk med Atlantisk laks, hvor det ble studert hvilken effekt IPNV og vaksinasjon har på utviklingen av HSMB *in vivo*. Det ble etablert en persistent infeksjon av IPNV etter smitte i ferskvann som varte gjennom hele forsøksperioden frem til 10 uker etter overføring av fisken til sjøvann. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i virusinnhold mellom vaksinert og uvaksinert fisk, noe som bekrefter at vaksinerer ikke forhindrer at fisken blir smittet med IPNV og blir bærere av viruset. En reaktivering av bærertilstanden ble ikke påvist etter at fisken ble overført til sjøvann. HSMB ble induisert ved smitte med PRV positivt hjertehomogenat fra HSMB syk fisk ved sjøsetting. PRV (RNA) ble påvist i fisken 3 uker etter smitte, før diagnosen HSMB ble bekreftet. Det ble påvist en større mengde PRV i vaksinert fisk i forhold til uvaksinert fisk 7 og 10 uker etter smitte, noe som kan indikere at PRV etableres lettere i vaksinert fisk. 7 uker etter smitte ble likevel HSMB diagnostisert på basis av hjertehistologisk undersøkelse i alle testede fisk og det ble ikke påvist noen patologiske forskjeller mellom vaksinert og uvaksinert fisk. En bærertilstand av IPNV så ikke ut til å påvirke hverken innhold av PRV i fisken eller utvikling av patologiske forandringer forbundet med HSMB.

I andre del av oppgaven ble det utarbeidet en protokoll for etablering og hold av primærcelekkulturer fra laksehjerter *in vitro*. Arbeidet som ble utført inkluderte også observasjon og beskrivelse av utviklingen til cellene gjennom flere uker i kultur. PRV ble forsøkt dyrket i disse hjertecellekulturene og i en etablert hjertecellelinje fra Stillehavslaks. Resultater fra forsøkene gav ingen sikre svar på om virus ble oppformert. Det ble imidlertid gjort interessante funn, spesielt ved forsøk med hjertecellekulturene, som må studeres videre før man eventuelt kan bekrefte eller avkrefte om cellene er egnet for dyrking av PRV.

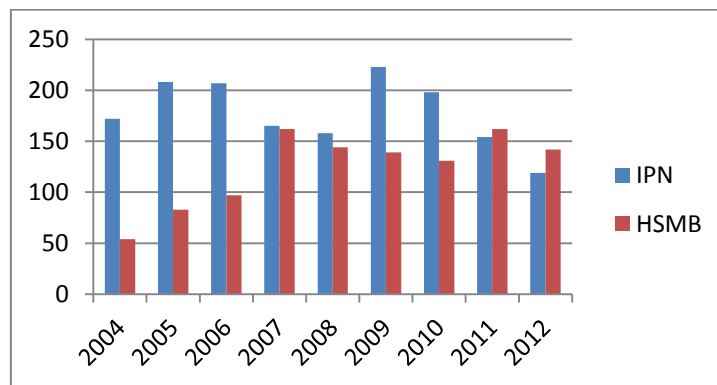
Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Infeksiøs pankreasnekrose (IPN)	2
1.1.1	Klassifisering og oppbygging av IPNV.....	2
1.1.2	Virulens	2
1.1.3	Forløp, klinikk og patologi	3
1.1.4	Bærertilstand	3
1.1.5	Tiltak mot IPN.....	5
1.1.6	Detektering av IPNV	7
1.2	Hjerte og skjellettmuskelbetennelse (HSMB)	8
1.2.1	Patogen / Agens.....	8
1.2.2	Klassifisering og oppbygging av Piscine reovirus (PRV).....	9
1.2.3	Forløp, klinikk og patologi.....	9
1.2.4	Hjertet som målorgan	10
1.2.5	Forsøk på dyrking av PRV i cellekultur.	12
1.2.6	Virusreservoar og smitteoverføring.....	13
1.2.7	Tiltak mot HSMB.....	14
1.3	Multifaktoriell sykdomsproblematikk	14
1.3.1	IPN, ILA, og V.salm	15
1.3.2	IPNV og IHNV.....	15
1.3.3	IPN og HSMB	16
1.4	Problemstilling	16
2	Materiale og metode	18
2.1	Dyrking av celler og virus	18
2.1.1	Arbeid med etablerte cellelinjer	18
2.1.2	Dyrkning av Infeksiøs Pankreasnekrose Virus (IPNV) i CHSE-celler.....	19
2.1.3	Påvisning og kvantifisering av IPN-virus.....	20
2.2	Dobbeltinfeksjon med IPNV og HSMB i Atlantisk laks	21
2.2.1	Forsøksdesign.....	21
2.2.2	Badsmitte IPNV	22
2.2.3	Vaksinering	23
2.2.4	I.p. smitte med HSMB.....	23
2.2.5	Uttak av organprøver.....	24
2.2.6	Analyse av prøvemateriale	25
2.3	Etablering av primærcelekkultur fra hjerte til Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.) og <i>In vitro</i> infeksjonsforsøk med Piscine reovirus (PRV).	25
2.3.1	Etablering av primærcelekkultur fra hjertet til Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i>).	25
2.3.2	Infeksjonsforsøk med PRV i etablert cellelinje av CHH-1 celler.....	31
2.3.3	Infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller isolert fra Atlantisk laks. ...	31
2.4	Deteksjon av virus ved bruk av Real-Time revers transkriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR)	34
2.4.1	Homogenisering og lysing.....	35
2.4.2	Isolering av RNA.....	36
2.4.3	DNase behandling.	37

2.4.4	Måling av RNA konsentrasjon	37
2.4.5	Syntese av cDNA	37
2.4.6	Real-time RT-PCR.	40
3	Resultater	43
3.1	Standardkurve og testing av PRV primere.	43
3.2	Effekt av vaksinerings og IPNV på utvikling av HSMB.	43
3.2.1	Observasjoner av fisk.	43
3.2.2	Utvikling av primær infeksjon med IPNV.	44
3.2.3	Utvikling av sekundær infeksjon med HSMB.....	46
3.3	Etablering av primærkultur av hjerteceller for dyrking av PRV <i>in vitro</i>	48
3.3.1	Etablering av primærkultur fra hjerte til Atlantisk laks.	48
3.3.2	Infeksjonsforsøk med PRV i CHH-1 celler.....	52
3.3.3	Infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller.....	52
4	Diskusjon	58
4.1	Dobbeltinfeksjon med IPN og HSMB. – Effekt av IPNV og vaksinasjon på utvikling av HSMB.....	58
4.1.1	Infeksjon med IPNV.....	58
4.1.2	Infeksjon med HSMB.....	62
4.1.3	Sammenheng mellom vaksinasjon, infeksjon med IPNV og utvikling av HSMB.	64
4.2	Hjerteceller. – Etablering av primærkultur og infeksjonsforsøk med PRV.....	66
4.2.1	Utvikling av protokoll for isolasjon og etablering av primærkultur av hjerteceller.	67
4.2.2	Infeksjonsforsøk med PRV <i>In vitro</i>	69
4.3	Konklusjon	76
5	Kilder	77
6	Appendiks	85
6.1	Reagenser:	85
6.2	Utstyr:.....	86
6.3	Løsninger:.....	87
6.4	Vaksine.....	88
6.5	Virusmateriale	88
6.6	Beregning av TCID ₅₀ og antall infeksjøs enheter (i.e.) per gram vev.	89
6.7	Beregning av deteksjonsgrense	91
6.8	Primere brukt i oppgaven	91
6.9	Standardkurve og beregning av primereffektivitet.....	91

1 Introduksjon

Norsk oppdrettsnæring er i dag verdensledende på produksjon av Atlantisk laks, og har siden innføringen av fiskevaksiner på starten av 1990-tallet hatt en enorm vekst. Den årlige produksjonen er fortsatt økende, og i 2012 ble det slaktet 1,18 millioner tonn laks [1]. Til tross for bruken av fiskevaksiner dør et høyt antall fisk under produksjonen. Veterinærinstituttet har anslått det totale tapet i sjøvannsfasen til å ligge mellom 15 - 20 % [2]. Årsakene til dette svinnet er sammensatt og omfatter flere forhold i produksjonssyklusen. Virussykdommer er en av de viktigste utfordringer for næringen. Infeksiøs pankreasnekrose (IPN) var tidligere den vanligste virussykdommen, men utviklingen de siste årene har vist en nedgang i antall utbrudd. Likevel er IPN fortsatt rapportert til å gi betydelig tap, både direkte som følge av utbrudd og senere som følge av fisk svekket av IPN. Hjerter- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) og Pankreassykdom (PD) er de to virussykdommene med flest registrerte utbrudd i 2012. Det meldes også om betydelige tap som følge av sykdommen kardiomyopatisyndrom (CMS), da denne virussykdommen hovedsakelig rammer stor, slakteklar fisk. Antall utbrudd av HSMB har i de siste årene holdt seg forholdsvis stabilt, med en liten nedgang fra 2011 – 2012. Figur 1 viser en oversikt av antall lokaliteter med påvist utbrudd av IPN og HSMB i perioden 2004 -2012 [1].



Figur 1: Antall lokaliteter med infeksiøs pankreasnekrose (IPN) og hjerter- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) i perioden 2004-2012. Figuren er utarbeidet fra data hentet fra Fiskehelse rapporten 2012. [1].

Av dyrevelferdsmessige og etiske årsaker er det nødvendig å redusere mengden tap i produksjonen. Svinneproblematikken har også stor økonomisk betydning for næringen. Økt forståelse av samspill mellom ulike virussykdommer, mellom virus og vert samt utvikling av bedre virusvaksiner er viktig for å få bukt med disse problemene og for å kunne drive et bærekraftig havbruk.

1.1 Infeksiøs pankreasnekrose (IPN)

Sykdommen infeksiøs pankreasnekrose ble trolig beskrevet for første gang i Canada i 1941, som akutt katarralsk enteritt (tarmbetennelse) hos yngel av bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) [3]. I 1955 ble det foreslått at IPN var forårsaket av et virus, noe som ble bekreftet 3 år senere da viruset Infeksiøs pankreasnekrose virus (IPNV) ble isolert i cellekultur [4]. IPNV forårsaker sykdom i en rekke arter av laksefisk [5], og er trolig det mest studerte fiskepatogene virus [4, 6].

1.1.1 Klassifisering og oppbygging av IPNV.

IPNV er kategorisert av the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) å tilhøre slekten Aquabirnavirus i familien *Birnaviridae*, som kjennetegnes ved å inneholde 2 segmenter (segment A og segment B) med dobbeltrådig RNA genom (derav navnet bi-rna virus). Viruset er nakent og har et viruskapsid med ikosahedrisk struktur [5]. Studier har vist at segment B koder for virus protein 1 (VP1) som utgjør den RNA avhengige RNA polymerasen, som er viktig for replikasjon av viruset. Segment A koder for et polyprotein bestående av VP2, VP4, og VP3. Et mindre virusprotein VP5, finnes i enkelte isolater. Analyser av virusproteinene har vist at VP2 er det proteinet som hovedsakelig utgjør de strukturelle egenskapene til viruset og er avgjørende for immunrespons i fisken [7].

Aquabirnavirus er den gruppen birnavirus med størst antigen-diversitet. Serologisk kan IPNV og andre aquabirnavirus deles inn i serogruppe A og serogruppe B. I gruppe A finnes det 9 kjente serotyper (A1-A9) av viruset og i gruppe B er det 1 serotype (B1) av viruset [8]. Basert på sekvensering av virusets genom, kan aquabirnavirus deles i 7 ulike genogrupper. Utbrudd av IPN hos atlantisk laks i Norge er assosiert med serotype A2 (genotype 3). Betegnelsen serotype Sp (Spjarup) brukes ofte om norske isolater [9].

1.1.2 Virulens

Det har blitt vist at virulens for IPNV er assosiert med segment A. [10]. Ved å sammenligne gen-sekvenser til ulike virusisolater av serotypen Sp, ble det funnet størst forskjell relatert til virulens på gener som kodet for VP2 og VP5. Felles for de virulente isolatene var at de kodet for en bestemt kombinasjon av aminosyrer i definerte posisjoner i VP2 genomet, samt at de inneholdt et 12-kDa kodende gen for VP5 [11, 12]. Høy-virulente IPNV virusisolater av serotypen Sp inneholder aminosyren threonin (Thr) i posisjon 217 og alanin (Ala) i posisjon

221 på VP2. [13] Det er ikke kartlagt hva disse egenskapene har av betydning for biologiske mekanismer, men en kan anta at disse områdene av overflateproteinet er involvert i receptor-interaksjoner og dermed kan ha betydning for mottakelighet og opptak i celler [9]. Studier har vist at VP5 ikke påvirker virulensegenskaper eller etablering av en persistent IPNV infeksjon *in vivo* [14] Nyere studier hvor det har blitt gjennomført smitteforsøk med IPNV, har vist at dødelighet direkte kan relateres til replikasjon og virulensegenskaper hos viruset. Det ble også vist at viruset kan mutere i løpet av infeksjonsperioden og forandre sekvens til en mer lav-virulent virusvariant [15]. Det har også blitt vist at stress induserer mutasjon av IPNV i fisk, hvor lav-virulente virusvarianter muterer til høy-virulente og mer replikasjonsdyktige virusvarianter. Stress spiller derfor en viktig rolle med tanke på viral replikasjon av IPNV *in vivo* [16].

1.1.3 Forløp, klinikk og patologi

Den kliniske manifestasjon av sykdommen IPN har i løpet av de siste 20 årene blitt noe endret. Opprinnelig var IPN kjent for å være en akutt sykdom som rammet yngel i tidspunktet rundt startfôring. I dag er sykdommen fortsatt vanlig i dette tidsrommet, men en ser også utbrudd senere i ferskvannsfasen hos 10-20 grams yngel. Dødeligheten er varierende, fra neglisjerbar til 100 %. Den største forskjellen i manifestasjon av sykdommen er et økende antall utbrudd hos post-smolt etter sjøsetting. Utbrudd i sjø har vanligvis 10-20 % kumulativ dødelighet, men kan i enkelte merder komme opp i 70 % [17]. I 2012 ble IPN diagnostisert på 119 lokaliteter, hvor kun 30 av utbruddene var i settefiskanlegg og resten i sjøfasen [1].

Typiske kliniske tegn på IPN er mørkfarging, fisken har ofte unormale svømmebevegelser og man kan se svimerfisk ligge på siden og hyperventilere. Fisken har ofte utspilt buk, blødninger ved brystfinnebasis, og generell finneslitasje. Indre tegn er små punktblødninger (petecchier) rundt pylorus og forstørrelse av blodårer i peritoneum. Fisken har typisk en blek, gulfarget lever og tarmen er tom med væskefylt innhold. Histopatologisk undersøkelse av syk fisk viser nekrose i lever og eksokrin del (acinarceller) av pankreas [18].

1.1.4 Bærertilstand

Det er kjent at fisk som overlever et utbrudd av IPN, eller tilsynelatende ikke blir syke, kan utvikle en vedvarende (persistent) virusinfeksjon – en bærertilstand, ofte uten sykdomstegn [17, 19-21]. En bærertilstand styres av en balansegang mellom virus og vert, den er ikke stabil

og virustiter vil variere over tid [19]. Ved en persistent infeksjon har viruset tilpasset sin replikasjon og evne til å fremkalle sykdom (patogenitet), slik at det unngår å drepe verten. For at en bærertilstand skal kunne oppstå, må viruset ha utviklet en metode for å unngå fiskens immunforsvar. En måte å gjøre dette på er ved immunsuppresjon og / eller produksjon av defect interfering particles (DIPs) [22].

Interferonsystemet spiller en viktig rolle for fiskens førstelinjeforsvar mot virussykdommer [23]. *In vitro* studier har vist at IPNV kan interferere med og inhibere type 1 interferon respons i cellekultur [24], og det har blitt foreslått at interferon spiller en viktig rolle for opprettholdelse av en persistent IPNV infeksjon [25]. Studier har vist at IPNV påvirker produksjonene av cytokiner, og dermed skaper et anti-inflammatorisk miljø i fisken. Dette kan være med på å forklare den høye andelen av persistente infeksjoner i laks [26].

DIPs er «defekte» viruspartikler som mangler deler av genomet, og avhengige av «hjelpvirus» for å kunne replikere. Produksjon av DIPs er spesielt vanlig hos RNA virus. Virusinfeksjonen i verten påvirkes ved at DIPs rekombineres med genomet til replikasjonskompetente viruspartikler [22]. Infeksjonsforsøk med homogenat fra IPNV bærerfisk i cellekultur, har gitt sterke indikasjoner på interferering pga DIPs [19]. De eksakte mekanismene som ligger bak utviklingen av en bærertilstand er ikke kjent, men studier har vist at IPNV kan overleve og replikeres i hodenyremakrofager isolert fra bærerfisk [27, 28].

Bærertilstand – effekt på fisken

Det er ikke bevist at en IPNV bærertilstand har en direkte negativ effekt på affiserte individer [17]. Studier utført av Knott og Munro indikerte riktignok at IPNV bærertilstand kan forårsake immunsuppresjon i fisken, noe som igjen kan lede til at fisken blir mer mottakelig for andre sykdommer, og at vaksinerings av IPNV bærerfisk kan ha redusert effektivitet [29]. Forsøk utført av Bruno og Munro indikerte imidlertid at dette ikke var tilfelle, da en IPNV bærerstatus ikke medførte noen forskjell i mottakelighet for agens eller effektivitet av vaksine mot *Yersinia ruckeri* [30]. Andre forsøk har vist at en IPNV bærertilstand med lave titer ikke påvirker utfallet av sekundære infeksjoner med kaldtvannsvibrose (*Vibrio salmonicida*) eller infeksjøs lakseanemi (ILA) forårsaket av infeksjøs lakseanemi virus, (ILAV) [31]. Fiskens appetitt og vekst påvirkes ikke i stor grad ved en IPNV bærertilstand ved lave titer [32], og en bærertilstand påvirker ikke effekt av vaksinerings mot *Aeromonas salmonicida* og *Vibrio salmonicida* [33]. Til forskjell fra en «sovende» IPNV infeksjon, som en bærertilstand i fisken

kan karakteriseres som, vil en aktiv infeksjon med IPNV med høye virustitre kunne påvirke fisken på en helt annen måte. Dette er beskrevet videre i kapittel 1.3.

Bærertilstand – reaktivering

Flere studier indikerer at ulike former for miljømessig stress og fysiologiske forandringer i fisken, kan påvirke bærertilstanden og føre til økt virusproduksjon og eventuelt utbrudd og dødelighet av IPN [19]. Laboratorieforsøk med stressindusert aktivering av IPN har vist å gi sykdomsutbrudd hos post-smolt med dødelighet etter 3 uker behandling [34, 35]. Det ble vist at påvirkning av miljømessig stress kan forårsake utbrudd av IPN hos fisk med en skjult infeksjon (bærertilstand) av viruset og det ble antatt at utbrudd av IPN hos post-smolt er knyttet til en IPNV bærerstatus i fisken før sjøsetting [34]. Hos fisk som gjennomgår en IPNV infeksjon i ferskvann og utvikler en bærertilstand, vil det ved sjøsetting oppstå en reaktivering av virusinfeksjonen som igjen kan medføre utbrudd av IPN. Dette er rapportert selv ved veldig lave virusmengder (<80 infeksjose enheter (i.e.) / g vev) i bærerfisken i ferskvann, og uten kjent påføring av tilleggs stressfaktorer [33]. Studier har vist at både høy- og lav-virulente virusvarianter kan etablere en persistent infeksjon i fisken. Stresspåkjenning spiller en nøkkelrolle for reversering av lav- til høy-virulente virus som igjen kan medføre økt replikasjon av viruset [16]. Reaktivering av IPNV infeksjon i fisken kan være ansvarlig for en stor andel av sykdomsutbruddene man ser i næringen [19].

Bærertilstand – påvirkning ved vaksiner

Eksperimentell testing av vaksiner utføres vanligvis på fisk som ikke er bærere av IPNV. Etersom IPN er en vanlig sykdom i næringen, vil imidlertid mye av fisken som produseres ofte ha gjennomgått en IPNV infeksjon og være bærere av viruset når vaksiner finner sted. Forskning på dette har vist at vaksiner også gir beskyttelse mot IPN-utbrudd forårsaket av en reaktivering av virusinfeksjonen etter sjøsetting. Studiet indikerte at fisk med en IPNV bærerstatus kan oppnå økt beskyttelse mot IPN etter vaksiner, hvor bærere av høy-virulent IPNV tilsynelatende har en bedre beskyttelse sammenlignet med bærere av lav-virulent IPNV [21, 36]. Johansen et al. viste at vaksiner gir beskyttelse mot reaktivering av IPNV, selv om vaksinen ikke inneholder en IPNV komponent [33].

1.1.5 Tiltak mot IPN

IPN har i mange år gitt betydelige tap både hos settefisk og post-smolt. IPN opphørte som meldepliktig sykdom i 2008. Selv om man i de siste årene har sett en nedgang i antall

utbrudd, er det lite som tyder på at fiskehelsetjenester de siste årene har endret rutiner som kan ha medført en underrapportering av sykdommen [1]. At sykdommen ikke lenger er meldepliktig betyr i praksis at en ikke lenger har en offentlig bekjempelsesplan for sykdommen. Det er opp til næringen selv og det enkelte selskap å håndtere sykdommen. Det har blitt foreslått flere bekjempelsesstrategier som eksempelvis; innføring av restriksjoner for omsetning av yngel med IPN-historikk, IPN-testing av stamfisk og restriksjoner for stryking av IPNV-bærere og stamfisk med IPN-historikk, men slike tiltak har aldri offisielt blitt iverksatt [37].

Tiltak mot IPN - Avl

Siden 2001, har seleksjon for resistens mot IPN vært inkludert i det kommersielle avlsprogrammet for Atlantisk laks [38]. Smitteforsøk i lab og naturlig utbrudd i felt viser sterk sammenheng mellom overlevelse og fisk selektert for økt resistens mot IPN [39]. Avl for økt resistens mot IPN har vist seg å være meget effektivt [40]. Av nyere dato har det blitt kjent at et område av laksens genom QTL (Quantitative trait loci), er ansvarlig for en stor del av variasjonen i resistens mot IPN [41, 42]. Siden 2009 har laks blitt selektert ved bruk av QTL genmarkør [43], og en antar at dette er en viktig faktor for nedgangen i antall IPN utbrudd som man har sett i de siste årene [1].

Tiltak mot IPN - Vaksinerings

I dag finnes det to typer kommersielt tilgjengelige vaksiner mot IPN, basert på helcelle- og rekombinant teknologi [44]. Den første vaksinen med beskyttelse mot IPN ble lansert på midten av 90-tallet og var en subenhetsvaksine basert på rekombinant produsert VP2 antigen [45, 46]. Feltstudier har vist at fisk vaksinert med vaksine som inneholder IPN-komponent har økt beskyttelse mot sykdommen, sammenlignet med fisk vaksinert med vaksine uten IPN-komponent [47]. Det samme er vist ved smitteforsøk med sykdommen i laboratorie. Bruk av fisk selektert for resistens mot IPN utviste en generelt lav dødelighet i smitteforsøket, og det ble indikert at det var nødvendig med 50 % dødelighet i kontrollfisk for å kunne påvise spesifikk beskyttelse av vaksinen [48].

Ved sammenligning av effektivitet til ulike vaksiner mot IPN, basert på forskjellige antigenleveringssystem som inaktivert hel virus, VP2-fusjonsprotein, VP2-subenhet, VP2-DNA og nanopartikkelvaksine, ble det vist at inaktivert helvirus vaksiner gir en bedre

beskyttelse mot høyvirulent IPN. En fremtidig utfordring er utvikling av en effektiv vaksine som totalt eliminerer en bærertilstand av IPNV. [49].

Tiltak mot IPN - Drift

Stress og ugunstige driftsforhold antas å kunne være utløsende faktorer for utbrudd av IPN, men det mangler fortsatt studier som beviser at man ved bevisst å gjennomføre bestemte driftstiltak, kan unngå utbrudd av sykdommen [50]. Smitteforsøk med IPN i laboratoriet har i enkelte studier vist at tetthet av fisk i karet har liten innvirkning på dødelighet som følge av IPN utbrudd [51]. Det har ikke blitt påvist korrelasjon mellom fiskens smoltifiseringsstadium og utbrudd av IPN [52].

Ved intensivt oppdrett av smolt er vann ofte en begrensende faktor, og produksjon drives vanligvis med redusert vanntilførsel og oksygenering av vannet. Ved å redusere vanntilførselen vil konsentrasjonen av ekskresjonsprodukter fra fisken, som ammoniakk, nitritt og CO₂, øke i vannet og sammen med et forhøyet O₂ nivå, vil det fungere som en kronisk stressfaktor for fisken. Dette har vist seg å kunne øke fiskens mottakelighet for IPNV [53]. I forsøk utført av Sommer et al. ble det testet om intensive driftsforhold i ferskvannsfasen, kunne føre til økt IPN-problematikk. Det ble vist at utfallet av en IPNV infeksjon i sjøvann ga signifikant høyere dødelighet for grupper av fisk som hadde blitt utsatt for intensive driftsforhold i ferskvannsfasen [54]. Det har blitt vist at fisk som har blitt utsatt for hyperoksygenering og redusert vanntilførsel i tidlige livsstadier, utvikler forstyrrelser i barrierefunksjonen i tarmen, som igjen kan gi økt mottakelighet for IPN [55].

Enkelte kommersielle aktører praktiserer screeningundersøkelser for å få en bedre innsikt i hvordan viruset spres i produksjonssystemet [56]. Resultater fra slike undersøkelser har vist at smitte med IPNV er et problem som må bekjempes i ferskvannsfasen. Det er ingen indikasjoner på at det finnes andre kilder for IPNV i sjø enn fisken selv, og det kan dermed være mulig å eliminere IPN i sjøvannsfasen ved å kun sette ut smittefrie fiskegrupper. Å bli kvitt viruset, er den eneste varige løsningen på IPNV-utfordringene i næringen [57].

1.1.6 Detektering av IPNV

En standard metode for detektering av IPNV er ved virusdyrking i cellekultur. Dette, sammen med antistoffer, kan brukes som et diagnostisk verktøy og som et kvantitativt verktøy ved metoder som for eksempel endepunktstitrering. Mengde virus i en akutt fase av IPN

sykdomsutbrudd, har blitt estimert til å ligge mellom $10^4 - 10^8$ TCID₅₀ / gram vev [7]. Bruk av molekylærbiologiske teknikker som real-time RT-PCR muliggjør kvantifikasjon og deteksjon av lave viruskonsentrasjoner [58]. En svakhet ved denne teknikken er at det kun detekterer tilstedeværelse av nukleinsyrer og dermed ikke gir informasjon om tilstedeværelse av infeksjøs virus. Ved sammenligning av teknikkene real-time RT-PCR og bruk av cellekultur for deteksjon av IPNV, ble det vist at real-time RT-PCR er lik- om ikke mer, sensitiv sammenlignet med deteksjon av viruset i cellekultur. Studiet indikerte også at det er en viss tilfeldighet i om fisk med en latent infeksjon vil teste positivt for IPNV ved bruk av disse teknikkene [59]. Et viktig moment ved vaksinetesting, er at PCR baserte teknikker ikke sikkert kan skille mellom deteksjon av infektive viruspartikler og virus nøytralisert av antistoffkomplekser [49].

1.2 Hjerte og skjellettmuskelbetennelse (HSMB)

Hjerte og skjellettmuskelbetennelse (HSMB) er en sykdom som rammer atlantisk laks (*Salmo salar* L). Sykdommen ble for første gang diagnostisert i 1999 [60], og har i de siste årene blitt svært utbredt med registrerte tilfeller på 162 lokaliteter i 2011 og 142 lokaliteter i 2012. [1]. Sykdommen har også blitt beskrevet utenfor Norge, sannsynligvis først i Skottland i 2004 [61]. HSMB har sammen med sykdommen Pankreassykdom (PD) og Infeksiøs lakseanemi (ILA), blitt karakterisert som en «emerging disease» i lakseoppdrett [62].

1.2.1 Patogen / Agens

Kongtorp et. al utførte i 2004 en studie som viste at HSMB er forårsaket av et smittsomt agens, og kan induseres gjennom intraperitoneal (i.p) smitte med hjertehomogenat fra HSMB-syk fisk og via kohabitantsmitte [60]. Sykdommen ble antatt å være forårsaket av et virus [60, 63]. I 2010 ble det bevist at HSMB kan knyttes til infeksjon med et nytt reovirus kalt Piscine reovirus (PRV), tilhørende virusfamilien *Reoviridae*. Det ble funnet en klar sammenheng mellom mengde virus i fisken og klinisk utbrudd av sykdommen [64]. Mikalsen et al. viste at et virus kalt Atlantic salmon reovirus (ASRV), med delvis identiske og identiske gensekvenser som PRV, kan passeres i cellekultur og forårsake sykdom i Atlantisk laks med tilsvarende patologiske forandringer som det man finner hos fisk med HSMB [65].

Det har blitt undersøkt om PRV også kan knyttes opp mot utbrudd av sykdommen CMS. Resultatet fra undersøkelsen ga ingen spesifikke indikasjoner på dette, da utbrudd av CMS

viste korrelasjon med et totivirus. Det er blitt foreslått at PRV har en opportunistisk natur [66] og forskning har vist at PRV er et utbredt virus [67]. PRV har blitt påvist hos flere ville fiskearter [68] og i både sjø- og ferskvannsfasen ved produksjon av laks [67, 69]. Det er klar sammenheng mellom klinisk sykdom av HSMB og mye PRV, men laks kan også inneholde PRV uten at kliniske og histopatologiske tegn på sykdommen påvises [1]. En nylig publisert studie har vist at PRV er vanlig i både vill og oppdrettet Atlantisk laks, og at fisken kan inneholde forholdsvis store viruskonsentrasjoner uten at histopatologiske vevsforandringer påvises [70].

1.2.2 Klassifisering og oppbygging av Piscine reovirus (PRV)

Pyrosekvensering av RNA fra HSMB syk fisk, viste 49 % likhet mellom en sekvens på 265 nukleotider og $\lambda 2$ «kjerne-spiss protein» til orthoreoviruset Mammalian orthoreovirus 2 (AF378009). Videre pyrosekvensering av genomet og bruk av bioinformatikk verktøy viste identifikasjon av minst 10 RNA segmenter, og at PRV representerer en egen «gren» av reovirus som genetisk ligger mellom Aquareovirus og Orthoreovirus [64]. Reovirus har en sfærisk struktur med ikosahedrisk symmetri. Kapsidet kan være organisert i flere lag av kapsidproteiner som omringer et dobbeltrådig RNA genom [71].

Det er klassifisert totalt 15 slekter av reovirus, som kan deles inn i 2 sub-familier – *Spinareoviridae* (med overflate projeksjoner) og *Sedoreoviridae* (med glatt struktur). Aquareovirus og Orthoreovirus inngår i gruppen virus med overflateprojeksjoner. Hos enkelte virusslekter av *Reoviridae* kan man ved bruk av proteaser som trypsin eller chymotrypsin endre viruspartikkelen og få infeksiøse eller intermediære subvirale partikler. For enkelte virustyper har dette vist seg å være essensielt for infektiviteten til viruset ved dyrkning i cellekultur [71].

1.2.3 Forløp, klinikk og patologi

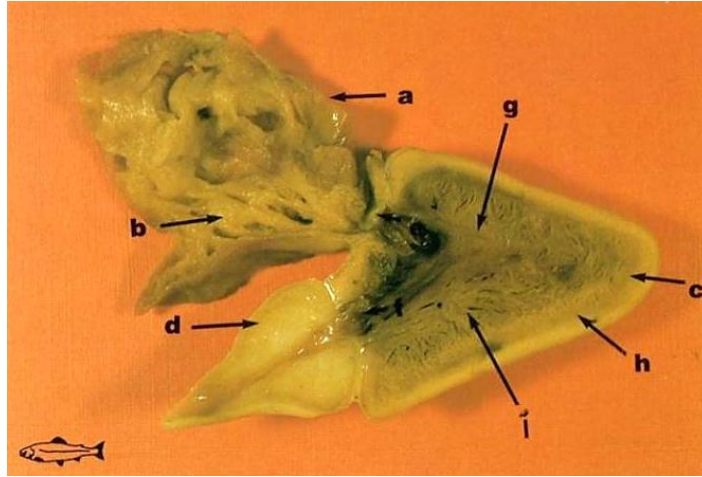
Et typisk utbrudd av HSMB forekommer 5-9 måneder etter sjøsetting, men sykdommen har også blitt påvist så tidlig som 14 dager etter sjøsetting [60, 72]. I 2012 ble det registrert 2 tilfeller av HSMB i settefiskanlegg som trolig kan knyttes til inntak av sjøvann i anlegget [1]. En undersøkelse fra 2003-2005 viste at diagnosen HSMB gjennomsnittlig ble stilt på 1 kg fisk, 7 måneder etter sjøsetting, hvor tidspunkt fra første til siste diagnostiske påvisning av HSMB for hver lokalitet og generasjon fisk varierte fra 1 til 7 måneder [73].

Kliniske tegn på HSMB er en forholdsvis høy ansamling av svimere motstrøms langs notveggen, fisken har ofte unormal svømmeaktivitet, mørkfarging og nedsatt / tap av appetitt. Utbrudd av HSMB gir varierende dødelighet fra neglisjerbar til opp til 20 %. Obduksjon av fisken viser ofte et blekt, gråfarget hjerte og ansamling av blod i perikardialhulen. Enkelte fisk kan vise tegn på sirkulasjonssvikt med svullen milt, blek og misfarget lever (med eventuelt fibrinlag), petecchier i fettvev og ansamling av ascites. Fisken kan også være uten sykdomstegn [72]

Diagnosen HSMB stilles ved bruk av histopatologisk undersøkelse, og baseres på funn av klassiske vevsforandringer [1] som indikeres av betennelsesforandringer i hjerte og i utpregede tilfeller også i rød skjelettmuskulatur [60, 72]. Histopatologiske tegn er epi-, endo- og myocarditt, hvor sterkt affisert fisk har utpreget panmyocarditt (infiltrasjon av betennesceller i alle lag i hjertet). Hjerterpatologiske forandringer er mest utpreget i ventrikkel, med infiltrasjon av mononukleære celler som makrofager, lymfocytter og plasma-lignende celler, rundt myocytter i kompakt og spongiøst lag. Dette kan ses som et diffust eller fokalt mønster, tydeligst i kompakt muskulatur. Affisert fisk viser degenerering og nekrose av hjertemuskulatur, med vakuolisering og tap av tverrstripping. Fisk med utpreget hjerterpatologi kan også vise samme type degenerering av myocytter i skjelettmuskulatur, da vanligvis mest utpreget i rød skjelettmuskulatur. Sterkt affisert fisk, med utpreget panmyocarditt, kan også vise degenerering og nekrose av hepatocytter. PD og CMS er andre sykdommer som også forårsaker lesjoner i hjertet, disse kan skilles fra HSMB ved bruk av histopatologi. [72]

1.2.4 Hjertet som målorgan

Hjertet hos fisk er plassert i hjertehulen (perikardialhulen) som er adskilt fra bukhulen ved septum transversum. Hjertet er inndelt i 4 kammer; sinus venosus, atrium, ventrikkel og bulbus arteriosus, hvor venøst blod entrer i sinus venosus. Hjerterveggen består av 3 deler: Epikard (ytre del) og endokard (indre del) som består av enlaget epitel med tynt lag underliggende bindevev. Mellom disse lagene ligger myocard som utgjør muskellaget. Muskellaget i ventrikkel er 2-delt og består av et ytre kompakt muskellag (Stratum compactum) og et indre muskellag (Stratum spongiosum) med tallrike trabekler. Kompakt muskellag får tilført arterielt blod gjennom coronarsirkulasjon [74]. Figur 2 viser et illustrasjonsfoto av hjertet til laks.



Figur 2: Illustrasjonsfoto av hjertet til laksefisk, hentet fra Amin et al. *Histology Atlas, Normal structure of Salmonids*. De ulike delene av hjertet er vist som: a) Sinus venosus, b) Trabekler i atrium, c) Ventrikkel, d) Bulbus arteriosus, e) Atrie-ventrikulære klaffer, f) Ventrikulo-bulbære klaffer, g) Ventrikkelhulen, h) Stratum compactum, i) Stratum spongiosum [75].

Ved å følge utviklingen av et naturlig utbrudd av HSMB, ble det observert en gradvis økning i histopatologiske lesjoner frem til klinisk utbrudd av sykdommen. I startfasen var de patologiske forandringene mest utpreget i kompakt myocardium, senere ble det observert forandringer både atrium og spongiøst lag av ventrikkel. 2 måneder etter start av utbrudd var det observert en generell nedgang i antall histopatologiske lesjoner, men det ble fremdeles observert degenererte myocytter og inflammasjonsrespons flere måneder etter utbrudd. De siste fasene av sykdommen viste også økt innslag av fibrøst vev i hjertet [76].

Ved eksperimentell smitte med HSMB, ble de første patologiske tegn på sykdommen observert som infiltrasjon av betennelsesceller rundt blodårer fra coronararterien i epicardium og kompakt myocardium. Det ble også observert hypertrofi (økt cellediameter) i endocardium og mild endocarditt (betennelsesforandringer). Det ble observert epikarditt hos alle fiskegrupper i forsøket, inkludert usmittet kontrollfisk, men dette ble mer utpreget på infiserte grupper senere i sykdomsforløpet [77]. Mild epikarditt er en «vanlig» anormalitet hos oppdrettsfisk [78] Observasjon av denne tidlige responsmekanismen på sykdommen, har ledet til hypotesen om at det infeksionse agenset som forårsaker HSMB blir transportert med blodet, og infiserer endotel og andre celler assosiert med blodårer fra coronararterien og endocardium, for senere å infisere myocytter og forårsake myocarditt. Ved infeksjon med HSMB har nekrose av myocytter alltid blitt assosiert med infiltrasjon av betennelsesceller. Degenerering av celler kan være forårsaket av et eventuell infeksionse agens og oppformering

av infeksjose partikler, men nekrose kan også oppstå som en sekundær effekt av en inflammasjonsrespons [77].

Bruk av immunhistokjemiske teknikker har vist at inflammasjonsresponsen i hjertet hovedsakelig utgjøres av CD3⁺ T-lymfocytter, makrofager, granulocytter og antigenpresenterende molekyler (identifisert ved farging av MHC class I og MHC class II). Det ble også vist en høy celle-turnover i hjertet [79]. Oppdaging og sekvensering av PRV i 2010 [64] gjorde det mulig å produsere antistoff mot viruset som kan brukes til immunhistokjemisk deteksjon av PRV. Ved analyse av smitteforsøk med HSMB ble det ved immunhistokjemi påvist PRV antigener i muskelceller og leukocyt-lignende celler i hjertevev. Det ble funnet PRV positive myocytter både i kompakt og spongiøst lag av ventrikkel. PRV positive leucocytter ble påvist i områder med blodkoagler lokalisert i lumen og blodårer. I studiet tok det 4-6 uker fra inokulering av smitemateriale til immunhistokjemisk deteksjon av PRV. Det er mulig at replikasjon av viruset skjer før dette, og det ble foreslått at PRV positive leukocyt-lignende celler kunne være målorgan for viruset. Det er uvisst om immunhistokjemisk deteksjon av PRV i leukocytter indikerer fagocytose, virusreplikasjon eller en passiv transport av viruset [80].

1.2.5 Forsøk på dyrking av PRV i cellekultur.

Bruk av cellekulturer er et viktig verktøy innen medisinsk forskning, da dette muliggjør produksjon av virus, utvikling av antivirale vaksiner, og studie av virus under kontrollerte betingelser [81]. Dyrking av PRV i cellekultur er derfor essensielt for å oppnå økt kunnskap om virusets sykdomsfremkallende evner, utvikle smitte modeller, vaksiner, og andre profylaktiske produkter mot sykdommen. Til nå har det vist seg vanskelig å dyrke PRV i cellekultur [60, 72, 77], men erfaring fra virusgrupper som er beslektet med PRV tilsier at dette skal være mulig [82, 83].

I forsøk på å finne det patogene /agens som forårsaker sykdommen HSMB, har det blitt utført flere forsøk på å dyrke agenset i cellekultur. Homogenat fra fisk med diagnosen HSMB, ble brukt til å inokulere kulturer av Chinook salmon embryo (CHSE-214), Blue-gill fry (BF-2), *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC), Atlantic salmon kidney (ASK-2), og Rainbow trout gill (RT-Gill) celler. [60, 72]. I 2009 utførte Kongtorp og Taksdal en studie hvor de infiserte cellekulturer av EPC og Fathead minnow *Pimephales promelas* (FHM) celler med vevshomogenat (hjerte, lever og nyre/milt) av fisk som hadde blitt intraperitonealt (i.p) smittet

med HSMB. Infiserte celler utviklet morfologiske forandringer og supernatant fra cellekulturen ble videre inokulert i fisk. Resultatet fra smitteforsøket gav histopatologiske forandringer, men i betydelig mindre grad sammenlignet med inokulering av HSMB homogenat, og det kunne derfor ikke konkluderes med at agenset har blitt oppformert i cellekultur. Ingen av de nevnte cellelinjer har vist å være mottakelig for det infeksiøse agens som forårsaker HSMB. [77]. Det har blitt publisert en studie som indikerer at ASRV, et virus som ligner PRV, kan være det agens som forårsaker HSMB. Det ble vist at hjertehomogenat fra fisk som er klinisk syk av HSMB kan passeres i GF-1 celler (en cellelinje utviklet fra grupper fisk *Epinephelus coioides* [84]) og forårsake vevsforandringer forenelig med HSMB ved intramuskulær (i.m.) injeksjon av cellelysat i frisk fisk [65].

1.2.6 Virusreservoar og smitteoverføring

Oppdrett av laks i et åpent system, muliggjør overføring av patogener fra miljø og vill-fisk til oppdrettsfisken [85]. Bestemmelse og sekvensering av genomet til PRV, har gjort det mulig å etablere kvantitative analysemetoder for viruset ved bruk av real-time RT-PCR [64]. Ved å undersøke for tilstedeværelse PRV gjennom ulike deler av produksjonssyklusen av laks, ble det vist en generell økning i viruskonsentrasjon ved sjøsetting av fisken. Studiet viste også en generell nedgang i viruskonsentrasjon ved slutten av produksjonssyklusen, noe som kan tyde på at fisken til en viss grad kan klare å bekjempe viruset [67].

PRV er et utbredt virus både i vill og kultivert Atlantisk laks [70]. Viruset har blitt detektert i fisk uten at man ser histopatologiske forandringer forenelig med HSMB [67, 70], men andre studier har vist at det er en klar sammenheng mellom HSMB patologi og PRV [65, 67, 80]. Epidemiologisk kartlegging av sykdommen har vist at sannsynligheten for at fisken utvikler HSMB, i stor grad er avhengig av smittepress. Sykdommen er mest utbredt i Midt-Norge, og smitterisiko øker med økende alder og størrelse på fisken [86]. Tilsynelatende klinisk frisk fisk kan inneholde infektive partikler i lang tid før et sykdomsutbrudd, og flytting av tilsynelatende sykdomsfri fisk kan dermed utgjøre en stor risiko for smittespredning av HSMB [77].

Wiik-Nielsen et al. undersøkte tilstedeværelse av PRV i ville fiskebestander av marin fisk for å finne ut om de kan fungere som en vektor for viruset. RNA fra PRV ble detektert i små mengder og indikerte en lav prevalens av PRV, men basert på studiets oppbygging kunne man ikke konkludere om de fiskeartene som testet positivt for PRV fungerer som relevante

vektorer for viruset. Studiet støtter teorien om et komplekst forhold som involverer flere bærere og virusreservoar av PRV [68]. Det har også blitt undersøkt sammenheng mellom tilstedeværelsen av parasitten *Paranucleospora theridion* (en mikrosporidie funnet assosiert med lidelsen proliferative gjellesyke, (PGI)) og utbrudd av sykdommene HSMB, CMS og PD. Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom tetthet av parasitten og diagnose av HSMB [87]

1.2.7 Tiltak mot HSMB

Frem til de siste årene har man hatt forholdsvis lite kunnskap om agens og årsaksforhold for utvikling av HSMB, og det har derfor vært vanskelig å utvikle konkrete bekjempelsesstrategier for sykdommen. Det har blitt foreslått at man ved å redusere smittepress, kan redusere antall utbrudd av sykdommen [86]. Mattilsynet har nylig sendt til høring forslag om å fjerne HSMB som nasjonal sykdomsliste (liste 3) [88]. Begrunnelsen for forslaget er at HSMB ikke lenger oppfyller kriteriene for listeføring. Hensikten med listeføring er at det skal iverksettes tiltak for å begrense spredning av sykdom. Dette har vist seg vanskelig for HSMB, da sykdommen og PRV er svært utbredt. Det kan svekke respekten for regelverket ved at det finnes listeførte sykdommer som forvaltningen som hovedregel ikke gjør noe med [89]. Det foreligger fortsatt uklarheter mellom tilstedeværelse av PRV og utvikling av HSMB. Ut fra de totale opplysninger som foreligger i dag, synes det som om næringen, i likhet med sykdommen IPN, har «gitt opp» å bekjempe sykdommen HSMB og dermed akseptert at dette er noe en må lære å leve med.

1.3 Multifaktoriell sykdomsproblematikk.

Etttersom det finnes en høy andel av IPNV bærerfisk i næringen, er det stor sannsynlighet for at IPNV sameksisterer med andre virus [31]. Det har blitt gjort en del forskning på dette feltet for å finne ut av hvordan en dobbeltinfeksjon med IPNV kan påvirke andre sykdommer. I eksperimenter utført av Johansen og Sommer ble det vist at en akutt IPNV infeksjon kan ha stor innvirkning på utfallet av en sekundær sykdomsinfeksjon, mens en IPNV bærertilstand ikke i signifikant grad påvirker sekundære infeksjoner [31]. Dette viser at tidspunkt for når fisken får de ulike infeksjoner, og hvilken fase av infeksjonen fisken er i, kan ha betydning for hvordan en sekundær infeksjon med andre agens utvikler seg.

1.3.1 IPN, ILA, og *V.salm*

Johansen og Sommer testet utfallet av sekundær smitte med viruset ILAV og bakterien *Vibrio salmonisida* (*V. salm*). IPN ble induert ved badsmitte og en sekundær infeksjon ble induert ved intraperitoneal (i.p.) smitte ved to ulike tidspunkt: ved akutt IPNV infeksjon (3 uker etter smitte) og ved IPNV bærertilstand (6-8 uker etter smitte). Resultater fra infeksjonsforsøket ved tidspunktet for akutt IPNV infeksjon, viste at fisk som var dobbeltinfisert med ILAV og IPNV oppnådde signifikant lavere dødelighet, sammenlignet med fisk som var infisert med ILAV alene. Dette indikerte at IPNV ga en form for beskyttelse mot ILAV. Ved dobbeltinfeksjon med bakterien *V. salm*. ble utfallet motsatt; fisk som var dobbeltinfisert med *V. salm* og IPNV hadde signifikant høyere dødelighet sammenlignet med fisk som kun var infisert med *V. salm*. Det samme infeksjonsforsøket ble utført på fisk i en IPNV bærertilstand, men ga da ingen signifikant påvirkning på utfallet av sekundære infeksjoner. [31]. Melby og Falk har også studert *in vivo* interaksjoner mellom en persistent IPNV infeksjon og sekundær infeksjon med ILA. Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom sykdommene og IPNV infeksjonen ble ikke reaktivert som følge av en sekundær infeksjon med ILA [90].

1.3.2 IPNV og IHNV.

Sykdommen infeksiøs hematopoetisk nekrose (IHNV) er en alvorlig laksesykdom som ikke har blitt påvist i Norge [91]. Eksperimentell dobbeltinfeksjon med IPNV og infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV), viste kun 2 % kumulativ dødelighet i fiskegrupper som hadde blitt infisert med IHNV 2 uker etter infeksjon med IPNV. Fisk som kun ble infisert med IHNV hadde 72 % kumulativ dødelighet. Dette indikerer at en dobbeltinfeksjon med IPNV inhiberer og «beskytter» mot effekt av IHNV [92]. Infeksjon med IPNV og IHNV påvirker uttrykk av cytokiner i brunørret. Det er vist at enkeltinfeksjon av virusene induserer uttrykk av IL-1 β og IL-8, mens en dobbeltinfeksjon av IPNV og IHNV medfører redusert uttrykk av IL-1 β [93]. Det har også blitt demonstrert at dobbeltinfeksjon med IPNV og IHNV påvirker Mx gen uttrykk, og at aktivering av immunsystemet kan forklare interferensen som oppstår mellom IPNV og IHNV i dobbeltinfeksjoner [94]. Inhibering av IHNV ved dobbeltinfeksjon med IPNV har også blitt demonstrert i *in vitro* infeksjonsforsøk. En annen hypotese på hvordan dette kan oppstå, er at det ved dobbeltinfeksjon oppstår en konkurranse om bindingssetet på cellen. Det ble foreslått at IHNV er mindre effektivt sammenlignet med IPNV til å etablere det tidlige infektive stadiet i vekstsyklusen til viruset [95].

1.3.3 IPN og HSMB

I næringen har det blitt observert at utbrudd av IPN ikke sjelden har blitt etterfulgt av et utbrudd av HSMB. [2]. Omtrent halvparten av alle oppdrettsanlegg i Troms og Finnmark er diagnostisert med IPN. Felldata har vist at mange opplever utbrudd av CMS og HSMB i etterkant av et IPN utbrudd, ofte satt i sammenheng med stresspåkjenninger hos fisken. I Møre og Romsdal, Trøndelag og Nordland har utbrudd av HSMB ofte kunnet assosieres med utbrudd av IPN, og fiskehelsepersonell har funnet det vanskelig å skille mellom disse sykdommene. Om tilstedeværelse av IPNV kan øke fiskens mottakelighet for sykdommen HSMB, er ikke kjent [96].

1.4 Problemstilling

HSMB og IPN er utbredte sykdommer i norsk lakseoppdrett. I felt har det ofte blitt observert utbrudd av HSMB i etterkant av et IPN utbrudd, men en vet ikke hvordan IPN påvirker HSMB. PRV er funnet i tilknytning til sykdommen HSMB, men det er fortsatt mange ubesvarte spørsmål vedrørende infeksjonsforløp og utbrudd av viruset. Frem til i dag har det ikke vært mulig å studere PRV *in vitro* da en ikke har etablerte metoder for dyrking av viruset.

Hovedmål 1:

Studere utviklingen av en dobbeltinfeksjon med IPNV og HSMB¹ i Atlantisk laks.

- Delmål 1: Undersøke utviklingen av en IPNV infeksjon og etablering av IPNV bærertilstand ved å se på titerutvikling i fisken.

¹ Ettersom det foreligger uklarheter i hvilken rolle PRV har og om viruset alene er tilstrekkelig for å gi utbrudd av sykdommen HSMB, brukes begrepet «infisert / smittet med HSMB» om fisk som er smittet med PRV-positivt hjertehomogenat fra fisk med diagnosen HSMB.

- Delmål 2: Undersøke utvikling av HSMB ved kvantitativ deteksjon av PRV ved bruk av real-time RT-PCR og diagnose bekreftet med histologisk undersøkelse av hjerter ved Veterinærinstituttet.
- Delmål 3: Undersøke hvordan en IPNV bærertilstand påvirker utfallet av en sekundær infeksjon med HSMB.
- Delmål 4: Undersøke hvordan vaksinerings påvirker utvikling av en infeksjon med IPNV, dobbeltinfeksjon med IPNV og HSMB, og fisk smittet med HSMB alene.

Hovedmål 2:

Etablere hjertecellekulturer fra Atlantisk laks, og forsøke å dyrke PRV *in vitro*.

- Delmål 1: Utarbeide en protokoll for etablering av primærcelekultur av hjerte.
- Delmål 2: Undersøke om hjerteceller (primærkultur og etablert cellelinje: CHH-1 celler) er mottakelige for infeksjon med PRV.

2 Materiale og metode

2.1 Dyrking av celler og virus

2.1.1 Arbeid med etablerte cellelinjer

I denne oppgaven ble det benyttet to typer etablerte cellelinjer: Chinook Salmon Embryo (CHSE) 214 celler, utviklet fra Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) embryo, og Chum salmon heart (CHH-1) celler, utviklet fra hjerte til Chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Cellelinjene er mottakelig for blant annet infeksiøst pankreas nekrose virus (IPNV) [97].

Dyrking av celler

Alt arbeid med celler ble utført i steril-lab i laminar air-flow (LAF) benker, det ble benyttet sterilt engangsutstyr. Cellene ble dyrket i dyrkingsmedium etter oppskrift gitt i appendiks 6.3. For å innarbeide god sterilteknikk, ble det startet med å dyrke celler uten tilsetning av antibiotika i mediet. Cellene ble dyrket i små (25 cm²) / medium (75 cm²) / store (175 cm²) celledyrkningskolber med filterkork (Nunc), og inkubert i CO₂ inkubatorskap (Galaxy R) ved 20 °C / 5 % CO₂.

Celler som ikke er i bruk, oppbevares over lang tid i ampulle nedfrosset i dampfasen av flytende nitrogen. Ved oppstart av CHH-1 cellelinje, ble ampulle med celler dekontaminert med 70 % sprit før cellemassen forsiktig ble overført (halv-tint) til en liten celledyrkningskolbe tilsatt 10 ml vekstmedium. Etter 24 timer ble det skiftet medium på kolben, non-adherente celler ble overført til ny celledyrkningskolbe som «back-up», og det ble tilsatt 10 ml nytt medium for å fortynne effekten av frysemediet. Cellene ble inkubert til de hadde dannet et monolag i bunnen av kolben.

Når cellene er i monolag, splittes de ved å løsne cellene fra dyrkningskolben ved bruk av trypsin. Trypsin er en protease som bryter ned ekstracellulær matrix og peptidbindinger som holder cellene sammen [98]. Medium ble helt av kolben, cellene ble vasket med 1 ml 0,25 % 1x trypsin-EDTA (Gibco) for å fjerne rester av medium som kan virke hemmende på trypsinet. Det ble tilsatt 2-3 ml trypsin som virket i ca. 2 minutter (avhengig av tykkelsen på celledaget). Cellene ble studert i invertmikroskop til celledaget begynte å løsne fra bunn av kolben. Dette indikeres ved at cellene blir rundet opp og får en lysere farge og det dannes

«rifter» i cellelaget. Trypsinet ble inaktivert ved å tilsette 6-10 ml vekstmedium, og cellene ble resuspendert forsiktig. En andel av cellene ble overført til nye dyrkningskolber med vekstmedium. Vanlig splittetio for CHSE-celler og CHH-1 celler er mellom 1:4 og 1:6. Kultur med CHH-1 celler ble splittet ca. hver 5. dag. CHSE-cellelinjen dyrkes kontinuerlig ved Nofima, og cellene splittes ca. 1 gang pr. uke, avhengig av vekstfase og behov.

2.1.2 Dyrkning av Infeksiøs Pankreasnekrose Virus (IPNV) i CHSE-celler.

CHSE-214 celler ble brukt til oppformering av IPNV som senere ble brukt i en badsmitte av Atlantisk laks (*Salmo salar*), beskrevet i del 2.2.2. IPN-viruset som ble brukt i forsøket ble samlet inn fra utbrudd i felt ved år 2000. Dette høyvirulente viruset er av serotype Sp, og har fått navnet IPNV feltstamme 12 (IPNV fs 12) [99].

Multiplicity of infection (Moi) er et forholdstall mellom mengde viruspartikler og celler, hvor $Moi = 1$ = 1 viruspartikkel pr. celle. Ved dyrking av IPNV, er det vanlig å infisere med moi 0,01 – 0,001. Dette gir viruset mulighet til spredning og infeksjon av nye celler, og en oppnår maksimal produksjon og nydannelse av virus. Moi beregnes ut fra titer på virus og mengde celler i dyrkningskolben. CHSE celler i monolag har konsentrasjon ca. 10^5 celler / cm^2 .

CHSE celler som har blitt infisert med IPNV karakteriseres ved at de utvikler cytopatogen effekt (CPE). De første tegn på infeksjon kan ses ved at det dannes små vakuoler i cellene. Cellene sveller opp og danner karakteristiske ballongceller. Tydelig CPE ses ved at cellene løsner fra bunn av kolben og cellelaget er fullstendig ødelagt og oppløst. Ved optimal infeksjonsmengde vil alle cellene være infisert etter ca. 7 dager.

Infisering av celler og høsting av virus

Alt arbeid ble utført i virus-lab, i egen LAF-benk tilegnet arbeid med IPNV. Til virusinfeksjon ble det benyttet store cellekolber med 2-dager gamle CHSE celler i 80-90 % monolag. Cellene bør fortsatt være i aktiv vekst (i slutten av log-fasen) ved infisering. Cellene ble infisert med virusløsning fortynnet i CHSE-vekstmedium uten foetal bovine serum (FBS) (pga. at det i serum finnes komponenter som kan hemme virusinfeksjonen) til ønsket moi. Det ble tilsatt ca. 18 ml virusløsning pr. kolbe, nok til å dekke cellelaget. Cellene ble inkubert i 3 timer, før virusløsning ble sugd av og det ble tilsatt 50 ml vekstmedium (med 2 % FBS) pr. kolbe. Kolbene ble inkubert i CO₂ inkubatorskap ved 20 °C / 5 % CO₂ (eget skap for virus) i ca. 1 uke. Høsting av virus ble utført når det var utviklet full CPE. Det ble arbeidet på is,

medium ble helt over i steril beholder og bunnen av cellekolben ble skrapet med en celleskraper for å få med rester av celler. Virusløsningen ble sentrifugert ved 4500 rpm / 4 °C / 15 min (Sorvall RC5C sentrifuge) for å fjerne rester av celledbris. Supernatanten ble overført til ny steril beholder, pellet ble deretter løst i ca. 5 ml av supernatanten og fryst ved -80 °C i minimum 3 timer, for frigjøring av viruspartikler. Løsning med pellet ble tint og spunnet ned og supernatanten ble slått sammen med resten av virusløsningen. Virusløsningen ble fordelt i 50 ml rør (40 ml / rør), og fryst ved -80 °C. Virus som skal benyttes i smitteforsøk bør passerer færrest mulig ganger i cellekultur, for å unngå at viruset endrer seg og virulensen i fisk svekkes [100, 101].

2.1.3 Påvisning og kvantifisering av IPN-virus

CHSE celler kan brukes som verktøy for å påvise og bestemme antall viruspartikler i en prøve. I dette forsøket ble IPNV detektert ved bruk av bærertest og kvantifisert ved endepunktstitrering.

Bærertest IPNV

Bærertest utføres for å detektere en eventuell bærertilstand av IPNV i fisken. Testen ble utført i medium cellekolber med 1-2 dager gamle CHSE celler i 80-90 % monolag. Det ble laget 5 % vekt / volum (w / v) homogenat av hodenyre ved å mose vevsbiter gjennom 100 µm nylon cell strainer (BD Falcon), fortynnet i CHSE-vekstmedium uten FBS. Homogenatet ble spunnet ned ved 12000 rpm / 10 min / 4 °C (Kubota 1300 sentrifuge) for å fjerne rester av celler, vev og eventuelle bakterier i prøven. Medium ble helt av CHSE cellene, det ble tilsatt 20 ml nytt vekstmedium med 2 % FBS og 4 ml av nyrehomogenatet. Cellene ble inkubert i minimum 1 uke før avlesning av CPE. Ved negativt resultat ble løsningen passert til nye kolber med CHSE-celler ved å mikse medium fra «gammel kolbe» 50 / 50 med nytt medium. Dersom CPE ikke er oppnådd etter 2 ganger passering erklæres fisken negativ for virus. Metoden ga en deteksjonsgrense på 5 viruspartikler pr. gram vev. Utregning for deteksjonsgrense av virus er vist i appendiks 0.

Titring av virus

For å bestemme antall viruspartikler i en løsning, ble det utført endepunktstitrering. Titring ble utført i 96-brønners celledyrkningsbrett med 1-2 dager gamle CHSE-celler i 80-90 % monolag. Ved kvantifisering av virusmengde i fisk, ble det laget en 10 % (w/v) eller 5 % (w/v) løsning av nyrehomogenat, som beskrevet for bærertest. Løsningen ble fortynnet i eget

96-brønners brett (hjelp Brett) til en 10-folds fortyningsserie i CHSE-vekstmedium tilsatt 2 % kalveserum. Som start på fortyningsrekken ble virusløsningen sådd ut i 4 paralleller pr. fisk, og i 8 paralleller ved kvantifisering av virus oppdyrket CHSE-celler. Det ble blandet godt, og byttet pipettespiss mellom hver overføring av virusløsning i fortyningsserien. Den siste raden på brettet ble ikke tilsatt virusløsning, da den ble brukt som negativ kontroll. Medium på CHSE-celler ble helt av og fortyningsserie i hjelp Brett ble overført til tilsvarende brønner i Brett med celler. Cellene ble inkubert i CO₂ inkubatorskap ved 20 °C / 5 % CO₂, og avlest for CPE etter 7 dager inkubering. Antall viruspartikler ble bestemt etter Tissue Culture Infectious Dose – 50 (TCID₅₀), en metode utviklet av Reed og Muench [102]. Eksempel på utregning av TCID₅₀ er vist i appendiks 6.6.

Det ble utført en nøytraslisasjonstest på 3 utvalgte prøver fra fisk der cellelaget hadde løsnet ved laveste fortyning i rad A (ved titrering av 5 % homogenat), og det var uklart om dette var forårsaket av cytotoxisk effekt av selve homogenatet eller CPE forårsaket av IPNV. Supernatant ble sugd av celledyrknings Brett og fortynt: 1:500, 1:5000 og 1:50000 i CHSE-vekstmedium tilsatt 2 % FBS. Fra hver prøve ble det laget 2 paralleller av hver fortyning, hvor den ene ble tilsatt nøytraliserende antistoff mot IPNV (pool av kanin anti IPNV-Sp og kanin anti IPNV-Ab), i sluttfortyning 1:100. For at antistoffet skulle få tid til å virke, ble prøvene satt på rotasjon i 3 timer før utsæd på nye CHSE-celler i 80-90 % monolag (aktiv vekst), tillaget i 24-brønners celledyrknings Brett. Prøvene ble avlest for CPE etter inkubering i 7 dager.

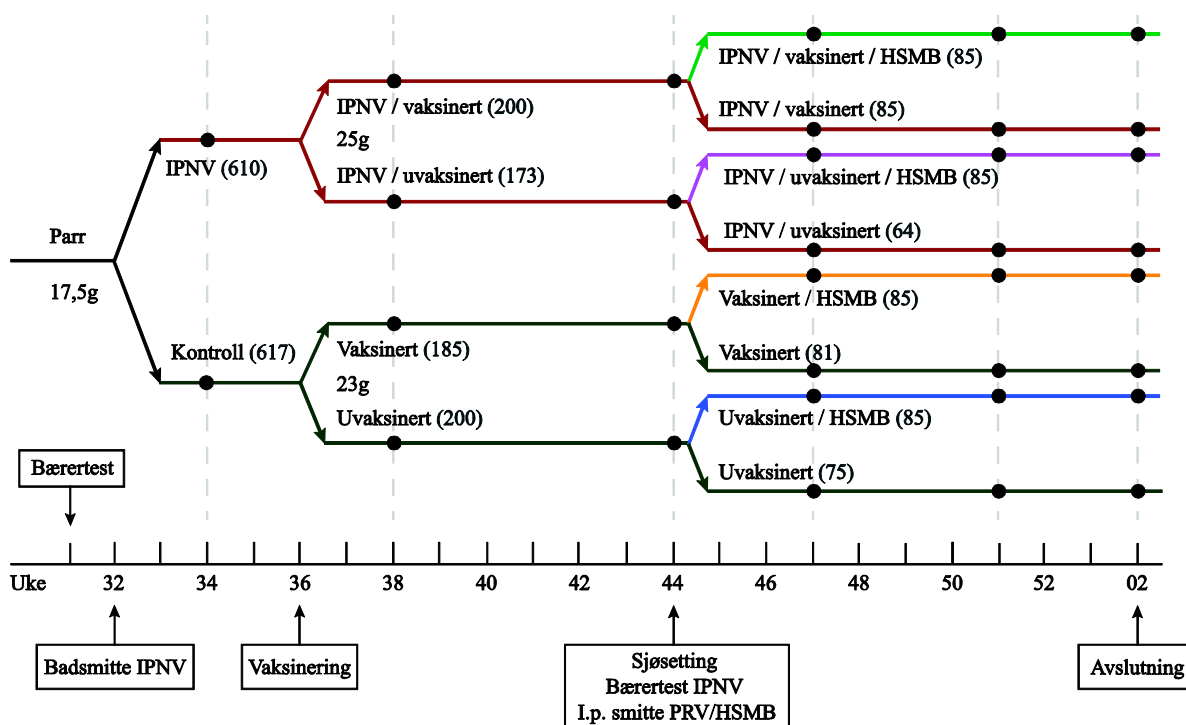
2.2 Dobbelinfeksjon med IPNV og HSMB i Atlantisk laks.

2.2.1 Forsøksdesign

Forsøket ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT). Lakseyngel ble gitt fra AquaGen AS. Fisken ble foret opp ved landanlegget, overført til fiskehelselaboratoriet ved oppstart av forsøket i uke 31 2012, og holdt der frem til avslutning av forsøket i uke 02 2013. (Se oversikt for forsøket i Figur 3). Alle prøver ble analysert ved Nofima, med unntak av prøver til histologi som ble analysert ved Veterinærinstituttet (VI) i Oslo.

For å sikre at forsøksfisken var fri for IPNV, ble det utført en bærertest av fisken før oppstart av forsøket og ved sjøsetting. Testen ble utført som beskrevet i avsnitt 2.1.3. Før oppstart ble

det brukt hodenyrer fra 10 fisk i pools av 2 fisk og ved sjøsetting ble det brukt 8 fisk pr. gruppe i pools av 2 fisk. I uke 32 ble fisken badsmittet med IPNV for å simulere naturlig IPNV smitte i settefiskfasen, og for å etablere en IPNV bærertilstand [33]. Fisken ble vaksinert i uke 36. I uke 38 ble lysregimet forandret fra vinterstimuli (6:18) til sommerstimuli (24:0), og fisken gjennomgikk en smoltifiseringsprosess. Smoltifiseringsstatus på fisken ble kontrollert av personale ved HiT, ved å utføre sjøvannstoleransetest. Fisken ble overført til sjøvann og intraperitonealt (i.p.) smittet med PRV positivt hjertehomogenat i uke 44. Det ble tatt ut prøver av fisken ved ulike tidspunkt under forsøket, som vist i Figur 3.



Figur 3: Forsøksoppsett for de ulike fiskegruppene som inngår i denne oppgaven. Tidspunkt for sampling av organprøver er indikert med sirkler. Antall fisk pr. gruppe er gitt i parentes, det ble tatt snittvekt ved oppstart av forsøket, og ved vaksinering. Forsøket ble avsluttet og hadde siste sampling i uke 02.

2.2.2 Badsmitte IPNV

Det ble benyttet IPNV isolat av typen Sp, dyrket til 1. passasje i CHSE-celler som beskrevet i del 2.1.2. Etter oppdyrking ble virulens i virus bekreftet ved sekvensering. Det ble smittet med dose 5×10^4 infeksjøs enheter (i.e.) IPNV / ml smittevann, med en tetthet på ca. 5 kg fisk pr. 100 liter vann. Vanntilførsel i karet ble stengt av, vannmengden ble tappet ned til ønsket volum, og det ble tilsatt oksygen ved bruk av diffusorsteiner. Oksygenivå ble kontrollert til å være rundt 80 % metning. Temperatur i karet var 9,2 °C ved oppstart av smitten, og økte ikke

mer enn 1 °C i løpet av smitteperioden. Fisken ble badsmittet i 3,5 timer og smitten ble avsluttet ved å sette på vanngjennomstrømming i karene. Kontrollgrupper i forsøket gjennomgikk samme behandling i eget kar, men fikk tilført celledyrkingsmedium i stedet for virus. Fisken var tatt av fôring 24 timer før oppstart av badsmitten og ble gjenopptatt da smitten var avslutta.

2.2.3 Vaksinerings

4 uker etter smitte med IPNV ble fisk som inngår i denne oppgaven vaksinert intraperitonealt (i.p.) med en 6-komponent vaksine med oljeadjuvans, mot sykdommene IPN, furunkulose, kaldtvannsvibriose, vintersår og vibriose (Alphaject Micro 6, Pharmaq), med dose 0,05 ml pr. fisk. Uvaksinert kontrollfisk ble injisert med fysiologisk saltvann (saline), med dose 0,1 ml. Fisken ble bedøvet i benzocaine (Benzoak Vet.) (40 mg / L), før injeksjon med automatsprøyte. Volumkontroll ble utført før oppstart, og underveis i vaksineringsen. Figur 4 viser bilder tatt under vaksineringsen.



Figur 4: Intraperitoneal vaksinerings av usmitta kontrollfisk.

2.2.4 I.p. smitte med HSMB

Ved sjøsetting, 12 uker etter smitte med IPNV, ble 85 fisk fra hver fiskegruppe i forsøket i.p. injisert med 0,1 ml 2,5 % (w / v) PRV positivt hjertehomogenat (KK) (appendiks 6.5). Smittematerialet var opparbeidet av hjerteprøver fra fisk i med diagnosen HSMB. Det var på forhånd testet med real-time RT-PCR og funnet positivt for PRV og negativt for andre kjente fiskepatogene virus som ILAV, PMCV, IPNV og SAV. Kontrollfisk ble injisert med 0,1 ml fysiologisk saltvann. Fisken ble bedøvet i benzocaine (40 mg / L) før injeksjon ved siden av vaksinstikkpunkt. Infeksjonsdose ble regelmessig kontrollert.

2.2.5 Uttak av organprøver

Det ble samlet flere ulike typer prøver fra forsøket. Hvilke organer som ble samlet, varierte mellom prøveuttak og grupper av fisk. I denne oppgaven ble virusmengde i fisk undersøkt ved titrering (beskrevet i kapittel 2.1.3) og real-time RT-PCR (beskrevet i kapittel 2.4). Prøver av hodenyre ble brukt til titrering og kvantifisering av IPNV og prøver av hjerte ble brukt til RNA-isolering og videre deteksjon av PRV (RNA). Organprøver av hjerte, lever og pankreas ble sendt til VI for histopatologisk undersøkelse og diagnostikk av HSMB og IPN.

Fisken ble avlivet fortløpende med dobbel dose benzocaine (80mg/L) og blodtappet / bløgget før organuttaket startet. Det ble arbeidet så sterilt som mulig. Fisken ble åpnet lateralt på venstre side ved å kutte fra bak gjellelokk, langs siden av fisken og ned mot gattåpning. Det ble benyttet ny skalpell og pinsett inne i fisken (ettersom fisken ikke er steril utvendig). Hjerte ble dissekert frem, lagt på sterilt underlag og delt i to (på langs), slik at del av bulbus, atrium og ventrikkel ble med. Høyre del av hjertet ble lagt på rør fylt med formalin for fiksering av vev til histopatologisk undersøkelse. Venstre del av hjertet ble lagt på rør fylt med en løsning som bevarer og hindrer degradering av RNA, RNAlater solution (Ambion). Det ble også tatt ut tverrsnitt av lever og pankreas til histopatologisk undersøkelse. Figur 5 illustrerer prøveuttak av hjerte, lever og pankreas. Hodenyre ble dissekert frem og ca. 1 cm av hodenyre (høyre lobe) ble skåret ut og lagt på rør fylt med vekstmedium for CHSE celler (uten FBS) for senere virustitrering på CHSE-celler.



Figur 5: Prøveuttak av lever, pancreas og hjerte. Innfelt: Skjematisk figur av hjerte.

Alle prøvene ble tatt med tilbake til Nofima. Prøver til virusdyrkning ble fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til titrering. Prøver på RNAlater ble oppbevart kjølig ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) over natt for at RNAlater skal trekke godt inn i vevet, før prøvene ble fryst og oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til isolering

av RNA. Vevsprøver til histologi ble oppbevart ved romtemperatur og sendt til VI for videre analyse.

2.2.6 Analyse av prøvemateriale

Histopatologisk ble diagnosen HSMB stilt etter gradering (1-3) av patologiske forandringer forenelig med HSMB i atrium og i de ulike lagene (epikard, kompaktum og spongiosum) av ventrikkel, der en sammenlagt score >4 gir diagnosen HSMB. PRV ble detektert ved immunhistokjemiske teknikker som beskrevet i arbeid av Finstad et al. [80].

Data fra forsøket ble behandlet i Excel for presentasjon av resultater. Fremstilling av box-plot og utførelse av statistiske analyser (t-test og Mann-Whitney test), ble gjort i programmet MiniTab 16.

2.3 Etablering av primærcelekkultur fra hjerte til Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og *In vitro* infeksjonsforsøk med Piscine reovirus (PRV).

2.3.1 Etablering av primærcelekkultur fra hjertet til Atlantisk laks (*Salmo salar*).

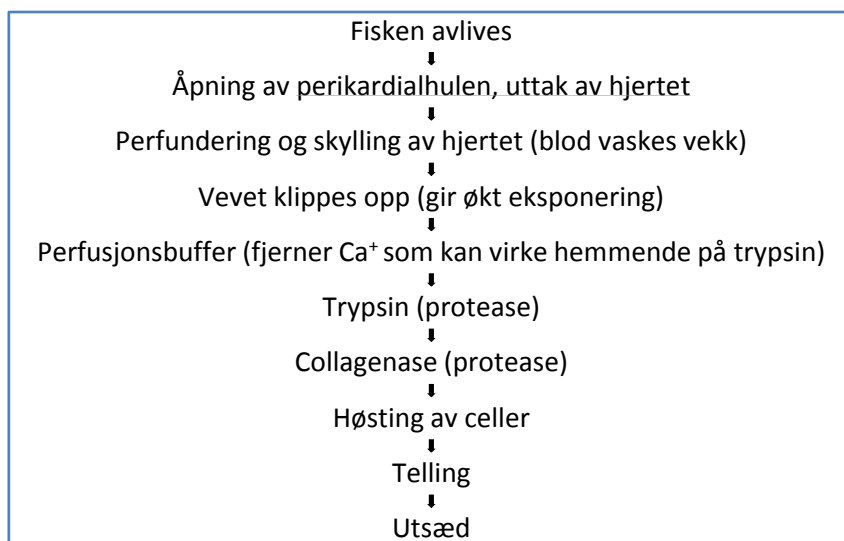
Primære cellekulturer kan utvikles ved mekanisk eller enzymatisk tillaging av en celleduspensjon fra vev, som deretter såes ut på et egnet substrat. Trypsin, elastase, dispase og collagenase er eksempler på enzymer (proteaser) som alene, eller i kombinasjon, kan brukes til å løsne celler fra hverandre [103]. Festemekanismer hos celler er mediert av ulike transmembrane proteiner. Interaksjoner mellom celle og substrat er primært kontrollert av integriner som er reseptorer for matrixmolekyler som fibronectin, entactin, laminin og collagen [98]. I dette forsøket ble celler isolert enzymatisk ved bruk av trypsin og collagenase. Det ble totalt utført 4 enzymatiske celleisoleringer, hvor det ble gjort optimaliseringer for å oppnå best celleutbytte og for å etablere en standard metodikk for isolering av hjerteceller. Protokollen som ble utarbeidet tok utgangspunkt i en publikasjon av Koren et al. [104] og en protokoll for celleisolering fra Tore Seternes (pers. med.). Tabell 1 viser en oversikt over de ulike prosedyrene som ble testet.

Tabell 1: Ulike prosedyrer som ble testet ved etablering av protokoll for isolasjon og tillaging av primærkultur av hjerteceller fra laks.

Prosedyre	Hensikt
Lengde (tid) på enzymbehandling	Nødvendig virketid for collagenase var ukjent. 10, 20, og 30 minutter enzymbehandling ble undersøkt.
Enzymstyrke	Nødvendig enzymstyrke var ukjent. Det ble startet med bruk av collagenase med «medium» styrke (Liberase TM). Et «kraftigere» enzym (Liberase TH) ble senere testet ut på ventrikkel.
Dyrkningssubstrat	Egnet dyrkningssubstrat var ukjent. Det ble testet ulike pre-coatinger av celledyrkningsbrett: primaria, laminin, fibronektin og amine.
Panning	Makrofager ble forsøkt fjernet.
Inkubasjonstid	Det var uvisst hvor lang tid cellene trengte på å feste seg til substratet. Det ble testet ulike inkubasjonstid (4 timer, 18 timer, 1 og 2 døgn), før vask av celler.
Vask	Non adherente celler, røde blodceller, og døde celler / vevsfragmenter ble forsøkt fjernet ved vask.
Celletelling	Estimering av celleutbytte. Det ble sammenlignet automatisk og manuell celletelling.

Protokoll for enzymatisk isolering av hjerteceller

Det ble brukt Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i størrelsen 0,7 – 1 kg fra HiT. Flytdiagram 1 viser de ulike trinn som inngår i metoden for isolering av hjerteceller. Avliving av fisk, uttak, og perfundering / skylling av hjertet ble utført ved HiT, mens de resterende trinn i prosedyren ble utført på lab ved Nofima. Det ble arbeidet så sterilt som mulig.



Flytdiagram 1: Oversikt av ulike trinn som inngår i protokoll for enzymatisk isolering av hjerteceller fra laks.

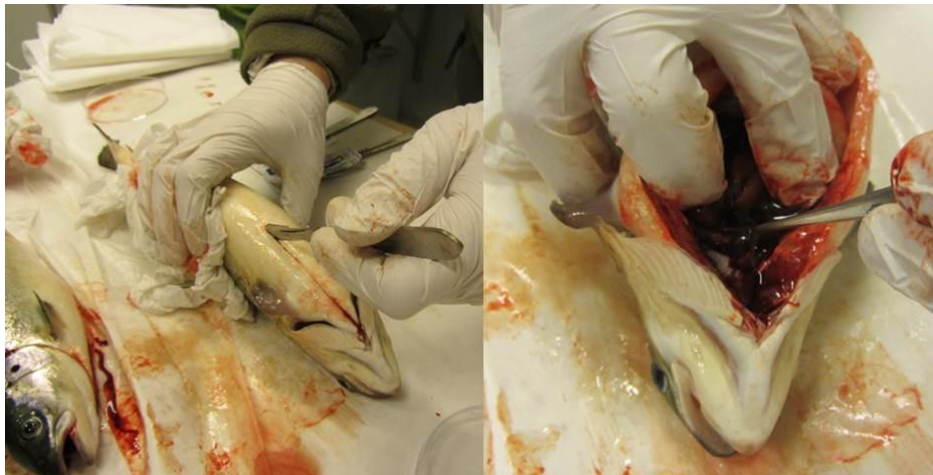
Forberedelser

Celledyrkningsbrett (Nunc) ble coatet med $2,5\mu\text{g} / \text{cm}^2$ med laminin eller fibronektin. Det ble tillaget transportmedium, dyrkingsmedium, perfusjonbuffer, trypsinløsning og collagenaseløsning etter oppskrift gitt i appendiks 6.3.

Utstyr ble gjort klart og satt frem før uttak/avliving av fisk; det ble lagt frem skalpell, saks, papir, og fylt 20 ml transportmedium i en sprøyte og litt i en petriskål. Fisken ble avlivet ved slag i hodet.

Dissekering av hjerte

Fisken ble lagt på rygg, huden ble tørket av og sprayet med 70 % sprit før åpning. Hjerte- (perikardial) og bukhulen ble åpnet ventralt ved å snitte med skalpell fra basis av gjellelokk i posterior retning. Hjertehulen ble holdt åpen og hjertet ble blottlagt som vist i Figur 6. Ved åpning er det lett å punktere blodårer og deler av hjertet, noe som vil gi store blodutredninger. Dette kan suges vekk med pasteurpipette. Det er viktig å unngå punktering av tarm, da den inneholder bakterier som kan kontaminere cellekulturen. Ved celleuttak nr. 4 ble det, i forsøk på å redusere kontaminering av bakterier, testet en ny metode for åpning av fisk og uttak av hjertet. Gjellelokket ble klippet av, fisken ble åpnet som beskrevet i avsnitt 2.2.5. Hjertet ble blottlagt ved å skjære ned langs septum transversum.

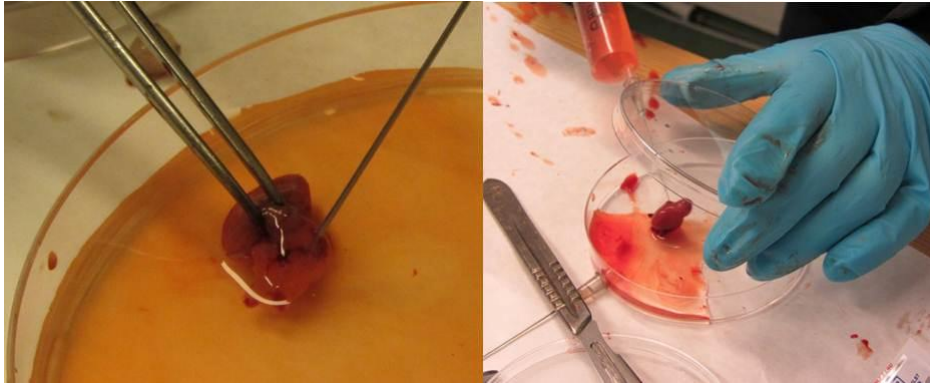


Figur 6: Åpning av perikardialhulen, pinsett holder hjertet ved sinus venosus

Hjertet ble løsnet/klippet over i bakkant (ved sinus-venosus/atrium) ved å bruke en pinsett med bøyd tupp eller skalpell. Hjertet ble løftet ut ved å kutte av bulbus, og overført til petriskål tilsatt litt transportmedium (da vevet kan bli skadet dersom det blir liggende på tørr plast).

Perfundering og skylling av hjertet

Hjertet ble perfunderert med kanyler (22GA₂) og skylt med 20 ml transportmedium ved å sprøyte medium forsiktig og med jevn hastighet inn i vevet, som illustrert i Figur 7. Vellykket perfundering indikeres ved at hjertet blåses opp og medium pumpes ut når hjertet kontraherer. Vevet skifter farge og blir lysere etter hvert som blodet vaskes vekk. For å unngå at blodet koagulerer i hjertet er det viktig at det går så kort tid som mulig fra avliving til uttak og skylling av hjertet. Koagulering vil medføre forurensing av røde blodceller i kulturen.

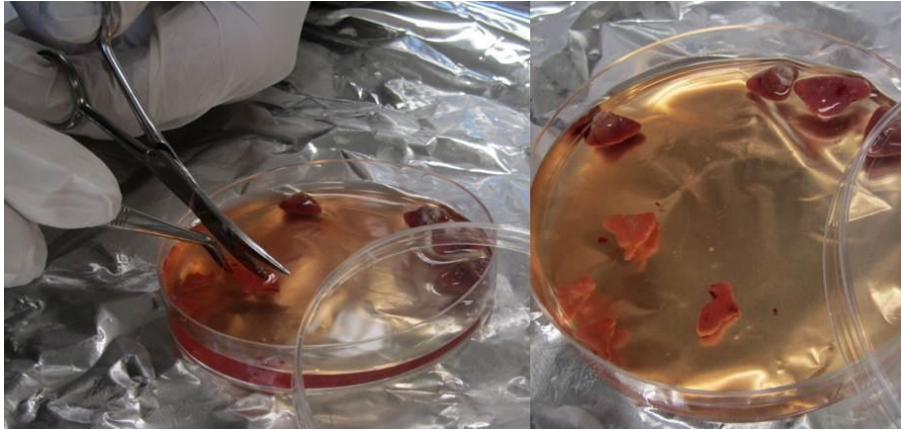


Figur 7: Skylling av hjertet med transportmedium for å hindre dannelse av blodkoagler.

Hjertet ble oppbevart og transportert i et 50 ml rør med transportmedium lagt på is. Rørene ble oppbevart flatt slik at mediet skvulper fritt rundt hjertet, og vevet er beskyttet mot mekanisk skade. Det ble transportert 3-4 hjerter pr. rør. I det første celleuttaket ble det tatt ut 9 stk. hjerter, ved uttak 2 og 3 ble det tatt ut 6 stk. hjerter og ved uttak 4 ble det tatt ut 7 stk. hjerter.

Oppdeling og behandling av vev med perfusjonsbuffer.

Hjertene ble sammen med transportmediet helt over i en petriskål satt på is. Bulbus ble klippet vekk og kastet. Atriene ble klippet fri fra ventrikkel. Atrium og ventrikkel ble åpnet ved å klippe fra «hjørne til hjørne», slik at vevet ble foldet ut. Åpning av atrier er vist i Figur 8. Koageler av blod ble forsøkt fjernet. Fra dette trinn ble atrium og ventrikkel holdt adskilt ved videre behandling.



Figur 8: Åpning av atrium. (Ventrikkel er lagt til siden og er ikke klippet opp)

Atriene ble fordelt på 2 stk. sentrifugerør tilsatt 25 ml perfusjonsbuffer (3 - 4 atrium / 25 ml perfusjonsbuffer). Rørene ble lagt på ristebrett (IKA labortechnik) i 30 minutter (80 rist / min, 12 °C). Samme behandling ble utført på ventrikkel.

Enzymbehandling av vev

Perfusjonsbuffer ble helt av, og atrier og ventrikler ble overført til rør med 25 ml trypsinløsning (625 µg / ml), fordelt 3-4 atrier eller ventrikler pr. rør. Rørene ble satt på ristebrett i 10 minutter (80 rist / min, 12 °C).

Trypsinløsning ble helt av, og vevet ble overført til rør med collagenaseløsning; liberase TM research grade (Roche) (0,16 Wünc h units / ml), fordelt på 3-4 atrier eller ventrikler pr. rør. Ved uttak 1 ble det brukt 10 ml collagenaseløsning pr. rør og ved uttak 2 og 3 ble det brukt 25 ml collagenaseløsning pr. rør. Ved uttak 4 ble det, som forsøk på å øke celleutbyttet fra ventrikkel, brukt en mer aggressiv enzymløsning for ventrikkel. Collagenaseløsning for atrium ble tillaget som beskrevet tidligere, mens collagenaseløsning for ventrikkel ble tillaget med liberase TH research grade (Roche) (0,16 Wünc h units / ml). I uttak 4 ble det brukt 20 ml collagenaseløsning pr. rør. Collagenaseløsning med vev ble satt på risting (80 rist / min, 12 grader).

Høsting av celler

Etter hver collagenasebehandling ble vevet overført til petriskål, løse celler ble vasket / skylt av vevet ved å suge opp litt av collagenaseløsningen med en 10-20 ml sprøyte og spyle dette forsiktig over vevet. Cellesuspensjonen (collagenaseløsningen) ble overført til et 50 ml rør (vevet ble liggende igjen i petriskåla), og cellene ble pelletert ved sakte akselerasjon og brems

(400 × g / 5 min / 10 °C). Hver cellepellet ble resuspendert i vekstmedium for hjerteceller tilsatt 10 % FBS. Cellesuspensjonen fra hver høstingsrunde ble slått sammen i et rør. Supernatant (collagenaseløsningen) ble tatt vare på og gjenbrukt i neste runde med enzymbehandling av vevet. Celler ble høstet etter ulike tidspunkt med collagenasebehandling. Tabell 2 viser inkubasjonstid / høstetidspunkt av celler ved de ulike celleuttakene.

Tabell 2: Høsting av celler ved ulike celleuttak. Tabellen viser antall høstinger × inkuberings tid med collagenase.

Celleuttak:	Atrium	Ventrikkel
Uttak 1	2 × 20 min	2 × 30 min*
Uttak 2	3 × 10 min	3 × 10 min
Uttak 3	3 × 10 min	3 × 10 min
Uttak 4	1 × 28 min.	1 × 35 min.

*Cellehøstingene fra begge høstingsrunder ble slått sammen.

Beregning av celleutbytte og utsæd av celler

Cellekonsentrasjon ble målt ved bruk av en automatisk celleteller (Scepter cell counter, Millipore). Ved uttak 4 ble antall celler også beregnet manuelt ved bruk av tellekammer. Cellene ble farget med trypanblå (10 µl 0,5 % trypanblå + 90 µl celler, 1min inkubering) før telling i mikroskop. Døde celler, fragmenter og celledetritus blir farget blå, slik at man lett kan skille mellom levende og døde celler. Cellene ble fortynnet i dyrkingsmedium tilsatt 10 % FBS, til ønsket tetthet (ca. $1,5 \times 10^6$ celler /ml).

Cellene ble sådd ut i pre-coatede 24-brønners celledyrkningsbrett (Nunc), 1 ml pr brønn. Ved uttak 1 ble det testet ulike dyrkingssubstrat: laminin, fibronectin, amine (BD Falcon) og primaria (BD Falcon). Ved uttak 2, 3 og 4 ble cellene sådd ut på celledyrkningsbrett pre-coated med laminin. Overskuddsceller ble sådd ut på primariakolber. Ved uttak 1 ble det utført et panning-steg av celler høstet av atrium, for å forsøke å fjerne eventuell kontaminering med makrofager. Cellene ble først sådd ut på brett coatet med 1 % Bovint serum albumin (BSA) for panning i ca. 30 minutter ved 12 °C. Panning med BSA ble ikke utført ved de andre uttakene. Cellene ble inkubert i celleinkubatorskap (Thermacks) ved 12 °C.

Vevsbiter og non-adherente celler ble fjernet ved vask. Dette ble gjort ved å bevege cellebrettet for å virvle opp løse celler og suge av medium med en plastpasteurpipette. Medium ble forsiktig spylt over cellene 1-3 ganger før det ble sugd av og overført til nye brønner eller kastet. Etter vask ble cellene tilsatt nytt vekstmedium. Ulike tidspunkt og styrke / grad av vask ble forsøkt optimalisert. Cellene ble også vasket og tilsatt nytt medium senere i

inkuberingsfasen ved behov. Cellene ble observert i invertmikroskop og det ble regelmessig tatt foto og notater angående utvikling av cellene.

2.3.2 Infeksjonsforsøk med PRV i etablert cellelinje av CHH-1 celler.

PRV ble forsøkt dyrket ved 2 ulike temperaturregimer, 17 °C og 20 °C. CHH-1 celler ble splittet til 28 små celledyrkningskolber (Nunc), cellene var 2 dager gamle og i 80-90 % monolag ved forsøksstart. 5 % (w / v) PRV-positivt hjertehomogenat (KK) fra HSMB diagnostisert fisk ble fortynnet i CHH-1 dyrkingsmedium uten FBS til 0,5 % homogenat og tilsatt nøytraliserende antistoff mot IPNV (pool av kanin anti IPNV-Sp og anti IPNV-Ab, laget ved Nofima) i sluttfortynning 1:1000. IPNV antistoff ble tilsatt på grunn av den utbredte bærertilstanden av IPNV i norsk oppdrettsfisk. I dag er serotypen Sp mest utbredt. Årsaken til at det også ble brukt antistoff mot serotypen Ab skyldes at antistoffet var gammelt og laget i en tid da Ab var relativt vanlig. Medium ble helt av cellekolbene, og cellene ble infisert med 2 ml virusløsning pr. kolbe. Uinfiserte kontrollkolber ble tilsatt 2 ml vekstmedium uten FBS, med antistoff mot IPNV i lik fortynning. Forsøksoppsett er vist i Tabell 3, høstetidspunkt er oppgitt som dager etter infeksjon (days post infection, dpi).

Tabell 3: Infeksjonsforsøk med PRV i CHH-1 celler. Antall infiserte og uinfiserte (kontroll) kolber ved ulike høstetidspunkt.

Høstetidspunkt	t0	3 dpi	7 dpi*	14 dpi*	21 dpi
17 °C	1 kontroll 1 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV
20 °C	1 kontroll 1 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV	1 kontroll 2 PRV

*Ved 7dpi og 14dpi ble det tilsatt 1 ml vekstmedium med 6 % FCS pr. kolbe.

Etter 2 timer inkubering ble kolbene etterfylt med vekstmedium tilsatt 6 % FBS og nøytraliserende antistoff mot IPNV, og t0 ble høstet. Kolbene ble videre høstet ved 3, 7, 14 og 21 dager etter infeksjon ved å fryse kolbene ved -80 °C. RNA fra supernatant og adherente celler ble senere høstet sammen ved bruk av E.Z.N.A. total RNA-kit 1 (Omega bio-tek) og virus ble detektert ved bruk av real-time RT-PCR som beskrevet i kapittel 2.4.

2.3.3 Infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller isolert fra Atlantisk laks.

Det ble totalt utført 3 infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller. Infeksjonsforsøk 1 og 2 ble utført på celler isolert ved uttak 2. Ved infeksjonsforsøk 1 ble det

benyttet 6 dager gamle celler og ved forsøk 2 ble det benyttet 35 dager gamle celler. Infeksjonsforsøk 3 ble utført på celler isolert ved uttak 4, som var 4 dager gamle ved oppstart av forsøket. Cellene ble infisert med PRV positivt hjertehomogenat (HL) tillaget fra fisk i felt med diagnosen HSMB (beskrevet i appendiks 6.5). Forsøksoppsett varierte noe mellom de ulike infeksjonsstudiene. Tabell 4 gir en oversikt av de ulike variablene som ble forsøkt testet ved de ulike infeksjonsforsøkene. RNA ble isolert og virus ble detektert ved bruk av real-time PCR som beskrevet i kapittel 2.4.

Tabell 4: Ulike variabler som ble testet ved infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller fra laks.

Prosedyre / variabel	Hensikt
Fortynning av infeksjonsløsning	Ulike fortynninger gir forskjellig innhold av virus. Det var uvisst hvor mye cellene tålte i forhold til cytotoxisk effekt av vevshomogenatet
Inkubasjonstid	Det var uvisst hvor lang tid viruset trenger for infeksjon og replikasjon. Celler ble forsøkt inkubert med og uten virushomogenat.
Behandling med trypsin	Infeksjonsmedium ble behandlet med trypsin som et forsøk på å øke virusets opptak i celler.
Kontroll	For å skape så lik behandling som mulig mellom kontroller, ble det tillaget hjertehomogenat av usmittet fisk, brukt til kontroll i infeksjonsforsøk 3.
Tidspunkt for infeksjon	Det ble brukt celler med ulik levetid i kultur ved tidspunkt for infeksjon. Ulike utviklingsfaser for celler og eventuell innvirkning på mottakelighet for virus er ukjent.

Infeksjonsforsøk – 1.

Det ble brukt celler isolert på celledyrkningsbrett pre-coatet med laminin og i primariakolber. Celler på brett 1 var isolert fra atrium etter 30 minutter enzymbehandling, og inneholdt en «tynn» blandingskultur av celler. Celler i brett 2 var isolert fra atrium etter 20 min collagenasebehandling. Cellene hadde «pannet» i primariakolbe i 24 timer før overføring til lamininbrett og kulturen besto hovedsakelig av muskelceller (myocytter). Primariakolbene som inngikk i forsøket bestod av en blandingskultur av celler isolert fra atrium etter 20 min og 30 min collagenasebehandling. Kolbene inneholdt de samme typer celler, men kolbe 1 inneholdt litt flere røde blodceller, endotel og epitelceller sammenlignet med kolbe 2 som var noe tettere og inneholdt litt flere myocytter. Primariakolbe 1 ble brukt som kontrollkolbe, primariakolbe 2 ble brukt til infeksjon. Figur 9 illustrerer oppsett av infeksjonsforsøk 1.

Primariakolber	Laminin. Atrium 30min.						Laminin. Atrium 30min, overført fra primaria.					
Atrium 20min Uinfisert	t0 Uinfisert	tEND Uinfisert	t0 Infisert	12dpi Infisert	20dpi Infisert	23dpi Infisert						
	t0 Uinfisert	tEND Uinfisert	t0 Infisert	12dpi Infisert	20dpi Infisert	23dpi Infisert						
Atrium 30min Infisert							t0 Uinfisert	tEND Uinfisert	t0 Infisert	12dpi Infisert	20dpi Infisert	23dpi Infisert
							t0 Uinfisert	tEND Uinfisert	t0 Infisert	12dpi Infisert	20dpi Infisert	23dpi Infisert

Figur 9: Forsøksoppsett infeksjonsforsøk 1.

Cellene ble infisert med 2 % homogenat (HL) fortynnet i vekstmedium uten FBS, med nøytraliserende antistoffer mot IPNV i fortynning 1:1000. Det ble tilsatt 0,5 ml homogenat pr. brønn og 5 ml homogenat pr. primariakolbe. Kontrollbrønner ble tilsatt dyrkingsmedium uten FBS, men med antistoff mot IPNV. Cellene ble inkubert i 4 timer før det ble tilført lik mengde dyrkingsmedium med 20 % FBS (gir sluttkonsentrasjon 10 % FBS). Cellene ble høstet som vist i Figur 9, ved t0 (4 timer etter påsett av virushomogenat), 12 dpi, 20 dpi og 23 dpi (tEND = avslutning). Kontrollbrønner ble kun høstet ved t0 og avslutning. Primariakolber ble høstet ved 20 dpi (tEND). Ved 6 dpi, ble medium på alle brett og kolber sugd av og høstet, og cellene fikk tilført nytt medium.

Infeksjonsforsøk – 2.

Infeksjonsforsøk 2 ble utført på celler isolert fra atrium etter 20 min enzymbehandling. Cellene var sådd ut på lamininbrett, kulturen var forholdsvis gammel ved oppstart av forsøket. Myocytter hadde dannet et nettverk som kontraherte. Oppsett av infeksjonsforsøk er illustrert i Figur 10.

Infeksjonsforsøk 2. Laminin. Atrium 20 min.						Infeksjonsforsøk 3. Laminin. Atrium.					
t0 Infisert	t0 Uinfisert	8dpi Infisert	8dpi Uinfisert	20dpi Infisert	20dpi Uinfisert	t0 Uinfisert	t0 Infisert	8dpi Uinfisert	8dpi Infisert	15dpi Uinfisert	15dpi Infisert
t0 Infisert	t0 Uinfisert	8dpi Infisert	8dpi Uinfisert	20dpi Infisert	20dpi Uinfisert	t0 Uinfisert	t0 Infisert	8dpi Uinfisert	8dpi Infisert	15dpi Uinfisert	15dpi Infisert
						15dpi Uinfisert m/hom	15dpi Infisert m/hom	t0 Uinfisert m/trypsin	t0 Infisert m/trypsin	15dpi Uinfisert m/trypsin	15dpi Infisert m/trypsin
						15dpi Uinfisert m/hom	15dpi Infisert m/hom	t0 Uinfisert m/trypsin	t0 Infisert m/trypsin	15dpi Uinfisert m/trypsin	15dpi Infisert m/trypsin

Figur 10: Forsøksoppsett for infeksjonsforsøk 2 (venstre side) og infeksjonsforsøk 3. (høyre side).

5 % virushomogenat HL, ble fortynnet i dyrkingsmedium uten FBS til 1 % homogenat, og tilsatt nøytraliserende antistoffer mot IPNV i fortynning 1:1000. Cellene ble infisert med 0,5 ml homogenat pr. brønn. Kontrollbrønner fikk tilsvarende behandling ved å tilsette

vekstmedium uten FBS tilsatt antistoff mot IPNV i samme fortyning. Cellene ble inkubert ved 15 °C. Etter ca. 17 timer ble virusløsning sugd av, og cellene fikk tilført nytt vekstmedium tilsatt 10 % FBS. Celler ble høstet ved t0 (17 timer etter infeksjon), 8 og 20 dager etter infeksjon (dpi), i henhold til forsøksoppsett vist i Figur 10. Halvparten av dyrkingsmediet (supernatant) ble høstet uten lysisbuffer, for en eventuell senere infeksjon av nye celler.

Infeksjonsforsøk – 3.

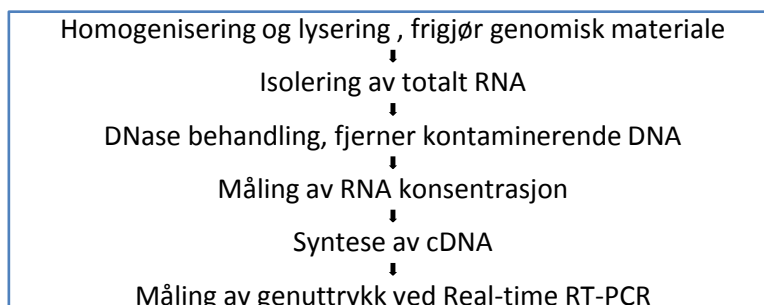
Infeksjonsforsøk 3 ble utført på celler isolert fra atrium, på brett pre-coatet med laminin. Kulturen var 4 dager ved start av forsøket, og inneholdt en blanding av myocytter, epitel- og endotelceller. Kulturen var tett, og det var lite/ingen forurensing av røde blodceller. Illustrasjon av infeksjonsforsøk 3, er vist i Figur 10.

Cellene ble vasket med L-15 (uten tilsetninger) for å fjerne celledbris og non-adherente celler før infeksjonsstart. 5 % virushomogenat (HL) ble fortynnet i dyrkingsmedium uten FBS til 2 % homogenat, og tilsatt nøytraliserende antistoff mot IPNV i sluttfortyning 1:1000. Cellene ble infisert med 0,5 ml homogenat pr. brønn. For at kontrollceller skulle få mest mulig lik behandling, ble kontrollbrønner tilsatt 0,5 ml 2 % hjertehomogenat tillaget på samme måte som virushomogenatet, men av klinisk frisk fisk. 6 brønner ble infisert med hjertehomogenat som i tillegg ble tilsatt 10 µg/ml trypsin, for å prøve å øke opptaket av viruset i cellene. Trypsinløsning ble tilsatt like før homogenatet ble tilført cellene. Celler infisert med homogenat tilsatt trypsin ble inkubert i 2 timer før homogenatet ble sugd av. Cellene ble vasket med L-15 (uten tilsetninger) og det ble tilsatt 1 ml vekstmedium med 5 % FBS pr. brønn. De resterende brønner ble inkubert i 13 timer, før homogenat ble sugd av og cellene ble tilført 1 ml vekstmedium med 5 % FBS. I 4 av brønnene ble homogenatet ikke sugd av, disse brønnene ble tilsatt 0,5 ml vekstmedium med 10 % FBS. Celler ble høstet ved t0 (2 timer etter infeksjon med trypsin, og 13 timer etter infeksjon), 8 dpi, 15 dpi i henhold til infeksjonsoppsett vist i Figur 10.

2.4 Deteksjon av virus ved bruk av Real-Time revers transkriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR).

Real-time polymerase chain reaction (PCR) er et av de mest brukte verktøyene innen molekylærbiologi for deteksjon og kvantifisering av DNA eller RNA, og baseres på bruk av

det varmestabile enzymet DNA polymerase [105]. I denne oppgaven ble PRV (RNA) detektert ved kvantitativ (real-time) revers transkriptase (RT) polymerase kjedereaksjon (PCR). Teknologien baserer seg på flere trinn, illustrert i Flytdiagram 2. Prosedyre for de ulike trinnene er beskrevet i hvert sitt underkapittel.



Flytdiagram 2: Ulike trinn som inngår i prosessen ved real-time RT-PCR

2.4.1 Homogenisering og lysering.

Vev blir homogenisert og lysert i lyseringsbuffer. Lyseringsbuffer kan generelt deles inn i to hovedtyper; skånsom og kraftig lysisbuffer, hvor en skånsom lysisbuffer lyserer plasmamembran og de fleste subcellulære organeller, men ikke kjernen av cellen. Kraftig lyseringsbuffer inneholder guanidinium, og gir isolering av totalt RNA – både nukleært og cytoplasmisk RNA. Ved å tilsette β -mercaptoethanol i bufferen, er det mulig å øke effektiviteten på protein denaturering og redusere innhold av RNaser [106]. I dette forsøket ble det brukt lyseringsbuffer som inneholder guanidinium for isolering av totalt RNA.

In vivo infeksjonsforsøk:

Ca. 20 mg hjertevev ble tilsatt 1 ml Nucleic Acid Purification lysis solution (Applied biosystem) som var fortynnet med PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} (Biochrom) til 1x løsning. Prøvene ble homogenisert i MagNa lyser green beads rør i MagNa lyser instrument (Roche) ved 5×10 sekunder homogenisering ved 7000 rpm, med 2 minutter avkjøling på is mellom hver homogeniseringsrunde. Prøvene ble fryst ved -80 °C inntil RNA isolering (øker RNA utbyttet).

In vitro infeksjonsforsøk

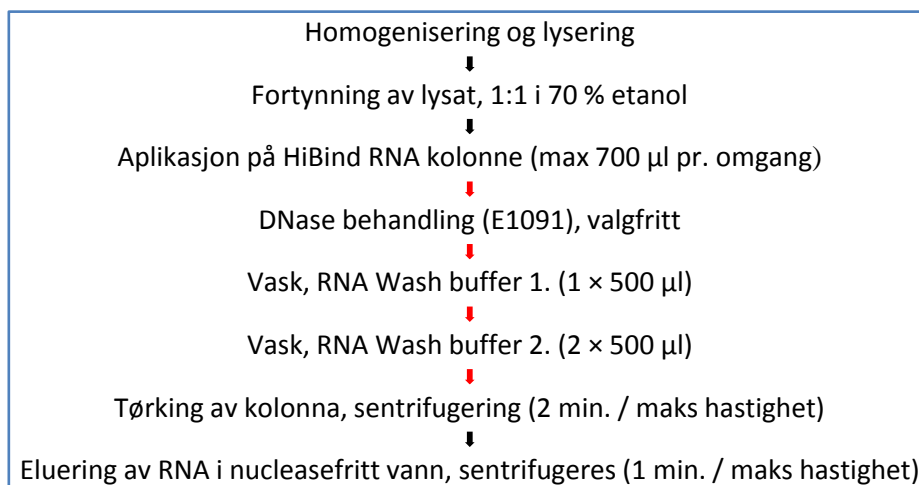
Prøver fra infeksjonsforsøk med PRV i hjerte og CHH-1 celler ble lysert i TRK lysisbuffer (Omega bio-tek), tilsatt 2-mercaptoetanol (20 $\mu\text{l/ml}$) før bruk. Det ble tilsatt 700 μl lysisbuffer pr. ml. supernatant (medium). Adherente celler ble lysert direkte i brønn ved å tilsette 350 μl

lysisbuffer pr. brønn. Supernatant og celler ble høstet separat, og parallelle brønner ble slått sammen. Høstinger ble fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil RNA isolering.

2.4.2 Isolering av RNA

Kommersielt finnes det mange forskjellige tilgjengelige kit for rensing av DNA og/eller RNA. Kittene er ofte basert på et affinitetsprinsipp, hvor nukleinsyrer bindes til en fast fase. Det mest brukte materialet for nukleinsyrebinding er silica-baserte partikler som silica filter og silica coatede magnetiske kuler [107]. Ved høye saltkonsentrasjoner har nukleinsyrer en sterk bindingsaffinitet for silicafilter. Ved å spinne lysatet gjennom et silicafilter vil nukleinsyrer feste seg, mens komponenter i lysisbuffer og andre cellulære makromolekyler vaskes bort [106].

Vevsprøver ble planlagt isolert på RNA rensesmaskin (ABI Prism 6100, Applied Biosystems), men grunnet problemer med metodikk ble disse prøvene i stedet isolert ved bruk av E.Z.N.A. total RNA-kit 1 (Omega bio-tek). Prinsipp og hovedtrekk i E.Z.N.A. RNA isoleringsprotokoll er gitt i Flytdiagram 3. RNA ble oppbevart på is, og lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Flytdiagram 3: Hovedtrekk av protokoll for isolering av RNA med E.Z.N.A. kit (Omega bio-tek) Rød pil indikerer nedspinning ved $10\ 000 \times g$ / 60 sek. / romtemperatur.

In vivo forsøk

Rensing av RNA fra hjertevev ble utført med modifisert protokoll. 300µl lysat ble tilsatt 6 µl 2-mercaptoetanol (Merck) og fortynnet i 400 µl vann før applisering på kolonne. Resterende

trinn ble utført i henhold til produsentens anbefalinger inkludert trinnet med DNase behandling.

In vitro forsøk

Isolering av RNA fra PRV infeksjonsforsøk i CHH-1 og hjerteceller forsøk 1 og 2, ble utført i henhold til produsentens protokoll, med følgende modifiseringer. Lysering og vaskebuffer ble spunnet ned ved 10 000 rpm (Jouan A14 sentrifuge) i 30 sek. Kolonnen ble tørket ved 6000 rpm (Jouan A14 sentrifuge) i 30 sek. RNA ble eluert ut ved å sentrifugere kolonnen på 13 000 rpm i 60 sek (Eppendorf centrifuge 4516C). Isolering av RNA fra PRV infeksjonsforsøk 3 ble utført etter protokoll anbefalt av produsent.

2.4.3 DNase behandling.

I en RNA isoleringsprosess er det vanlig å inkludere et trinn med DNasebehandling for å fjerne eventuelt kontaminerende genomisk DNA som kan gi et falskt positivt RT-PCR resultat [107]. Ved isolering av RNA fra vevsprøver og PRV hjertecelleinfeksjonsforsøk 3, ble prøvene DNasebehandlet i et trinn inkludert i RNA isoleringsprosessen fra E.Z.N.A. med RNase Free DNase Set (E1091) som beskrevet av produsent. RNA isolert fra infeksjonsforsøk med PRV i CHH-1 og hjerteceller (forsøk 1 og 2), ble DNase behandlet med Turbo DNase kit (Ambion) i henhold til produsentens anbefalinger.

2.4.4 Måling av RNA konsentrasjon

Utbytte og renhet av ekstraherte nukleinsyrer kan måles ved bruk av UV spektrofotometri. RNA har spesifikk absorpsjonskoeffisient på $0,025 \mu\text{g} / \text{ml} / \text{cm}$, ved 260 nm. Absorpsjonsraten 260 / 280 nm er en indikator på renheten i prøven, da protein og phenol har maksimum absorpsjon ved 280 nm. Absorpsjonsratio mellom 1,9 – 2,0 indikerer RNA med høy renhet [107]. RNA-konsentrasjon ble målt med NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Saveen Werner) eller NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo scientific)

2.4.5 Syntese av cDNA

RNA er ikke et egnet mål molekyl for DNA polymerase og må derfor omgjøres til enkelttrådet komplementært / copy DNA (cDNA) før det kan amplifiseres i en PCR reaksjon. Dette gjøres ved bruk av et revers transcriptase (RT) enzym. Ved bruk av uspesifikke random hexanucleotide eller decanucleotide primere, er det mulig å konvertere alt RNA i prøven til

cDNA, og en vil senere kunne analysere prøven for tilstedeværelse av ulike transkripter. Oligo-dT er en primer som brukes for å revers transkribere messenger RNA (mRNA) med poly-A hale [107].

High capacity RNA to cDNA mastermix (Applied biosystems)

Kittet ble brukt ved syntese av cDNA fra infeksjonsforsøk med PRV i CHH-1 og hjerteceller forsøk 1 og 2. Kittet inneholder en ferdig mastermix, og baserer seg på bruk av tilfeldige primere som startpunkt for syntesen. Reaksjonen ble utført i 20 µl reaksjoner i henhold til produsentens anbefalinger. Det ble i tillegg tilsatt 1 µl Oligo dT (Roche) pr. reaksjon. RNA ble fortynnet i nucleasfritt vann til å inneholde lik mengde input for hver prøve. Det ble brukt 500 ng RNA pr. reaksjon fra CHH-1 celler og 400 ng RNA pr. reaksjon fra hjerteceller. RNA isolert fra supernatant av hjerteceller, var ikke konsentrert nok til å oppnå ønsket mengde RNA input i syntesen og det ble da tilsatt maks volum (15 µl) uforynna RNA i syntesen. Reaksjonen ble inkubert i PCR maskin 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems), programmert til følgende sykluser vist i Tabell 5.

Tabell 5: Program på PCR maskin ved syntese av cDNA med High capacity RNA to cDNA mastermix (Applied biosystems)

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatur (°C)	25	42	85	4
Tid (minutter)	5	60	5	∞

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)

High capacity RNA to cDNA mastermix gikk ut av produksjon og ble erstattet av kittet High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit som baseres på de samme ingredienser, men det må blandes manuelt. Kittet ble brukt ved syntese av cDNA fra infeksjonsforsøk med PRV i hjerteceller forsøk 1 og 2. Reaksjonen ble kjørt i 25 µl reaksjoner. Mastermix (10µl pr. reaksjon) ble modifisert til å inneholde:

2,50 µl 10x reverse transcription buffer
 1,00 µl 25x dNTP's
 2,50 µl 10x random primers
 1,25 µl Multiscribe revers transcriptase
 1,75 µl Nucleasfree H₂O
 1,00 µl Oligo dT

RNA ble fortynnet i nucleasefritt vann til å inneholde 400 ng RNA input pr. reaksjon (så mye som mulig fra supernatant). Reaksjonen ble kjørt PCR maskin 2720 Thermal cyclers (Applied Biosystems) programmert til følgende sykluser vist i Tabell 6.

Tabell 6: Program på PCR maskin ved cDNA syntese med High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Tid (minutter)	10	120	5	∞

SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen)

Kittet er utviklet for å gi økt utbytte av cDNA og en bedre utførelse av real-time assayet. [108] Grunnet problemer ved tolking av resultater fra PRV infeksjonsforsøk 1 og 2, ble det laget nytt cDNA fra forsøkene med dette kittet. SuperScript VILO cDNA synthesis kit ble også benyttet ved syntese av cDNA fra vevsprøver (*in vivo* forsøk), hjertecelle infeksjonsforsøk 3, og ved tillaging av positiv kontroll for PRV.

cDNA syntese ble utført i henhold til protokoll beskrevet av produsent. Det ble brukt 100 ng RNA input i reaksjon for prøver av hjertecelle infeksjonsforsøk 1 og 2, og 400 ng RNA input for prøver av infeksjonsforsøk 3. cDNA til positiv kontroll for PRV ble tillaget av RNA som var isolert fra hjerte til fisk infisert med PRV-positivt homogenat (KK) ved et tidligere forsøk utført ved Nofima. Ved tillaging av positiv kontroll ble cDNA syntesen oppskalert til 100 µl reaksjon, med 5000 ng RNA input. Prøvene ble inkubert i PCR maskin 2720 Thermal cyclers (Applied Biosystems), programmert som vist i Tabell 7.

Tabell 7: Program på PCR maskin ved syntese av cDNA med SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen)

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatur (°C)	25	42	85	4
Tid (minutter)	10	60	5	∞

Etter syntesen ble cDNA fortynnet 1:10 i nukleasefritt vann til en stock-løsning. cDNA ble videre fortynnet til bruksløsning 1:30, for å redusere effekten av stoffer i løsningen som kan hemme PCR reaksjonen. cDNA ble oppbevart fryst ved -20 °C, eller ved kortere tidsrom (inntil 1 uke) i kjøleskap på is.

2.4.6 Real-time RT-PCR.

Polymerase chain reaction (PCR) er en teknologi som muliggjør amplifisering av en spesifikk sekvens DNA eller et cDNA templat, ved å bruke et varmestabilt enzym (DNA polymerase), sekvensspesifikke oligonukleotider (primere) og thermal cycling (oppvarming og nedkjøling i PCR-maskin). En Real-time PCR syklus er inndelt i 3 trinn:

1. Denaturering – Høy inkubasjonstemperatur smelter DNA dobbeltråd til enkeltrådig DNA.
2. Annealing – Komplementære primere hybridiserer.
3. Extension – DNA polymerase binder til primere bundet til templatet og syntetiserer ny komplementær DNA tråd.

I real-time PCR blir mengden DNA målt etter hver syklus. En måte å gjøre dette på er ved bruk av en fluoriserende markør som bindes til dobbeltrådig DNA. SYBR-green er et eksempel på en slik markør. Mengden fluoriserende signal vil øke proporsjonalt etter hvert som mengden PCR produkt (amplikon) blir generert. Ved å plote fluorescens mot syklustrinn kan man si noe om akkumulering av produkt i reaksjonen og dermed oppnå kvantitativ informasjon om startmaterialet (amplifikasjons target). De første syklusene av PCR reaksjonen viser liten forandring i fluorescerende signal, og refereres til som bakgrunnsstøy for reaksjonen. Amplifikasjonssignalet vil øke direkte proporsjonalt med mengden PCR produkt som genereres. For å eliminere påvirkning av bakgrunnsstøy, settes en baseline som utelater tidlige sykluser i reaksjonen, og det bestemmes en terskelverdi (Threshold) der amplifikasjonsnivået øker signifikant over bakgrunnsnivået. Threshold cycle (Ct) indikerer den syklusen hvor amplifikasjonssignalet krysser terskelverdien for reaksjonen. Ct verdien sier noe om mengden DNA i reaksjonen. En lav Ct verdi indikerer en større mengde starttemplat, sammenlignet med en høy Ct verdi. Uspesifikke produkter eller dannelsen av primer-dimer kan detekteres ved smeltepunktanalyse. Smeltepunktanalysen gjøres når amplifikasjonen er ferdig ved at produktet sakte varmes opp til smeltepunktet for dobbeltrådig DNA, og mengden fluoriserende signal registreres. Et smeltepunkt for mål-gen skal ha en spesifikk smeltepunktstemperatur, og indikeres med en smal og symmetrisk kurve. Formasjon av primer-dimer kjennetegnes ofte ved å ha et lavere smeltepunkt [105].

Oppsett av real-time PCR reaksjon

Real-time analyse ble kjørt i Realtime-maskin fra Applied Biosystems (7900 HT Fast Real-Time PCR system) i 384-brønners brett (Ambion) med 2 paralleller for hver reaksjon. I hver brønn ble det tilsatt totalt reaksjonsvolum 20 µl, som besto av 10 µl Power SYBR Green PCR Mastermix (Applied biosystem), 8 µl bruksløsning cDNA, og 0,6 µl (300 nM) av forward og revers primer for hvert gen. Primer PRV-L1_1 ble brukt for kvantifikasjon og deteksjon av PRV og eEF1α ble brukt som referanseggen for normalisering av genuttrykk. Primersekvenser er gitt i appendiks 6.8. For å verifisere at real-time assayet fungerte, ble det analysert en positiv kontroll ved hvert oppsett. Nukleasefritt vann ble benyttet som negativ kontroll, og det ble tilsatt en non-templat kontroll av isolert RNA som ikke var konvertert til cDNA, for å kontrollere eventuell tilstedeværelse av genomisk DNA. Reaksjonen ble amplifisert ved betingelser gitt i Tabell 8.

Tabell 8: PCR program for amplifisering av cDNA.

	Step 1	Step 2 (repeteres i 40 sykluser)		Step 3 (smeltepunktsskurve)		
Temperatur (°C)	95	95	60	95	60	95
Tid	10 min	15 sek	1 min	15 sek	15 sek	15 sek

Standardkurve for testing av PRV-primere

Amplifikasjonseffektivitet (E) av PRV-primere brukt i forsøket ble testet ved å lage en standardkurve. Det ble laget 2 stk 2-folds fortyningsserier av cDNA med stock-løsning 1/10 som utgangspunkt, totalt 11 fortyninger. Hvert primersett ble brukt i de to fortyningsseriene, med 3-parallele prøver for hver reaksjon. Ulike primerkonsentrasjoner ble testet ved å tilsette 300 nM og 500 nM av forward/reverse primer for hvert gen i hver reaksjon. Standardkurve ble laget ved å plote Ct-verdi mot fortyning. Stigningstallet (slope) for standardkurven ble brukt til å kalkulere amplifikasjonseffektivitet (E), ved å bruke formelen: $E = 10^{(-1/slope)}$. Amplifikasjonseffektivitet er ofte oppgitt i prosent (% E = (E - 1) × 100 %). % E verdi fra 90 – 105, indikerer en god primereffektivitet. Lavere verdi indikerer ofte dårlig primerdesign, mens høyere % E verdier indikerer pipetteringsfeil, co-amplifikasjon eller tilstedeværelse av primer-dimer [109].

Analyse av data

Resultatene fra real-time RT-PCR reaksjonene ble analysert med SDS 2.3 software (Applied Biosystem). Threshold ble justert manuelt og ikke-amplifiserte prøver og prøver med feil

smeltepunkt ble fjernet fra analysen. Ct verdier ble overført i Excel for fremstilling av resultater. Statistisk behandling av data, og tillaging av box-plot ble utført i programmet minitab 16.

3 Resultater

3.1 Standardkurve og testing av PRV primere.

Standardkurve og utregning av primereffektivitet er vist i appendiks 6.9. Primer PRV L1-1 hadde en effektivitet på 96 % og ble godkjent til bruk i real-time RT-PCR. Primer PRV L1-2 og PRV L1-3 dannet primer-dimer, og ble derfor ikke brukt videre i forsøket.

3.2 Effekt av vaksinerings og IPNV på utvikling av HSMB.

3.2.1 Observasjoner av fisk.

Det ble observert forskjeller mellom vaksinerte og uvaksinerte fiskegrupper. Vaksinert fisk hadde tydelig sammenvoksinger og melanisering av organpakke (Figur 11). Disse observasjonene ble mer fremtredende med økende alder og størrelse på fisken. 9 uker etter smitte med IPNV ble det tatt snittvekt av uvaksinert fiskegruppe. Usmitta kontrollfisk var 37,1 gram (n = 8), mens IPNV infisert fisk var 6 g mindre, med snittvekt 31,4 gram (n = 8). Hos enkelte fisk, ble det gjort observasjoner som kan tyde på patologiske forandringer forenelig med sykdommene IPN og HSMB. Av IPNV infisert fisk ble det observert enkeltindivider med blødninger / petecchier i fettvev og misfarget lever i perioden før sjøsetting. Fra 3 uker etter infeksjon med HSMB, ble det observert enkelte fisk som hadde en utposning med væskeansamling på ventrikkelspiss (Figur 12). Totalt sett var det ingen prøveuttakstidspunkt eller fiskegrupper som skilte seg ut og som indikerte patologiske forskjeller mellom fiskegruppene. Det ble ikke observert sykdomstegn i uinfisert kontrollfisk.



Figur 11: Adheranser og melanisering i organpakke av vaksinert fisk. (Foto er tatt i forsøkets uke 01, 17 uker etter vaksinerings)



Figur 12: Hjerter fra fisk med HSMB, væskeutposning ved ventrikkel er indikert med pil.

3.2.2 Utvikling av primær infeksjon med IPNV.

Det ble ikke registrert noen dødelighet som følge av infeksjon med IPNV. Oversikt av de ulike gruppene som inngår i forsøket er gitt i Figur 3, side 22. Ved prøveuttak 2 uker etter smitte, ble all fisk smittet med IPNV funnet positiv for IPNV (Tabell 9). En fisk skilte seg ut med virusinnhold på over 800 000 infeksjøs enheter (i.e.) per gr. vev. Ved prøveuttak 6 uker etter smitte (2 uker etter vaksinerings) ble det fortsatt detektert virus i fisken, med størst andel IPNV i uvaksinert fisk. Fra 12 uker etter smitte er det registrert en kraftig nedgang i andelen IPNV positive fisk hvor det kun ble detektert enkeltindivider med lave titer av IPNV. Det ble ikke registrert noen økning i virusmengde i fisken etter sjøsetting (målt 3 uker etter overføring til sjøvann og 15 uker etter infeksjon), og det har dermed ikke oppstått en reaktivering av IPNV infeksjonen. Det ble ikke detektert virus i prøver tatt av uvaksinert fisk som var smittet med IPNV alene i perioden etter sjøsetting (Tabell 9). IPNV ble ikke detektert i prøver fra usmitta kontrollfisk.

Ved titrering av nyrehomogenat, oppsto det problemer med at cellelaget løsnet i brønner med laveste fortykning av homogenatet (rad A). Utvalgte prøver testet IPNV-negativ ved bruk av nøytralisasjonstest, noe som indikerte at celleløsning var forårsaket av cytotoxisk effekt. For å utelukke risiko for feil avlesning av titreringene, ble det bestemt å unnlate avlesing i rad A. Prøver tatt 6 og 12 uker etter IPNV smitte har deteksjonsnivå 818,5 i.e. / gram vev. Prøver fra uke 15 – 22 etter smitte har deteksjonsgrense 330 i.e. / gram vev.

Resultater

Tabell 9: IPNV titer (infeksiøse enheter (i.e.) per gr vev) i hodenyre av laks 2 – 21 uker etter badsmitte med IPNV. (-) indikerer viruskonsentrasjon under deteksjonsnivå. Deteksjonsgrensen var 81,8 i.e. per gr vev 2 uker etter infeksjon, 818 i.e. per gr vev 6-12 uker etter infeksjon, og 330 i.e. per gr vev 15-22 uker etter infeksjon. (x) indikerer grupper/prøver som ikke eksisterer. Oversikt av prøveuttaksplan for forsøket er vist i Figur 3, side 22.

Gruppe/ Fisk nr.	Uker etter smitte med IPNV:					
	<i>Ferskvann</i>			<i>Sjøvann</i>		
	2	6	12	15	19	22
Før vaksinerings						
1	818.5	x	x	x	x	x
2	820000	x	x	x	x	x
3	553	x	x	x	x	x
4	553	x	x	x	x	x
5	553	x	x	x	x	x
6	1750	x	x	x	x	x
7	1750	x	x	x	x	x
8	553	x	x	x	x	x
Vaksinert						
1	x	-	818.5	-	-	-
2	x	-	-	700	-	-
3	x	1183	-	-	470	-
4	x	-	-	-	-	700
5	x	818.5	-	-	-	-
6	x	-	-	-	-	-
7	x	8185.4	-	x	x	x
8	x	-	-	x	x	x
Uvaksinert						
1	x	-	-	-	-	-
2	x	55340	-	-	-	-
3	x	17500	-	-	-	-
4	x	17500	1750	-	-	-
5	x	-	-	-	-	-
6	x	5534	-	-	-	-
7	x	-	-	x	x	x
8	x	-	-	x	x	x
Vaks. + HSMB						
1	x	x	x	-	-	330
2	x	x	x	-	-	-
3	x	x	x	-	-	-
4	x	x	x	-	-	-
5	x	x	x	-	-	-
6	x	x	x	-	-	-
Uvaks. + HSMB						
1	x	x	x	-	-	-
2	x	x	x	-	330	-
3	x	x	x	-	-	-
4	x	x	x	-	700	330
5	x	x	x	-	-	-
6	x	x	x	327	-	-

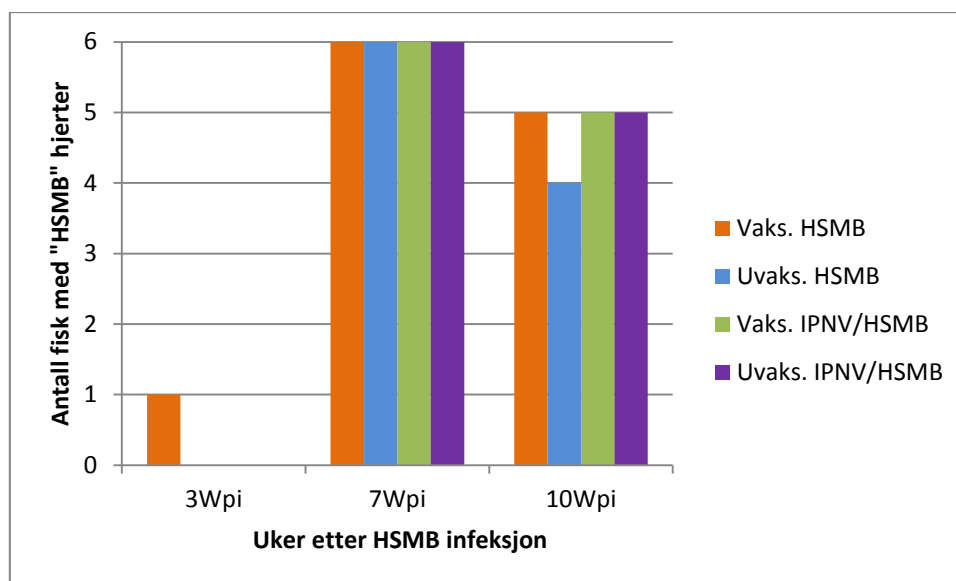
Mange av prøvene inneholdt for lave viruskonsentrasjoner til at dette var registrerbart med den deteksjonsgrense som testen hadde. Statistisk analyse ved bruk av T-test og Mann-

Whitney test av vaksinert og uvaksinert gruppe 6 uker etter infeksjon, påviste ikke signifikante forskjeller i virusmengder mellom gruppene. Ved senere prøveuttakstidspunkt var det for få prøver med IPNV over deteksjonsnivå, og en har derfor ikke nok data til å utføre statistiske analyser på disse gruppene.

3.2.3 Utvikling av sekundær infeksjon med HSMB.

Histopatologi

Histopatologisk undersøkelse av 6 fisk per gruppe hhv 3, 7 og 10 uker etter HSMB smitte, påviste peritonitt (bukhinnebetennelse) i alle vaksinerte fiskegrupper. Patologiske forandringer i hjertet ble ikke påvist hos usmittet kontrollfisk. På første uttakstidspunkt 3 uker etter smitte ble det diagnostisert 1 fisk med HSMB lignende epikarditt (Figur 13). 7 uker etter smitte ble all smittet fisk diagnostisert med HSMB, mens 10 uker etter smitte var antall fisk med HSMB-patologi i hjertet gått noe ned.



Figur 13: Antall fisk i hvert prøveuttak som histopatologisk ble diagnostisert med HSMB. Det ble totalt undersøkt 6 fisk fra hver gruppe på hvert tidspunkt. (Vaks. = vaksinert. IPNV/HSMB = smittet med både IPNV og HSMB)

Med unntak av vaksinert fisk smittet med både IPNV og HSMB, ble det utført immunhistokjemi på hjerteprøver fra alle HSMB smittede fiskegrupper. PRV ble ikke detektert med denne metoden før 7 uker etter smitte og da var alle prøver var positive (Tabell 10). Det ble detektert 2 PRV-positive fisk 10 uker etter smitte med HSMB.

Resultater

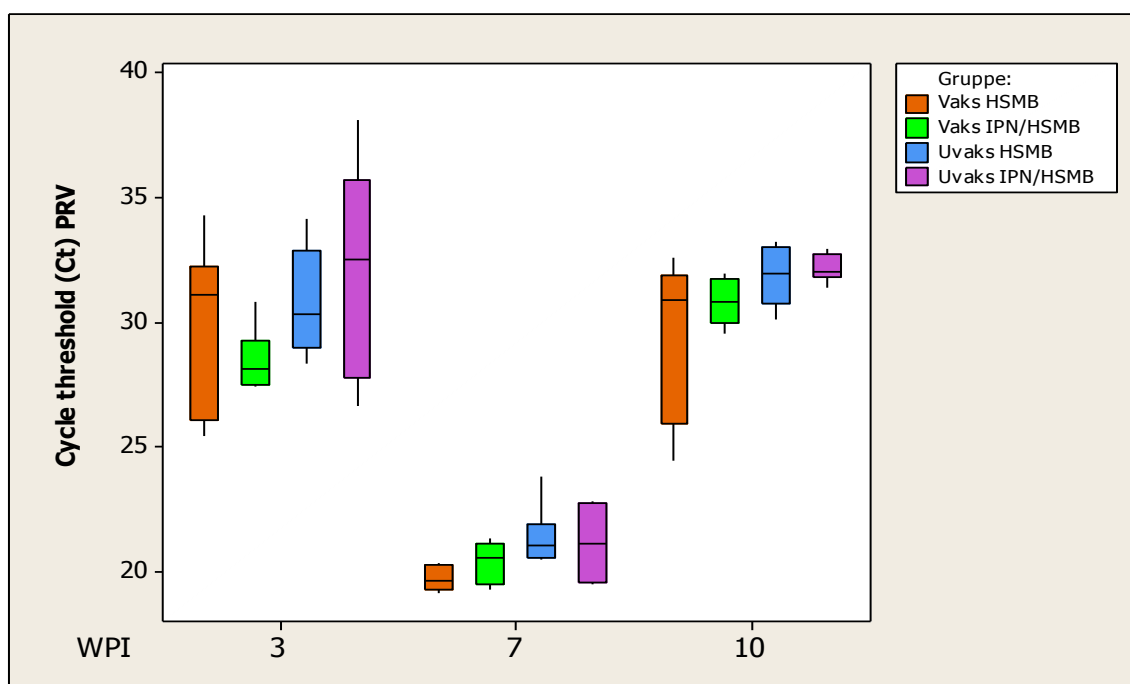
Tabell 10: Immunhistokjemisk påvisning av PRV i hjerteprøver fra fisk med HSMB. Antall PRV positive fisk / antall undersøkt. (x) indikerer prøver som ikke har blitt analysert.

Prøveuttak-tidspunkt	Vaksinert HSMB	Uvaksinert HSMB	Vaksinert IPNV/HSMB	Uvaksinert IPNV/HSMB
3wpi	0/6	0/6	x	0/6
7wpi	6/6	6/6	x	6/6
10wpi	2/6	0/5*	x	0/6

*Kun 5 av 6 fisk undersøkt.

Kvantitativ påvisning av PRV ved bruk av Real-time RT-PCR.

Virusdeteksjon ved bruk av real-time RT-PCR påviste PRV i alle HSMB smittede fiskegrupper (Figur 14). Det ble ikke detektert PRV i usmittet kontrollfisk. Genuttrykk av referansegnet viste jevne verdier og maksimum og minimum Ct verdi som ble påvist, avvek ikke mer enn 0,8 Ct verdier fra gjennomsnittlig Ct verdi. Grunnet dette ble det ikke ansett nødvendig å normalisere Ct verdier mot referansegnet for å oppnå korrekt presentasjon av data (I henhold til tidligere studier med HSMB / PRV [67]). Ct verdiene for prøvene er vist i box-plot, da dette gir en god indikasjon på nivå og spredning av verdiene. Det ble detektert PRV i alle fiskegrupper ved alle prøveuttak. Størst virusmengder (lavest Ct verdi) ble påvist 7 uker etter smitte. 10 uker etter smitte er det en generell nedgang i virusinnhold i alle fiskegrupper.



Figur 14: Box-plot av Cycle threshold (Ct) verdier for PRV detektert i HSMB smittede fiskegrupper hhv 3, 7 og 10 uker etter smitte. Horizontal linje indikerer median, boks indikerer kvartil-verdier. Maksimum og minimumsverdier er indikert ved vertikale barer. N=6. (Forklaringsboks indikerer om fisken er vaksinert (vaks) eller uvaksinert (uvaks), samt sykdom)

Av prøver tatt 7 uker etter infeksjon, ble det påvist signifikante forskjeller i mengde PRV mellom vaksinert og uvaksinert fiskegruppe smittet kun med HSMB. I prøver tatt 10 uker etter infeksjon, ble det påvist signifikante forskjeller i mengde PRV mellom vaksinert og uvaksinert fisk som var smittet både med IPNV og HSMB. Det ble det detektert et høyere virusinnhold av PRV i de vaksinerte fiskegruppene, sammenlignet med uvaksinerte fiskegrupper. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom de andre fiskegruppene innen samme uttakstidspunkt.

3.3 Etablering av primærkultur av hjerteceller for dyrking av PRV *in vitro*.

3.3.1 Etablering av primærcellekultur fra hjerte til Atlantisk laks.

Celleutbytte

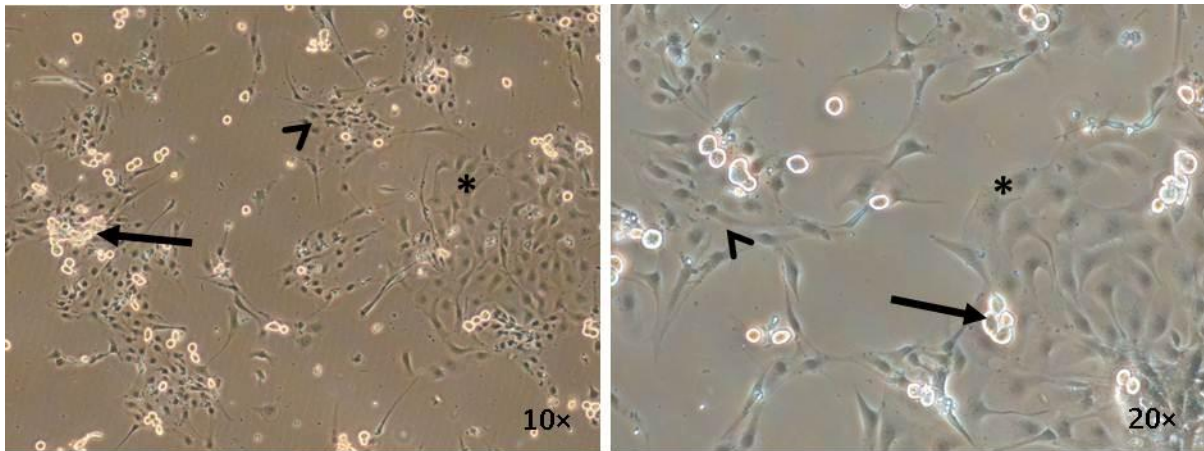
Målinger gjort med automatisk celleteller var ikke troverdige sammenlignet med manuell telling i tellekammer. Dette ble oppdaget ved celleuttak 4 da de to målemetodene ble sammenlignet. Den automatiske celletelleren overestimerte antall celler da forurensing av rusk og fragmenter i kulturen, samt røde blodceller trolig ble registrert og telt med. Grunnet dette er resultater fra telling med automatisk celleteller ikke tatt med. Ved uttak 4 ble celleutbyttet beregnet til å være $2,9 \times 10^7$ celler fra atrium og $5,88 \times 10^6$ celler fra ventrikkel ved manuell telling i tellekammer (Atrium: $4,3 \times 10^6$ celler pr. kg kroppsvekt, ventrikkel: $8,75 \times 10^5$ celler pr. kg kroppsvekt, snittvekt fisk: 960 gram, $n = 7$).

Observasjoner av kulturene indikerte størst celleutbytte fra atrium etter 20 og 30 minutter collagenasebehandling. Det var generelt lavt celleutbytte fra ventrikkel og få celler festet seg i kolben. I uttak 4 ble det bruk en kraftigere collagenase (Liberase TH reasearch grade), noe som ga bedre celleutbytte fra ventrikkel sammenlignet med bruk av Liberase TM.

Celletyper

Celletyper ble identifisert i henhold til beskrivelse i Koren et al [104]. Ut i fra dette var det hovedsakelig 3 celletyper som dominerte kulturene: myocytter, endotel- og epitelceller. De ulike celletypene er angitt i Figur 15. Myocytter ble identifisert som store, lyse, opprunda celler. De brukte lengst tid på å feste seg og lå ofte over andre celler. Endotelceller er mørke,

grå, definerte celler mindre enn myocytter. Epitelceller var av lik størrelse, men med et mer diffust utseende og svakere kontrast sammenlignet med endotelceller.



Figur 15: Celler isolert fra atrium etter 40 min collagenasebehandling i Primariakolbe. Foto er tatt 4 dager etter uttak. Ulike celletyper er indikert med: Pil = myocytter. Spiss = endotelceller. Stjerne = epitelceller.

De få cellene som ble isolert fra ventrikkel var stort sett av samme type som atrium, men det ble i tillegg observert noen langstrakte celler som ikke ble identifisert og navngitt. Fra atrium og ventrikkel ble det gjort spredte observasjoner av en lang og tynn celletype («spindelceller») som strekte seg ut fra vevsbiter og uoppløste celleklumper som hadde blitt med kulturen.

Dyrkningssubstrat

Laminin var den pre-coatingen som så ut til å fungere best, da en stor andel celler etablerte seg raskt på dette substratet og cellene hadde lang levetid i kultur. Det var i tillegg et godt utbytte og lang levetid på celler sådd ut på brett coatet med fibronektin. Det etablerte seg færrest celler på brett coatet med amine. En god del celler festet seg ved utsæd i primariakolber, men observasjoner viste at cellene brukte lengre tid på å feste seg på dette dyrkningssubstratet. Ved observasjon 1 dag etter uttak var det tilsynelatende ingen celler som hadde festet seg på primariakolber, men etter 3 dager ble det observert adherente celler. Det ble likevel vist at celler kan festet på primaria i løpet av 24 timer dersom celler blir sådd ut i høy konsentrasjon (Dette ble vist ved celleuttak 2, beskrevet i neste avsnitt) Det ble også gjort observasjoner som indikerte at myocytter hadde vanskeligere for å feste seg og løsnet raskere på primariakolber, sammenlignet med brett pre-coatede med laminin. Endotel- og epitelceller hadde lang levetid i kultur og så ut til å trives godt i primariakolber.

Panning

Panning av celler på bovint serumalbumin hadde ingen hensikt, da det ikke ble observert noen adherente celler etter 30 min panning.

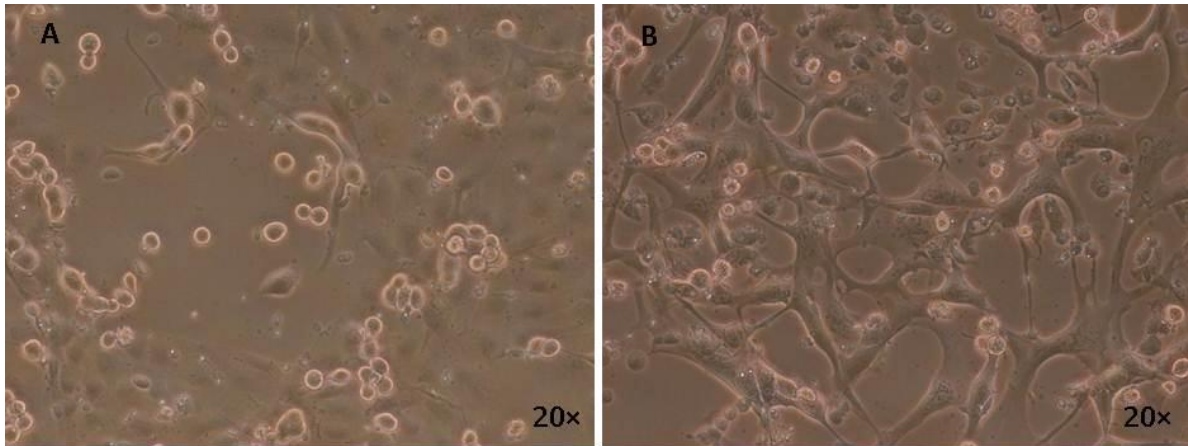
Ved celleuttak 2 ble celler forsøkt sådd ut i høy konsentrasjon på primariakolber. 24 timer etter utsæd ble cellene forsiktig overført til brett coatet med laminin, og de utviklet seg til fine kulturer dominert av myocytter.

Vask

Celler isolert fra atrium brukte ca. 1 døgn på å feste seg på brett coatet med laminin. Det ble observert godt celleutbytte etter vask ved 18, 24 og 42 timer etter utsæd. Det var antatt at endo- og epitelceller fester seg raskere på plasten sammenlignet med myocytter [104], noe som ble bekreftet ved observasjon i dette studiet. I forbindelse med vasking ble non-adherente celler overført til nye brønner, men disse ble sjeldent fine eller vellykkede kulturer. Mange av de overførte cellene festet seg ikke, og av de adherente cellene ble det i enkelte tilfeller observert indikasjoner på kontaminering av bakterier. Myocytterne som festet seg utviklet et ruglete utseende og endo- og epitelceller ble ofte opprunda som indikerte at de var døde - døende.

Utvikling av kulturene over tid

Etter noen dager i kultur ble det oppdaget kontraksjoner i enkelte myocytter. Myocytterne forandret gradvis morfologi og ble mer utstrakt. Etter ca. 10 dager i kultur ble det gjort tydelige observasjoner som indikerte at myocytterne hadde festet seg til bunnen, til endotelceller og andre myocytter. Enkelte celler utviklet forgreninger, noe som ble mer tydelig med økende alder (Figur 16). Etter ca. 20 dager i kultur hadde myocytterne dannet et «myocyttnettverk» med forgreninger mot andre myocytter. Cellene så ut til å være koblet sammen, og det ble observert jevnlig og synkrone kontraksjoner flere steder i myocyttnettverket. Løse eller opprunda myocytter som ikke fulgte dette vekstmønstret ble ofte stygge og knudrete av utseende og antatt døende. Etter 32 dager i kultur var det meste av endo- og epitelceller løsnet (i brett pre-coatet med laminin) og kunne observeres som opprunda, vakuoliserte celler (Figur 16).

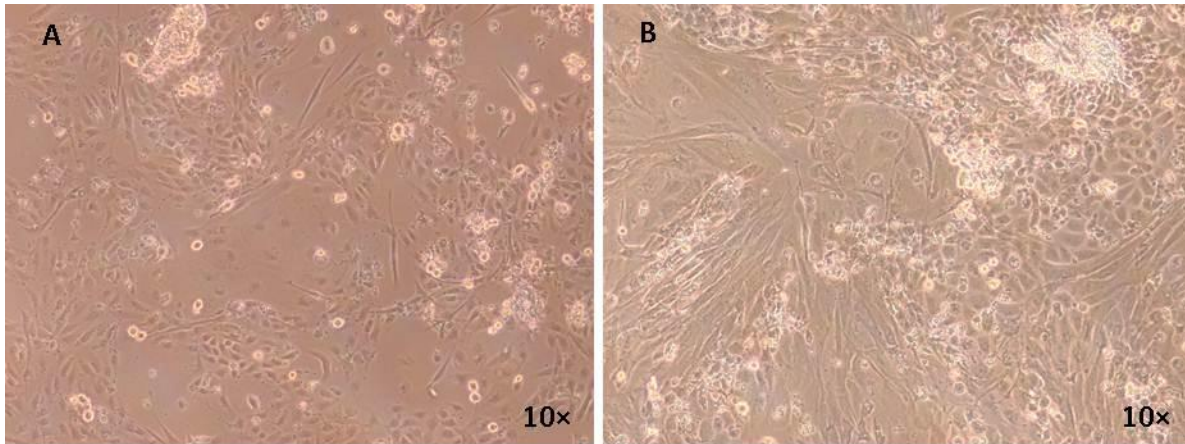


Figur 16: Figur 16 viser vekstmønster av myocytter; A) etter 11 dager i kultur og B) etter 32 dager i kultur. Celler ble isolert fra atrium og sådd ut på brett pre-coatet med laminin etter 20 min collagenasebehandling.

Observasjoner indikerte at endotel- og epitelceller delte seg. Dette ble tydeligst observert i primariakolber etter ca. 3 uker i kultur. Myocytter i primariakolber løsnet ofte etter 20-30 dager i kultur. Løse celler ble ofte observert i etterkant av medieskift. Primariakolber som ble stående lenge i inkubatorskap (over 2 mnd) ble dominert av kulturer av epitelceller. Cellene var forholdsvis store, flate og diffuse. Cellene vokste i monolag og de var vanskelig å fotografere grunnet dårlig kontrast.

Det utviklet seg variasjoner mellom kolber og brønner som i utgangspunktet så like ut. Etter ca. 10 dager i kultur utviklet det seg pH forandringer i enkelte brønner, indikert av fargeforskjeller i mediet. Det ble observert løse og døde celler i mediet, hvor celler i brønner med forhøyet pH ofte var styggere og viste økt tegn til vakuolisering, sammenlignet med celler i brønner med senket pH verdi.

Ved uttak 4 ble det isolert en økt mengde celler fra ventrikkel sammenlignet med tidligere uttak. Cellene ble identifisert som endotelceller, epitelceller og myocytter likt uttak fra atrium. Det ble også observert en langstrakt celletype. Mange av myocytterne løsnet fra kulturen eller ble stygge / døende etter ca. 10 dager og av resterende celler utviklet det seg monolag dominert av den langstrakte celletype (Figur 17).



Figur 17: Celler isolert fra ventrikkel ved celleuttak 4. A) 6 dager etter uttak. B) 34 dager etter uttak.

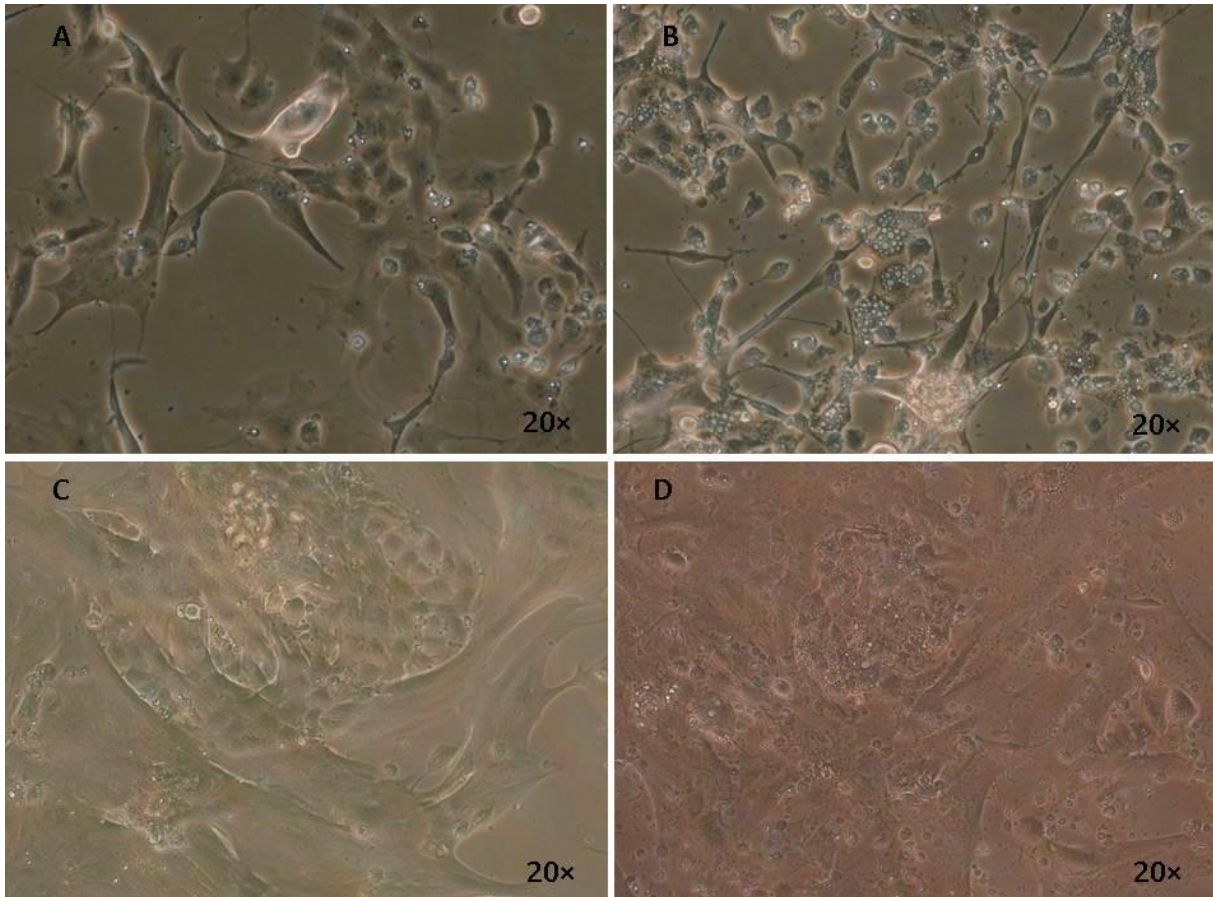
3.3.2 Infeksjonsforsøk med PRV i CHH-1 celler

Det ble ikke observert noen forskjeller i utvikling mellom infiserte celler og kontrollceller. Analyse ved real-time RT-PCR detekterte svært lave mengder PRV (RNA) i prøvene ($Ct > 35$) det ble ikke detektert økning i viruskonsentrasjon over tid, og det ble ikke detektert forskjell i utvikling mellom kolber inkubert på 17 °C kontra 20 °C. Det ble observert noe økning i uttrykk av referansegnet (1,5 – 2 Ct), fra start til avslutning av forsøket (resultater ikke vist).

3.3.3 Infeksjonsforsøk med PRV i primærkultur av hjerteceller

Observasjoner ved infeksjonsforsøk 1 og 2.

I infeksjonsforsøk 1 og 2 ble det observert stor forskjell i utvikling mellom kontroll og infiserte celler, hvor infiserte celler utviklet karakteristiske vakuoler og granuli, og det var også mer løse fragmenter i mediet til infiserte celler (Figur 18). Vakuolisering ble observert i primariakolber allerede 4 timer etter påsett av virus. Ved 20 dpi begynte celler i både kontroll og infisert primariakolbe å løsne fra underlaget. Celler i lamininbrett løsnet ikke og det ble observert antydning til granuli i infiserte myocytter. I infeksjonsforsøk 1 ble det observert jevnlig kontraksjoner i uinfiserte myocytter, men ikke i infiserte myocytter. Ved infeksjonsforsøk 2 ble det også observert kontraksjoner i uinfiserte myocytter.



Figur 18: Infeksjonsforsøk 1 og 2. Foto A-B viser celler i primariakolbe 14 dager etter infeksjon, hvor A) er uinfiserte kontrollceller, og B) er infiserte celler. Foto C-D viser celler i infeksjonsforsøk 2, hvor C) er uinfiserte kontrollceller, og D) er infiserte celler.

Observasjoner ved infeksjonsforsøk 3

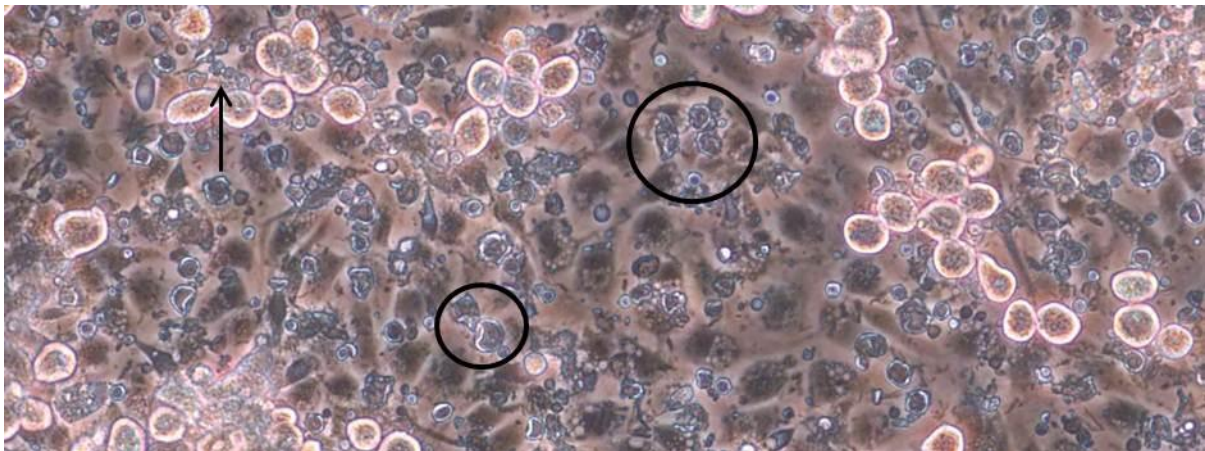
I dette forsøket ble det observert ulik utvikling av celler, avhengig av tidspunkt og behandlingform (Tabell 11). Det ble observert utvikling av vakuoler i infiserte og uinfiserte celler, og det ble observert granuli (mørke partikler) i cellene - oftest i de infiserte. I brønner hvor homogenatet ikke ble sugd av, utviklet cellene en annen morfologi og ble mer langstrakte, sammenlignet med brønner der homogenatet ble sugd av cellene. Celler behandlet med homogenat tilsatt trypsin utviklet sterk grad av vakuolisering i både infiserte og uinfiserte celler. En samling med observasjoner gjort under infeksjonsforsøket er vist i Tabell 11. Foto av cellene og variasjoner i utvikling ved de ulike behandlingsmåtene er vist i Figur 20.

Resultater

Tabell 11: Observasjoner av celler ved infeksjonsforsøk 4. Ulike variabler (grupper), ved ulike observasjonstidspunkt – dager etter infeksjon (dpi).

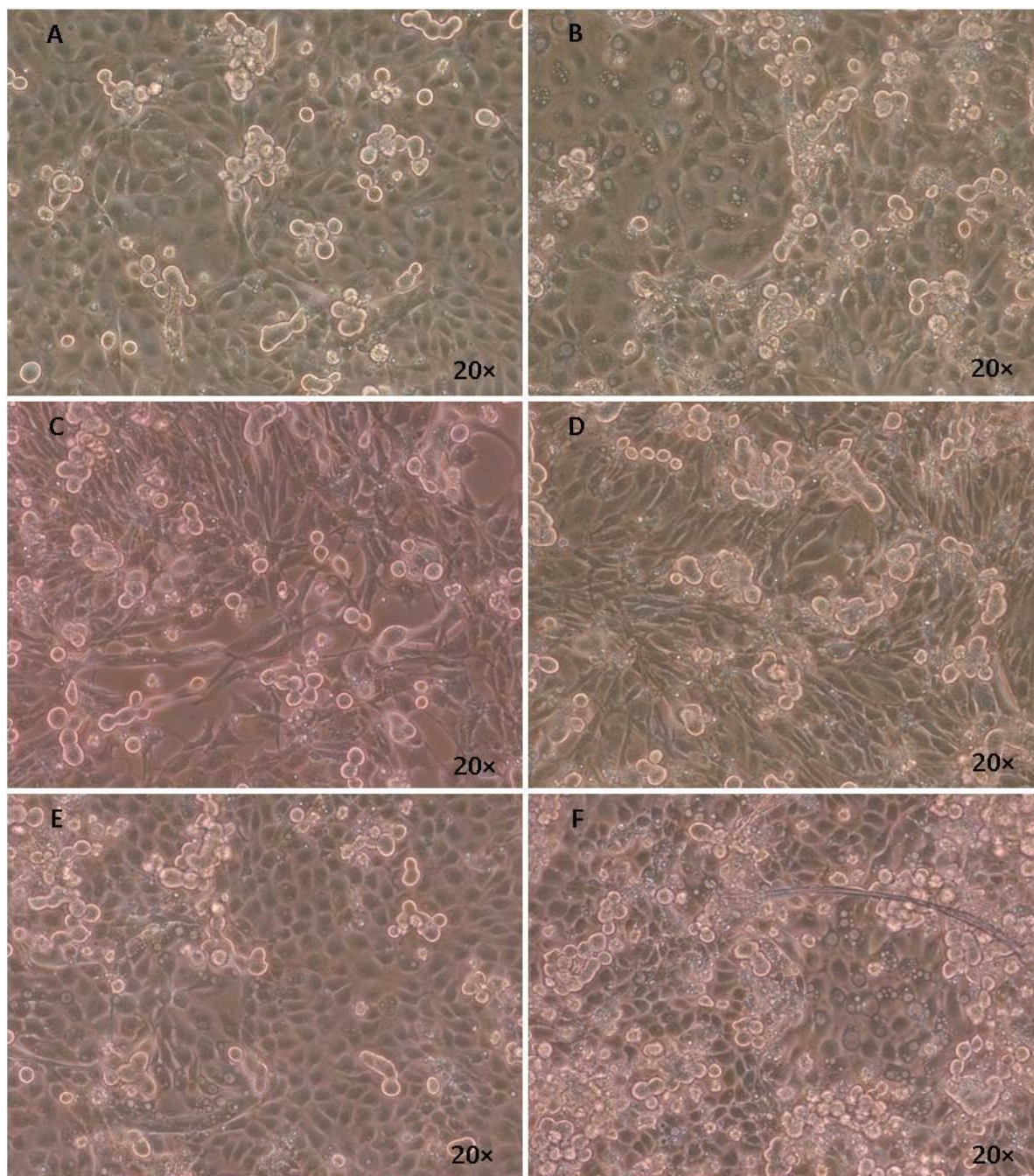
Dpi	Med trypsin	Med homogenat	Uten homogenat
t0	Antydning til vakuoler i endotelceller. Ringstrukturer (vesikler) i infiserte brønner.		
3dpi	Uinfiserte celler er fine, liten/ingen vakuolisering.		
6dpi	Vakuoler og granuler både i infiserte og uinfiserte celler	Celle morfologi endret, endotelceller er mer langstrakt.	Kontrollceller er fine. Vakuoler og granuli i infiserte celler.
11dpi	Voldsom vakuolisering! (blir større?) Områder med vesikler. Granuli i infiserte celler.	Annet vekstmønster. Vakuolisering og granuli. Celler løsner i en uinfisert brønn.	Kontrollceller er fine. Alle celler inneholder granuli, men myocytter forholdsvis upåvirket.
15dpi	Enormt med vakuoler. Brønnsforskjeller.	Endo- og epitelceller holder på å løsne.	Monolag. Vakuoler og granuli. (Både uinf og inf celler) Myocytter kontraherer.

Det ble observert variasjoner mellom paralleller, hvor enkelte brønner hadde en mer utpreget grad av vakuolisering sammenlignet med andre. Uavhengig av behandlingsmåte, ble det observert en karakteristisk forskjell mellom infiserte og uinfiserte celler: I infiserte celler ble det observert sirkelrunde fragmenter / vesikler, ofte lokalisert i nærheten av myocytter. Dette ble ikke observert i uinfiserte kontrollbrønner (Figur 19).



Figur 19: Vesikler påvist i infiserte celler ved t0, 13 timer etter infeksjon med HSMB hjertehomogenat. Sirkler er markert rundt enkelte av vesiklene, pil indikerer vesikler ansamlet rundt myocytter. Foto av cellene er tatt ved mikroskopforstørrelse 20x, og ytterligere forstørret ved redigering av bilde.

Resultater



Figur 20: Forskjeller i utvikling mellom infiserte og uinfiserte celler og ulike behandlingsmetoder i infeksjonsforsøk 3, foto er tatt 8 dager etter infeksjon. Figur A-B viser infiserte celler hvor homogenat ble sugd av etter 13 timer, A) er uinfiserte kontrollceller, og B) er infiserte celler. C-D viser celler inkubert med homogenat. Cellene utviklet en mer langstrakt morfologi, hvor C) er uinfiserte kontrollceller, og D) er infiserte celler. Foto E-F viser celler infisert med homogenat tilsatt trypsin. Det utviklet seg mer vakuoler i disse cellene sammenlignet med andre behandlingsmåter. E) Uinfiserte kontrollceller, F) infiserte celler.

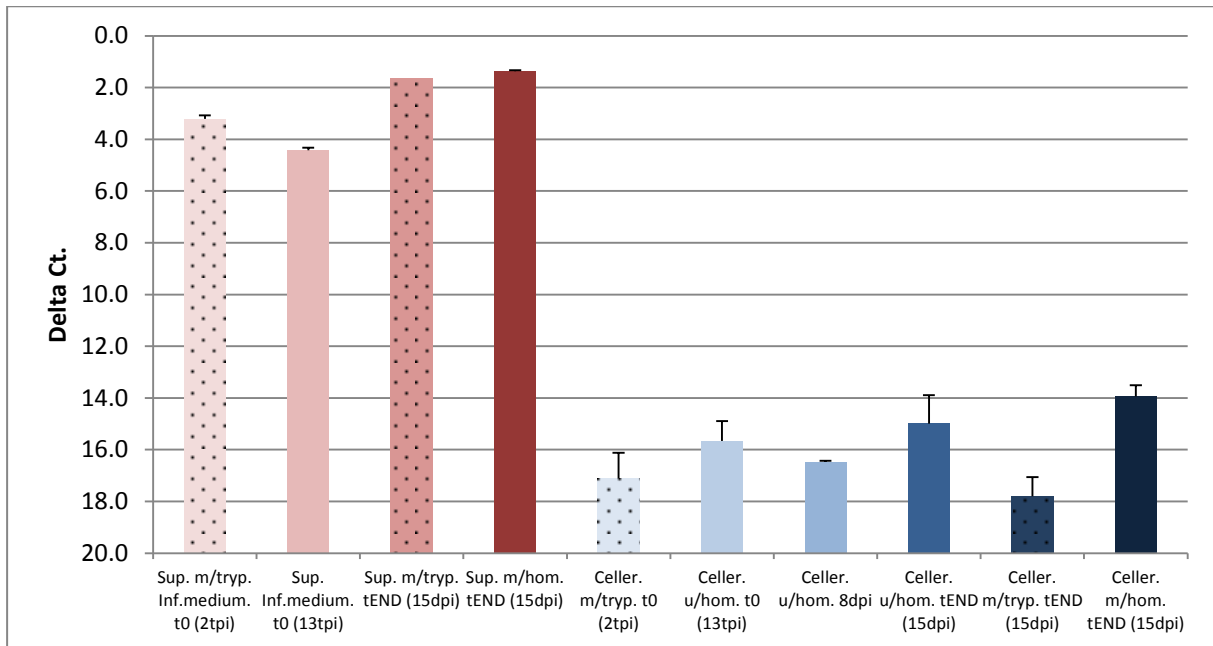
Analyseresultater for real-time RT-PCR.

Prøver fra infeksjonsforsøk 1 og 2 ble analysert samtidig. Ved første real-time oppsett, med cDNA tillaget ved bruk av High capacity RNA to cDNA mastermix, var PRV (RNA) ikke detekterbart. Analysen viste generelt høye Ct-verdier for referansegen sammenlignet med positiv kontroll, noe som tydet på lite cDNA inn i oppsettet. Ny analyse av prøvene ved bruk av High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit og SuperScript VILO cDNA synthesis kit, ga forholdsvis «normale» Ct verdier for referansegenet for prøver høstet av adherente celler, sammenlignet med positiv kontroll. PRV ble detektert i lave mengder i enkelte av prøvene. Prøver høstet av supernatant inneholdt svært lite RNA og det ble ikke tilsatt ønsket mengde inn i cDNA syntesen. Disse prøvene ga ofte en unormal amplifikasjon og smeltepunktsskurve i real-time analysen. Ingen av resultatene fra infeksjonsforsøk 1 og 2 ga en sikker indikasjon på økning av virusmengde (resultater ikke vist).

Ved real-time RT-PCR analyse av materiale fra infeksjonsforsøk 3 ble det detektert PRV (RNA) i infiserte celler (Figur 21). Ved dette infeksjonsforsøket oppsto det også enkelte problemer med ukorrekt smeltepunktsskurve for prøver som hadde hatt lavt RNA-input i cDNA syntesen (supernatant), men i mye mindre grad sammenlignet med infeksjonsforsøk 1 og 2. Prøver som ikke hadde korrekt smeltepunktsskurve ble ikke tatt med i videre analyse. Ved normalisering av Ct verdi i forhold til referansegen (Delta Ct) ble det vist en økning i PRV-konsentrasjon i løpet av forsøksperioden i supernatant fra celler inkubert med homogenat i hele forsøksperioden. Det ble også vist en økning i supernatant fra celler som ble infisert med trypsinbehandlet homogenat. Dette sammenlignet med t0 høsting gjort etter 13 timer og t0 høsting gjort etter 2 timer for homogenat med trypsin (se forsøksoppsett i Figur 10, side 33). Resultater er presentert i Figur 21. Adherente celler (inkubert med homogenat), inneholdt også en høyere mengde PRV ved avslutning av forsøket 15 dpi (tEND), sammenlignet med t0 fra adherente celler. Størst økning i viruskonsentrasjon ble observert ved sammenligning av supernatant høstet ved t0 og supernatant høstet 15 dpi (tEND) fra celler inkubert med homogenat hvor det ble detektert en økning på 3 Ct verdier (som tilsvarer 8 ganger mer virus). Ved sammenligning av virusmengde i prøver fra adherente celler, ble det observert en svak nedgang i viruskonsentrasjon fra høstetidspunktet 13 timer etter infeksjon (t0) til høstetidspunktet 8 dpi. Ved høstetidspunkt 15 dager etter infeksjon, ble det vist en økning i viruskonsentrasjon sammenlignet med t0 og 8 dpi. Fra celler ble det generelt påvist

Resultater

lave viruskonsentrasjoner (høye Ct verdier), noe som gir større grad av variasjon mellom parallelle prøver.



Figur 21: infeksjonsforsøk 3. Normalisert Ct verdi (delta Ct) for PRV i infiserte celler. (Sup. = høsting av supernatant. / Cells = høsting av adherente celler. / Inf.medium = infeksjonsmedium. / m/trypp. = homogenat behandlet med trypsin. / u/hom = homogenatet ble sugd av.)

Ved 2. gangs analyse av prøver høstet av supernatant og adherente celler med homogenat ble det detektert delta Ct verdier som var i samme størrelsesorden som ved første analyse. PRV ble detektert i supernatant fra prøver som hadde blitt inkubert med homogenat, men ikke i stor grad i adherente celler. Det ble ikke gjort funn som tydet på at temperering av lysat ved RNA-isolering eller tilstedeværelse av hemmende molekyler var med på å påvirke smeltepunktkurver, amplifikasjonsplot og det totale real-time RT-PCR resultatet.

4 Diskusjon

I denne oppgaven ble det gjort både *in vivo* og *in vitro* studier av PRV / HSMB i laks. Det er derfor naturlig å diskutere resultatene fra hver del av oppgaven, hver for seg. Som avslutning på oppgaven oppsummeres resultatene fra studiene i en felles konklusjon.

4.1 Dobbelinfeksjon med IPN og HSMB. – Effekt av IPNV og vaksinasjon på utvikling av HSMB.

Som beskrevet innledningsvis, er IPN og HSMB sykdommer som er vidt utbredt innen norsk lakseoppdrett [1]. Det har blitt gjort observasjoner som indikerer at utbrudd av IPN ofte har blitt etterfulgt av utbrudd med HSMB [2, 96]. Flere studier viser at en infeksjon med IPNV kan påvirke utfallet av sekundære infeksjoner med andre patogener [31, 33, 90, 92, 93, 110].

4.1.1 Infeksjon med IPNV

Som grunnlag for forsøksdesign ble det benyttet resultater fra et tidligere utført forsøk hvor det har blitt vist at det ved badsmitte i ferskvannsfasen er mulig å etablere en persistent infeksjon av IPNV i laks som så reaktiveres hos post-smolt etter sjøsetting. Forsøket indikerte at det var smoltifiseringsprosessen og sjøsettingen i seg selv som utløste reaktivering av IPNV infeksjonen i fisken [33]. Vi viste i vår studie at det ble etablert en persistent infeksjon og bærertilstand av IPNV i alle IPNV-smittede fiskegrupper som varte hele forsøksperioden på 22 uker etter smitte. Riktignok ble det ikke detektert virus i uvaksinert fisk som kun var smittet med IPNV i perioden etter overføring til sjøvann 12 uker etter smitte, men ettersom IPNV er kjent å etablere en livslang bærertilstand i laksefisk [19, 21], er det grunn til å anta at mangel på deteksjon av viruset kan skyldes svakheter med påvisningsmetodikken. Dette vil bli diskutert i et eget avsnitt: Metodikk for deteksjon av IPNV. Ingen fisk døde i forsøket og for de andre fiskegruppene ble det detektert virus i lave konsentrasjoner gjennom hele forsøksperioden. I motsetning til forsøk utført av Johansen et al. [33], ble det ikke påvist en reaktivering av IPNV infeksjonen hos post-smolt, da det ved tidspunkt fra uttak av prøver i sjø, 15 – 22 uker etter smitte med IPNV, ikke er registrert noen fisk med virusinnhold tilsvarende en akutt infeksjon med IPNV. Dette kan skyldes flere årsaker.

Stress

En bærertilstand av IPNV er ingen stabil og konstant tilstand i fisken. Balansegang mellom virus og immunsystemet til verten gjør at virustiter kan variere over tid [19, 31]. Ulike former for miljømessig eller fysiologisk stress, har vist seg å kunne påvirke bærertilstanden og trigge økt virusproduksjon [19, 33-35, 53, 55]. Under dette forsøket ble fisken ikke påført noen former for stress, med unntak av det som daglig røkting, vaksinasjon og håndtering ved prøveuttak vil innebære. Fisken ble sikret optimale fôrings- og vannkvalitetsbetingelser, og det ble sikret god smoltifisering og sjøvannstoleranse før sjøsetting. Ved intensiv settefiskproduksjon, kan ulike produksjonsforhold fungere som en kronisk stressor for fisken som igjen kan gi økt mottakelighet for smitte med IPNV i senere livsstadier [53, 54]. Ved forsøk på å simulere intensive driftsforhold i laboratoriet, har en ikke med sikkerhet kunnet påvise at fisk med en persistent IPNV infeksjon har økt risiko for reaktivering av infeksjonen ved sjøsetting [54]. I et «små-skala» laboratorieforsøk er det vanskelig å simulere alle faktorer som innvirker på fisken ved kommersiell produksjon i næringen. Ut fra disse opplysningene, kan man ikke utelukke at IPNV infeksjonen i dette forsøket kunne fått et annet utfall, under mer «naturlige» omstendigheter og de stresspåkjenninger som oppdrettslaksen i dagens produksjon blir utsatt for.

Virulens

I dette forsøket ble det brukt et høyvirulent virusisolat av typen Sp [99]. Det er kjent at IPNV kan forandre virulensegenskaper ved gjentatt passasje i cellekultur [100, 101] I dette forsøket ble det brukt virus dyrket til 1. passasje i cellekultur og som etter oppdyrking var blitt sekvensert og bekreftet høyvirulent (resultater er ikke vist). En kan derfor med sikkerhet si at det ble smittet med et høyvirulent virusisolat. En kan derimot ikke utelukke at viruset kan ha forandret seg i fisken. Sekvensstudier har vist at IPNV er i stand til å mutere og forandre virulens inne i fisken, og at høyvirulente virusisolat kan endre seg i løpet av en infeksjonsperiode til mer lav-virulente virus med redusert evne til replikasjon [15]. I dette forsøket ble det ikke gjort sekvensering av viruset etter reisolering fra fisken. Dette kunne ha blitt utført for å undersøke om det hadde skjedd mutasjoner og dermed forandring av virulens i løpet av infeksjonsperioden. Dette kunne eventuelt vært med på å forklare hvorfor det ikke har oppstått en reaktivering av IPNV infeksjonen i fisken etter sjøsetting.

Avl

En kan heller ikke utelukke at avl og seleksjon for resistens mot IPN har påvirket fiskens mottakelighet for sykdommen, og på denne måten medført at IPNV infeksjonen ikke reaktiveres i sjøvannsfasen. Gruppen av laks som ble brukt i forsøket var produsert ved såkalt QTL metodikk, og skulle teoretisk sett være moderat «mottakelig» for IPN (Nina Santi, AquaGen, pers. med). Seleksjon for resistens mot IPN har vært en del av avlsprogrammet til AquaGen siden 2001 [38]. Den genetiske bakgrunn til fisken har vist å ha stor innflytelse på utfall av smitteforsøk med IPNV [39, 48]. I løpet av de siste årene har utfallet av smitteforsøk med IPNV under kontrollerte betingelser i laboratorium endret seg, og det har vist seg vanskelig å oppnå dødelighet (Lill-Heidi Johansen, Nofima, pers. med). Selv om det i dette forsøket ble brukt fisk som skulle mangle den genetiske markøren for resistens mot IPN, kan man ikke utelukke at det i gjennom >10 år med avlsarbeid har blitt selektert og utviklet en fisk som generelt er mer robust og motstandsdyktig mot infeksjon med IPNV.

Vaksinering

I dette forsøket ble fisken smittet med IPNV før den ble vaksinert. Dette for å simulere en «naturlig» IPNV-smitte som kan oppstå i ferskvannsfasen før vaksinasjonstidspunkt, og for derved å kunne studere hvilken innvirkning vaksinering har på IPNV bæreretablering og sekundær HSMB infeksjon. Studier har vist at fisk vaksinert med vaksine uten IPN komponent kan oppnå en viss uspesifikk beskyttelse mot reaktivering av en IPNV infeksjon [33]. Vaksinering av fisk som allerede er bærer av IPNV har vist å gi økt beskyttelse mot reaktivering, spesielt dersom fisken er bærer av et høyvirulent IPNV isolat. Økt beskyttelse ble indikert ved bruk av vaksine både med og uten IPNV komponent [36]. Det er frem til i dag ikke utviklet effektive nok vaksiner som fullstendig klarer å eliminere en IPNV bærertilstand som oppstår etter smitte [49].

Kvantifisering av virus ble gjort ved dyrking og titrering av nyrehomogenat i CHSE-celler. En akutt virusinfeksjon med IPNV er estimert til å inneholde $10^4 - 10^8$ TCID₅₀ / g vev [7]. Ved 2 og 6 uker etter infeksjon ble det detektert enkeltfisk med virusinnhold tilsvarende en akutt IPNV infeksjon $>10^4$ TCID₅₀ / g vev; 1 fisk ved prøveuttak 2 uker etter smitte og totalt 4 fisk ved prøvetaking 6 uker etter smitte med IPNV. I gruppen med uvaksinert fisk hadde tre av fire undersøkte fisk virusmengder tilsvarende en akutt infeksjon ved seks uker etter smitte. Dette indikerer at den uvaksinerte fiskegruppen inneholdt en høyere mengde IPNV ved

prøveuttakstidspunkt 6 uker etter smitte sammenlignet med den vaksinerte fiskegruppen. I mange av fiskene var virusinnholdet for lavt til at det kunne detekteres med den metoden som ble benyttet her. På grunn av dette har en ikke nok data til å kunne påvise signifikante forskjeller mellom uvaksinert og vaksinert fisk på utvikling av IPNV. Fra 12 uker etter smitte ble det kun registrert enkeltfisk med lave konsentrasjoner av IPNV, på grensen til hva som var detekterbart. Ettersom titrene er så lave og havner under deteksjonsgrensen for mange av fiskegruppene, vil eventuelle forskjeller mellom de ulike gruppene være marginale og av mindre betydning.

Metodikk for deteksjon av IPNV

I dette forsøket ble IPNV påvist og kvantifisert ved titrering i cellekultur. En svakhet ved denne teknikken er at vevshomogenat inneholder molekyler som kan være toksiske for cellene, og dermed forårsake celledød uten at det skyldes påvirkning av virus. Metoden kan gjøres mer sensitiv ved titrering på et større areal, som er det vanligste når en skal undersøke for IPNV bærertilstand. Metoden er imidlertid ikke hensiktsmessig ved titrering av et stort antall prøver. I tillegg var metoden med titrering i 96 brønners brett valgt ut i fra antagelsen om at en reaktivering av viruset skulle skje etter overføring til sjøvann og med dertil høye virustitre. I dette forsøket oppsto det problemer, sannsynligvis forårsaket av cytotoxiske effekter, ved titrering av 5 % nyrehomogenat som startfortynning. Ved avlesning var det vanskelig å skille mellom cytotoxisk påvirkning av celler og CPE forårsaket av IPNV. Av den grunn ble det besluttet å heve deteksjonsgrensen og starte avlesning av titer i neste fortynning (rad B). Deteksjonsgrensen medførte at eventuelle lave mengder IPNV ikke kunne påvises og kvantifiseres i mange av fiskene, noe som medførte at man fikk for få opplysninger til å påvise statistiske forskjeller mellom ulike grupper.

Det er kjent at produksjon av DIPs kan være en mekanisme for utvikling av en persistent virusinfeksjon [22]. *In vitro* infeksjonsforsøk med homogenat fra IPNV bærerfisk har vist at CPE i en høyere fortynning av homogenatet (10^{-3}) ikke nødvendigvis trenger å gi CPE i en lavere fortynning (10^{-1}) av prøven, og det ble foreslått at dette kan skyldes interferering med DIPs i det mest konsentrerte prøven [19, 111]. En kan ikke utelukke at DIPs har hatt en innvirkning på resultatet ved kvantifikasjon og deteksjon av IPNV i dette forsøket.

Det hadde også vært mulig å følge IPNV infeksjonen ved bruk av real-time RT-PCR. Denne teknikken kan være mer sensitiv med tanke på deteksjon av virus [58, 59, 112], men ulempen

er at teknikken ikke sier noe om tilstedeværelse av infeksjøs virus. Ørpetveit et al. har sammenlignet de to teknikkene og konkluderte med at begge metodene har forholdsvis lik sensitivitet ved deteksjon av lave mengder IPNV fra nyre hos bærerfisk. For begge metodene ble det vist at det alltid vil foreligge en viss tilfeldighet i om bærerfisk vil teste positivt [59]. I dette forsøket ble det valgt å benytte cellekultur for påvisning og kvantifisering av IPNV. Dette er en godt etablert teknikk ved Nofima og det var ønskelig å detektere infeksjøs viruspartikler fremfor virale nukleinsyrer.

4.1.2 Infeksjon med HSMB

Sykdommen HSMB blir i dag diagnostisert ved bruk av histopatologisk undersøkelse, basert på klassiske vevsforandringer forbundet med sykdommen [1]. Studier har vist at HSMB har et forholdsvis langtrukket sykdomsforløp i felt [76], sammenlignet med eksperimentell smitte i laboratorieforsøk [60]. I dette forsøket ble HSMB diagnostisert hos alle infiserte fiskegrupper 7 uker etter smitte. Lignende resultater har også blitt vist ved tidligere eksperimentelle forsøk med i.p. smitte med hjertehomogenat fra HSMB-diagnostisert fisk [60, 73], og ved presmitte utført for prosjektet Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett (Lill-Heidi Johansen, Nofima, pers. med).

Sykdommen HSMB er forbundet med tilstedeværelse av PRV [64, 65, 67, 80]. Karakterisering av viruset har også gjort det mulig å utvikle immunhistokjemiske teknikker som kan fungere som et supplement til dagens diagnostikk [64, 80]. I dette forsøket ble PRV detektert ved bruk av real-time RT-PCR. PRV ble påvist i fisken allerede ved første prøveuttakstidspunkt 3 uker etter smitte, før store histopatologiske forandringer ble registrert.

PRV innhold i fisken – patologi

PRV har blitt påvist i fisk som ikke utviser kliniske eller histopatologiske tegn på sykdommen [67, 69, 70]. Ved utarbeiding av kriterier for diagnostikk av HSMB i Norge har en, for å kunne stille diagnosen HSMB ved real-time RT-PCR, satt en Ct grenseverdi for PRV på <28, for å sette diagnosen [67]. I dette forsøket ble det ved uttakstidspunkt 3 uker etter infeksjon, detektert flere fisk med høyere viruskonsentrasjoner enn denne grenseverdien. På dette tidspunktet var det allikevel bare påvist histopatologiske forandringer i en fisk. Dette indikerer at viruset er tilstede i høye mengder før det oppstår vevsforandringer som er detekterbare ved histopatologisk undersøkelse.

I en nylig utført studie hvor det ble undersøkt innhold av PRV i vill og kultivert laks, ble det funnet fisk med virusinnhold helt ned i Ct-verdi 17 uten at det ble detektert histopatologiske forandringer i hjertet på fisken. Det ble vist at forekomsten av PRV er utbredt og at viruset nødvendigvis ikke trenger å være assosiert med patologi [70]. Men ettersom histopatologisk undersøkelse gir et øyeblikksbilde, kan en ikke utelukke at vevsforandringer kan komme i etterkant. Et annet viktig poeng vedrørende teknikken, er at den gir en 2-dimensjonal undersøkelse av et begrenset område av vevet. En kan derfor ikke utelukke at eventuelle patologiske forandringer kan ligge skjult i områder som ikke er med på snittet. Dersom det er få, spredte forandringer, er det større sannsynlighet for at disse ikke kommer med på snittet.

Infeksjonsforløp PRV

Resultater fra pre-smitte (med samme virushomogenat brukt i dette forsøket) viste også relativt høye viruskonsentrasjoner i fisken ved uke 5 og 6 etter smitte, før histopatologisk HSMB diagnose kunne stilles (Upubl. data, Lill-Heidi Johansen, Nofima, pers. med.) Finstad et al. utførte en studie i 2012 hvor det, ved bruk av immunhistokjemiske teknikker og PRV antigen, ble undersøkt distribusjon av virus i hjertet under et sykdomsforløp med HSMB. Resultater fra forsøket detekterte først PRV i leucocyttilignende celler i blodkoagler i hjertet, før viruset ble detektert i cardiomyocytter. Det kan indikere at leucocyttilignende celler er tidlige mål-celler for virusreplikasjonen, eller at de fungerer som passiv transport eller driver fagocytose av viruset [80]. Ser man dette i sammenheng med virusdeteksjon med real-time RT-PCR, kan resultatene antyde at oppformering av viruset finner sted før det oppstår påvisbare vevsforandringer. Dessverre er det for lite målepunkter i vår studie til at en kan trekke noen sikre konklusjoner angående utvikling og oppformering av virus i forhold til utvikling av vevsskader.

I dette studiet ble immunhistokjemi utført på 3 av 4 HSMB infiserte fiskegrupper, og det ble ikke detektert tilstedeværelse av PRV før 7 uker etter smitte. For at virus skal kunne detekteres med immunhistokjemi må en viss mengde virus være tilstede (eksempelvis en eller flere celler fulle av viruspartikler), noe som gjør dette til en mindre sensitiv teknikk sammenlignet med real-time RT-PCR. Dette kan være med på å forklare hvorfor en ved immunhistokjemi ikke klarte å påvise PRV før 7 uker etter smitte med HSMB.

4.1.3 Sammenheng mellom vaksinasjon, infeksjon med IPNV og utvikling av HSMB.

Et viktig moment med studiet var å undersøke forskjeller mellom de ulike fiskegruppene, og hvordan vaksinasjon og en primær infeksjon med IPNV kan påvirke utfallet av en sekundær infeksjon med HSMB. Statistiske beregninger påviste signifikante forskjeller mellom enkelte av fiskegruppene.

Vaksinert – uvaksinert fisk

Ved 7 uker etter smitte, ble det påvist signifikant høyere innhold av PRV i fisk som var vaksinert og som kun hadde blitt smittet med HSMB, sammenlignet med uvaksinert fisk med samme behandling. Det ble også påvist signifikant høyere PRV innhold i vaksinert (kontra uvaksinert) fisk ved 10 uker etter smitte, hos den fiskegruppen som var infisert med både IPNV og HSMB. Disse resultatene kan antyde at PRV infeksjonen oppformerer lettere i vaksinert fisk, noe som kan tilsi at vaksinert fisk er mer mottakelig for PRV. Resultatene fra dette forsøket antyder at vaksinasjon av fisken ikke induserer uspesifikk beskyttelse i forhold til etablering av PRV infeksjon og utvikling av vevsskader i hjertet. Da en ikke oppnår dødelighet i infeksjonsforsøk med HSMB kan en ikke konkludere om vaksinerer gir en uspesifikk beskyttelse mot sykdommen eller ikke, noe som tidligere er vist for IPNV [36, 52].

Det ble ikke detektert signifikante forskjeller mellom noen av de andre fiskegruppene. Generelt var det stor spredning i data mellom prøver tatt 3 uker etter smitte og 10 uker etter smitte. Prøver fra 7 uker etter smitte viste jevnt høye virusmengder og det var liten individuell variasjon mellom prøvene. Ved dette tidspunktet er sykdommen i en akutt fase. Ulikt virusinnhold i fisken ved 3 og 10 uker etter smitte, kan være gjenspeile infeksjonsforløpet til sykdommen og den enkelte fisk sin evne til å motstå / bekjempe PRV.

I dette forsøket ble det registrert peritonitt i alle vaksinerte fiskegrupper, trolig forårsaket av bivirkninger som oppstår ved vaksinerer. Resultatene fra forsøket indikerer at infeksjon med HSMB etablerer seg raskere i fisk som er vaksinert. Det er uvisst om denne negative innvirkningen er forårsaket av vaksinen i seg selv, eller av bivirkningene som følge av selve vaksinerer. Selv om det er detektert en signifikant forskjell mellom vaksinert / uvaksinert fisk, er det likevel små forskjeller det er snakk om. I norsk oppdrettsnæring vaksineres all fisk før sjøsetting. Dersom det viser seg at vaksinerer gir økt mottakelighet for HSMB, kan dette ha store økonomiske og dyrevelferdsmessige konsekvenser. Da en ikke har etablerte

smittemodeller som forårsaker dødelighet av HSMB, er det per i dag vanskelig å få testet ut under kontrollerte, eksperimentelle betingelser om vaksinerings har en konkret negativ effekt på utvikling av sykdommen. Gjennom en epidemiologisk feltstudie, med sammenligning av ulike vaksintyper og naturlig utbrudd av HSMB, kan det være mulig å avdekke eventuelle forhold ved vaksinasjon som kan forårsake økt innhold av PRV og mottakelighet for HSMB. Av dyrevelferdsmessige og etiske årsaker, bør det kontinuerlig forskes på å utvikle bedre vaksiner som, i tillegg til å bevare sin effektivitet, gir minst mulig bivirkninger i fisken.

HSMB – effekt på IPNV infeksjon

Resultatene fra dette forsøket ga ingen tilsynelatende indikasjon på at sekundær infeksjon med HSMB har innvirkning på den persistente IPNV infeksjonen i fisken. Som nevnt tidligere ble det kun detektert lave IPNV mengder i fisken og eventuelle forskjeller mellom fiskegrupper kan være skjult på grunn av deteksjonsgrensen i metoden som ble brukt. Dette har imidlertid ikke noen stor betydning da titrene er så lave. Dersom HSMB hadde hatt innvirkning på IPNV infeksjonen, og en hadde oppnådd økt produksjon av IPNV, ville dette vært detekterbart med den metoden som ble brukt i vårt studie.

IPNV – effekt på HSMB

Flere studier har vist at en infeksjon med IPNV kan påvirke og gjøre fisk mer eller mindre mottakelig for sekundære infeksjoner med andre patogener [31, 33, 92, 110, 113]. I dette forsøket ble HSMB diagnostisert og PRV detektert i både grupper smittet med HSMB og i grupper smittet med både IPNV og HSMB. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i virusinnhold mellom grupper av fisk som kun hadde blitt infisert med HSMB, og fisk som hadde blitt dobbeltinfisert med IPNV og HSMB. I studiet ble det etablert en persistent infeksjon med IPNV. Dette samsvarer med tidligere utførte eksperimenter, da det har blitt vist at en IPNV bærertilstand med lave virustiter tilsynelatende ikke påvirker sekundær infeksjoner med verken ILA eller *Vibrio salmonicida*. [31]. Tidligere forsøk har heller ikke kunne bekrefte noen påvirkning på appetitt og vekst hos fisk som er bærere av IPNV [32]. *In vitro* er det vist at en bærertilstand av IPNV gir beskyttelse mot sekundære infeksjoner av homologe og heterologe virus [114, 115]. Med den informasjon som foreligger i dag på *in vivo* infeksjonsstudier, er det imidlertid lite som tyder på at en persistent infeksjon med IPNV med lave virustiter ville hatt stor innvirkning på en sekundær infeksjon med HSMB [31].

Dette kan være med på å forklare hvorfor det ikke blir detektert noen forskjell i HSMB utvikling mellom fiskegruppene i dette forsøket.

Bakgrunnen for dette studiet var observasjoner i felt som indikerte utbrudd med HSMB i etterkant av utbrudd med IPN. I dette forsøket ble det etablert en persistent infeksjon med IPNV som tilsynelatende ikke hadde noen innvirkning på utviklingen av HSMB. Observasjoner i felt er gjort i etterkant av IPN utbrudd, altså etter en akutt infeksjon med IPNV. Tidligere studier med dobbeltinfeksjoner i fisk, har vist at fisk som er pre-smittet med IPNV og har en aktiv IPNV infeksjon, oppnår en viss beskyttelse ved sekundær infeksjon med ILA og IHN [31, 92, 93]. For å kunne avgjøre om IPNV har noen innvirkning på infeksjon med HSMB, bør det utføres en infeksjonsstudie med sekundær infeksjon i en aktiv fase av IPNV infeksjonen. Det er mulig at dette kunne vært oppnådd i dette studiet, dersom fisken hadde blitt utsatt for ulike stressfaktorer som er «vanlige» ved intensiv produksjon i kommersielt lakseoppdrett. Feltobservasjoner vedrørende utbrudd av HSMB i etterkant av IPN, trenger heller ikke nødvendigvis å skyldes en direkte sammenheng mellom virusene. Generelt vil sykdom gjøre fisken svekket og mer mottakelig for andre patogener. Det kan også være spesifikke hendelser, eksempelvis stresspåkjenninger som transport, behandling mot lakselus, eller sortering, som påvirker fiskens forsvarsmekanismer mot infeksjoner.

4.2 Hjerteceller. – Etablering av primærkultur og infeksjonsforsøk med PRV.

PRV er et virus som har vist seg vanskelig å dyrke i cellekultur. Det har blitt gjort flere forsøk på å dyrke PRV i ulike cellesystemer [60, 72, 77], men frem til i dag har det kun blitt publisert en studie som indikerer at dette er mulig. Viruset ASRV, som nesten er identisk med PRV, ble dyrket i en cellelinje fra en Grouper – fisk [65]. Dyrking av viruset i cellekultur er essensielt for blant annet å etablere smitte modeller og utvikle vaksiner mot PRV, samt å etablere økt kunnskap om virusets virulens og sykdomsforløp. I denne delen av oppgaven ble det utarbeidet en protokoll for isolering og etablering av primærkultur av hjerteceller fra Atlantisk laks, som senere ble brukt til infeksjonsstudier med PRV. Det ble også utført et infeksjonsforsøk med en etablert hjertecellelinje fra Stillehavslaks, CHH-1 celler.

4.2.1 Utvikling av protokoll for isolasjon og etablering av primærkultur av hjerteceller.

I denne oppgaven ble det til sammen utført 4 forskjellige celleisoleringer fra Atlantisk laks, hvor det gjennom testing av ulike betingelser ble etablert en standard metode for isolering av celler fra atrium. Det ble bestemt egnet dyrkningssubstrat (laminin), enzym (liberase TM) og enzymbehandlingstid (30 min) for vevet, som ga isolasjon av hovedsakelig 3 ulike celletyper: endotel, epitel og myocytter.

Identifikasjon av celler

Celletypene ble angitt utifra morfologi basert på beskrivelser i en studie for etablering av kulturer med endocardiale endotelceller [104]. Det finnes ikke mange publikasjoner på etablering av cellekultur fra hjerte hos laks, og det ble også observert andre celletyper i kulturen som ikke var beskrevet i den nevnte studien. For sikker identifikasjon av de ulike celletypene burde man analysert uttrykk av cellespesifikke markører. Slike markører er ikke kjent for ulike typer hjerteceller fra laks og dette ble dermed ikke utført. I dette studiet var det hovedsakelig myocytter en var interessert i å etablere kultur av, ettersom PRV tidligere har blitt påvist i cardiomyocytter *in vivo* [80]. Myocytterne var lett å identifisere i våre kulturer, da de hadde et karakteristisk utseende og var større sammenlignet med de andre celletypene. Det ble også observert kontraksjoner av cellene noe som gir en sikker identifikasjon.

Enzymbehandling

I likhet med Koren et al. ble det observert bedre celleutbytte fra atrium, sammenlignet med ventrikkel [104]. Ventrikkel er en mer kompakt vevstype sammenlignet med atrium [74], noe som kan forklare hvorfor det er vanskeligere å løsne cellene fra vevet enzymatisk. Ved siste celleuttak ble celler fra ventrikkel forsøkt isolert ved bruk av en kraftigere enzymblending. Resultatene fra dette var lovende, men det er fortsatt behov for mer optimalisering og testing for å kunne etablere en standard protokoll for isolering av hjerteceller fra ventrikkel.

Ved collagenasebehandling av atrium er det viktig å utvise forsiktighet ved spyling av vevet for løsning av celler. Kraftig spyling kan medføre at vevet går i oppløsning og en får dannet vevsklumper i kulturen. Atrium er et mye «bløtere» vev sammenlignet med ventrikkel, og det er mulig celleisolering kunne vært utført med en mindre aggressiv collagenaseløsning og at man dermed kunne unngått å få med vevsklumper i kulturen. I dette forsøket ble vevsbiter

fjernet ved sedimentering. Det ble ikke testet ut noen andre enzymløsninger, da en fikk godt celleutbytte og det oppsto ikke store problemer med at vevsbiter fulgte med i kulturen.

For å kunne utvikle en standard protokoll for enzymbehandling av vev ved etablering av primære cellekulturer er en avhengig av at enzymer og reagenser er like og har de samme egenskapene selv ved bruk av ulike produksjonsbatcher med enzymløsning. Dette har ofte vist seg problematisk ved tidligere forsøk, da ulike produksjonsbatcher med collagenase har vist seg å gi ulike resultater av celleutbytte. Det var da nødvendig å bestemme varighet for enzymbehandling fra batch til batch (Tore Seternes, pers. med.) I dette forsøket ble det benyttet 2 ulike batcher av Liberase TM, men det ble ikke oppdaget noen store forskjeller i celleutbytte mellom batchene. Dagens teknologi har gjort enzymutvinning mer stabilt, en har derfor mer stabile reagenser som gjør at man unngår problemer med batch- forskjeller.

Estimering av antall

I studiet ble det til å begynne med benyttet en automatisk celleteller for estimering av antall celler. Kontroll opp mot manuell telling av celler i tellekammer i mikroskop, ga indikasjoner på at automatisk celleteller overestimerer antall celler isolert. Dette skyldes sannsynligvis at maskinen ikke klarer å skille mellom rusk og vevsfragmenter, samt eventuelle røde blodceller som kan følge med kulturen. Ut fra dette kan man konkludere med at manuell telling av celler er nødvendig for å kunne gi et nøyaktig antall av celleutbyttet.

Dyrkingssubstrat

Ved det første celleuttaket ble det testet ulike pre-coatinger av celledyrkningskolber, med matrix-proteinene laminin, fibronectin og amine, som et forsøk på å oppnå økt tilhefting av celler. Koren et. al har tidligere rapportert at coating med matrixproteiner er nødvendig for tilhefting av celler, og at god tilhefting av endocardiale endotelceller ble oppnådd på plast coatet med collagen, gelatin og fibronectin [104]. I vårt studie ble det også observert god tilhefting av celler ved utsæd på fibronectin. Ved sammenligning, var laminin den pre-coatingen som tilsynelatende fungerte best for tilhefting av myocytter, og ble av den grunn valgt som dyrkingssubstrat ved de andre celleuttakene.

Kontaminering

Det ble observert tydelig sammenheng mellom godt forarbeid (eks. rask perfusjon av hjertet og god sterilteknikk ved uttak) for å oppnå kulturer uten kontaminering med bakterier og røde

blodceller. Ved uttak 2 var det problemer med kontaminering av røde blodceller i kulturen. Dette kan forklares ved at fisken ble liggende litt lenge før hjertet ble tatt ut og perfundert og det ble dermed dannet blodkoagler. Ved uttak 3 var det store problemer med kontaminering av bakterier i kulturene. Det er uvisst hva dette skyldtes, men en mulighet kan være dersom det har oppstått punktering av tarm ved dissekering og uttak av hjertet. Teknisk sett er det omtrent umulig å jobbe helt sterilt, og det er derfor nødvendig med tilsetning av bredspektret antibiotikum i transport og dyrkingsmedium for cellene.

Forslag til videre arbeid med primære hjerteceller.

Det er fortsatt mange parametre som kan testes ut for å optimalisere dyrkningsbetingelsene for cellene. I dette studiet ble det ikke utført noen optimaliseringer for utvikling av dyrkingsmedium for cellene. Observasjoner fra infeksjonsforsøk 3 indikerer at cellene påvirkes av innhold i inkubasjonsmedium, og at dette kan ha stor innvirkning på utvikling av morfologi til cellene (celler inkubert med og uten homogenat utviklet seg forskjellig). Det bør også jobbes videre med etablering av kultur fra ventrikkel. Behandling med en kraftigere enzymløsning, ga lovende resultater i forhold til celleutbytte og bør testes ut videre. Det bør også gjøres optimaliseringer av dyrkningssubstrat for ventrikkel, da det ble gjort observasjoner som indikerte dårlig tilhefting av myocytter på laminin. I studiet ble det også gjort observasjoner av andre celletyper som ikke ble navngitt. Det ville vært interessant og spesifikt bestemt de ulike celletypene, ikke bare ved vurdering av cellens morfologi, men også ved utvikling av markører for de ulike celletypene. Ved bruk av slike markører, er det mulig å gi en mer sikker identifikasjon og vurdering av utvikling av cellene. Protokollen som ble utviklet i dette studiet, gir en forutsigbar etablering av primære hjerteceller med relativt lang levetid i kultur. I dette studiet ble cellene benyttet til infeksjonsforsøk med PRV. Det kunne også vært interessant å teste cellene for infeksjon med andre patogene virus som forårsaker lesjoner i hjertet hos laks, eksempelvis PMCV og SAV.

4.2.2 Infeksjonsforsøk med PRV *In vitro*

HSMB er en sykdom som primært forårsaker skade og vevsforandringer i hjertet (hovedsakelig ventrikkel) hos Atlantisk laks [72]. Senere studier har også vist tilstedeværelse av PRV i hjertet [64, 80], noe som har ledet til oppfattelsen om at hjertet er det primære målorgan for viruset. På bakgrunn av dette var det ønskelig å teste ut om det var mulig å dyrke viruset i en cellekultur fra hjertet. I denne oppgaven ble PRV forsøkt dyrket i 2 ulike

cellesystem; etablert cellelinje av Chum salmon heart celler (CHH-1) [97] og i primærkultur av hjerteceller fra Atlantisk laks. Det ble benyttet primærcellekultur av hjerte, ettersom det i dag ikke finnes noen tilgjengelige etablerte cellelinjer fra hjerte til Atlantisk laks.

ASRV er dyrket i en etablert cellelinje fra grouperfisk, GF-1 celler [65]. Denne cellelinjen er utviklet fra finnevev fra arten *Epinephelus coioides*, og er i tillegg vist å være mottakelig for blant annet IPNV, hard clam reovirus (HCRV), eel herpes virus Formosa (EHVF) og grouper nervous necrosis virus (GNNV) [84]. For at en viruspartikkel (et viron) skal kunne infisere celler og spres fra celle til celle og deretter fra organisme til organisme, må viruset ha utviklet egenskaper som gjør at det kan komme inn i organismen og cellen. Det første stadiet i en virusinfeksjon, er binding av viruset til en målcelle. I cellemembranen finnes ulike molekyler som kan fungere som reseptorer og tilheftingsfaktorer til viruset. Korrekt reseptor i cellen er derfor en avgjørende faktor for hvilke celler som kan bli infisert av et gitt virus [116]. Infeksjon med PRV i GF-1 celler, kan mulig forklares ved at denne cellelinjen sannsynligvis har en reseptor som viruset kan benytte.

Infeksjonsforsøk i etablert cellelinje CHH-1 celler

Ved dyrking av virus i cellekultur, er det nødvendig å opprette betingelser som er mest mulig optimale for både celler og virus. Optimal veksttemperatur for CHH-1 celler er ca. 20 °C, men cellene har god vekst også ved noe lavere temperaturer [97]. Etersom havtemperaturen langs kysten normalt sett ligger godt under 20 °C, er derfor nærliggende å tro at optimal dyrkningstemperatur for viruset vil være noe lavere enn optimum dyrkningstemperatur for CHH-1 celler. Temperaturspekter for dyrking av PRV er ikke kjent, men kjent fra andre fiskepatogene virus er at de kan oppformeres ved 15 til 20 °C. For infeksjonsforsøket ble det valgt en temperatur som er innenfor CHH-1 cellenes temperaturområde og som viruset muligens kan replikere ved.

Resultater fra real-time RT-PCR analyse av prøver fra infeksjonsforsøket viste ingen deteksjon av PRV. Det ble heller ikke gjort observasjoner som kunne tyde på cytopatogen effekt eller andre celleforandringer forårsaket av viruset. Første høsting ble gjort etter 2 timer inkubering, men det ble ikke påvist PRV fra denne eller noen av de andre prøvene som ble tatt i løpet av infeksjonsperioden på 3 uker. Det kan tenkes at en hadde for lav mengde virus i homogenatet som ble satt på ved infisering av cellene, og at man derfor ikke har oppnådd infeksjon. Selv om prøvene kort tid etter infeksjon var negative for PRV ville det, om en

hadde klart å etablere virusinfeksjon i cellene og på den måten oppnådd nydannelse av viruspartikler, vært mulig å detektere virus ved et senere høstetidspunkt. Ved analyse av prøvemateriale, ble det beregnet lik RNA mengde fra alle prøvene inn i cDNA syntesen. Analyser ved real-time RT-PCR viste likevel en liten økning i genuttrykk av referansegenet i løpet av infeksjonsperioden. Det er lite trolig at dette skyldes en unøyaktig fortykning av RNA, da det ble observert en «jevn» øking av EF1 α . En annen mulighet er at uttrykk av referansegenet forandres over tid og uttrykkes mer med økende alder på cellene, eller påvirkes av andre faktorer i kulturen over tid. Stabilitet av ulike referansegener ble ikke testet ut da dette ligger utenfor rammene for denne oppgaven. Referansegenet som ble brukt var valgt på basis av tidligere arbeid med påvisning av PRV isolert direkte fra laksehjerte [64, 67].

Selv om en i dette forsøket ikke har klart å påvise oppformering av PRV i CHH-1 celler, er det fremdeles mange ulike betingelser som gjenstår å teste før man kan utelukke at denne cellelinjen er mottakelig for PRV. Det er fortsatt ukjent hvilken celletype PRV kan replikere i, og selv om man benytter en celletype som er utviklet fra hjerte (som CHH-1) er det på ingen måte sikkert at denne celletypen er riktig for PRV. I tillegg til riktig reseptor, er det også andre faktorer i celler som er med på å bestemme om en celletype er mottakelig for et virus eller ikke. Ved etablering av protokoll for dyrkning av et nytt virus er det mye som «skal klaffe». Man må ha god tid og gjennomføre mange forsøk (og kanskje er man avhengig av en liten dose flaks?), før man finner egnede betingelser for dyrking av virus.

Infeksjonsforsøk i primære hjerteceller

Så vidt meg bekjent, har det ikke blitt publisert noen tidligere infeksjonsforsøk med PRV i primære hjerteceller fra Atlantisk laks. I denne oppgaven ble det totalt utført 3 infeksjonsstudier med blandingskultur av hjerteceller isolert fra atrium. Resultater fra infeksjonsforsøk 3 indikerte en økning i viruskonsentrasjon i enkelte av prøvene. Det ble testet ulike infeksjonsstrategier hvor det ble detektert en økning på 1,5 – 2 Ct verdier fra t0 til høsting gjort 15 dager etter infeksjonsstart i supernatant fra celler inkubert med homogenat og trypsinbehandlet homogenat. Prøver fra infeksjonsforsøk 1 og 2 samt enkelte prøver i infeksjonsforsøk 3 ble ekskludert fra resultatene, da det oppsto feil amplifikasjon og smeltepunktskurve ved real-time RT-PCR analysen. Amplifikasjonskurven for enkelte av prøvene som ble tatt med i resultatet hadde en noe flatere stigning sammenlignet med positiv kontroll, og en kan ikke utelukke at dette kan ha påvirket resultatet og gitt indikasjoner på økt

mengde PRV. En annen betenkelighet ved disse resultatene er at det ikke ble detektert noen økning av virus i de adherente cellene som var infisert med trypsinbehandlet homogenat. Ved sammenligning av virusinnhold i adherente celler inkubert uten homogenat, og adherente celler inkubert med homogenat, ser man en liten økning i viruskonsentrasjon. Infeksjonsforsøket gir derfor indikasjoner på at det kan ha oppstått en økning i viruskonsentrasjon, men dette må bekreftes ved gjentakende forsøk. Det bør også utføres infeksjon av nye celler ved bruk av cellemedium / supernatant høstet av infeksjonsforsøket for å teste om det på nytt gir indikasjoner på infeksjon i celler og økning av virusinnhold.

Studier med andre virus i familien *Reoviridae* har vist at behandling med proteaser, som trypsin, kan gi strukturelle endringer i overflateproteiner på viruset og dermed lede til økt infektivitet både hos Aquareovirus og Orthoreovirus [117-121]. I dette forsøket ble det forsøkt å øke infektiviteten til viruset ved å behandle infeksjonsmaterialet med trypsin. Resultatene indikerer en økning i viruskonsentrasjon i supernatant, men grunnet usikkerhet i analyseresultatene kan en ikke konkludere sikkert med at man har fått en produksjon av virus. Dette må testes videre ved å gjøre flere infeksjonsforsøk. De lovende resultatene med trypsinbehandling av hjerteceller, er også en grunn til å eventuelt teste ut dette også i CHH-1 celler.

Ved infeksjonsforsøk 1 og 2 ble det observert store morfologiske forskjeller i utvikling mellom uinfiserte og infiserte celler. Infeksjonsforsøk med PRV i GF-1 celler, viste at de utviklet cytoplasmiske vakuoler etter ca. 1 ukes inkubering [65]. I vårt forsøk ble det observert dannelse av vakuoler i endo- og epitelceller så tidlig som 4 timer etter infeksjon. Dette ledet til mistanken om at det var komponenter i homogenatet som forårsaket cytotoxiske effekter, og på den måten påvirket cellene. For å undersøke dette, ble det tillaget et homogenat fra klinisk frisk fisk som ble brukt som kontroll ved infeksjonsforsøk 3. Dette forsøket ga forholdsvis lik morfologisk utvikling mellom infiserte og uinfiserte celler, noe som var med på å bekrefte at morfologiske forandring som ble observert i celler var forårsaket av komponenter i selve homogenatet og ikke nødvendigvis virus. Over tid ble det observert ulik morfologisk utvikling mellom celler som hadde blitt infisert med homogenat, og celler der homogenatet ble sugd av, noe som indikerer at det finnes komponenter, både i kontroll og infeksjons-homogenat, som er med på å påvirke den morfologiske utviklingen til cellene.

Ved infeksjonsforsøk 3 ble det observert en karakteristisk forskjell mellom infiserte og uinfiserte celler, hvor celler infisert med homogenatet fra HSMB syk fisk inneholdt noen sirkelrunde partikler / vesikler som ikke ble observert i celler infisert med homogenat fra klinisk frisk fisk. Vesiklene ble observert i alle infiserte brønner, de ble registrert for første gang 13 timer etter infeksjon og det ble gjort observasjoner som kunne tyde på at vesiklene ofte var plassert i nærheten av myocytter. Det er ikke kjent hva som forårsaket utvikling av disse vesiklene og om dette kan være indikasjoner på en eventuell virusinfeksjon. Denne forskjellen mellom infiserte og uinfiserte celler ble ikke registrert ved infeksjonsforsøk 1 og 2, da kun medium ble tilsatt i uinfiserte kontroller. Vesiklene ble ikke observert i kontrollceller som fikk tilført homogenat tillaget av klinisk frisk fisk, men selv om homogenatene var likt opparbeidet og ble brukt i samme konsentrasjon, kan en ikke utelukke at forskjellene er knyttet til ulikheter i selve homogenatene og ikke til viruspåvirkning.

I en nylig publisert studie har det blitt vist at PRV tilhører en gruppe ikke-fusogene reovirus og at viruset mangler et fusion-associated small transmembrane (FAST) protein [122], som er essensielt for å kunne fusjonere celler og danne multinukleære synsytium [123]. I studien ble det vist at PRV p13 er en ny type integralt membranprotein som induserer cytotoxicitet i celler, noe som kan være med på å forklare vevsskadene som oppstår med sykdommen HSMB [122]. Dersom en har klart å oppnå infeksjon i hjertecellene, kan en ikke utelukke at dette proteinet som en del av infeksjonsstrategien til viruset, har vært med på å skape noen av de cellulære forandringene som ble observert under forsøksperioden.

I løpet av forsøksperioden ble det registrert at det oppsto fargeforskjeller på cellemediet, noe som kan indikere pH forskjeller skapt av ulike brønnermiljø. Enkelte virustyper blir trigget av (vanligvis) lav pH for aktivering av penetrering til cytosol. Det er ikke kjent at Reovirus er avhengig av pH for infeksjon [116]. Det ble vist i forsøk med dyrking av ASRV i GF-1 celler, at inokulum med svært lav pH (pH 3) forhindret dannelse av vakuoler som tegn på infeksjon [65]. I vårt studium ble det ikke testet ut hvilken effekt eventuelle pH forandringer kunne ha for infeksjon av celler. Det ble ikke utført målinger for å detektere eventuelle pH forskjeller, og parallelle brønner ble høstet sammen uavhengig om det hadde oppstått fargeforskjeller i mediet. En kan ikke utelukke at eventuelle pH forskjeller har gitt ulike forutsetninger for virusproduksjon, og en burde optimalt sett ha holdt disse brønnene adskilt. Likevel er det liten grunn til å anta at dette er tilfelle, da både celler og virus tåler en viss variasjon i pH og en stor

pH-variasjon ville vært detektert ved kraftig fargeforandring på mediet. I en forsøkssammenheng er det viktig å finne en balansegang for hva som er relevant og hvilke parameter en skal prioritere. Dersom man hadde oppnådd virusproduksjon i 1 av 2 parallelle brønner, må en anta at denne produksjonen er stor nok til å gi klare resultater ved real-time RT-PCR.

Et annet viktig moment som må tas i betraktning når det gjelder dette infeksjonsstudiet, er at det ble arbeidet med en miks av ulike celletyper. Dersom bare en av disse celletypene er mottakelig for PRV vil dette påvirke forholdet mellom mengde virus / celler. For lav konsentrasjon av celler gir suboptimal moi, noe som gir mindre sjanse for etablering av en virusinfeksjon.

Kan PRV dyrkes i hjerteceller fra Atlantisk laks?

I dette forsøket kan det ikke sikkert bevises at en har klart å infisere primære hjerteceller med PRV og oppnådd nyproduksjon av viruset. Det er flere momenter som kan være med på å forklare dette.

Primærcelekkulturen ble etablert ved enzymatisk løsning av celler fra vevet. Selv om det ble brukt et enzym som er vist å være skånsomt for cellene, kan en likevel ikke utelukke at behandlingen kan ha medført en endring i eventuelle reseptorer og egenskaper i cellene. En har derfor ingen garanti for at *in vitro* infeksjonsforhold er de samme som *in vivo*.

Scavenger endotel celler (SEC) er en viktig del av immunsystemet til vertebrater, som aktivt tar opp og fjerner avfallsstoffer fra blodet. Hos pattedyr finnes disse cellene lokalisert i lever, hos beinfisk er cellene påvist i hjertet (endocardium) eller nyre (venous sinusoids) [124]. I Atlantisk laks har SEC blitt påvist i nyre, men ikke i hjerte [104, 125]. Med bakgrunn i lokalisering av SEC hos laks, er det lite trolig at viruset blir tatt opp i endotelceller i hjertet på grunn av en scavenger funksjon.

Per dags dato eksisterer det ingen publikasjoner som beskriver konkret infeksjonsmekanisme til PRV. PRV har blitt påvist i både myocytter og leukocytter i hjertet *in vivo*, og det ble foreslått at leukocytter kunne være en målcelle for viruset [80]. Kongtorp og Taksdal påpekte at det infeksiøse agens som forårsaker HSMB ikke nødvendigvis primært trenger å infisere cardiomyocytter. En mulighet kan være at agenset transporteres med blodet og infiserer endotel- og andre celler assosiert med koronare blodårer og i endocardium, og gjennom det

induserer en betennelsesreaksjon i hjertet [77]. Ettersom immunhistokjemisk påvisning av PRV i myocytter er i korrelasjon med histopatologiske lesjoner [80], taler dette for en mulig replikasjon av viruset i hjertemuskulatur.

Immunhistokjemisk farging av PRV har påvist viruset i leukocyttilignende celler i blodårer og i ventrikkellumen, hvor enkelte av de PRV positive cellene ble funnet i nærheten av endotelceller. Ut fra dette ble det spekulert i om PRV kunne ha en lignende infeksjonsmekanisme som Mammalian Orthoreovirus (MRV) som bindes til junctional adhesionsmolekyl-A (JAM-A) [80], som er et festemolekyl lokalisert mellom endotel- og epitelceller [126] og en reseptor for reovirus [127]. Dersom PRV benytter en slik reseptor, kan man ikke utelukke at viruset gjennom JAM-A infiserer og entrer endotelceller før infeksjon av myocytter. Nylig har det blitt påvist 2 nye kapsidproteiner i PRV, p37 outer-clamp og p35 outer-fibre protein. Dersom man antar at disse proteinene fungerer på tilsvarende måte som hos Mammalian reovirus (MRV), må outer-clamp proteinet degraderes av proteaser fra verten før viruset kan penetrere cellemembranen og entre cellen [122]. Dette kan være en forklaring på de lovende resultatene som ble registrert ved trypsinbehandling av homogenatet.

Som et ledd i å bekjempe sykdommen HSMB, bør det fortsatt jobbes videre med å utvikle en metodikk for dyrkning av PRV i cellekultur. Det er fortsatt mye som tilsier at dette kan være mulig både i CHH-1 celler og primære hjerteceller. Behandling med trypsin ga lovende resultater i dette studiet, noe som også har vist seg nødvendig ved infeksjonsstudier med andre reovirus. Det er viktig at kontrollceller behandles mest mulig likt infiserte celler, da resultatene indikerer at selve vevshomogenatet har stor innvirkning på utvikling av morfologien til cellene. For å hindre påvirkning fra toksiske molekyler i homogenatet, kan en bruke en mer opprenset PRV løsning til infeksjon av celler. Resultater fra dette forsøket indikerte virusøkning i celler hvor homogenatet ikke var blitt fjernet. Infeksjonsmengde (virusinnhold i homogenatet) og inkubasjonstid bør testes ut videre. Det kan også gjøres optimaliseringer i forhold til metodikken ved RNA rensing, for å kartlegge årsaker og mulig unngå at det oppstår resultater med unormal amplifikasjonskurve i real-time assayet.

4.3 Konklusjon

Gjennom badsmitte av Atlantisk laks med et høyvirulent IPNV virusisolat i ferskvann ble det etablert en virusinfeksjon, som utviklet seg til en persistent IPNV infeksjon og som vedvarte gjennom hele forsøksperioden på 22 uker.

IPNV infeksjonen ble ikke reaktivert ved sjøsetting. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i IPN-virusutvikling mellom vaksinerte og uvaksinerte fiskegrupper og fisk som var smittet med både IPNV og HSMB. Vaksinering mot IPN forhindret ikke smitte og etablering av bærertilstand av IPNV.

PRV RNA ble detektert i alle infiserte fiskegrupper 3 uker etter i.p.- smitte med hjertehomogenat fra HSMB diagnostisert fisk, på et tidspunkt da ingen fisk ble diagnostisert med HSMB. Alle undersøkte fisk ble diagnostisert med HSMB 7 uker etter smitte. Det ble samtidig detektert høye mengder PRV i alle fiskegrupper.

Det ble ikke gjort noen funn, hverken ved kvantifisering av PRV RNA eller histopatologisk diagnostisering, som tydet på at IPNV bærere hadde en annen utvikling av HSMB infeksjonen enn ikke-bærere. Vice versa, så det heller ikke ut til at en PRV infeksjon påvirket en bærertilstand av IPNV på noen måte.

I uke 7 og 10 etter smitte med HSMB ble det påvist signifikant mer PRV i vaksinert fisk (henholdsvis fiskegruppe infisert med HSMB i uke 7 og fiskegruppe dobbeltinfisert med IPN og HSMB i uke 10), sammenlignet med uvaksinert fisk i samme gruppe og prøveuttakstidspunkt. Vaksinert fisk synes å være mer mottagelig for en infeksjon med PRV, uten at dette så ut til å påvirke utviklingen av vevsforandringer forenelig med en HSMB diagnose negativt.

I dette studiet ble det utarbeidet en protokoll for etablering av primærkultur av hjerteceller fra atrium hos Atlantisk laks. Protokollen gir blandingskulturer av hovedsakelig 3 ulike celletyper som lever ca. 2 måneder i kultur.

Det ble ikke påvist produksjon av PRV i CHH-1 celler. Det ble funnet indikasjoner på at viruset lar seg dyrke i primære hjerteceller men flere infeksjonsstudier må gjennomføres for å kunne verifisere dette.

5 Kilder

1. Olsen, B.A., et al., *Fiskehelse rapporten 2012*, R. Johansen, Editor 2013, Veterinærinstituttet - Norwegian Veterinary Institute: <http://www.vetinst.no/Publikasjoner/Fiskehelse rapporten>.
2. Bornø, G. and Sviland, C., *Helsesituasjonen hos laksefisk 2010*, in *Fiskehelse rapporten 2010*, G. Bornø and C. Sviland, Editors. 2010, Veterinærinstituttet - Norwegian Veterinary Institute: <http://www.vetinst.no/Publikasjoner/Fiskehelse rapporten>.
3. M'Gonigle, R.H., *Acute Catarrhal Enteritis of Salmonid Fingerlings*. Transactions of the American Fisheries Society, 1941. **70**(1): p. 297-303.
4. Biering, E., *Infeksiøs pankreasnekrose*, in *Fiskehelse og fiske sykdommer*, T. Poppe, Editor 1999, Universitetsforlaget AS: Oslo. p. 135-141.
5. Delmas, B., et al., *Family Birnaviridae*, in *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, A.M.Q. King, et al., Editors. 2012, Elsevier Academic Press. p. 499-507.
6. Evensen, Ø., et al., *IPN in salmonids a review October 2003*, B. Skjelstad, Editor 2003, FHF / NFR.
7. Rimstad, E., *The Infectious pancreatic necrosis virus*, in *IPN in salmonids a review October 2003*, B. Skjelstad, Editor 2003, FHF / NFR. p. 17-36.
8. Hill, B.J. and Way, K., *Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses*. Annual Review of Fish Diseases, 1995. **5**(0): p. 55-77.
9. Evensen, Ø., *IPN-virusets sykdomsfremkallende evne (virulens)*, in *Tiltak mot IPN i Norsk Oppdrettsnæring - Gjennomgang av forskning og erfaringer de siste 10 år*, A.-I. Sommer, L.-H. Johansen, and I. Jensen, Editors. 2011, FHF. p. 1-3.
10. Sano, M., et al., *Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment-A)*. Journal of Fish Diseases, 1992. **15**(4): p. 283-293.
11. Shivappa, R.B., et al., *Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence*. Dis Aquat Organ, 2004. **61**(1-2): p. 23-32.
12. Santi, N., Vakharia, V.N., and Evensen, O., *Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus*. Virology, 2004. **322**(1): p. 31-40.
13. Song, H.C., et al., *Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation*. Journal of Virology, 2005. **79**(16): p. 10289-10299.
14. Santi, N., et al., *Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence*. Journal of Virology, 2005. **79**(14): p. 9206-9216.
15. Skjesol, A., et al., *IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection*. Virology Journal, 2011. **8**.
16. Gadan, K., et al., *Stress-Induced Reversion to Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Naive Fry of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)*. Plos One, 2013. **8**(2).
17. Evensen, Ø. and Santi, N., *Infectious Pancreatic Necrosis Virus*, in *Encyclopedia of virology*, B.W.J. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, Editors. 2008, Elsevier AP: Amsterdam. p. 83-89.

18. Roberts, R.J. and Pearson, M.D., *Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, Salmo salar L.* Journal of Fish Diseases, 2005. **28**(7): p. 383-390.
19. Johansen, L.-H., *Host-related factors - Persistence, in IPN in salmonides a review October 2003*, B. Skjelstad, Editor 2003, FHF / NFR. p. 68-76.
20. Johansen, L.-H., *Påvisning av IPN-virusbærere, smitteoverføring og desinfeksjon*, in *Tiltak mot IPN i Norsk oppdrettsnæring - Gjennomgang av forskning og erfaringer de siste 10 år*, A.-I. Sommer, L.-H. Johansen, and I. Jensen, Editors. 2011, FHF. p. 4-12.
21. Jensen, I. and Sommer, A.I., *IPN-virusangrep og forsvarsstrategier hos laksen*, in *Tiltak mot IPN i Norsk oppdrettsnæring - Gjennomgang av forskning og erfaringer de siste 10 år* 2011, FHF. p. 13-18.
22. Cann, A.J., *Persistent infection*, in *Principles of Molecular Virology* 2012, Elsevier Ltd: Canada. p. 198-200.
23. Zou, J. and Secombes, C.J., *Teleost fish interferons and their role in immunity*. Developmental and Comparative Immunology, 2011. **35**(12): p. 1376-1387.
24. Skjesol, A., et al., *The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection*. Virus Research, 2009. **143**(1): p. 53-60.
25. Saint-Jean, S.R., de Las Heras, A.I., and Prieto, S.I.P., *The persistence of infectious pancreatic necrosis virus and its influence on the early immune response*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **136**(1-2): p. 81-91.
26. Reyes-Cerpa, S., et al., *IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence*. Fish Shellfish Immunol, 2012. **32**(2): p. 291-300.
27. Johansen, L.H. and Sommer, A.I., *In-vitro studies of infectious pancreatic necrosis virus-infections in leukocytes isolated from Atlantic salmon (Salmo-salar L)*. Aquaculture, 1995. **132**(1-2): p. 91-95.
28. Johansen, L.H. and Sommer, A.I., *Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, Salmo salar L.* Journal of Fish Diseases, 1995. **18**(2): p. 147-156.
29. Knott, R.M. and Munro, A.L.S., *The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon*. Vet Immunol Immunopathol, 1986. **12**(1-4): p. 359-364.
30. Bruno, D.W. and Munro, A.L.S., *Immunity in Atlantic Salmon, Salmo salar L., Fry Following Vaccination Against Yersinia ruckeri, and the Influence of Body Weight and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) on the Detection of Carriers*. Aquaculture, 1989. **81**(3-4): p. 205-211.
31. Johansen, L.H. and Sommer, A.I., *Infectious pancreatic necrosis virus infection in Atlantic salmon Salmo salar post-smolts affects the outcome of secondary infections with infectious salmon anaemia virus or Vibrio salmonicida*. Dis Aquat Organ, 2001. **47**(2): p. 109-117.
32. Damsgard, B., Mortensen, A., and Sommer, A.I., *Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, Salmo salar L.* Aquaculture, 1998. **163**(3-4): p. 185-193.
33. Johansen, L.H., Eggset, G., and Sommer, A.I., *Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr; recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts*. Aquaculture, 2009. **290**(1-2): p. 9-14.
34. Taksdal, T., et al., *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, 1998. **21**(3): p. 193-204.
35. Stangeland, K., Hoie, S., and Taksdal, T., *Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, Salmo salar L, post-smolts*. Journal of Fish Diseases, 1996. **19**(4): p. 323-327.
 36. Sommerset, I. and Sommer, A.-I., *Bør en vaksinere laks som allerede er bærer av IPN-virus?* Norsk Fiskeoppdrett, 2010. **35**(11): p. 54-56.
 37. Biering, E., Håstein, T., and Hjeltnes, B., *Har forvaltningsmessige tiltak hatt betydning for (manglende) kontroll av IPN?*, in *Tiltak mot IPN i Norsk Oppdrettsnæring - Gjennomgang av forskning og erfaringer de siste 10 år*, A.I. Sommer, L.H. Johansen, and I. Jensen, Editors. 2011, FHF. p. 30-35.
 38. AquaGen. *Living with the IPN virus*. Information Letter No.2 2007 [cited 2013 07.05.]; Available from: http://aquagen.no/En/Information_Letter/Living+with+the+IPN+virus.9UFRrGXB.ips.
 39. Wetten, M., et al., *Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Aquaculture, 2007. **272**(1-4): p. 111-117.
 40. Storset, A., et al., *Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Aquaculture, 2007. **272**: p. S62-S68.
 41. Houston, R.D., et al., *The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL*. Heredity, 2010. **105**(3): p. 318-327.
 42. Moen, T., et al., *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, 2009. **10**.
 43. AquaGen. *QTL Eggs - Documented IPN Protection from Day One*. Information Letter no. 1. 2010; Available from: <http://www.aquagen.no/filestore/01-2010QTLeggsDocumentedIPNProtectionfromDayOne.pdf>.
 44. Wilkinson, E. and Bævre-Jensen, M., *Vaksinering mot IPN - muligheter og begrensninger*, in *Fiskehelse2011*, Tekna.
 45. Christie, K.E., *Immunization with viral antigens: Infectious pancreatic necrosis*. Fish Vaccinology, 1997. **90**: p. 191-199.
 46. Frost, P. and Ness, A., *Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge*. Fish Shellfish Immunol, 1997. **7**(8): p. 609-619.
 47. Ramstad, A., et al., *Field validation of experimental challenge models for IPN vaccines*. Journal of Fish Diseases, 2007. **30**(12): p. 723-731.
 48. Ramstad, A. and Midtlyng, P.J., *Strong genetic influence on IPN vaccination-and-challenge trials in Atlantic salmon, Salmo salar L*. Journal of Fish Diseases, 2008. **31**(8): p. 567-578.
 49. Munang'andu, H.M., et al., *Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (Salmo salar L.) in a cohabitation challenge model*. Vaccine, 2012. **30**(27): p. 4007-4016.
 50. Midtlyng, P.J., *Kontroll av IPN ved vaksinering, bruk av helsefôr og endrede driftsrutiner*, in *Tiltak mot IPN i Norsk Oppdrettsnæring - Gjennomgang av forskning*

- og erfaringer de siste 10 år, A.I. Sommer, L.H. Johansen, and I. Jensen, Editors. 2011, FHF. p. 25-29.
51. Bowden, T.J., et al., *Experimental challenge of post-smolts with IPNV: mortalities do not depend on population density*. Journal of Fish Diseases, 2003. **26**(5): p. 309-312.
 52. Eggset, G., et al., *Susceptibility to furunculosis, cold water vibriosis, and infectious pancreatic necrosis (IPN) in post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar L.) as a function of smolt status by seawater transfer*. Aquaculture, 1997. **158**(3-4): p. 179-191.
 53. Fridell, F., et al., *Effect of hyperoxygenation and low water flow on the primary stress response and susceptibility of Atlantic salmon Salmo salar L. to experimental challenge with IPN virus*. Aquaculture, 2007. **270**(1-4): p. 23-35.
 54. Sommer, A.-I., Johansen, L.-H., and Toften, H., *Sammenhenger mellom intensivert drift og IPN-utbrudd hos smolt*. Norsk fiskeoppdrett, 2001. **12**(12): p. 60-62.
 55. Sundh, H., et al., *The effect of hyperoxygenation and reduced flow in fresh water and subsequent infectious pancreatic necrosis virus challenge in sea water, on the intestinal barrier integrity in Atlantic salmon, Salmo salar L.* Journal of Fish Diseases, 2009. **32**(8): p. 687-698.
 56. Anonymous. *Marine Harvest: Offensiv mot IPN*. Pathos #2 2011 [cited 2013 07.05.]; Available from: http://project.vbook.no/project.asp?version_id=838#b4.
 57. Anonymous. *IPN - et ferskvannsproblem*. Pathos #2 2011 [cited 2013 07.05.]; Available from: http://project.vbook.no/project.asp?version_id=838#zpb6.
 58. Mackay, I.M., Arden, K.E., and Nitsche, A., *Real-time PCR in virology*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(6): p. 1292-1305.
 59. Orpetveit, I., et al., *Detection of Infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2010. **22**(6): p. 886-895.
 60. Kongtorp, R.T., et al., *Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, Salmo salar L.: a new infectious disease*. Journal of Fish Diseases, 2004. **27**(6): p. 351-358.
 61. Ferguson, H.W., et al., *An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation in Scottish farmed salmon, Salmo salar L., with observations on myocardial regeneration*. Journal of Fish Diseases, 2005. **28**(2): p. 119-123.
 62. Rimstad, E., *Examples of emerging virus diseases in salmonid aquaculture*. Aquaculture Research, 2011. **42**: p. 86-89.
 63. Watanabe, K., et al., *Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI)*. Dis Aquat Organ, 2006. **70**(3): p. 183-92.
 64. Palacios, G., et al., *Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus*. Plos One, 2010. **5**(7).
 65. Mikalsen, A.B., et al., *Atlantic Salmon Reovirus Infection Causes a CD8 T Cell Myocarditis in Atlantic Salmon (Salmo salar L.)*. Plos One, 2012. **7**(6).
 66. Lovoll, M., et al., *A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (Salmo salar) with cardiomyopathy syndrome (CMS)*. Virology Journal, 2010. **7**.
 67. Lovoll, M., et al., *Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon Salmo salar production*. Dis Aquat Organ, 2012. **99**(1): p. 7-U5.
 68. Wiik-Nielsen, C.R., et al., *First detection of piscine reovirus (PRV) in marine fish species*. Dis Aquat Organ, 2012. **97**(3): p. 255-258.

69. Wiik-Nielsen, C.R., et al., *Prevalence of viral RNA from piscine reovirus and piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, Salmo salar L., broodfish and progeny*. Journal of Fish Diseases, 2012. **35**(2): p. 169-171.
70. Garseth, A.H., et al., *Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, Salmo salar L., and sea-trout, Salmo trutta L., in Norway*. Journal of Fish Diseases, 2013. **36**(5): p. 483-93.
71. Attoui, H., et al., *Family Reoviridae*, in *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, M.Q.A. King, et al., Editors. 2012, Elsevier academic press. p. 541-560.
72. Kongtorp, R.T., Taksdal, T., and Lyngoy, A., *Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon Salmo salar*. Dis Aquat Organ, 2004. **59**(3): p. 217-24.
73. Kongtorp, R.T., *Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmon, Salmo salar : pathology, pathogenesis and experimental infection*, 2008, Norwegian School of Veterinary Science: Oslo.
74. Kryvi, H. and Totland, K.G., *Hjertet*, in *Fiskeanatomi1997*, Høyskoleforlaget AS: Norway. p. 107-110.
75. Amin, A.B., Mortensen, L., and Poppe, T.T., *Cardiovascular system*, in *Histology Atlas Normal structure of Salmonids1992*, Akvapatologisk laboratorium AS: Bodø, Norway. p. 64-65.
76. Kongtorp, R.T., et al., *Longitudinal study of a natural outbreak of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, Salmo salar L*. Journal of Fish Diseases, 2006. **29**(4): p. 233-244.
77. Kongtorp, R.T. and Taksdal, T., *Studies with experimental transmission of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, Salmo salar L*. Journal of Fish Diseases, 2009. **32**(3): p. 253-262.
78. Poppe, T. and Ferguson, H.W., *Cardiovascular System*, in *Systemic Pathology of Fish A text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*, H.W. Ferguson, Editor 2006, Scotian Press: London. p. 141-167.
79. Yousaf, M.N., et al., *Cardiac pathological changes of Atlantic salmon (Salmo salar L.) affected with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI)*. Fish Shellfish Immunol, 2012. **33**(2): p. 305-15.
80. Finstad, O.W., et al., *Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI)*. Vet Res, 2012. **43**(1): p. 27.
81. Freshney, R.I., *Introduction*, in *Culture of animal cells A manual of basic technique2000*, Wiley-Liss: Canada. p. 1-8.
82. DeWitte-Orr, S.J. and Bols, N.C., *Cytopathic effects of chum salmon reovirus to salmonid epithelial, fibroblast and macrophage cell lines*. Virus Research, 2007. **126**(1-2): p. 159-171.
83. Fan, C., Shao, L., and Fang, Q., *Characterization of the nonstructural protein NS80 of grass carp reovirus*. Archives of Virology, 2010. **155**(11): p. 1755-1763.
84. Chi, S.C., Hu, W.W., and Lo, B.J., *Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, Epinephelus coioides (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV)*. Journal of Fish Diseases, 1999. **22**(3): p. 173-182.

85. Johansen, L.H., et al., *Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway*. *Aquaculture*, 2011. **315**(3-4): p. 167-186.
86. Kristoffersen, A.B., Bang Jensen, B., and Jansen, P.A., *Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **109**(1-2): p. 136-143.
87. Nylund, S., et al., *Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion**. *Dis Aquat Organ*, 2011. **94**(1): p. 41-57.
88. Mattilsynet. *Endring av den nasjonale sykdomslisten*. 2013 29.04.2013.; Available from: http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/endring_av_den_nasjonale_sykdomslisten.9278.
89. Mattilsynet. *Høringsbrev endring i omsetning og sykdomsforskriften*. 2013 [cited 2013 08.05.]; Available from: http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/horingsbrev.9279/BINARY/H%C3%B8ringsbrev.
90. Melby, H.P. and Falk, K., *Study of the interaction between a persistent infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection and experimental infectious salmon anaemia (ISA) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.* *Journal of Fish Diseases*, 1995. **18**(6): p. 579-586.
91. Dale, B.O. *Fakta om: Infeksiøs Hematopoetisk Nekrose (IHN)*. 2012; Available from: <http://www.vetinst.no/index.php/nor/Faktabank/Alle-faktaark/Infeksioes-Hematopoetisk-Nekrose-IHN>.
92. Byrne, N., et al., *Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008. **24**(5): p. 489-497.
93. Tafalla, C., Rodriguez Saint-Jean, S., and Pérez-Prieto, S., *Immunological consequences of the coinfection of brown trout (*Salmo trutta*) with infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. *Aquaculture*, 2006. **256**(1-4): p. 15-22.
94. Saint-Jean, S.R. and Perez-Prieto, S.I., *Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007. **23**(2): p. 390-400.
95. de las Heras, A.I., Saint-Jean, S.R., and Perez-Prieto, S.I., *Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle*. *Journal of Fish Diseases*, 2008. **31**(7): p. 535-546.
96. Johansen, L.H., et al., *Multifactorial diseases in Norwegian Atlantic salmon farming - project description*, 2011.
97. Lannan, C.N., Winton, J.R., and Fryer, J.L., *Fish Cell-Lines - Establishment and Characterization of 9 Cell-Lines from Salmonids*. In *Vitro-Journal of the Tissue Culture Association*, 1984. **20**(9): p. 671-676.
98. Freshney, R.I., *Biology of Cultured cells*, in *Culture of animal cells a manual of basic technique*, R.I. Freshney, Editor 2000, Wiley-Liss Inc: Canada. p. 9-18.
99. Julin, K., Mennen, S., and Sommer, A.I., *Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway*. *Journal of Fish Diseases*, 2013. **36**(2): p. 89-102.

100. Dorson, M., Castric, J., and Torchy, C., *Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: biological and antigenic features of a pathogenic strain and of a non-pathogenic variant selected in RTG-2 cells*. Journal of Fish Diseases, 1978. **1**(4): p. 309-320.
101. McAllister, P.E. and Owens, W.J., *Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Protocol for a Standard Challenge to Brook Trout*. Transactions of the American Fisheries Society, 1986. **115**(3): p. 466-470.
102. Reed, L.J. and Muench, H., *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. American journal of Hygiene, 1938. **27**(3): p. 493-497.
103. Freshney, R.I., *Primary Culture*, in *Culture of Animal Cells a manual of basic technique* 2000, Wiley-Liss Inc: Canada. p. 149-175.
104. Koren, C.W., Sveinbjornsson, B., and Smedsrod, B., *Isolation and culture of endocardial endothelial cells from Atlantic salmon (Salmo salar) and Atlantic cod (Gadus morhua)*. Cell Tissue Res, 1997. **290**(1): p. 89-99.
105. Life-technologies, *Real-time PCR handbook*. 2nd ed 2012, http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf: life technologies.
106. Farrell, R., *RNA isolation strategies*, in *RNA methodologies - A laboratory guide for isolation and characterization* 2010, Elsevier Academic press. p. 45-80.
107. Pelt-Verkuil, E., Belkum, A., and Hays, J.P., *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 2008, Springer Netherlands.
108. test. *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit*. 2013 [cited 2013 05.05.13.]; Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/reverse-transcription/cdna-synthesis-kits/rt-real-time-pcr/superscript-vilo-cdna-kit.html>.
109. Pestana, A.E., et al., *Summary: Optimised Real-Time PCR Assay*, in *Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications* 2010, Springer. p. 260-261.
110. Pakingking, R., et al., *In vivo and in vitro analysis of the resistance against viral haemorrhagic septicaemia virus in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) preceedingly infected with aquabirnavirus*. Fish Shellfish Immunol, 2004. **17**(1): p. 1-11.
111. Nicholson, B.L. and Dexter, R., *Possible Interference in the Isolation of IPN Virus from Carrier Fish*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1975. **32**(8): p. 1437-1439.
112. Taksdal, T., Dannevig, B.H., and Rimstad, E., *Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2001. **21**(5): p. 214-219.
113. Kim, H.J., et al., *Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly(I:C)*. Dis Aquat Organ, 2009. **83**(2): p. 105-113.
114. Garcia, I., et al., *Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses*. Veterinary Microbiology, 2011. **149**(1-2): p. 48-55.
115. Hedrick, R.P., Leong, J.C., and Fryer, J.L., *Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. Journal of Fish Diseases, 1978. **1**(4): p. 297-308.

-
116. Acheson, H.N., *Virus entry*, in *Fundamentals of molecular Virology* 2011, John Wiley & Sons, Inc. p. 45-55.
 117. Nason, E.L., Samal, S.K., and Prasad, B.V.V., *Trypsin-induced structural transformation in aquareovirus*. *Journal of Virology*, 2000. **74**(14): p. 6546-6555.
 118. McPhillips, T.H., et al., *Enhancement of aquareovirus infectivity by treatment with proteases: Mechanism of action*. *Journal of Virology*, 1998. **72**(4): p. 3387-3389.
 119. Fang, Q., et al., *Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases*. *Archives of Virology*, 2008. **153**(4): p. 675-682.
 120. Golden, J.W., et al., *Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(15): p. 7430-7443.
 121. Nygaard, R.M., Golden, J.W., and Schiff, L.A., *Impact of Host Proteases on Reovirus Infection in the Respiratory Tract*. *Journal of Virology*, 2012. **86**(2): p. 1238-1243.
 122. Key, T., et al., *Piscine reovirus encodes a cytotoxic, non-fusogenic, integral membrane protein and previously unrecognized virion outer-capsid proteins*. *J Gen Virol*, 2013. **94**(Pt 5): p. 1039-50.
 123. Shmulevitz, M. and Duncan, R., *A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses*. *EMBO J*, 2000. **19**(5): p. 902-12.
 124. Sorensen, K.K., et al., *The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2012. **303**(12): p. R1217-R1230.
 125. Seternes, T., Sorensen, K., and Smedsrod, B., *Scavenger endothelial cells of vertebrates: A nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(11): p. 7594-7597.
 126. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. *Journal of Cell Biology*, 1998. **142**(1): p. 117-127.
 127. Barton, E.S., et al., *Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus*. *Cell*, 2001. **104**(3): p. 441-451.

6 Appendiks

6.1 Reagenser:

Reagens	Produsent	Katalog nr.
0,25 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25200-056
10 RT random primers	Applied Biosystem	4319979
10x RT buffer	Applied Biosystem	4319981
10x superscript enzyme mix	Invitrogen	100002280
2-Mercapto ethanol (CAS no. 60-24-2)	Merck	8057400005
5x VILO reaction mix	Invitrogen	100002278
Albumin 6 % (bovine) for dilution of Anti-D Reference Reagent	Bio-Rad	13030
Antistoff IPNV (Mix kanin anti IPNV Sp / Ab)	Nofima	
Benzoak vet. (200 mg benzocain/ml 20 %)	ATCvet-nr QN01X92	519389
dNTP Mix (100 mM)	Applied Biosystem	362271
DPBS (10x) Dulbecco's phosphate buffered saline – CaCl ₂ Mg-Cl ₂	Gibco	14200-067
E.Z.N.A. total RNA-kit 1.	Omega bio-tek	ref: R6834-02
Foetal bovine serum gold	PAA	A15-151
Gentamicin solution (50 mg/ml)	Sigma	G1397
Heparin LEO 5000 IE /a.e. /ml	LEO	585679
HEPES 1 M	Gibco	15630-056
High capacity RNA to cDNA mastermix	Applied biosystem	4390716
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem	4368813
Kalsiumklorid-2-hydrat (CaCl ₂ x2H ₂ O) M=147,02g/mol	Merck	1,02382
L-15 Leibovitz's L-15	PAA	E15-020
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane. 1 mg/ml	Sigma	L2020
Leibovitz L-15 medium (1x)	Gibco	11415-049
L-glutamine (200 mM løsnng)	PAA	M11-004
Liberase TH Research Grade (Thermolysin High)	Roche	05401135001
Liberase TM Research Grade (Thermolysin medium)	Roche	05401119001
Minimum essential medium 1x MEM (Gibco)	Gibco	21090-022
Multiscribe reverse transcriptase (50 U/μl)	Applied Biosystem	4319983
Non essential amino acid solution (100x)	HyClone	SH 30238.01
Nuclease-free water	Ambion	AM9937
Nucleic Acid Purification lysis solution (2x)	Applied biosystem	4305895
Oligo d(T) ₁₆ (50μM, 5nmoles) Lot no: P06040	Roche	58002114-01
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biochrom	L1830
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA	P11-010
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied biosystem	4367660
Proteinase K (20 mg/ml)	Ambion	AM2546
RNAlater®solution	Ambion	AM 7024
Rnase Free Dnase Set	Omega bio-tek	E1091
Rnase inhibitor (20 U/μl)	Roche	N808-0119
Rnase Zap®	Ambion	AM9782
Sodium bicarbonate (7,5 % solution)	PAA	S11-002
Sodium pyruvate (100 mM løsnng)	Sigma	s8636
SuperScript VILO cDNA synthesis kit	Invitrogen	11754-250
Turbo DNasefree.	Ambion	AM 1907
Water for injection (WFI)	Gibco	A-12872-02

6.2 Utstyr:

Utstyr	Produsent	Katalog nr.
1,5 ml eppendorfrør (Rnase frie) Reaction tubes	Greiner bio-one	616201
24 - brønners celledyrkningsbrett Nunclon surface	Nunc	142485
2 ml eppendorfrør (autoklaverte)	Greiner bio-one	623201
384 brønners brett (kompatibelt med Real-time maskin)	Ambion	A30A38
40 ml rør med formalin (forhåndsfylt og tilsendt fra VI, histologi)	-	-
6 - brønners celledyrkningsbrett	TPP	92006
7900 HT Fast Real-Time PCR system	Applied Biosystem	-
Cell Strainer (100µm Nylon)	BD Falcon	352360
Eppendorf 5810R sentrifuge	-	-
Eppendorf centrifuge 5804	-	-
Galaxy R CO ₂ incubator (Inkubatorskap CHSE og CHH-1 celler)	-	-
Invertmikroskop	Nikon TMS	-
Kanyle 22GA ₂ 0,7×50	Microlance	300094
Kubota 1300 sentrifuge	-	-
Liten cellekolbe: Nunclon Delta Surface	Nunc	156367
MagNa Lyser green beads	Roche	03358941001
MagNa lyser instrument	Roche	-
Medium cellekolbe: 75cm ² nunclon treated flask	Nunc	156499
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystem	4311971
NanoDrop 8000 spectrophotometer	Thermo Scientific	-
NanoDrop ND-1000 spectrophotometer	Saveen Werner	-
Nicon eclipse TE 2000-S (Invertmikroskop tilkoblet kamera)	-	-
PCR 96 brønners brett (kompatibelt med PCR maskin)	Bioplastics	AB 17500
PCR maskin 2720 Thermal cycler	Applied Biosystem	-
Plastpasteurpipetter Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt	86.1172.010
Primaria celledyrkningskolbe 25cm ²	BD Falcon	353813
Pure coat cultureware Amine	BD	356723
Ristebrett KS 501 digital	IKA Labortechnik	-
Scepter Handheld automated cell counter	Millipore	PHCC00000
Scepter sensors (40 µm)	Millipore	PHCC40050
Sorvall RC5C sentrifuge (Virus nedspinning)	-	-
Stainless steel surgical blades	Swann Morton	0308
Steril plastsprøyte 1 ml	BD Plastipak	300013
Steril plastsprøyte 20 ml	BD Plastipak	301183
Stor cellekolbe : Thermo Scientific Nunclon Delta Surface	Nunc	178883
Strips (lokk) til 96 brønners PCR brett	Bioplastics	C79701B
Thermacks serie 6000 (celleinkubatorskap for hjerteceller)	-	-
Tissue culture testplate 96F (96-brønners celledyrkningsbrett)	TPP	92696

6.3 Løsninger:

Dyrkingsmedium CHSE

1 fl. (500 ml) Minimum essential medium 1× MEM (Gibco) tilsettes:
 5 ml 200 mM L-glutamine (→ 2 mM) (PAA)
 5 ml 100x Non essential amino acid solution (→ 1x) (HyClone)
 10 ml 1 M HEPES (→ 20 mM) (Gibco)
 1ml 100x penicillin/streptomycin (→ 0,2x) (PAA)
 (8 % Foetal bovine serum) (PAA)

Dyrkingsmedium CHH-1

1fl. (500 ml) Minimum essential medium 1× MEM (Gibco)
 5 ml 200 mM L-glutamine (→ 2 mM) (PAA)
 5 ml 100x Non essential amino acid solution (→ 1x) (HyClone)
 1ml 100x penicillin/streptomycin (→ 0,2x) (PAA)
 100 ml av "basis - flaske" tilsettes:
 1 ml 100 mM Natriumpyruvate (→ 1,0 mM) (Sigma)
 2 ml 7,5 % Natriumbikarbonat (→ 0,15 %) (PAA)
 (10 % Foetal bovine serum) (PAA)

Dyrkingsmedium hjerteceller

100 ml Leibovitz's L-15 medium (1×) (Gibco)
 1 ml 200mM L-glutamine (→ 2mM) (PAA)
 200 µl (50mg/ml) gentamicin (→100µg/ml, 60 IE/ml) (Sigma)
 (10 % Foetal bovine serum)

Vekstmedium for cellene tillages med henholdsvis 8 % og 10 % Foetal bovine serum (FBS).
 Vedlikeholdsmedium (til eksempelvis virusinfeksjon) tillages med en mindre andel FBS.

Transportmedium hjerteceller

250 ml Leibovitz's L-15 medium (1×) (Gibco)
 500 µl 5000 IE / ml Heparin (→ 10 IE / ml) (Leo)
 500 µl (50mg/ml) gentamicin (→ 100µg/ml, 60 IE / ml) (Sigma)

Perfusjonsbuffer hjerteceller (25×)

350 ml H₂O tilsettes:
 103,8 g NaCl
 6,2 g KCl
 28,7 g HEPES
 75 ml 1 M NaOH
 Tilsett H₂O til 500 ml totalt. Lagres -20 °C.
 Fortynnes i H₂O til 1× bruksløsning.

Trypsinløsning hjerteceller

0,25 % trypsin EDTA (1x)
 Fortynnes i PBS⁻ til (0,25x?) løsning

Fosfat bufret salin (PBS⁻)

DPBS (10x) (Gibco)
 Fortynnes i WFI (Gibco) til 1× bruksløsning

Collagenaseløsning hjerteceller

5 mg tørrstoff Liberase Reasearch grade (Roche)

2 ml Nucleasefritt vann

Stock-løsning = 13 Wünsch units / ml. Fordeles, lagres ved -20 °C.

Fortynnes 80x i følgende, til bruksløsning 0,16 Wünsch units / ml.

Leibovitz's L-15 medium (1×) (Gibco) tilsatt

0,7 mg / ml CaCl₂ × 2H₂O

60 IE / ml gentamicin

Coating av celledyrkningsbrett

Laminin (1 mg / ml) (Sigma),

Fortynnes bruksløsning PBS⁻ til konsentrasjon 20 µg / ml

Brett coates med 2,5 µg laminin / cm²

Inkuberes ved 37 °C i 1,5 – 2 timer

Vaskes 3 × med bruksløsning PBS⁻, lagres i kjøleskap (1 mnd).

Fuktes 1× med PBS⁻ før bruk.

Fibronektin (1 mg / ml)

Fortynnes i bruksløsning PBS⁻ til konsentrasjon 25 µg / ml

Brett coates med 2,5 µg fibronektin/cm²

Brett lufttørkes i 45 min ved romtemperatur

Oppbevares i kjøleskap (2 - 4 uker)

6.4 Vaksine

Alphaject micro 6. Batch: 5279 Prod.batch: 3679-0324 (Pharmaq)

Vaksinen inneholder formaldehyd inaktivert kultur av:

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida*

Listonella (Vibrio) anguillarum serotype 01

Listonella (Vibrio) anguillarum serotype 02

Vibrio salmonicida

Moritella viscosa

Infeksiøs pankreasnekrose virus serotype Sp

6.5 Virusmateriale

Piscine reovirus (PRV)

Høsten 2011, ble det samlet materiale (hjerter fra fisk) fra to feltutbrudd med HSMB, kalt KK og HL. Tilstedeværelse av PRV ble bekreftet ved sekvensering utført av Torstein Tengs ved Veterinærinstituttet, og viste at isolatene var identisk med PRV som er påvist i Norge. Av hjertene ble det laget et 5 % homogenat i Minimum essential medium (Gibco) tilsatt 2µl/ml

penicillin/streptomycin. Homogenatet ble fryst en gang ved -80 °C, før vev og cellerester ble spunnet ned (5000 rpm / 10 min). Virusløsningen ble sterilfiltrert gjennom 0,8 µm og 0,2 µm filter, fordelt i rør og oppbevart ved – 80 °C. Smittematerialet ble screenet og funnet positivt for PRV og negativt for andre kjente fiskepatogene virus som Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV), Piscine myocarditis virus (PMCV), Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV) og Salmonid alphavirus (SAV).

Infeksiøs pankreasnekrose virus (IPNV)

IPNV ble samlet inn fra feltutbrudd av IPN i 2001 – 2002, som beskrevet i publikasjon av Julin et. al (2013). Isolatet ble kalt IPNV feltstamme 12 (IPNV fs 12), og er et høyvirulent virus av serotypen Sp.

6.6 Beregning av TCID₅₀ og antall infeksiøse enheter (i.e.) per gram vev.

I denne oppgaven ble mengde IPNV i en prøve beregnet etter en statistisk metode utviklet av Reed og Muench (102). Metoden baseres på estimering av 50 % endepunkt (den viruskonsentrasjon som gir 50 % dødelighet i en populasjon). Tissue culture infectiouse dose 50 (TCID₅₀) beregnes ved titrering av virus i en logaritmisk fortyningsserie, og forutsetter at 1 viruspartikkel er nok til å forårsake CPE. Den fortyningen som gir 50 % infeksjon beregnes ved å estimere prosentvis infeksjon gitt av forholdet mellom akkumulerte verdier av infiserte brønner (starter fra høyeste fortyning) og akkumulerte verdier av uinfiserte brønner (starter fra laveste fortyning) (Tabell 12).

Tabell 12: Eksempel på beregning av prosentvis infeksjon i hver fortyning.

Fortynning	Andel infiserte brønner	Infiserte brønner	Uinfiserte Brønner	Akkumulerte verdier			
				Totalt infiserte	Totalt uinfiserte	Ratio	%
1 (1:50)	4/4	4	0	5	0	5/5	100 %
2 (1:500)	1/4	1	3	1	3	1/4	25 %
3 (1:5000)	0/4	0	4	0	7	0/7	0 %

Det finnes ulike fremgangsmåter for beregning av TCID₅₀. I denne oppgaven er det tatt utgangspunkt i følgende formel, hvor h er log av fortynningsserien. (Ved en 10-folds fortynningsserie, er $h = \log(1/10) = -1$)

$$\text{TCID}_{50} = \frac{h \times ((\% \text{ infiserte brønner i fortynningen } > 50 \%) - (50 \%))}{(\% \text{ infiserte brønner i fortynningen } > 50 \%) - (\% \text{ infiserte brønner i fortynningen } < 50 \%)}$$

I henhold til denne formelen, vil TCID₅₀ for dette eksemplet være:

$$\text{TCID}_{50} = \frac{-1 \times (100 - 50)}{100 - 25} = -0,67$$

Fortynningen som gir 50 % infeksjon ligger mellom fortynning 1 og 2. Fortynning nr. 1 er $1/10^1 = 10^{-1}$ Log av fortynning 1 = $\log 10^{-1} = -1$. $\text{Log TCID}_{50} = (-1) + (-0,67) = -1,67$

Antilog av TCID₅₀ er $10^{-1,67}$. Virusprøven inneholder resiproke verdi, dvs. $10^{1,67}$ TCID₅₀ doser. For å kalkulere antall infeksiøse enheter i virusprøven, må en korrigere for antall uinfiserte celler.

50 % uinfiserte celler regnes som $e^{-\text{TCID}_{50}} = 0,5$. $\text{TCID}_{50} = -\ln(0,50) = 0,7$.

En TCID₅₀ dose tilsvarer 0,7 infeksiøse virusenheter. I dette tilfellet ble cellene inokulert med 200 µl virusløsning, og en må derfor gange med faktor 5 for å beregne infeksiøse enheter (i.e.) pr. ml.

$$10^{1,67} \times 0,7 \times 5 = 163,7 \text{ ie./ml. inokulat.}$$

I dette eksemplet er inokulatet er fortynna 50 ganger. I regnestykket er det brukt 1/10 fortynning (-1) for utangsløsningen som i virkeligheten er fortynnet 1/50. Det må derfor ganges med faktor 5 for å få i.e. / ml ufortynna homogenat. Tar man utgangspunkt i at 1 ml = 1 gram, gir dette i.e. per gr. vev.

$$163,7 \times 5 = 818,5 \text{ i.e. / g. vev.}$$

6.7 Beregning av deteksjonsgrense

For å beregne deteksjonsgrense, blir det tatt utgangspunkt i mengde vev som settes på cellene. I bærertesten ble det satt på 4 ml 5 % (w/v) homogenat, som tilsvarer 200 mg vev. En forutsetter at 1 viruspartikkel er nok til å kunne forårsake CPE i cellene. Deteksjonsgrense tilsvarer 1 viruspartikkel i 200mg vev.

$$\text{Antall viruspartikler pr. gram vev} = \text{Antall viruspartikler pr. mg. vev} \times \left(\frac{(1000 \text{ mg.} \times g^{-1})}{\text{antall mg vev}} \right)$$

Dette gir:

$$1 \text{ viruspartikkel pr. mg. vev} \times (1000 \text{ mg} \times g^{-1} / 200 \text{ mg vev}) = 5 \text{ viruspartikler pr. gram vev.}$$

Deteksjonsgrense til bærertest var 5 viruspartikler pr. gram vev.

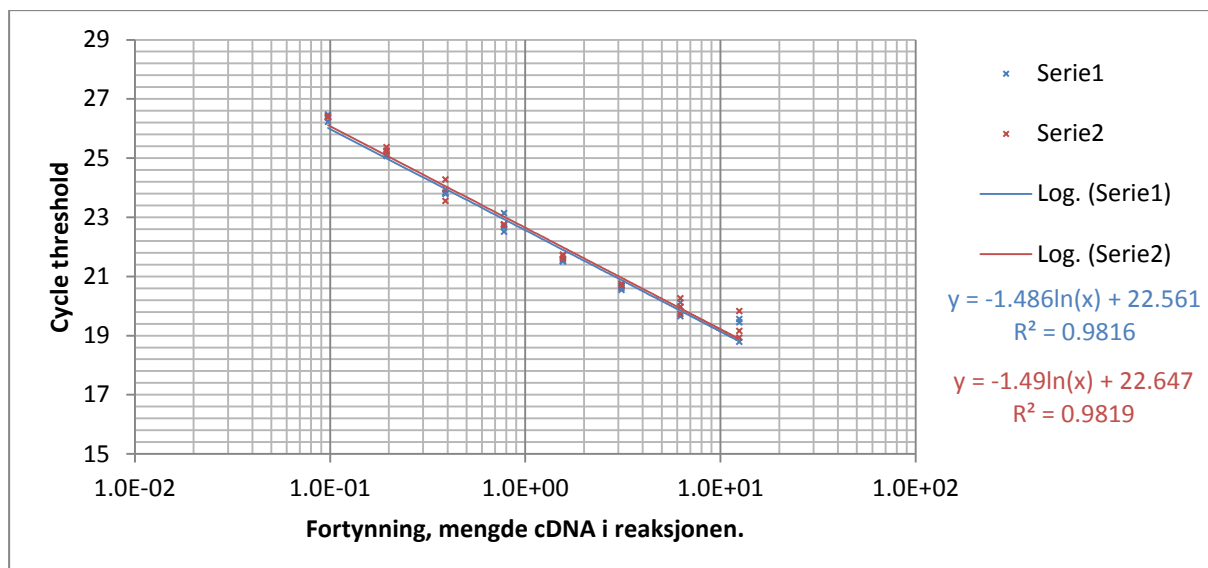
6.8 Primere brukt i oppgaven

Primere er designet fra sekvenser i PRV-L1 segmentet. Primer PRV-L1_1 er designet etter beskrivelse i publikasjon av Palacios et al. (64), mens PRV-L1_2 og PRV-L1_3 ble designet av Marit Seppola, Nofima.

Navn primer.	Sekvens (5' → 3')	Produsent
PRV-L1_1 Forward 1144021	ATG-TCA-CAA-CTT-GAG-TCA-GTT-CC	Eurogentec
PRV-L1_1 Reverse 4727460	GAT-ACA-GCT-ACC-CAA-CAT-GAT-TGA	Eurogentec
PRV-L1_2 Forward 1291	ACA-CAG-GCT-GAA-CGC-ACT-GG	Eurogentec
PRV-L1_2 Reverse 1391	ACG-GTC-AAC-GTA-TCG-CAG-GT	Eurogentec
PRV-L1_3 Forward 461	ACG-TTA-GTG-GAA-AAG-AGG-CTG-CT	Eurogentec
PRV-L1_3 Reverse 561	TGT-AGT-GCC-TGT-AGA-CGT-GGT-AGG-A	Eurogentec
eEF1α Forward(L)	CGC-CAA-CAT-GGG-CTG-G	Eurogentec
eEF1α Reverse(L)	TCA-CAC-CAT-TGG-CGT-TAC-CA	Eurogentec

6.9 Standardkurve og beregning av primereffektivitet

Standardkurver ble tillaget i excel ved å plote Ct verdi mot fortytning. Resultat fra de 3 høyeste fortytningene ble ekskludert da de inneholdt molekyler som hemmet reaksjonen. Plot av Ct verdier for primer PRV L-1, ved ulike konsentrasjoner i 2stk 2-folds fortytningsserier tillaget med primerkonsentrasjon 300 nM, er vist i Figur 22.



Figur 22: Standardkurve av PRV-L1, ved primerkonsentrasjon 300nM

Amplifikasjonseffektivitet (E) kalkuleres ved bruk av stigningstallet til kurven, og er gitt ved formelen: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. Amplifikasjonseffektiviteten er ofte oppgitt i prosent. $\%E = (E - 1) \times 100 \%$. Beregning av amplifikasjonseffektivitet for PRV L-1, ved fortynningsserie 1 er vist som eksempel:

$$\text{Slope} = -1,486 \times \ln(10) = -3,4216$$

$$E = 10^{(-1/-3,4216)} = 1,96$$

$$\% E = (1,96 - 1) \times 100 = 96 \%$$

Primereffektivitet (% E) ble regnet ut på tilsvarende måte for alle primere testet i denne oppgaven (Tabell 13)

Tabell 13: Effektivitet (%) av PRV primere testet i denne oppgaven

Primer	300 nM		500 nM	
	Serie 1	Serie 2	Serie 1	Serie 2
PRV L1 – 1	96,0 %	95,6 %	96,3 %	96,4 %
PRV L1 – 2	117,6 %	113,4 %	-	-
PRV L1 – 3	110,3 %	104,4 %	-	-