

Resultatrapport

1) Hovedmål og resultater.

Hovedmålet for prosjektet var å fremskaffe basal kunnskap om Alfavirus (*Togaviridae*) fra laksefisk (laks og regnbueørret) i Norsk oppdrett, dvs nødvendig kunnskap for bekjempelse og forebygging av sykdom assosiert med disse alfavirus. Viktige delmål i dette arbeidet var:

A) Genomisk karakterisering av Alfavirus.

B) Kartlegging av vevs- og celletropisme til SAV 1 og SAV 3.

C) Undersøke muligheten for vertikal overføring av SAV 3, dvs overføring fra stamfisk til embryos.

I tillegg til disse delmålene ble det i løpet av prosjektperioden utført et forsøk for å se nærmere på uttrykking av SAV 1, 2 og 3 i RT-gill celler samt hvordan immungenene Mx, IFN- α , IL- β og TNF- α reguleres under infeksjon av RT-gill celler med SAV. Resultatene fra dette forsøket foreligger ikke ennå.

A) Genomisk karakterisering av Alfavirus

En viktig del av prosjektet ble å karakterisere genomet til det norske salmonid Alfavirus (SAV 3). Dette ble gjennomført ved sekvensering av fullengde SAV 3 og sammenligning av dette viruset med SAV 1 (SPDV) og SAV 2 (SDV) som man finner i henholdsvis Irland/UK og Frankrike/UK. RNA ble rensset fra vevsprøver fra smittet fisk og cDNA ble syntetisert. Deretter ble det kjørt PCR hvor en brukte en rekke primerpar som dekker hele genomet (ca 12 kb). PCR-produktene ble til slutt rensset og sekvensert ved hjelp av Big Dye 3.1. Dette ga oss sekvensen av hele genomet til SAV 3 og det viste at dette genomet er distinkt og skiller seg fra både SAV 1 og SAV 2. Dette forsøket er publisert i artikkelen til Hodneland et al. 2006, "New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway".

B) Kartlegging av vevs- og celletropisme til SAV 1 og SAV 3.

norske isolater av SAV 3, samt isolat av SAV 1 ble benyttet i et smitteforsøk med henblikk på å kartlegge vevs- og celletropisme. Atlantisk laks ble IP-smittet og det ble tatt ut vevsprøver i alle deler av sykdomsforløpet og utvikling av bærerstatus ble undersøkt. Vevsprøvene ble veid og avirulent influenza tilsatt i forhold til mengden vev. Etter veiing ble RNA rensset og cDNA dannet ved RT. Til slutt ble cDNA'et undersøkt ved bruk av Real-time RT-PCR. Real-time RT-PCR er en sensitiv metode for å påvise tilstedeværelsen av virus. Ved bruk av en universalprobe (nsP1) påviser man både SAV 1 og SAV 3. De samme prøvene ble også kjørt med prober som detektere influensavirus (Infl HA) som er en ekstern standard og elongeringsfaktoren (EL1A) som er en intern standard man finner likt uttrykt i alle celler i fisken. Begge disse standardene forteller noe om hvor vellykket renseprosessen har vært, og hvor mye virus som er til stede. Dette er med andre ord en semikvantitativ Real-Time RT-PCR.

Resultatene fra forsøket viste at pseudobranch og hjerte er organene som oftest er SAV-positive, mens man ikke finner SAV like ofte i andre organer som f.eks nyre, pancreas og muskel. Man fant også at virus har høy prevalens i gjellene noe som åpner for at bruk av gjeller i diagnostikk av SAV, siden man da kan ta biopsi.

Forsøket er publisert i artikkelen til Andersen et al., 2006 "Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV 1 and SAV 3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)".

C) Vertikal overføring av SAV 3.

Tidligere studier har indikert at SAV 3 kan overføres vertikalt fra stamfisk til embryos (Nylund pers.obs). Det ble derfor bestemt at dette skulle undersøkes nærmere. Det er ikke klarlagt om vertikal overføring av SAV faktisk skjer. Sentralt for denne delen av prosjektet var derfor å klarlegge om vertikal overføring av SAV kan skje, og eventuelt hvilken betydning dette har. For å undersøke dette ble deler av laksens livssyklus (Stamfisk, embryo, øyerogn og yngel) undersøkt for påvisning av eventuell SAV 3-smitte. I tillegg ble smoltanlegg screenet for tilstedeværelse av virus i ferskvann. Vevsprøver ble tatt og RNA ble rensset. Etter RNA-rensing ble cDNA dannet ved RT før prøvene ble analysert ved hjelp av Real-Time RT-PCR. Det man håpet på var om dette kunne gi oss svar på om SAV 3 overføres fra stamfisk til embryo, eller finne ut i hvilken fase smitte eventuelt finner sted. For å forsikre oss om

at det er det riktige viruset vi har ble sekvensering forsøkt.

Artikkelen til dette forsøket er sendt til Journal of Aquatic Animal Health. I forsøket ble det ikke funnet noen sikre bevis for vertikal overføring av SAV 3, men studiet indikerte at vertikal overføring kan forekomme. Det ble gjort to studier om vertikal overføring. I det ene studiet ble gyteklar laks (22 hunner og 9 hanner) strøket, og real-time RT-PCR viste at 21 av hunnene og 7 av hannene var SAV-positive. Avkommet etter disse ble holdt frem 843 døgngrader og prøveuttak ble gjort underveis. Positive avkom ble funnet på alle trinn (egg, øyerogn og yngel) med en prevalens på 0.5 %. Det var dessverre ikke mulig å sekvensere viruset fra noen av disse positive prøvene. Smolt i 35 ferskvannsanlegg ble også screenet for tilstedeværelse av SAV 3 og man fant positive i 16 av 35 anlegg, noe som indikere at vertikal overføring muligens kan forekomme.

2) Nytteverdi.

Kartlegging av vevstropisme og karakterisering av SAV er viktig med tanke på diagnostikk av SAV. Ved diagnostikk er det avgjørende at det vevet med høyest prevalens for virus benyttes, og karakterisering av genomet til det norske isolatet kan være viktig i vaksineutvikling. Når det gjelder vertikal overføring er det viktig for næringen å få klarhet i om vertikal overføring finner sted og eventuelt hvilken rolle den spiller i spredning av viruset. Dette er viktig med tanke på screening og fjerning av stamfisk som er SAV-positiv.

3) Ikke-ferdigstilte resultater.

Forsøket for å finne ut mer om regulering av SAV 1, 2 og 3 i RT-gill celler, samt uttrykking av immungenene Mx, IFN, IL-1b og TNF-2a er ferdig men resultatene foreligger ikke ennå.

4) Disputas.

Forventer at disputas blir avlagt i løpet av våren 2009.