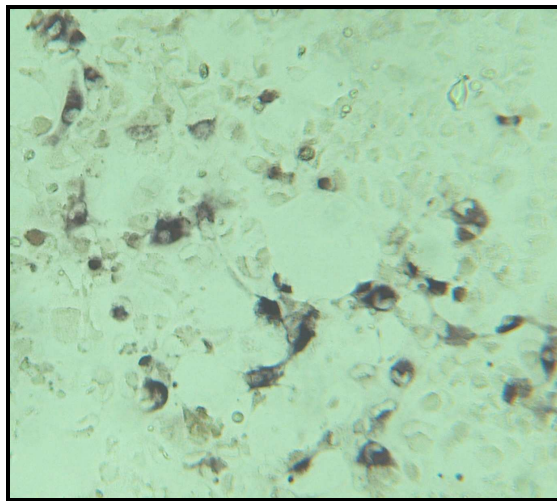


Utvikling og testing av RNA-probe mot nsP2 (Salmonid Alfavirus subtype 2) for bruk på celler og vev



Av
Ellen Sandvik Berg

Master i fiskehelse



Institutt for Biologi
Universitetet i Bergen, Norge

Juni 2009

Forord

Arbeidet i forbindelse med denne masteroppgaven i fiskehelse ble utført ved Fiskeesykdomsgruppen, institutt for biologi ved Universitetet i Bergen.

Ønsker først og fremst å takke mine veiledere Professor Are Nylund, Linda Andersen og Marius Karlsen for utmerket veiledning som har gjort dette året både spennende og lærerikt.

Ønsker også å takke Cathrine Kalgraff og Anette Furevik for alle de trivelige stundene opp igjennom studiet.

En stor takk til Tore Løding og Marianne Sandvik for korrekturlesning. Siri Vike og EWOS takkes også for å ha bidratt med fôr til yngelen.

Sist men ikke minst vil jeg takke venner og familie for all støtte gjennom studiet, og selvfølgelig også Dart for utallige timer med tålmodig lytting.

Bergen 15.06.09

Ellen Sandvik Berg

Sammendrag

Salmonid alfavirus (SAV) er et virus i familien *Togaviridae* og forårsaker sykdomsproblemer ved oppdrett av laks (*Salmo salar L*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) i Europa. Det er per i dag kjent at det forekommer tre ulike subtyper, SAV 1 -3, og det er gjort studier som indikerer at det finnes tre subtyper til. SAV 1 er i all hovedsak utbredt i Storbritannia og gir sykdom hos både laks og regnbueørret, mens SAV 2 i all hovedsak er kjent for å føre til sykdom hos regnbueørret i ferskvann i Frankrike. I Norge har SAV 3 størst utbredelse på Vestlandet, hovedsakelig fylkene Hordaland og Sogn og Fjordane, men i de senere år har dette området utvidet seg noe og utbrudd har også forekommet i Nord Norge.

Introduksjonsvei, målceller og målorgan for SAV er emner som det foreligger svært lite eller ingen kunnskap om. For å belyse dette tema har det i denne oppgaven blitt utviklet en digoxigenin-merket RNA probe for påvisning av SAV-spesifikt RNA ved *in situ* RNA-RNA hybridisering. Proben har vist seg å være et meget vellykket verktøy for påvisning av SAV i cellekultur og den har trolig stort potensial for påvisning av SAV også fra vevssnitt eller fra vev ved whole mount *in situ* hybridisering (ISH).

Det var også planlagt å teste ut proben ved whole mount ISH på plommeseckyngel av laks og det ble i den forbindelse utført smiteforsøk med SAV 2 og SAV 3. Uforutsette problemer med smitte førte imidlertid til at dette ikke var mulig å gjennomføre, men det ble vist at 0,5 grams lakseyngel kan i.p. smittes med SAV 3. Det var også mulig å påvise SAV fra badsmittet 0,5 grams yngel, men resultatene indikerte at tilstedeværelsen av virus i yngelen var lav. Det er også spekulert i hvorvidt yngelen kunne ha vært infisert med viruset før smiteforsøkene ble iverksatt da det ble funnet SAV-positiv yngel fra kontrollgruppen. Det er imidlertid ikke mulig å dra noen slutninger ut i fra dette på grunn av lavt antall yngel analysert og lave mengder SAV-spesifikt RNA til stede i den positive yngelen.

Innhold:

Innledning.....	Side 5
Klinikk forløp og patologi.....	Side 7
Utbredelse og fylogeni.....	Side 8
Viruskarakteristikk.....	Side 9
Replikasjon hos alfavirus.....	Side 10
Diagnostikk av SAV-relatert sykdom og metoder for deteksjon av SAV... Side 12	
Målceller for alfavirus.....	Side 14
Mål for studiet.....	Side 16
Material og metode.....	Side 17
CHSE-214 celler.....	Side 17
Virus.....	Side 17
Antistoff og Virustitrering.....	Side 17
Rensing av RNA	Side 18
Revers transkriptase PCR (RT-PCR).....	Side 18
Rensing av PCR produkt.....	Side 19
TOPO kloning og sekvensering.....	Side 19
Konvensjonell kloning.....	Side 20
<i>In vitro</i> transkripsjon.....	Side 21
Northern "dot" blot.....	Side 22
<i>In situ</i> hybridisering.....	Side 23
Kontrastfarging av celler med metylgrønt.....	Side 25
Forsøksfisk.....	Side 25
Smitte av yngel.....	Side 25
Vannprøver.....	Side 27
Real-time RT-PCR.....	Side 28
Resultat.....	Side 30
Kloning av pCR-SDV.....	Side 30
<i>In vitro</i> transkripsjon og Northern "dot" blot.....	Side 30
<i>in situ</i> hybridisering av SAV-infisert cellekultur	
ved bruk av anti digoxigenin Alkaline Phosphatase.....	Side 31
ved bruk av anti digoxigenin fluorescein.....	Side 32

kontrastfarging med metylgrønt.....	Side 35
smitteforsøk.....	Side 35
vannprøver.....	Side 37
Diskusjon.....	Side 39
<i>In situ</i> hybridisering	Side 40
Smitte av yngel.....	Side 42
Virusutskillelse.....	Side 44
Konklusjoner og fremtidsperspektiver.....	Side 46
Referanser.....	Side 47
Vedlegg.....	Side 55

Innledning

Pancreas Disease (PD) og Sleeping Disease (SD) er sykdommer som skaper problemer og store økonomiske tap i forbindelse med oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar* L) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) i Europa. PD forårsaker sykdom ved oppdrett av Atlantisk laks og regnbueørret i sjø, mens SD forårsaker sykdom ved ferskvannsoffdrett av regnbueørret. Sykdomsutbruddene forårsakes av et alfavirus i familien *Togaviridae* kalt Salmonid alfavirus (SAV) (Weston *et al.* 1999) og det er per i dag funnet tre ulike subtyper av viruset, og det kan se ut for at det eksisterer minst tre til (Fringuelli *et al.*, 2008).

Pancreas disease ble først påvist etter et sykdomsutbrudd hos Atlantisk laks i Skottland i 1976 (Munro *et al.* 1984) og har senere også blitt beskrevet fra laks og regnbueørret i Storbritannia, Irland, Norge, Spania og Frankrike (McLoughlin & Graham, 2007; Graham *et al.*, 2003a ; Taksdal *et al.* 2007; Fringuelli *et al.*, 2008; McLoughlin *et al.*, 1996; Poppe *et al.*, 1989). Det har også vært rapportert om utbrudd av PD i Nord Amerika (Washington) i 1987 (Kent & Elston, 1987), men utover dette er PD bare beskrevet fra Europa.

I 1995 ble det påvist togavirus- lignende partikler ved et PD utbrudd hos oppdrettslaks, og navnet Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV) ble da foreslått (Nelson *et al.*, 1995). Sekvensering av deler av SPDV genomet viste at dette var et alfavirus, det første som er påvist hos fisk (Weston *et al.*, 1999) og det har senere blitt klassifisert som salmonid alfavirus subtype 1 (SAV 1) (Weston *et al.* 2005). I Norge ble viruset isolert første gang i 1998 fra Atlantisk laks og det ble konkludert med at kausalt agens var SPDV eller et virus nært beslektet til SPDV (Christie *et al.*, 1998). Senere ble det vist at dette tilhørte en egen subtype og det fikk navnet Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) eller salmonid alfavirus subtype 3 (SAV 3) (Hodneland *et al.*, 2005).

Utbrudd av Sleeping disease ble først beskrevet i 1994 (Boucher & Baudin Laurencin, 1994) og Sleeping Disease Virus (SDV) ble isolert fra regnbueørret i Frankrike første gang i 1997 og ble da antatt å være et togavirus (Castric *et al.*, 1997). Dette ble bekreftet av Villoing *et al.* i 2000 da det ble vist at viruset som forårsaker Sleeping Disease er et alfavirus (Villoing *et al.*, 2000a) og dette er nå klassifisert som salmonid alfavirus subtype 2 (SAV 2) (Weston *et al.*, 2005). Etter de første beskrivelsene av SD har det også vært registrert utbrudd og funn av virus hos regnbueørret i ferskvann i Skottland, England, Italia, Spania og Tyskland (Castric *et al.*, 1997, McLoughlin & Graham 2007, Graham *et al.*, 2007a).

I Norge er utbrudd med SAV 3 oftest forekommende på vestlandet, hovedsakelig i Hordaland og Sogn og fjordane, men dette området har i de senere år utvidet seg noe både nordover og sørover (Taksdal *et al.*, 2007). I tillegg til dette har det også vært påvist sporadiske utbrudd av PD i Nord-Norge (Johansen *et al.*, 2008, Karlsen *et al.*, 2006), men ved flere av disse utbruddene ble det regnet som sannsynlig at smitten hadde fulgt med smolt som var transportert fra vestlandet (Karlsen *et al.*, 2006). Det har i de senere år også vært observert en økning i antall rapporterte utbrudd av PD i Norge, hvor det i 1998 kun var registrert 7 utbrudd mens dette tallet hadde økt til 108 i 2008 (tall fra veterinærinstituttet, Johansen *et al.*, 2008).

Det har lenge vært hevdet at subtypene som forårsaker utbrudd av PD hos laks og regnbueørret kan ha et marint reservoar da utbrudd utelukkende har vært dokumentert fra laksefisk i sjøvann (Kent & Elston, 1987, McVicar, 1987, Christie *et al.*, 1998, Graham *et al.*, 2006 a). Det har imidlertid i de senere år også forekommet funn av SAV 3 hos lakseparr i ferskvann (Bratland & Nylund, *i trykk*), samt at det har vært gjort funn av togavirus- lignende partikler i forbindelse med Hemoragisk smolt syndrom (HSS) hos laks i ferskvann (Nylund *et al.*, 2003). Det forekommer også teorier om at overføring av SAV hovedsakelig finner sted i ferskvannsfasen. Dette baserer seg på den geografiske utbredelsen av de ulike subtypene, samt at SAV 3 har blitt påvist hos laks i ferskvann (Karlsen *et al.* 2006, Bratland & Nylund, *i trykk*, Hodneland, 2006). Ved oppdrett av regnbueørret kan man se sykdomsutbrudd forårsaket av SAV 2 i ferskvann (Boucher & Baudin Laurentin, 1996, Weston *et al.*, 2002), men det har også vært påvist SAV 2 lignende isolater hos Atlantisk laks i sjøvannsfasen (Fringuelli *et al.* 2008).

Foreløpig er det mye som ikke er fullstendig kartlagt omkring virusets smitteveier, men det er gjort flere funn som støtter opp om teorien om horisontal smitte (Kristoffersen *et al.*, 2009, Fringuelli *et al.* 2008). Blant annet viste studier utført av Fringuelli *et al.* (2008) at laks som ble importert til Vest Irland fra Skottland og andre deler av Irland fikk utbrudd forårsaket av SAV 1 og ikke de subtypene av SAV som var vanlig å finne på opprinnelsesstedet. Det er også vist av Graham *et al.* (2007b) at SAV er i stand til å overleve i sjøvann over lengre perioder, da det i sterilt sjøvann var mulig å detektere virus i 21 dager eller mer og virus fortsatt kunne påvises i 5 av 8 prøver etter 65 dager. I aktivt sjøvann ble det vist at virusoverlevelsen var betydelig lavere med en halveringstid på 4,3 dager ved 4 °C og 1 dag ved 10 °C, mot 61 og 23,4 dager ved hhv. 4 og 10 °C i sterilt sjøvann. Basert på disse resultatene ble det hevdet at viruset har potensial for horisontal smitte i sjøvann (Graham *et*

al., 2007b). Det er også foreslått at sei, *Pollachius virens*, kan være et naturlig reservoar for SAV etter at det ble gjort funn av virusnøytraliserende antistoff mot SAV hos sei i forbindelse med et PD-utbrudd i Storbritannia (Graham *et al.*, 2006a). Dersom dette er tilfelle vil det kunne vise seg å ha stor betydning for spredning av viruset da det er svært vanlig å observere sei rundt oppdrettsanlegg. En vertikal smittevei for SAV er imidlertid også foreslått av Bratland og Nylund (i trykk) etter funn av SAV 3 i stamfisk og hos egg og yngel fra settefiskanlegg på Vestlandet, samt fra 2-4 grams yngel i Nord-Norge levert av en rognprodusent på Vestlandet.

Utbrudd av PD forekommer i sjøvannsfasen og det er hevdet at det er høyest risiko for utbrudd tidlig på sommeren eller tidlig på høsten (Rodger & Mitchell, 2007). Det har ved utbrudd i Irland vært observert at dødelighet kan variere fra 0,1 % og opp til 63 % (Crockford *et al.*, 1999) og det er ofte observert at en betydelig andel av fisken som overlever et utbrudd er svært avmagret og kan klassifiseres som tapere (Munro *et al.*, 1984). Utbrudd av SD forekommer i løpet av hele produksjonssyklusen hos regnbueørret og dødeligheten kan variere fra nesten ubetydelig til 22 % av biomassen (McLoughlin & Graham, 2007).

Klinikk, forløp og patologi

Ved utbrudd av PD kan det observeres letargisk og apatisk fisk som samler seg nært overflaten i hjørner eller langs notveggen og den kan ha problemer med å opprettholde posisjonen i vannet (McVicar, 1987, Poppe *et al.* 1989). Ved utbrudd av SD er det vanlig å observere fisk som tilsynelatende sover på bunnen av karet, men som svømmer vekk dersom den forstyrres (Boucher & Baudin Laurencin, 1994). Det er vist at de ulike subtypeene av SAV har svært lik innvirkning på verten (Hodneland, 2006) og det er både for PD og SD også vanlig å observere en betydelig svekket appetitt hos fisken. Svekket opptak av næring gjør at det en tid ut i forløpet kan observeres en større andel svært tynn fisk (Christie *et al.* 2007). Ved obduksjon av syk fisk er det vanlig og observere punktblødninger i pylorusblindsekker og omkringliggende fettvev, acites, tom tarm eller tarm med et gult slimaktig innhold (McLoughlin *et al.* 2002). Ved PD-utbrudd i Norge har det også hos enkelte fisk blitt observert bleke hjerter og blodansamling i perikardialhulen som følge av hjerteruptur (Taksdal *et al.*, 2007).

De histopatologiske endringene ved infeksjoner med SAV er i all hovedsak funnet å være lokalisert til pankreas, hjerte og somatisk muskulatur (Christie *et al.*, 2007, McLoughlin *et al.*, 2002, Munro *et al.*, 1984, McVicar, 1987, Ferguson *et al.*, 1986). Undersøkelser av fisk tidlig

i forløpet viser store skader i eksokrin pankreas, mens skadene i hjerte og somatisk muskel er på dette tidspunktet rapportert som milde. Senere i forløpet vil det derimot kunne observeres større lesjoner i muskulatur og hjerte, mens det ofte kan observeres at pankreasvev er proliferert eller erstattet med bindevev. Det er også hevdet at regenerasjon av pankreasvev kan forekomme (McLoughlin *et al.*, 2002). Ved eksperimentell intraperitoneal (i.p.) smitte av laks med SAV 1 og SAV 3 ble de første histopatologiske endringene i pankreas og hjerte observert rundt 7 dager etter smitte, disse ble beskrevet som milde og forekom bare hos enkelte individer (Christie *et al.*, 2007) dette er også observert av McLoughlin *et al.* (1996) hos laks ip smittet med SAV (SPDV) i Irland. Ved 14 dager etter smitte observert Christie *et al.* (2007) patologiske endringer i pankreas og hjertet hos både SAV 1 og SAV 3 smittet laks og de første muskellesjonene ble funnet ved 21 dager etter smitte. Hos regnbueørret i ferskvann i.p. smittet med SAV 2 har det derimot blitt observert patologiske endringer både i pankreas, hjerte og muskulatur allerede en uke etter smitte (Boucher & Baudin Laurencin, 1996). Det ble også for første gang i 2006 påvist patologiske endringer i hjernestammen (fokal gliose) hos i.p. smittet laks i sjøvann i Irland (McLoughlin *et al.* 2006), noe som senere også har blitt observert av Christie *et al.* (2007) hos lakseparr i.p. smittet med SAV 1 og SAV 3.

Utbredelse og fylogeni

Slekten *Alfavirus* hører til i familien *Togaviridae* sammen med slekten *Rubivirus*. Av disse to slektene er *Alfavirus* den største gruppen med omtrent 40 arter, mens *Rubivirus* kun består av arten Rubella virus som forårsaker røde hunder hos mennesker (Knipe & Howley, 2007). Men til tross for stor likhet i oppbygning av genomet og viruspartikkelen hos de to slektene er det er stilt spørsmål ved hvor nært slektskapet egentlig er da det er store forskjeller i replikasjonszyklusen (Koonin & Dolja, 1993).

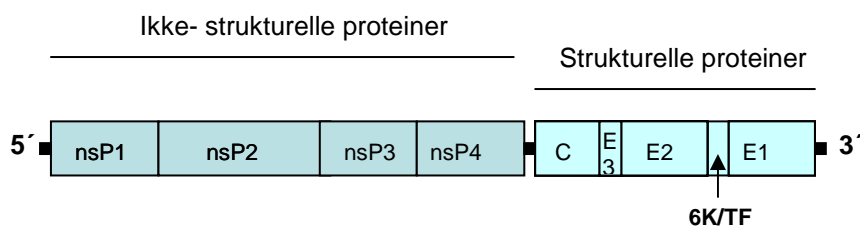
Alfavirus er utbredt på alle verdenskontinentene hvor de fører til sykdom hos en rekke arter inkludert mennesker og fisk. De blir klassifisert som arbovirus ("arthropode borne virus") siden en rekke alfavirus blir overført via arthropoder, (Firth *et al.*, 2008, Linn *et al.*, 2001), men en slik overføringsvei er ikke kjent for salmonid alfavirus. Det er derimot gjort funn av alfaviruset Southern Elephant Seal Virus (SES) fra lusen *Lepidophthirus macrorhini* på elefantsel, *Mirounga leonina*, i Australia, og det er foreslått at *L. Macrorhini* kan fungere som vektor for overføring av SES (Linn *et al.* 2001). SAV 3 har også blitt identifisert fra lakselus, *Lepeophtheirus salmonis*, under utbrudd av PD i Norge, uten at det kunne avgjøres om dette

skyltes at viruset hadde fulgt med på lusens overflate (Pettersen *et al.* 2009, Karlsen *et al.* 2006) eller som følge av opptak av blod eller hud fra SAV-positiv laks.

Alfavirus grupperes også etter den geografiske utbredelsen i to grupper kalt Old World og New World. Arter tilhørende Old World har geografisk utbredelse i Europa, Asia og Australia, mens New World artene er utbredt i Nord- og Sør-Amerika. Det kan se ut som om salmonid alfavirus tidlig i evolusjonen har utviklet seg fra denne linjen og dermed ikke har noen nære slektninger blant alfavirusene i dag (Knipe & Howley, 2007, Weston *et al.*, 1999, Weston *et al.*, 2002).

Viruskarakteristikk

Alfavirus er forholdsvis små kappekleddede virus med en diameter mellom 45 og 75 nm, Genomet er enkeltrådig positivt RNA og har en 5'-terminal cap og en 3'-terminal poly A hale (Knipe & Howley, 2007). Genomet er omtrent 12 kb og består av to leserammer (open reading frames) som koder for de ikke-strukturelle proteinene og de strukturelle proteinene, disse utgjør henholdsvis 2/3 og 1/3 av genomet. De ikke-strukturelle proteinene finner man kodet for på de to tredjedelene nærmest 5' enden av genomet og de består av nsP1 til 4. I 3' enden finner man den tredjedelen som koder for de fem strukturelle proteinene; Capsid, E3, E2, 6K og E1 (figur 1) (Stauss & Strauss, 1994). Det er nylig også oppdaget nok et strukturelt protein, kalt TransFrame (TF) protein, som overlapper med 6K og forekommer pga ribosomal frameshifting. Denne frameshiftingsregionen er lokalisert til C-terminal enden av 6K noe som fører til at 71 til 81 % av sekvensen er lik for de to proteinene (Firth *et al.*, 2008).



Figur 1: Figuren viser organisering av alfavirusgenomet inklusive det nylig påviste TF proteinet. (Utarbeidet fra Firth *et al.*, 2008).

Som navnene tilsier er de ikke- strukturelle proteinene vesentlige for utførselen av virusets replikasjon og transkripsjon av RNA, mens de strukturelle proteinene sentrale for virusets oppbygning.

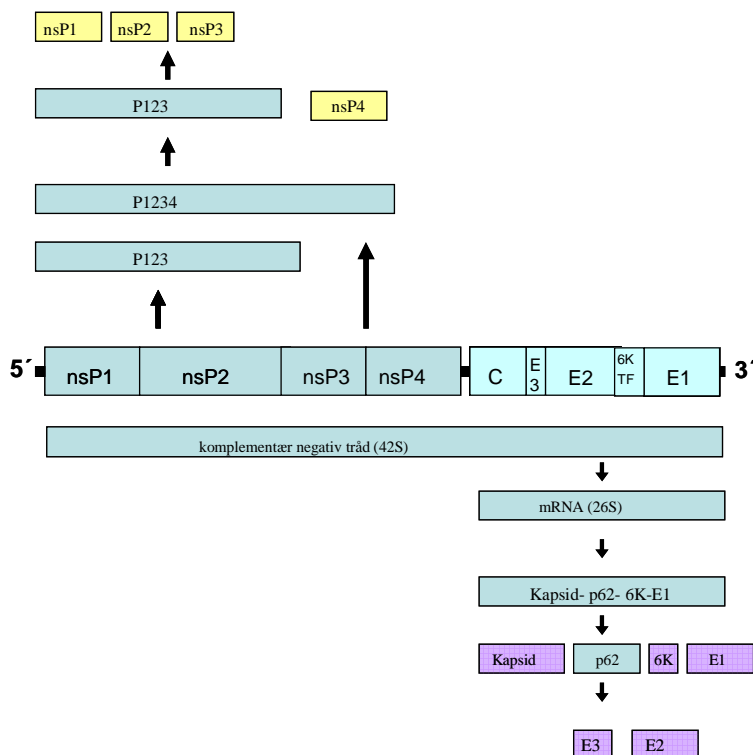
Viruspartikkelen holdes samlet av kapsidet og av en plasmamembran avledet fra vertscellen. Gjennom denne membranen går glykoproteinene E1 og E2 som i tillegg til å være med på å holde viruspartikkelen samlet har funksjoner ved virusets opptak i og frigjøring fra vertscellen (Garoff *et al.*, 2004). Viruset har en sfærisk form mens kapsidet er arrangert i et T=4 ikosahedrisk mønster (Strauss & Strauss, 1994). Glykoproteinene E1 og E2 utgjør til sammen en subenhet og det er totalt 240 slike subenheter som tre og tre sammen danner en overflateutløper.

Replikasjon hos Alfavirus

Ved infeksjon av cellen bindes alfavirus til reseptorer på cellens overflate og fraktes inn i cellens cytoplasma via reseptormediert endocytose. Da alfavirus er vist å ha en rekke ulike vertsorganismer og målceller (Gardner *et al.*, 2008, Park & Griffin, 2009, Strauss & Straus, 1994, Ozden *et al.*, 2007) kan reseptoren som benyttes enten være en reseptor som er tilstede i en rekke ulike celler eller så kan det være at alfavirus er i stand til å binde til en rekke ulike reseptorer (Knipe & Howley, 2007) Etter at viruset er tatt inn i cellen i en endosom fører et fall i pH i endosomen til fusjon av membranene og frigjøring av kapsidet inn i cellens cytoplasma. Dette skjer ved at pH-endringene fører til strukturelle endringer i E2 og E1 slik at et fusjonssete på E1 avdekkes og dermed igangsettes fusjonen (Wahlberg & Garoff, 1992). For Semliki Forest virus er fusjonen mellom vertscellens membran og virusets membran også vist å være avhengig av tilstedeværelsen av kolesterol i vertscellens membran (Kielian & Helenius, 1984). Nukleokapsidet foreligger nå fritt i cellens cytoplasma og binding til ribosomer fører til dissosiering av nukleokapsidet og frigjøring av genomet til cytoplasma.

Da alfavirus har et positivt sense enkeltrådig RNA fungerer dette direkte som mRNA for syntesen av de ikke-strukturelle proteinene. Disse dannes fra to polyproteiner, P123 og P1234, hvor P1234 dannes hos enkelte alfavirus ved at et opalt stoppkodon i P123 overses slik at translasjonen fortsetter og det noe lengre polyprotein P1234 oppstår (Knipe & Howley, 2007). Bearbeiding av disse polyproteinene skjer ved hjelp av proteaser (kodet for av viruset i nsP2) og de danner først et replikasekompleks bestående av nsP4 og P123. Over tid vil oppsamling av proteaser i cellen føre til at replikasekomplekset blir ustabil og kløyves til nsP1, nsP2 og nsP3 som sammen med nsP4 sørger for produksjon av positivt trådet RNA. Men før denne kløyvingen inntreffer bidrar replikase komplekset P123 + nsP4 til transkripsjon av en komplementær negativ tråd (42S) fra genomet (Hodneland, 2006). Ut i fra denne transkriberes så en 26S subgenomisk mRNA som gir opphav til et polyprotein bestående av kapsid, p62, 6K og E1 (Figur 2). I cytoplasma kløyves kapsidprotein

proteolytisk fra polyproteinet mens de resterende delene av polyproteinet fraktes til endoplasmisk retikulum hvor p62 kløyves til E2 og E3. Deretter transporteres E1 og E2 via golgiapparatet til plasmamembranen hvor de senere danner virusets glykoproteiner (Garoff *et al.*, 2004). Kapsidprotein assosieres med viralt RNA og fører til en oppsamling av nukleokapsidlignende partikler i cytoplasma. Deretter fører interaksjoner med glykoproteinene til at avknopping av viruspartikler fra cellen initieres. Det finnes to teorier angående hvordan utførelsen av avknoppingen foregår. En teori beskrevet av Garoff og Simons i 1974 går ut på at nukleokapsidet med en T=4 ikosahedrisk utforming settes sammen i cytoplasma og at avknoppingen initieres når dette nukleokapsidet bindes til de virale glykoproteinene i cellens plasmamembran. En annen mulighet er at et uferdig nukleokapsid bindes til glykoproteiner i cellemembranen slik at ferdigstilling av nukleokapsidet og binding av glykoproteiner for avknopping fra cellen skjer samtidig (Garoff *et al.* 2004). Det har tidligere vært antatt at 6K spiller en viktig rolle ved sammensetning og avknopping av virus og det er foreslått av Firth *et al* (2008) at både 6K og det nylig oppdagede TF proteinet spiller en rolle ved frigjøring av virus fra vertscellen (Firth *et al.*, 2008).



Figur 2: Skjematiske framstilling av genom, replikasjon og translasjon hos alfavirus. Virusets genom (+ sense) fungerer direkte som mRNA for translasjon av de ikke-strukturelle proteinene (nsP1 -4) via to polyproteiner, P123 og P1234. P123 og nsP4 samt nsP1-4 utgjør replikasekomplekser for translasjon av en komplementær negativ tråd (42S) og transkripsjon av en subgenomisk mRNA (26S) fra denne. Ut i fra den subgenomiske mRNA (26S) tråden dannes et strukturelt polyprotein, Kapsid-p62-6K-E1. Fra dette dannes de strukturelle

proteinene kapsid, E3, E2, 6K (og trolig også TF) og E1. Figuren er utarbeidet fra Hodneland, 2006 og Knipe & Howley, 2007.

Diagnostikk av SAV-relatert sykdom og metoder for deteksjon av SAV

En PD eller SD diagnose baseres på observasjoner av de kliniske tegnene på sykdommene sammen med et samlet sett av karakteristiske histopatologiske endringer i hjerte, pankreas og muskulatur. I tillegg til dette benyttes også andre teknikker slik som isolering av virus i cellekultur, serologi og real-time RT-PCR for å påvise SAV (McLoughlin & Graham, 2007). De histopatologiske endringene må også vurderes i forhold til andre sykdommer slik som infeksjøs pankreasnekrose (IPN), kardiomyopatisyndrom (CMS) og hjerte- og skjelettmuskel betennelse (HSMB) da patologien kan være svært lik for disse sykdommene (Kongtorp *et al.* 2004, McLoughlin, 1997).

SAV kan isoleres i cellekultur fra homogeniserte vevsprøver, blant annet fra nyre (Castric *et al.* 1997, Nelson *et al.* 1995, López-Dóriga *et al.* 2001), hjerte (Christie *et al.* 1998) og serum (Jewhurst *et al.* 2004). Produksjon av virus i cellekulturen kan da vurderes etter tilstedeværelsen av CPE (cytopatogen effekt) eller ved bruk av IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test). Ulempen med denne metoden er at den er tidkrevende og vil være uegnet dersom man er avhengig av å stille en hurtig diagnose. Da det også er vist å dannes virusnøytraliserende antistoffer mot SAV (Houghton & Ellis, 1996) kan virusdyrking fra materiale tatt ut sent i forløpet være vanskelig. Ved dyrking av SAV 3 i cellekultur er det også observert at CPE (cytopatogen effekt) ikke forekommer før etter 12 passasjer (Karlsen *et al.* 2006), og at manglende CPE ikke nødvendigvis indikerer fravær av virus (Graham *et al.* 2003a). Dette gjør at vurdering av CPE alene ikke alltid er en pålitelig metode for påvisning av SAV i cellekultur. Fordelene med metoden er imidlertid at den i tillegg til å gi informasjon om tilstedeværelse av virus også viser at det påviste viruset er infektivt og dermed sannsynlig årsak til det observerte sykdomsutbruddet.

Ved bruk av PCR (polymerase chain reaction) og real-time RT-PCR er det mulig å påvise SAV-spesifikt RNA fra vevsprøver, samt at det ved real-time RT-PCR også er mulig å fastslå mengden viralt RNA tilstede i prøven (Kubista *et al.* 2006, Bustin & Nolan, 2004). Dette er sensitive metoder som er i stand til å påvise viralt RNA både før, under og etter et sykdomsutbrudd og det er utviklet flere real-time RT-PCR-assay for påvisning av SAV

(Graham *et al.* 2006b, Hodneland & Endressen, 2006). Andre klare fordeler med denne metoden er at den er lite tidskrevende, og at det er mulig å analysere flere prøver samtidig.

Immunhistokjemiske undersøkelser kan benyttes for påvisning av SAV-spesifikke antigen i vevssnitt (Morieite *et al.* 2005). Metoden baserer seg på bruk av antistoff merket med et signalmolekyl (f.eks fluorescens eller enzymer slik som peroksidase og alkaline phosphatase) for påvisning av antigen eller proteiner i vevssnitt. Det er i løpet av de siste årene blitt frambrakt en rekke monoklonale antistoffer mot SAV (Todd *et al.* 2001, Welsh *et al.* 2000, Weston *et al.* 2002, Morieite *et al.* 2005, Jewhurst *et al.* 2004). Det er også utviklet rekombinante polyklonale antistoff mot de strukturelle proteinene E1 og E2 hos SAV 3 (Ottem, 2005) hvor primærantistoffet E2-pTe200 har blitt benyttet til å finne virustiter i denne oppgaven.

For påvisning av SAV-spesifikke antistoffer fra serum eller plasma er det også blitt utviklet en virusnøytralisasjonstest (McLoughlin *et al.* 1996, Graham *et al.* 2003b). En modifisert variant av denne virusnøytralisasjonstesten har også vært benyttet av Taksdal *et al.* (2007) for påvisning av SAV-spesifikke antistoffer i plasma fra laks og regnbueørret i Norge. Ulempen ved slike tester er at de er både ressurs- og tidkrevende samt at de bare gir informasjon om tilstedeværelse av antigen eller antistoff og ikke nødvendigvis selve viruspartikkelen.

Ingen av de nevnte metodene vil gi informasjon om målceller og introduksjonsvei for SAV ved å identifisere arvemateriale, men dette vil imidlertid kunne undersøkes nærmere ved *in situ* hybridisering (ISH) for påvisning av SAV-spesifikt RNA i celler og vev (Cano *et al.* 2009, Brown, 1998, Wilkinson, 1999).

Ved bruk av denne metoden benyttes en RNA eller DNA probe bestående av en komplementær tråd hvor det er inkorporert et signalmolekyl som ved en enzymreaksjon eller avgivelse av fluoressens kan brukes til å synliggjøre viralt RNA i cellen (Brown, 1998, Wilkinson 1999). Det er mulig å lage prober for deteksjon av både RNA og DNA og det kan benyttes flere ulike signalmolekyl (f.eks fluorescein og alkaline phosphatase). Metoden kan benyttes både på vevssnitt og ved whole mount ISH på små vevesbiter eller liten yngel (Wilkinson, 1999). En fordel ved whole mount ISH er at det også dannes et bilde over den tredimensjonale spredningen av viralt RNA i yngelen eller vevsbiten (Karlsen *et al.* 2008). Det er også mulig å hybridisere ulike sekvenser samtidig ved bruk av prober med ulike signalmolekyl (Brend & Holley, 2009), samt at det er mulig å kombinere ISH med metoder for immunlokalisering av antigen (Wilkinson 1999). *In situ* hybridisering har med andre ord

et stort bruksområde og har blant annet blitt benyttet for påvisning av virus og bakterier og undersøkelser omkring distribuering og målceller for disse (Moneke *et al.* 2003, Cano *et al.* 2009, Karlsen *et al.* 2008, Alonso *et al.* 2004, McCarthy *et al.* 2008), studier av genfunksjoner under utviklingen av embryo (Helvik *et al.*, 2009) og studier av forandringer i kromosomer i forbindelse med genetiske sykdommer (Wilkinson, 1999).

For SAV er det per i dag kun utviklet en Digoxigenin-merket probe rettet mot arvematerialet til SAV 3 til bruk ved in situ hybridisering på vevssnitt (L.Andersen, ikke publisert). Og behovet for utvikling av en slik metode for SAV er blitt påpekt blant annet av McLoughlin *et al* (2002).

Det er utviklet flere ISH prosedyrer som har bidratt med nyttig kunnskap om målceller og/eller infeksjonsvei for andre virus og bakterier i fisk (Moneke *et al.* 2003, Alonso *et al.* 2004, Cano *et al.* 2009, Karlsen *et al.* 2008, McCarthy *et al.* 2008) og en ISH metode for påvisning av SAV vil trolig vise seg å bidra med verdifull kunnskap om SAV.

Målceller for SAV og andre alfavirus

Det foreligger svært lite kunnskap om målceller for SAV, men studier av andre alfavirus har vist at disse har en rekke ulike målceller slik som neuroner, gliaceller, chondrocytter, muskelceller (både glatt og tverrstripet), brune fettceller, synovialceller (ledd) og celler med lymfoid opprinnelse (Strauss & Strauss, 1994). Blant annet er det vist ved infeksjoner med Chikungunya virus (CHIK) hos mennesket at målceller for CHIK er satellittceller i skjelettmuskulatur (Ozden *et al.*, 2007). Patologi ved både SD og PD involverer blant annet muskeldegenerasjon, noe som gir grunnlag for spekulasjoner i hvorvidt muskelceller kan være målceller også hos fisk. Det har også blitt gjort funn av viralt RNA fra hjerne hos regnbueørret i ferskvann badsmittet med SAV 2 ved RT-PCR analyser (Villoing *et al.* 2000b) og SAV-spesifikt RNA har også blitt påvist i hjerne hos i.p. smittet laks i ferskvann ved real-time RT-PCR analyser (Andersen *et al.* 2007). Dette kan indikere at nerveceller kan være mulige målceller for SAV, noe som også er sett hos andre alfavirus (Gardner *et al.* 2008, Park & Griffin, 2009). Dette store spekteret av vertsceller har ført til at det også diskuteres hvorvidt alfavirus kan benytte en felles reseptor som er tilstede i flere ulike celler (Strauss & Strauss, 1994). Ved real-time RT-PCR analyser på laks i.p. smittet med SAV 1 og SAV 3 ble det funnet at SAV spesifikt viralt RNA var til stede i en rekke organer (hjerne, pseudobranch, gjelle, nyre, pankreas og muskel) i løpet av smitteforløpet (Andersen *et al.* 2007). En slik

utbredelse av viruset i fisk kan indikere at målceller for SAV er celler som er tilstede i flere typer vev (for eksempel endothelceller i blodrike organer eller nerveceller) eller at en rekke ulike celler kan være målceller for SAV (Andersen *et al.* 2007).

Mål for studiet:

Målorgan og målceller for salmonide alfavirus hos Atlantisk laks er et tema som det foreligger lite eller ingen informasjon om. Det er kjent at patologiske endringer ved SAV-infeksjoner forekommer i pankreas, hjerte- og skjelettmuskulatur og at det også har vært observert endringer i hjerne, nyre og milt. Ved eksperimentell smitte har det i løpet av store deler av sykdomsforløpet også vært påvist SAV-spesifikt viralt RNA ved real-time RT-PCR analyser fra pseudobranch, gjelle, hjerte, nyre, pankreas og muskel. Når det gjelder målceller for SAV foreligger det derimot ingen kunnskap og virusets introduksjonsvei og utskillelse er heller ikke kjent.

Ved å lage en Digoxigenin RNA probe rettet mot arvemateriale til SAV 2 vil man ha mulighet til å påvise viruset i plommesekkkyngel ved whole mount *in situ* RNA-RNA hybridisering og dermed være i stand til å identifisere målceller og/eller målorgan i yngel. Ved å benytte proben på yngel tatt ut ved ulike tidspunkt i løpet av en infeksjon vil det også være mulig å si noe om introduksjonsvei og distribuering av viruset i yngelen gjennom smitteforløpet. Proben vil først bli testet ut på northern "dot" blot og SAV smittede CHSE-214 celler før den benyttes til SAV-infisert yngel. For å undersøke spesifisiteten til proben vil den også bli benyttet til SAV 3 smittede celler og yngel. Whole-mount *in situ* hybridisering er bare praktisk gjennomførbart på vev under en viss størrelse. Da det er ønskelig å se på introduksjonsvei og forløp i hel fisk må det pga størrelsen benyttes SAV-infisert plommesekkkyngel. Dette fører til at det må utføres et smitteforsøk hvor plommesekkkyngel av laks badsmittes med SAV 2 og SAV 3. I løpet av smitteforsøket skal også virusutskillelse fra yngelen undersøkes ved å analysere vannprøver fra karene etter smitte. Dette skal gjøres ved å benytte elektropositive virusfiltere til filtrering av vannprøvene. Det er tidligere gjort en studie hvor det ble vist å være høyest virusutskillelse fra 80-100 grams laks ved 4 til 10 dager etter i.p. smitte med SAV 3. Slik kunnskap om virusutskillelse vil kunne gi verdifull informasjon om hvilke tidspunkt etter smitte det er høyest risiko for spredning av viruset og dermed muligheter til å ta dette med i betraktningen ved utarbeiding av handlingsplaner for å forebygge spredning.

Materiale og metoder

CHSE-214 celler

Chinook salmon embryo (CHSE-214) celler ble dyrket ved 21 °C i 175cm² store flasker (Nunclon™) i 10 % vekstmedium bestående av 500ml Minimum Essential Medium Eagle (BioWhittaker™), 5ml HEPES buffer (BioWhittaker™), 5ml Non-Essential Amino acid solution (Sigma®), 5ml L-glutamin (Sigma®), 50ml Foetal Bovine Serum og 200µl gentamicin sulfat (BioWhittaker™). Cellekulturen ble splittet med 3 ukers mellomrom ved bruk av 2 x 3ml trypsin for å løsne cellene fra flasken. Ved smitte av celler med SAV 2 eller SAV 3 ble det byttet til 2 % vekstmedium (vedlegg 1).

Virus

Til smitte av celler og fisk ble det benyttet Salmonid alfavirus (SAV) subtype 2 (SAV 2) og subtype 3 (SAV 3). SAV 2 isolatet SDV. Orig SBV, 9812005 A, ble dyrket opp i CHSE-214 celler ved 10°C og passasje nr 3 ble benyttet til å smitte yngel. Ved smitte av celler for *In situ* Hybridisering (ISH) ble passasje nr 2 av samme isolat benyttet. Ved smitte av yngel med SAV 3 ble SAV 3 isolat SAVH30/04 (Karlsen *et. al.*, 2006) passasje 5 benyttet, mens det til smitte av celler for *in situ* hybridisering ble benyttet SAVH 20/03 (Hodneland *et al.* 2005) passasje 26. Ved smitte av CHSE-214 celler ble det benyttet 500µl smittestoff til en 175cm² stor celleflaske med 30 ml medium. Ved smitte av celler i 24-brønners brett til ISH ble det benyttet 50µl smittestoff per brønn med 500µl vekstmedium. Infeksjonsevnen til smittestoffet som ble benyttet ble testet i CHSE-214 celler, hvor det ble observert at alle smittestoffene som ble benyttet ga CPE og dermed var infeksjøs i cellekultur.

Antistoff og Virustitrering

For å finne virustiter ble antistoffene E2-pTe200 (Ottem, 2005) og Alexa dye 488-labeld anti-rabbit IgG (Molecular probes) benyttet på SAV 2 og SAV 3 infiserte CHSE-214 celler. Det rekombinante antistoffet E2-pTe200 er dannet mot SAV 3 og var blitt absorbert i cellekultur før bruk (Skotheim, 2009). Virustiter (TCID₅₀) ble funnet ved endepunktstitrering med påfølgende Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), som beskrevet av Skotheim (2009). For vurdering av resultat ble cellene undersøkt med fluorescensmikroskop (Leica).

Rensing av RNA

Det ble rensset RNA fra både SAV-smittet yngel, usmittet yngel og fra SAV-infisert cellekultur inkludert supernatant. Fra forsøksfisken ble gjelle og hjerte dissekert ut og homogenisert i 100µl TRI[®]Reagent (Sigma[®]). Fra enkelte uttakstidspunkt ble også hel yngel homogenisert i 100µl TRI[®]Reagent og fordelt over på 2 eppendorfrør, hvor det ene røret ble lagret som en reserve ved -80 °C. Deretter ble det tilsatt 900µl TRI[®]Reagent, samt at det ble tilsatt 2µl *Halobacterium salinarum* for å ha en eksogen kontroll ved real-time RT-PCR. *Halobacterium salinarum* med en optisk tetthet OD_{600nm} på 0,2 var på forhånd fortynnet 1:1000, porsjonert ut i 150µl porsjoner og lagret ved -80 °C. For RNA ekstraksjon fra SAV infiserte celler og supernatant ble 1ml TRI[®]Reagent tilsatt og dette ble blandet ved bruk av vortex. RNA ekstraksjon ble deretter utført som beskrevet av Devold *et al.* (2000) og RNA ble løst i 50µl RNase-fritt vann før RNA konsentrasjonen ble målt i et spektrometer (NanoDrop[®] ND-1000).

Revers Transkriptase PCR (RT-PCR)

For å lage cDNA ble det brukt 2µg rensset RNA fra de SAV 2-smittede CHSE-214 cellene. Dette ble blandet sammen med 1µl pd(N₆) og 5µl dH₂O og varmet til 70 °C i 5 minutter. Deretter ble det kjølt ned til 4 °C før det ble tilsatt en RT- mix bestående av 1,5µl (5x) RT buffer, 1,25µl (200mM) DTT, 2,5µl (10mM) dNTP, 0,5µl RNasin , 0,15µl M-MLV og 6,5µl dH₂O. Denne løsningen ble så inkubert ved 37 °C i en time og cDNAet ble deretter oppbevart ved - 80 °C frem til bruk.

Det ble laget primere i forward og revers retning for amplifisering av et 725 bp stort område av nsP2 fra SAV 2. For nsP-sdvF var primersekvensen

5'-CCGAATTCTTCCAAGCAGTGCGTC AAGA-'3, mens den for nsP-sdvR var

5'-CCGAATTCGCAGTCATGAGCTCGTTGTGT-3'. Området som er understreket er kuttetsetet EcoR I og de to C'ene på 5'enden ble lagt til for å lette kutting med EcoR I. Primerene ble produsert av Invitrogen.

Til PCR ble det benyttet en reaksjonsmiks bestående av 5µl thermo pol buffer (NEB, 10x), 4µl (2,5mM) dNTP, 1µl (10µM) nsP-sdvF primer, 1µl (10µM) nsP-sdvR primer, 0,3µl Taq DNA polymerase (NEB), 37µl dH₂O og 2µl cDNA (50-500ng). Det ble laget til 6 identiske rør som ble satt på under følgende PCR betingelser; 94 °C i 5 min, deretter 40 sykluser med 94 °C i 30 sek, varierende annealing temperatur for hvert rør i 45 sek og 72 °C i 60 sek, tilslutt

fulgte 72 °C i 7 min og deretter en nedkjøling til 4 °C. Annealing temperatur ble optimalisert ved å benytte følgende temperaturer; rør 1: 48,2 °C, rør 2: 50,7 °C, rør 3: 53,3 °C, rør 4: 55,9 °C, rør 5: 58,1 °C, rør 6: 59,9 °C.

Det ble så tatt ut 9µl PCR produkt av hvert rør som sammen med 1µl loading buffer (6x) ble satt på en 1 % agarose gel tilsatt en dråpe etidiumbromid (0,2mg/ml). For sammenligning av størrelsen på produktet ble det også satt 2,5µl SmartLadder (Eurogenetic) i en brønn. Resultatet ble synliggjort og tatt bilde av under UV- lys ved å benytte en Ultra Violet Transilluminator (ultra violet products Ltd.) og bildene ble behandlet i programmet Grab-It, versjon 2.59 (Synoptics Ltd)

Rensing av PCR produkt

PCR produktet ble rensert fra 1 % agarose gel ved å kombinere E.Z.N.A.TM Cycle-Pure kit (Omega bio-tek) og QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Gelbiten ble veid og det ble tilsatt 3 x gel volum av Buffer QG som ble inkubert på 60 °C til biten var løst opp (5-10 minutter). Deretter ble det tilsatt 1 x gel volum av Isopropanol og løsningen ble så pipettert over i en HiBind®DNA minicolumn (Omega Bio-Tek) og sentrifugert i 1 minutt. Væsken som hadde gått gjennom filteret ble så tømt ut og det ble tilsatt 500µl QG buffer for så å sentrifugere kolonnen i 1 minutt. Deretter ble det vasket med 2 x 700µl DNA Wash Buffer (Omega Bio-Tek) og sentrifugert ved i 1 minutt mellom hver vask. Den tomme kolonnen ble så sentrifugert i 2 minutter for å fjerne eventuelle rester av buffer og ble deretter satt i et nytt eppendorfrør og tilsatt 50µl elueringsbuffer (elution buffer 10mM Tris, pH 8,5). Det hele ble så sentrifugert i 1 min for å vaske ut DNA fra filteret i kolonnen. Alle sentrifugeringer ble utført ved ca 13000 x g. Mengden DNA ble bestemt ved å måle konsentrasjonen i et spektrometer (NanoDrop[®] ND-1000).

TOPO kloning og sekvensering

Det rensede PCR-produktet ble klonet inn i vektoren pCR[®]2.1-TOPO ved bruk av TOPO TA cloning[®] kit for sequencing (Invitrogen). PCR-produkt ble da orientert i sense eller antisense retning i vektoren (plasmidet). Vektoren pCR[®]2.1-TOPO har blant annet områder som koder for resistens mot ampicillin og kanamycin, noe som gjør det mulig å dyrke *E.coli* med denne vektoren på agar tilsatt ampicillin eller kanamycin og dermed unngå vekst av andre bakterier. LacZ α sørger for en egen kontroll på om PCR- produktet er satt inn i vektoren. Dette gjør det

ved at det gir en blå farge til kolonier hvor PCR-produktet ikke er satt inn i vektoren, mens kolonier hvor PCR-produktet er satt inn blir hvite. Vektoren inneholder også EcoRI som gjør det mulig å kutte ut PCR- produktet fra vektoren igjen og Bam HI som gjør det mulig å kutte plasmidet slik at det blir lineært. Vektoren inneholder også en T7-promotor som muliggjør *in vitro* transkripsjon/ translasjon ved å angi startsekvens for T7 polymerasen. TOP10 E.coli ble deretter transformert med disse plasmidene som beskrevet av produsent i protokollen Transforming one shot® TOP10 and DH5 α TM – T1^R competent cells. Det ble gjort et unntak fra protokollen ved oppsett av kloningsreaksjonen hvor oppskriften ble halvert.

Det ble deretter valgt ut 4 kolonier som ble streket ut på en ny skål med LB medium iblandet kanamycin. De 4 utvalgte klonene ble dyrket videre på flytende LB medium med innblandet kanamycin (50 μ g/ml) ved 37 °C og risting (250 rpm) over natt. Plasmidene ble rensert ut ved bruk av et plasmid DNA purification kit, Nucleospin® plasmid (Macherey-Nagel) som beskrevet av produsent. DNA konsentrasjonen ble målt på spektrometer før insert fra de rensede plasmidene ble sekvensert. Til sekvenseringen ble det benyttet 1 μ l BigDye (BD), 1 μ l sekvenseringsbuffer, 1 μ l forward eller revers primer (M13 Revers primer/ T7 forward primer), 6 μ l dH₂O og 100-250 ng plasmid. Dette ble satt på under følgende betingelser; 96 °C i 4 minutter, 30 sykluser med 96 °C i 10 sekunder og 50 °C i 5 sekunder og tilslutt 60 °C i 4 minutter for så å bli kjølt ned til 4 °C og tilsatt 10 μ l destillert H₂O. Sekvenseringen ble utført ved Sekvenseringslaboratoriet ved Universitetet i Bergen.

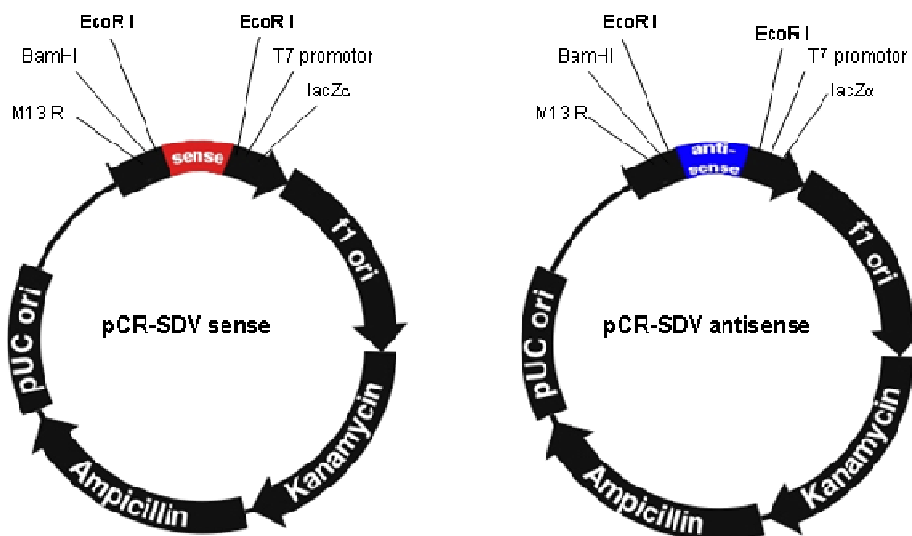
Konvensjonell kloning

Sekvenseringen viste at innsatt PCR-produkt lå i samme retning hos alle klonene som var sekvensert. Flere kloner ble undersøkt med samme resultat og PCR-produktet ble derfor kuttet ut fra plasmidet og de ulike bitene ble ligert sammen igjen i et forsøk på å få kloner hvor PCR-produkt var satt inn motsatt vei. Til kuttingen ble det benyttet 1 μ g plasmid (DNA), 15 enheter EcoRI (15 enheter/ μ l), 2 μ l 10x H buffer og dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 20 μ l. Dette ble satt på en 1 % agarosegel tilsatt etidiumbromid og to bånd var da synlig, et på ca 4000bp (vektor) og et på ca 700bp (PCR-produkt). Dette viste at kuttingen var vellykket og båndene ble kuttet ut hver for seg og rensert ved å kombinere E.Z.N.A.TM Cycle-Pure kit (Omega bio-tek) og QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) på samme måte som beskrevet under rensing av PCR-produkt.

Før ligering ble vektoren defosforylert ved å benytte 50µl av det rensede vektorbåndet fra kuttingen, 6µl 10x alkaline phosphatasebuffer, 2µl alkaline phosphatase (calf intestine) og 2µl dH₂O. Dette ble varmet opp til 37 °C i 15 minutter og deretter til 50 °C i 15 minutter for så å kjøles ned til 4 °C. Løsningen ble så pipettert over i en HiBind DNA spinnkolonne og sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Deretter ble det vasket ved å sentrifugere i 1 minutt først med 500µl CP buffer og deretter to ganger med 700µl DNA wash buffer. Etter tørking ved 13 000 x g i 2 minutter ble DNA eluert ved tilsetting av 30µl elueringsbuffer.

Deretter ble insert og vektor ligert sammen igjen ved å benytte 1 µl T4 DNA ligase, 1 µl 10x L buffer, 67,2 ng plasmid og 34 ng insert. Denne løsningen ble inkubert ved 14 °C over natt.

Transformering ble utført påfølgende dag som beskrevet ovenfor ved bruk av TOPO TA cloning[®] kit for sequencing (invitrogen). Dette ble så overført til en agarskål med LB medium med kanamycin og inkubert på 37 °C over natten. Sekvenseringen viste at de ulike plasmidene hadde PCR-produkt i både sense og antisense retning, disse kalles heretter pCR-SDV sense og pCR-SDV antisense og er vist i figur 3.



Figur 3: Figuren viser plasmidene pCR-SDV sense og pCR-SDV antisense når PCR-produktet fra SAV 2 er satt inn. Figuren er utarbeidet fra Invitrogens kart over plasmidet pCR[®]2.1-TOPO[®].

In vitro transkripsjon

De to plasmidene pCR-SDV sense og pCR-SDV antisense ble så benyttet til å produsere en DIG- merket RNA probe ved *in vitro* transkripsjon. Renset plasmid ble først linearisert ved å kutte plasmidet med 5µl av restriksjonsenzymet BamH I (5'..GGATCC..3'), 10µl 10x buffer E, 4µg rensed plasmid (templat) og dH₂O til 100µl. Reaksjonen ble inkubert ved 37°C i 4

timer. Kuttingen ble kontrollert ved gel elektroforese hvor ukuttet plasmid ble sammenlignet med kuttet plasmid.

Deretter ble 1µg linearisert plasmid felt ut ved tilsetning av 200µl kald (-20°C) 100% etanol og 0,5µl glykogen. Løsningen ble inkubert på -20 °C i 20 minutter før den ble sentrifugert ved ca 13 000 \times g i 40 minutter ved 4 °C. Væsken ble så fjernet og pelleten ble vasket i 250µl 70% etanol før pelleten ble tørket i 15 minutter ved romtemperatur. Plasmid ble deretter eluert i 12,5µl dH₂O før transkripsjonen ble igangsatt. Det ble da laget en transkripsjonsmiksbestående av 2µl 10x buffer (TaKaRa), 2µl 50 mM DTT (TaKaRa), 2µl 10x DIG-merket nukleotid mix (Roche), 0,5µl RNase inhibitor (20U), 1µl T7 RNA polymerase og 12,5µl av det lineariserte plasmidet eluert i vann. Løsningen ble inkubert på 42 °C i to timer. Ved uttesting av proben på Northern "dot" blot var det behov for transkript uten DIG-markør som "templat" og dette ble derfor produsert samtidig med den DIG-merkede proben.

For kontroll av transkripsjonen ble det utført gel elektroforese (1% agarose gel) på probe med DIG-markør og transkript uten DIG-markør. Da RNA brytes ned i agarosegelen ble det tilsatt 0,5µl RNase (CRI) i tillegg til 3,5µl dH₂O, 1µl loading buffer til 1µl probe/transkript (sense probe; 1052,5ng/µl, antisense probe; 712,7ng/µl, transkript (sense); 1753ng/µl, transkript (antisense); 1921,1ng/µl) . Dette ble varmet på 85 °C i 3 minutter før det ble satt på gel og resultatet ble vurdert etter 5 minutter og etter 20 minutter.

Deretter ble 18µl transkripsjonsprodukt, 2µl 4M LiCl, 4µl (5µg/µl) tRNA og 51µl 100 % etanol blandet og sentrifugert ved 4 °C og ca 13 000 \times g i 40 minutter. Proben ble så vasket i 70 % etanol og tørket før den ble eluert i 10µl 0,1 % DEPC vann og tilsatt 90µl hybridiseringsbuffer (vedlegg 1). Proben ble lagret slik ved -20 °C frem til bruk.

Northern dot blot

Den ferdige proben ble først testet ved bruk av Northern "Dot" Blot for å kontrollere om den kjente igjen og reagerte med SAV 2. For å undersøke eventuell kryssreaksjon ble de også benyttet en SAV 3 sense og SAV 3 antisense probe rettet mot nsP2 (L.Andersen, *ikke publisert*). Det ble benyttet en nitrocellulose-membran hvor 1µl av sense- og antisensetranskriptene (SAV 2 S 1052,5ng/µl, SAV 2 AS 712,7ng/µl, SAV 3 S 1125,3ng/µl og SAV 3 AS 1150,1ng/µl) ble satt på membranen i en 1:10 fortyningsserie i 0,1 % DEPC vann (Ufortynnet, 1:10, 1:100, 1:1000 og 1:10 000). Ved å utsette membranen for UV lys i 1

minutt ble RNA krysslinket til membranen. Deretter ble den tørket mellom to filterpapir før det ble tilsatt 5ml prehybridiseringsløsning bestående av 50 % deionisert Fomamide, 20x SSC, 2 % blokkings reagent, 0,1 % N-lauroylsarcosine, 0,5 % SDS og 0,1 % DEPC H₂O til 100ml. Denne ble forvarmet til 65 °C og membranene ble etter tilsetningen inkubert på 65 °C i 15 minutter. De ulike probene ble så denaturert ved 99 °C i 5 minutter før de ble overført til et rør med 5ml varm (65 °C) prehybridiseringsløsning. Løsningen som dekket membranene ble fjernet og prehybridiseringsløsningen hvor de ulike probene var tilsatt ble overført til de tilhørende membranene og inkubert ved 65 °C over natten.

Påfølgende dag ble membranene vasket i 2 x 5 minutter ved 65 °C i forvarmet Low Stringency Wash Buffer (LSWB) bestående av 1x SSC, 0,5 % SDS, 0,1% N-Lauroylsarcosine i 0,1% DEPC H₂O. Deretter ble membranene vasket i 2 x 30 minutter ved 65 °C med forvarmet High Stringency Wash Buffer (HSWB) bestående av 0,1 x SSC, 0,5 % SDS, 0,1 % N-Lauroylsarcosine i 0,1 % DEPC H₂O. Videre ble de vasket i 2 x 5 minutter med 1 x maleatbuffer og blokkert med blokkeringsbuffer (1 % blocking reagent i 1 x maleatbuffer) i en time ved romtemperatur og lett risting. Membranene ble deretter inkubert i en time ved romtemperatur og risting med anti-Digoxigenin alkaline phosphatase (AP) Fab fragments (Roche). Denne ble vasket vekk med DIG-buffer i 2 x 5 minutter før det ble tilsatt fremkallingsbuffer (Vedlegg 1) og de ble inkubert i 2 x 30 minutter ved romtemperatur og lett risting. Tilslutt ble 5ml chromagen substrat bestående av 37,5µl BICP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) og 50µl NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride) per 10ml fremkallingsbuffer tilsatt til hver membran og satt på lett risting i 1 time for fremkalling. Det ble tatt bilder av resultatene med et Nikon D80 kamera.

In situ hybridisering

For *in situ* hybridisering (ISH) av cellekultur ble CHSE-214 celler overført til 24 brønners brett (Nunclon™) med runde dekkglass i bunnen og dyrket ved 21 °C frem til det var ca 80 % dekning av dekkglasset. Cellene ble så smittet med SAV 2 eller SAV 3 og inkubert ved henholdsvis 10 °C og 14 °C i 9 dager. Deretter ble supernatant tømmt av og cellene ble vasket med 1 x PBS før fiksering i 20 minutter i 4 % paraformaldehyd i 1x PBS DEPC vann. Cellene ble vasket i 1 x PBS DEPC i 2 x 10 minutter og seriedehydrert på is i 25 %, 50 %, 75 % og 100 % etanol i 1 x PBS DEPC vann i 5 minutter for hver konsentrasjon. Cellene ble så lufttørket før vasking i 3 x 5 minutter i 1 x PBS DEPC vann før proteinase k (10µg/µl)

behandling i 15 minutter for nedbryting av proteiner og eksponering av arvestoff. Deretter ble cellene vasket 2 x 5 minutter i 1 x PBS DEPC vann før de ble fiksert i 4 % paraformaldehyd i 20 minutter. Paraformaldehyd ble vasket vekk ved 3 x 5 minutter i 1 x PBS DEPC vann før cellene ble seriedehydrert i 25 %, 50 %, 75 % og 100 % etanol i 1 x PBS DEPC vann i 5 minutter i hver konsentrasjon. For å fjerne bindinger og gjøre probene lineære ble probene denaturert ved 80 °C i 5 minutter. Det ble så tilsatt en hybridiseringsløsning (900ng probe per ml) til probene og dette ble overført til de forskjellige brønnene. Alle de fire probene ble testet både på SAV 2 og SAV 3 infiserte celler, dette ble gjort for å undersøke spesifisitet.

Brettene med celler ble så inkubert ved 65 °C over natt (16 timer) i et fuktkammer med filterpapir gjennomvåt av 50 % deionisert formamide og 5x SSC. Deretter ble cellene vasket i 30 minutter ved 65 °C med 2 x SSC og 25 % deionisert formamide (pH 7) i DEPC vann. Videre ble cellene vasket ved 65 °C med LSBW først i 30 minutter og så i 15 minutter og deretter 2 x 30 minutter i HSBW. Deretter ble cellene vasket 2 x 10 minutter ved romtemperatur med 1 x Maleatbuffer før de ble blokkert med blokkeringsbuffer i en time ved romtemperatur og forsiktig vugging. Blokkeringsbufferen ble så fjernet og det ble tilsatt Anti-digoxigenin AP (37,5µl 0,3 % tween 20, 12,5 ml blokkeringsbuffer og 6,5 µl anti-digoxigenin-AP) og cellene ble inkubert over natt ved 4 °C og forsiktig vugging. Påfølgende morgen ble cellene vasket 2 x 15 minutter i 1 x maleatbuffer og deretter 2 x 30 minutter med fremkallingsbuffer. Cellene ble framkalt over natt med en chromogen substrat blanding bestående av 10 ml fremkallingsbuffer, 37,5µl NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride) og 50 µl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). Dekkglassene ble så montert på objektglass med en dråpe (2,5µl) SlowFade™Gold (invitrogen) og resultatet ble undersøkt og tatt bilder av med et mikroskop (aristoplan, leitz) tilkoblet til et Olympus kamera E- 330 DC 7.

Det ble også utført ISH ved bruk av anti-digoxigenin fluorescein (fab fragments), men her var prosedyren noe annerledes enn ved bruk av anti-digoxigenin alkaline phosphatase (fab fragments). Etter inkubering over natt med de ulike probene i hybridiseringsløsning ble cellene inkubert ved 65 °C 2 x 15 minutter med LSBW og 2 x 30 minutter med HSWB. De ble så vasket med 1 x maleatbuffer i 15 minutter før cellekjernene ble farget i 1 minutt med DAPI fortynnet 1:5000 i 1 x PBS. Cellene ble vasket i 1 x PBS DEPC vann før montering på objektglass (som beskrevet ovenfor) og undersøkelse med fluorescensmikroskop (Zeiss).

Kontrastfarging av celler med metylgrønt

Etter ISH ble cellene kontrastfarget med metylgrønt for å bedre fremheve celler og cellekjernene. Cellene ble farget i 10 minutter ved 60 °C med metylgrønt løst i 0,1M Natriumacetat (Merch) i 0,1 % DEPC H₂O. Dersom cellene ble farget etter at de var montert på objektglass ble de vasket i 0,1 % DEPC H₂O og 96 % etanol for å fjerne SlowFade og oljerester før de ble farget med metylgrønt. Etter inkuberingen ble overflødig farge vasket vekk med 0,1 % DEPC H₂O og cellene ble så dehydrert i 96 % etanol (10 dypp) og deretter i 100 % etanol (2 x 10 dypp) før de ble dyppet i histoclear. Cellene lufttørket ved romtemperatur før de ble montert på objektglass med 2,5µl SlowFade™Gold.

Forsøksfisk

Plommeseekkyngel av laks ble levert fra et settefiskanlegg i Hordaland da den var 180 døgngader. Forsøket ble utført på industrilaboratoriets (ILAB) lokaler ved høyteknologisenteret i Bergen. Yngelen ble holdt i et kar i akvahallen frem til 6 dager før smitteforsøket ble iverksatt. Den ble da overført til sykdomscellen hvor 360 yngel ble fordelt over i 3 kar til et totalt antall på 120 stk i hvert kar. Det ble også holdt 80 yngel som reserve i et kar i akvahallen. Yngelen ble holdt i 8 °C ferskvann og fikk tilbud om fôr to ganger om dagen frem den var 263 døgngader. Temperaturen ble da økt gradvis til 10 °C og det ble montert fôrautomater på karene slik at yngelen fikk tilbud om fôr gjennom hele døgnet. Fôret som ble benyttet var et kommersielt 0,15mm startfôringsfor fra EWOS. Yngelen gikk på kontinuerlig lys og hadde astrotuf til å skjule seg i.

Smitte av yngel

Yngel ble badsmittet med SAV 2 og SAV 3 da vi hadde til hensikt å benytte proben til å gjøre whole mount *in situ* hybridisering på den smittede yngelen. Uforutsette problemer med smitte førte til at det måtte utføres tre smitteforsøk før det var mulig å påvise SAV-spesifikt RNA fra yngelen (tabell 1). Første smitteforsøk ble utført da yngelen var 258 døgngader, andre gang ved 293 døgngader og tredje gang ved 663 døgngader. Ved første smitteforsøk ble 120 yngel i hver gruppe badsmittet i 20 minutter hvor virustiter (TCID₅₀) i rent oppdyrket smittestoff var $3,91 \times 10^{11}$ TCID₅₀/ml for SAV 3 og $1,25 \times 10^6$ TCID₅₀/ml for SAV 2. Yngelen ble smittet i tre baljer med 40 liter vann og 8 ml smittestoff, noe som ga en sluttkonsentrasjon i vannet på $7,81 \times 10^5$ TCID₅₀/ml for SAV 3 og $2,5 \times 10^2$ TCID₅₀/ml for SAV 2. Under smitteperioden ble det benyttet trykkluft for å holde oksygenmengden i vannet stabil ved 96

til 100 % oksygenmetning. Umiddelbart etter smitte (tid 0) ble det tatt ut 10 yngel fra hvert kar. Av disse ble 5 lagret på 4 % paraformaldehyd til ISH, 2 ble lagret på karnovsky for undersøkelse med elektronmikroskopi og 3 ble lagret på eppendorfrør ved -80 °C for real-time RT-PCR analyse. Det samme antall yngel ble så tatt ut ved ytterligere 6 tidspunkt (se tabell 1). For SAV 2 ble totalt 12 yngel tatt ut etter 24, 48, 96 og 144 timer analysert, mens det for SAV 3 ble analysert totalt 9 yngel tatt ut etter 48, 96 og 144 timer. Yngel fra kontrollgruppen ble ikke analysert da det ikke ble gjort funn av SAV-positiv yngel fra de to smittede gruppene.

Ved andre gangs forsøk på smitte ble det benyttet 10 liter vann og 20 ml av samme virusisolat som ved første smitte. Sluttkonsentrasjonen av virus i vannet ble da for SAV 3 $7,8 \times 10^6$ TCID₅₀/ml og for SAV 2 $2,5 \times 10^3$ TCID₅₀/ml. Smitteperioden ble økt til 90 minutter og det ble ikke benyttet trykkluft eller annen tilsetning av oksygen. Oksygenmetningen ble kontinuerlig overvåket og den laveste oksygenmetningen målt var 94 %. Yngel ble tatt ut ved ulike tidspunkt etter smitte (se tabell 1). Det ble da tatt ut 4 yngel til ISH, 1 til elektronmikroskopi og 2 til real-time PCR. Totalt ble det analysert 10 yngel fra begge de smittede gruppene tatt ut etter 3, 10, 24, 96 og 192 timer. Ved 192 timer var det en dødfisk i SAV 3 gruppen og også denne ble undersøkt for tilstedeværelse av SAV-spesifikt RNA.

Da det ikke var beregnet å skulle smitte flere ganger var det ikke dyrket opp nok virus til å smitte en tredje gang. Det ble derfor i løpet av forsøksperioden dyrket opp mer virus fra de samme passasjene som ble benyttet ved dyrking av virus til første og andre forsøk på smitte. Virustiter var 5×10^4 TCID₅₀/ml for SAV 3 og 1×10^4 TCID₅₀/ml for SAV 2, med en sluttkonsentrasjon i vannet på 100 TCID₅₀/ml for SAV 3 og 20 TCID₅₀/ml for SAV 2. Til tredje gangs smitte ble det også overført 26, 24 og 25 yngel fra reservegruppen til henholdsvis kontrollfisk gruppen, SAV2 gruppen og SAV 3 gruppen, noe som ga et totalt antall på 30 yngel i hver gruppe. Yngel ble tatt ut 6, 12, 24, 48, 144 og 216 dager etter smitte og det ble tatt ut 2 yngel til real-time RT-PCR, 2 til ISH og 1 til TEM. Det ble totalt analysert 12 yngel fra alle tre gruppene og yngel fra alle uttakstidspunktene ble analysert. Ved 144 timer etter smitte var det en dødfisk i SAV 3 gruppen og også denne ble analysert ved real-time RT-PCR. Tabell 1 gir en oversikt over smitteforsøkene.

Samtidig med tredje gangs smitte ble 5 yngel fra gruppen med reservefisk overført til et eget kar og i.p. smittet med SAV 3 fra samme virusisolat som ble benyttet til badsmitte (Virustiter

5×10^4 TCID₅₀/ml). Yngelen ble håvet over i et bedøvelseskar med metakain (Tamro) og bedøvd som anbefalt av produsent før 10µl inokulum ble injisert i bukhulen ved bruk av 300µl Micro Fine™ insulinsprøyter (BD). All i.p. smittet yngel ble tatt ut 216 timer etter smitte.

Tabell 1: Oversikt over de ulike smitteforsøkene. Tidspunkt ved smitte er oppgitt i døgngader (d°C). Tid(min) er eksponeringstid i minutter ved badsmitte. Uttakstidspunkt er oppgitt i timer etter smitte. Antall yngel tatt ut ved hvert uttakstidspunkt er også oppgitt (N per uttak).

Forsøk nr	Gruppe	d°C v/ smitte	Type smitte	Tid (min)	subtype	TCID ₅₀	Uttakstidspunkt (timer)	N per uttak
1	Kontroll	258	Ikke smittet	20	-	-	0, 6, 12, 24, 48, 96, 144	10 ^a
	SAV 2	258	Badsmitte	20	SAV 2	$2,5 \times 10^2$		
	SAV 3	258	Badsmitte	20	SAV 3	$7,8 \times 10^5$		
2	Kontroll	293	Ikke smittet	90	-	-	3, 10, 24, 48, 96, 192	7 ^b
	SAV 2	293	Badsmitte	90	SAV 2	$2,5 \times 10^3$		
	SAV 3	293	Badsmitte	90	SAV 3	$7,8 \times 10^6$		
3	Kontroll	663	Ikke smittet	90	-	-	6, 12, 24, 48, 144, 216	5 ^c
	SAV 2	663	Badsmitte	90	SAV 2	20		
	SAV 3	663	Badsmitte	90	SAV 3	100		
i.p. smitte	SAV 3 i.p.	663	i.p. smitte	-	SAV 3	5×10^4	216	5 ^d

a - hvorav 5 til ISH, 2 til TEM og 3 til real-time RT-PCR analyser

b - hvorav 4 til ISH, 1 til TEM og 2 til real-time RT-PCR analyser

c - hvorav 2 til ISH, 1 til TEM og 2 til real-time RT-PCR analyser

d - 5 til real-time RT-PCR analyser

Vannprøver

For å undersøke om yngelen skilte ut virus etter at den var smittet ble det tatt ut vannprøver fra alle tre karene etter både første, andre og tredje smitteforsøk. Vannprøvene fra første og andre gangs forsøk ble ikke bearbeidet videre da det ikke ble påvist SAV i vev fra yngelen. Etter tredje gangs smitte ble det tatt ut vannprøver annen hver dag (1-9dager) etter smitte. Da det ble påvist SAV hos yngelen ble alle disse prøvene filtrert ved bruk av en modifisert VIRADEL metode (Andersen *et al.* ikke publisert) og videre analysert ved bruk av real-time RT-PCR.

Ved uttak av vann ble det benyttet autoklaverte glassflasker med skrukork og det ble tatt ut 1 liter vann fra hvert kar. Vannprøvene ble tatt ut fra samme plass i karet og til omtrent samme tidspunkt ved hvert uttak. Som en eksogen kontroll for real-time RT-PCR ble det til hver

vannprøve tilsatt 20µl ufortynnet *Halobacterium salinarum* (type strain DSM 3754/ATCC 33171) med en konsentrasjon på $5,5 \times 10^{11}$ bakterier per ml og OD_{600nm} på 0,2.

Vannprøvene ble filtrert gjennom et elektropositivt Zeta Plus® 1MDS filter (Cuno) ved å bruke et filterapparat. Etter filtreringen ble filteret lagt opp ned i en petriskål (Ø 50 mm) med 1,4ml TRK lysis buffer fra Total RNA Kit I (omega bio-tek) tilsatt 28µl 2-mercaptoetanol (sigma®). Forseglet med parafilm ble petriskålene satt på vippebrett i 20 minutter ved romtemperatur før 2 x 360 µl av væsken fra hver prøve ble overført til to eppendorfrør og tilsatt lik mengde 70 % etanol. Dette ble blandet godt og lagret ved -80 °C. RNA ble rensset fra prøvene ved å benytte E.Z.N.A total RNA kit (OmegaBio Tek) slik som anbefalt av produsenten og konsentrasjonen av RNA ble målt på spektrometer (NanoDrop® ND-1000). Tilstedeværelsen av SAV-spesifikt RNA i vannprøvene ble så undersøkt ved real-time RT-PCR.

Real-Time RT- PCR

Renset RNA fra hjerte- og gjelleregion og hel yngel ble undersøkt ved bruk av real-time RT-PCR og Verso™ 1-step QRT-PCR Rox kit (Thermo Scientific). Det ble benyttet tre real-time PCR assay; nsp1 (SAV), Ef1A (elongeringsfaktor alfa) og Sal (*Halobacterium salinarum*) (Tabell 2). I hver brønn ble det tilsatt 6,25µl 1-step QPCR rox mix, 0,625µl RT Enhancer, 0,125µl verso enzyme mix samt prober, primere og templat. De ulike primerene og probene var tidligere blitt optimalisert og for nsP1 og Ef1A ble det benyttet 1,13µl forward og revers primer og henholdsvis 0,25µl og 0,2µl probe. For Sal-assayet ble benyttet 0,38µl forward primer og 1,13 µl revers primer samt 0,25 µl probe. Det ble tilsatt destillert vann til 10,5µl og 2µl templat ble senere tilsatt hver brønn. Løsningen ble overført til en fast optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) og sentrifugert kort ved 4 °C før det ble satt på under følgende betingelser; 50 °C i 15 minutter (revers transkriptase steget), 95 °C i 15 minutter for aktivering av Thermo- start™ DNA polymerasen og deretter 45 repetisjoner med 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i ett minutt. Det ble benyttet et 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) og til evaluering av resultater ble programmet Sequence Detection Software versjon 1.4/ 7500 fast system SDS software benyttet.

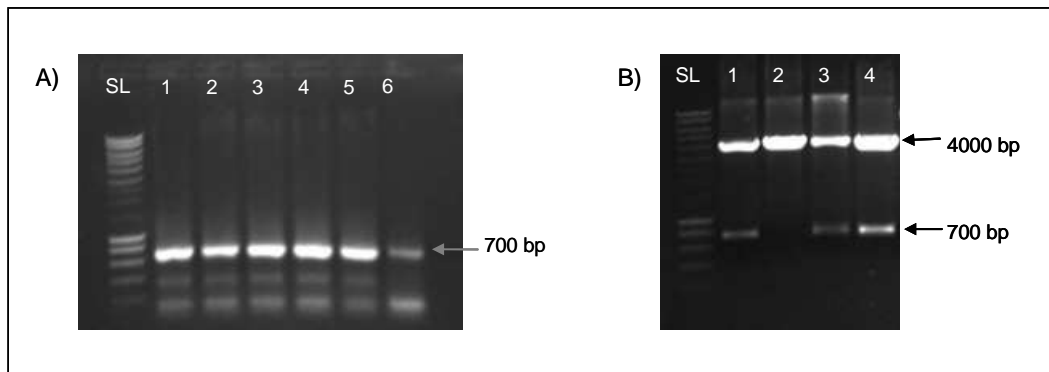
Tabell 2: Oversikt over primere og prober (TaqMan[®]) benyttet ved real-time RT-PCR for påvisning av SAV-spesifikt RNA (nsP1-assay), elongeringsfaktor alfa fra Atlantisk laks (Ef1A) og *Halobacterium salinarum* (Sal-assay). Posisjonene er satt ut i fra accession nr. AY604235 (SAVH20/03), AF321836 (Ef1a) og AB219965 (H.salinarum).

Amplicon	Bp	Sekvens	Posisjon	Kilde
nsP1-assay	107	F-primer: 5'-CCGGCCCTGAACCAGTT-3' R-primer: 5'-GTAGCCAAGTGGGAGAAGCT-3' Probe: FAM-5'-TCGAAGTGGTGGCCAG-3'-MGB	58-74 144-164 95-110	Hodneland og Endresen, 2006 Andersen <i>et al.</i> 2007
Ef1A-assay	57	F-primer: 5'-CCCCTCCAGGACGTTTACAAA-3' R-primer: 5'-CACACGGCCCCACAGGTACA-3' Probe: FAM-5'- ATCGGTATTGGAAC-3'-MGB	800-820 839-857 821-837	Olsvik <i>et al.</i> 2005
Sal-assay	59	F-primer: 5'-GGGAAATCTGTCCGCTTAACG-3' R-primer: 5'-CCGGTCCCAAGCTGAACA-3' Probe: VIC-5'-AGGCGTCCAGCGGA-3'MGB	541-562 582-600 566-579	Andersen <i>et al.</i> ikke publisert

Resultater

Kloning av pCR-SDV

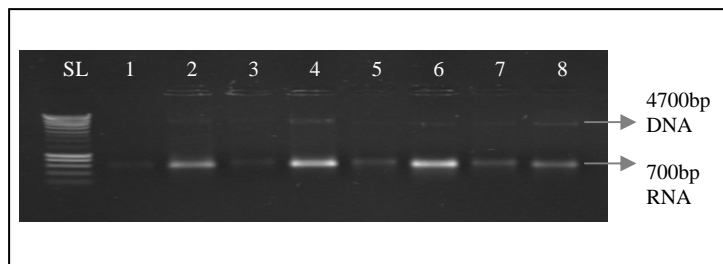
Et 725 bp stort område av nsP2 fra SAV 2 ble amplifisert ved PCR (Figur 4A) og klonet inn i plasmidet pCR[®] 2.1-TOPO. Sekvensering av de bakteriekoloniene som ble valgt ut viste at alle hadde PCR-produktet orientert i samme retning. Plasmid og PCR-produkt ble kuttet ved bruk av EcoRI og tilstedeværelsen av et 4000bp og et 700bp stort fragment ble bekreftet ved gel elektroforese (Figur 4B). Sekvensering av re-ligert plasmid og PCR-produkt viste at det var dannet plasmid hvor PCR-produkt var satt inn i både sense og antisense retning og at dette var 100 % likt SDV AJ316246.1 ved alignment av sekvensene. Plasmidene ble kalt pCR-SDV sense og pCR-SDV antisense og er vist i figur 3.



Figur 4: A) Viser PCR-produkt ved bruk av primerene ns2-sdvF og R for amplifisering av et 725bp stort område av nsP2 fra SAV 2. SmartLader (SL) er brukt som en størrelsesindikator for produktene, mens rør 1- 6 viser resultat etter PCR med ulik annealingtemperatur for hvert rør. Dette ble gjort for å optimalisere annealingtemperaturen for primerparet. Følgende temperaturer ble benyttet; rør 1: 48,2 °C, rør 2: 50,7 °C, rør 3: 53,3 °C, rør 4: 55,9 °C, rør 5: 58,1 °C, rør 6: 59,9 °C.) B) Kuttet plasmid ved bruk av EcoRI hvor plasmidet gir bånd på 4000bp, mens insert gir bånd på ca 700 bp.

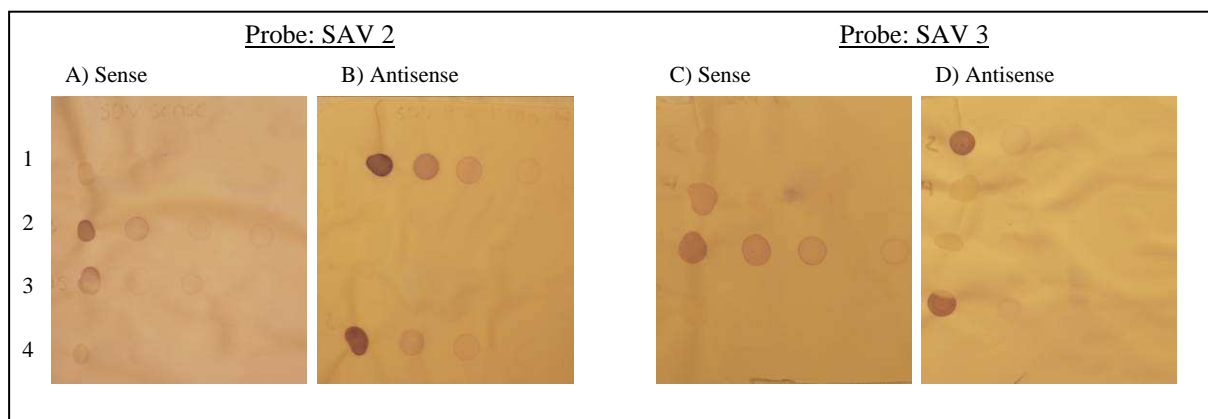
In vitro transkripsjon og Northern "dot" blot

De rensede plasmidene pCR-SDV sense og antisense ble brukt videre for å lage en DIG-merket RNA probe ved *in vitro* transkripsjon. For å kontrollere at transkripsjonen hadde vært vellykket ble det utført en gel elektroforese med både probe og transkript (uten DIG markør) for både SAV 2 sense og antisense, samt SAV 3 sense og antisense som var laget til tidligere av Andersen (*ikke publisert*). Det ble da observert to bånd, et for plasmid på omtrent 4700bp og et for RNA-transkript på omtrent 700bp (figur 5).



Figur 5; Figuren viser en vellykket transkripsjon med bånd på omtrent 4700bp (plasmid) og 700nt (RNA-transkript). Brønn 1 til 4 viser SAV 2 hvor 1 og 2 er henholdsvis probe og transkript (uten DIG markør) for SAV 2 sense, mens 3 og 4 er probe og transkript for SAV 2 antisense. Brønn 5 til 8 viser SAV 3 hvor 5 og 6 er hhv. probe og transkript for SAV 3 sense, mens 7 og 8 er probe og transkript for SAV 3 antisense.

De Digoxigenin-merkede probenes evne til å hybridisere med SAV 2-spesifikt og SAV 3-spesifikt RNA ble testet ved bruk av Northern "dot" blot. Det ble da vist at alle probene var i stand til å hybridisere med RNA-transkript i motsatt orientering. Det ble også demonstrert kryssreaksjon mellom SAV 2 og SAV 3 (figur 6).



Figur 6; Uttesting av prober på nitrocellulosemembraner ved Northern "Dot" blot. RNA Transkript fra nsP2 uten DIG markør ble satt på membranene i en fortyningsserie (1:10) fra venstre mot høyre. På alle membranene ble transkriptene lagt på i følgende rekkefølge ovenifra og ned; 1) SAV 2 sense, 2) SAV 2 antisense, 3) SAV 3 antisense og 4) SAV 3 sense. De ulike membranene viser hybridisering med A) SAV 2 sense probe, B) SAV 2 antisense probe, C) SAV 3 sense probe og D) SAV 3 antisense probe. Alle probene var i stand til å hybridisere med RNA-transkript i motsatt retning. Probene viste også kryssreaksjon mellom SAV 2 og SAV 3.

In situ hybridisering av SAV- infisert cellekultur

- Ved bruk av anti digoxigenin Alkaline Phosphatase, fab fragments

Ved uttesting av de digoxigenin-merkede probene på SAV 2 og SAV 3 infiserte CHSE-214 celler viste både SAV 2 og SAV 3 antisense probene å gi en hybridisering til hhv SAV 2 og SAV 3- spesifikt RNA (figur 7a og b og figur 8 a og b). I likhet med resultatene fra Northern

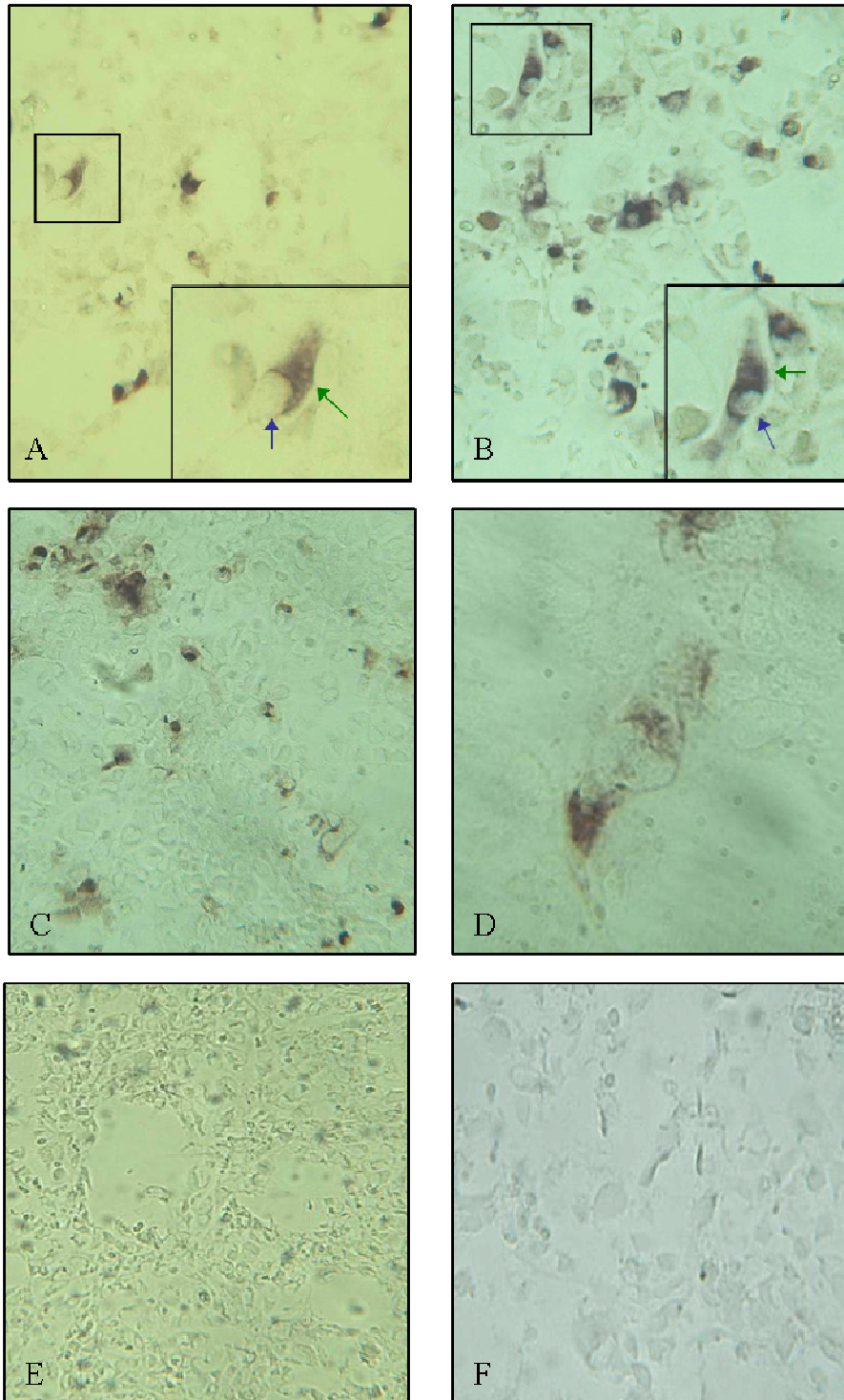
”dot” blot ble det også her observert en kryssreaksjon mellom SAV 2 og SAV 3 (figur 7a og b og figur 8c og d). Det ble ikke observert hybridisering ved bruk av sense probene på SAV-infiserte celler eller ved bruk av probene på usmittede celler (figur 7e og f og figur 8e og f).

Ved hybridisering med antisense probene i SAV 3 smittede celler ble det enkelte ganger observert en mer brunlig farge (figur 8a og b) i motsetning til SAV 2 smittede celler hvor hybridiseringen ga en lilla/burgunder fargereaksjon. Hybridisering med SAV-spesifikt RNA viste seg alltid å være lokalisert til cellens cytoplasma, og de infiserte cellene lå som regel med god avstand til hverandre. Det ble også observert at SAV 3 smittede celler ofte hadde en større andel av avrundede celler enn det som ble observert hos de SAV 2 smittede cellene. Det ble ikke observert bakgrunnsfarging ved bruk av probene.

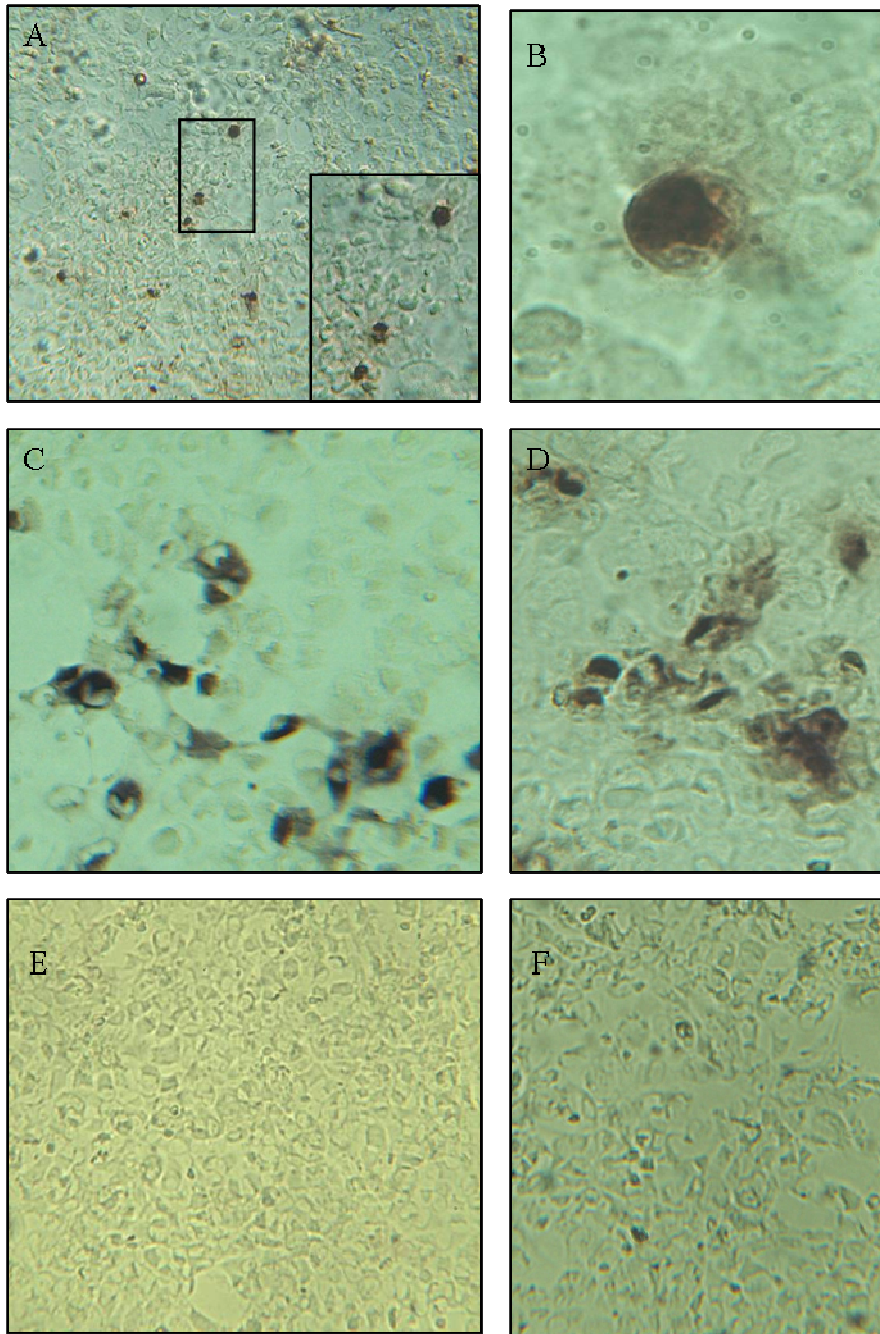
In situ hybridisering av SAV-infisert cellekultur

- ved bruk av anti digoxigenin fluorescein, fab fragments

Ved *in situ* hybridisering på SAV 2 og SAV 3 smittede celler ved bruk av anti digoxigenin fluorescein og DAPI-farging av cellekjerner forekom det store mengder bakgrunnsfarging og det var ikke mulig å skille hybridisering til SAV-spesifikt RNA fra bakgrunnsfargingen.



Figur 7: ISH på SAV 2 smittede og SAV 3 smittede CHSE-214 celler ved bruk av SAV 2 antisense og sense probe. Bilde A og B viser SAV 2 smittede celler inkubert på 10 °C i 9 dager hybridisert med SAV 2 antisense probe. Blå pil indikerer cellekjerne, mens grønn pil indikerer hybridisering med viralt RNA i cytoplasma. Bilde C og D viser SAV 3 infiserte celler inkubert ved 14 °C i 9 dager og hybridisert med SAV 2 antisense probe. Bilde E viser usmittede celler ved bruk av SAV 2 antisense probe, mens bilde F viser SAV 2 smittede celler ved bruk av SAV 2 sense probe. Ingen av de to sistnevnte viste SAV positive celler.



Figur 8; ISH på SAV 2 og SAV 3 smittede CHSE-214 celler ved bruk av SAV 3 antisense og sense probe. Bilde A og B viser SAV 3 smittede celler inkubert i 9 dager hvor SAV 3 antisense proben hybridiserer med SAV-spesifikt RNA. Merk at fargereaksjonen er mer brunlig og de infiserte cellene er mer opprundet. C og D viser bruk av SAV 3 antisense probe på SAV 2 smittede celler hvor det ble observert en mørk lilla fargereaksjon. Cellene er ikke så opprundet som for de SAV 3 smittede cellene. Bilde E viser usmittede celler som ikke gir hybridisering med SAV 2 antisense probe, mens F viser SAV 3 smittede celler hvor SAV-spesifikt antisense RNA ikke hybridiseres med SAV 3 sense proben.

Kontrastfarging med metylgrønt etter ISH

Kontrastfarging av celler med metylgrønt etter *in situ* hybridisering gode resultater ved farging umiddelbart etter hybridiseringen. Det oppsto da en lys grønn farging av celler som fremhevet cellene svært godt uten å påvirke hybridiseringen. Mens det 4 uker etter at ISH var utført oppsto en lys blå farge som også påvirket fargen på den tidligere utførte hybridiseringen slik at denne ble mer blålig.

Smitteforsøk

Etter første forsøk på smitte av yngelen viste real-time RT-PCR analyser av rensset RNA fra gjelle fra yngel tatt ut 24, 48 og 96 timer etter smitte og fra rensset RNA fra hel yngel tatt ut 96 og 144 timer etter smitte (totalt 12 yngel) at yngelen var negativ for SAV. For SAV 3 gruppen var rensset RNA fra hel yngel tatt ut 48, 96 og 144 timer etter smitte negativt og det samme gjaldt for rensset RNA fra gjelle og hjerte tatt ut etter 96 og 192 timer (totalt 9 yngel). Da det ikke ble påvist SAV-positiv yngel ble kontrollgruppen ikke undersøkt for tilstedeværelse av SAV.

Det ble heller ikke etter andre smitteforsøk påvist SAV fra gjelle og hjerte hos SAV 2 og SAV 3 smittet yngel tatt ut 3, 10 og 24 timer etter smitte. Ved dag 8 (192 timer) etter smitte ble det funnet en dødfisk i SAV 3 gruppen, men heller ikke denne var positiv for SAV. Totalt ble det analysert 10 yngel fra begge de smittede gruppene, mens det i likhet med første forsøk ikke ble analysert prøver fra kontrollfisk.

Etter tredje smitteforsøk ble det rensset RNA fra hjerte og gjelle hos yngel tatt ut etter 6, 12, 24, 48, 144 og 216 timer. Ved bruk av real-time RT-PCR ble det da gjort funn av virus fra hjerte og/eller gjelle 6, 12, 48 og 216 timer etter smitte hos SAV 2 smittet yngel, mens det for SAV 3 smittet yngel ble påvist virus fra hjerte og/eller gjelle 24, 48 og 144 timer etter smitte. I den SAV 3 smittede gruppen var det en dødfisk ved dag 6 (144t) etter smitte hvor det ble påvist SAV-spesifikt RNA i 1 av 3 replikater. Totalt ble 12 yngel fra hver av gruppene analysert.

Det ble også analysert gjelle og hjerte fra kontrollfisk fra samme tidspunkt som for SAV 2 og SAV 3 og det ble funnet en positiv yngel etter 6 dager hvor 2 av 3 replikater var positive. Fra de øvrige uttakstidspunktene for kontrollfisk ble det funnet at 1 av 3 replikater var positive fra minst en yngel ved hvert uttakstidspunkt. Totalt var det 7 positive kontrollfisk etter tredje

smitteforsøk. Dette er fremstilt i tabell 3. I alle tilfeller av positiv yngel var ct-verdiene forholdsvis høye og lå gjennomsnittlig på 36,3. Da forholdet mellom ct-verdi og mengde templat er omvendt proporsjonalt til hverandre indikerer dette at det var lave mengder templat til stede i prøvene.

De fem ynglene som ble i.p. smittet med SAV 3 ble alle funnet å være positive for SAV 216 timer etter smitte. Ct-verdiene for disse var relativt lave og lå mellom 16 og 18, noe som tilsier at det var forholdsvis store mengder SAV-spesifikt RNA til stede i prøven. Resultatene fra smitteforsøkene er fremstilt i tabell 3 og 4.

Tabell 3: Oversikt over de fire smiteforsøkene: antall SAV-positive yngel detektert ved real-time RT-PCR analyser og totalt antall yngel analysert. Yngel fra kontrollgruppen ble ikke undersøkt for SAV dersom det ikke ble funnet SAV-positiv yngel i de smittede gruppene.

Forsøk nr	Gruppe	Type smitte	Virus/ml (TCID ₅₀)	N positive yngel	N analysert/ totalt N [⌘]	ct-verdi (gj.snitt)		
						nsP1	- Ef1A	- Sal
1	Kontroll	Ikke smittet	-	-	0/21	x	x	x
	SAV 2	Badsmitte	2,5 x 10 ²	0	12/21	-	17,3	x
	SAV 3	Badsmitte	7,8 x 10 ⁵	0	9/21	-	20,1	x
2	Kontroll	Ikke smittet	-	-	0/12	x	x	x
	SAV 2	Badsmitte	2,5 x 10 ³	0	10/12	-	17,9	25,2
	SAV 3	Badsmitte	7,8 x 10 ⁶	0	10/12	-	18,3	26,3
3	Kontroll	Ikke smittet	-	7	12/12	38,1	18,6	25,2
	SAV 2	Badsmitte	20	11	12/12	36,5	18,9	26,1
	SAV 3	Badsmitte	100	10	12/12	34,5	17,8	25,1
i.p.smitte	SAV 3 i.p.	i.p. smitte	5 x 10 ⁴	5	5/5	17,1	17,5	26,1

⌘ = totalt antall yngel analysert/ totalt antall yngel tatt ut til real-time RT-PCR analyse.

x = ikke analysert

- = ikke detektert

Tabell 4; Oversikt over smitteforsøk nr 3 (se tabell 3) hvor det ble funnet SAV positive yngel ved ulike tidspunkt etter smitte. Tabellen viser resultater av real-time RT-PCR analysene utført på SAV 2 og SAV 3 smittet yngel samt kontrollyngel ved de ulike uttakstidspunktene. Ct-verdiene for alle positive yngel var imidlertid relativt høye (se tabell 3), noe som indikerer at det var forholdsvis lave mengder SAV-spesifikt RNA til stede i yngelen.

Tid etter smitte	Fisk nr	Kontroll	SAV 2	SAV 3
6 timer	1	+ ^a	+ ^b	+ ^a
	2	-	+	-
12 timer	3	-	-	+ ^a
	4	+ ^a	+	-
24 timer	5	+ ^a	-	+ ^b
	6	-	+ ^a	+ ^a
48 timer	7	-	+	+
	8	+ ^a	+	+
144 timer	9	+ ^a	+	+ ^b
	10	+ ^b	+	-
216 timer	11	-	+ ^b	+ ^{ac}
	12	+ ^a	+ ^b	+ ^a

a- 1 av 3 replikater var positive

b- 2 av 3 replikater var positive

c – dødfisk fra dag 6

Vannprøver

Vannprøver ble tatt ut fra de tre karene med yngel for å undersøke om det var mulig å detektere virus i vannet som følge av en eventuell virusutskillelse fra yngelen. Renset RNA fra vannprøver tatt ut 1, 3, 5, 7 og 9 dager etter tredje smitteforsøk ble analysert ved bruk av real-time RT-PCR og det ble da gjort funn av SAV-spesifikt RNA fra SAV 2 karet etter 5 og 7 dager og fra SAV 3 karet etter 1, 3, 7 og 9 dager (tabell 5). Vannprøven fra SAV 2 gruppen dag 7 var den eneste vannprøven som hadde positivt utslag for SAV på alle replikatene med en gjennomsnittlig ct-verdi på 36,6, mens de resterende var positiv på 1 av 3 replikater, men også her var ct-verdiene forholdsvis høye (gjennomsnittlig 36,8). Ved dag 5 ble det funnet at 1 av 3 replikat fra kontrollprøven var positiv med en ct-verdi på 37,1.

Tabell 5; Funn av SAV-spesifikt RNA i vannprøver fra karene 1-9 dager etter tredje smitteforsøk. Prøvene ble analysert ved bruk av real-time RT-PCR ved bruk av nsP1- og Sal-assay hvor gjennomsnittlig ct-verdi lå på 36,8 for nsP1 og 19,9 for Sal.

Dag	Kontroll	SAV 2	SAV 3
1	-	-	+ ^a
3	-	-	+ ^a
5	+ ^a	+ ^a	-
7	-	+	+ ^a
9	-	-	+ ^a

a- 1 av 3 replikater var positive

Diskusjon

De usikkerhetene som er i forbindelse med introduksjonsvei og målceller for SAV gjør at det er stort behov for ytterligere belysning av temaet. Dette fører igjen til et behov for nye verktøy for påvisning av SAV i vev og celler. En bedre forståelse av virusets infeksjonsvei og målceller vil kunne bidra til økt forståelse omkrig utviklingen av sykdommen og dermed muligheter til å iverksette tiltak for å forebygge sykdom. For å stille diagnosen SAV-syken/pankreassykdom (PD) benyttes histologiske undersøkelser av vev, samt ulike metoder for viruspåvisning slik som real-time RT-PCR og isolering av virus i cellekultur, eller immunhistokjemi (IHC) og virusnøytralisasjonstester for å påvise henholdsvis SAV-antigen og SAV-spesifikke antistoffer fra serum.

Histologiske undersøkelser kan være informative, men metoden gir ikke mulighet for å knytte de observerte vevs og/eller celledskadene direkte til et bestemt agens. Bruk av real-time RT-PCR for påvisning av viralt RNA i organer er en viktig metode for å undersøke tilstedeværelse av SAV både før og etter man kan se utbrudd av sykdom. Metoden gir informasjon om mengde viralt RNA noe som indikerer mengde virus i det enkelte organ. Men det er ikke mulig å si noe konkret om målceller ut i fra slike analyser eller om skadene man ser i vev er en direkte følge av virusreplikasjon. IHC og virus nøytralisasjonstester sier bare noe om tilstedeværelsen av henholdsvis SAV-antigen og SAV-spesifikke antistoffer, mens det ved virusdyrking i cellekultur bare vil kunne påvises infeksjøs virus fra enkelte organ.

Ved utvikling av en SAV-spesifikk digoxigenin probe for ISH vil det være mulig å påvise tilstedeværelsen av replikerende virus, undersøke distribuering av SAV i lakseyngelen i løpet av sykdomsforløpet og identifisere målceller og introduksjonsvei for SAV. Det er derfor blitt utarbeidet en SAV-spesifikk probe mot et 725bp langt område i nsP2 hos SAV 2. Tidligere har det av Andersen (*ikke publisert*) blitt utviklet en SAV-spesifikk probe mot nsP2 hos SAV 3 og denne har også blitt benyttet i denne oppgaven. Det ble valgt å benytte ISH for å undersøke introduksjonsvei og målceller for SAV i infisert yngel da ISH har vist seg og være en vellykket metode for å påvise målceller og introduksjonsvei for andre virus hos fisk (Cano *et al.* 2009, Moneke *et al.* 2003).

In situ hybridisering

Ved uttesting av SAV 2 og SAV 3 probene på SAV 2 og SAV 3 smittede CHSE-214 celler ble det vist at probene var SAV-spesifikke, men at de kryssreagerer. Probene ble ikke funnet å gi bakgrunnsfarging, noe som tilsier at de gir en sikker identifisering av SAV-spesifikt RNA i cellekultur. Det at proben var forholdsvis lang (725nt) er også med på å gi en sikker identifisering av SAV da dette gir en mindre sjanse for uspesifikk binding til en lignende sekvens (Wilkinson, 1999). Det sterke signalet som ble oppnådd ved hybridiseringen er trolig også forårsaket av lengden på proben da en lang probe vil også gi et sterkere hybridiseringssignal i og med at den vil få en større andel av signalmolekyler bundet til seg (Wilkinson, 1999). Videre uttesting av proben vil sannsynligvis kunne vise identifisering av SAV-spesifikt RNA også i vev, og probene vil dermed kunne vise seg å være et nyttig redskap for nærmere undersøkelser angående introduksjonsvei, målorganer og målceller for SAV.

Ved bruk av de to probene på CHSE-214 cellekultur infisert med SAV 2 eller SAV 3 viste hybridisert RNA og gi en sterk blå/lilla fargereaksjon. Ved senere bruk av probene på SAV 3 infiserte celler ble det også observert en mer brunlig fargereaksjon. Som gjennomgått av Brown (1998) er det vanlig å observere en mørk blå til brun fargereaksjon ved bruk av 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate og nitroblue tetrazolium chloride som substrat. Dette er noe som kan vise seg å bli et problem ved bruk av proben på vev da melanomakrofager inneholder pigmentkorn som gir de en mørk brun til sort farge (Kryvi & Totland, 1997, Moneke *et al.*2003) og dermed kan misstolkes som påvisning av SAV eller føre til at hybridiseringen feiltolkes som melanomakrofager. Men da denne brunlige fargen bare ble observert på SAV 3 infiserte celler en av gangene hybridiseringen ble utført er det mulig at dette kan ha vært forårsaket av enkelte av løsningene eller bufferne som ble benyttet eller som følge av substratets ferskhet.

Da det er vist stor likhet i sekvensene mellom SAV 2 og SAV 3 når det gjelder nsP2 var det antatt at proben kunne vise seg å gi en kryssreaksjon med SAV 3. Dette viste seg også å stemme da det ble vist kryssreaksjon både ved uttesting ved Northern "dot" blot og i SAV-infiserte celler. Da det er større forskjeller i sekvensen til nsP3 enn i sekvensen til nsP2 mellom de ulike subtypene (Hodneland, 2006), er det mulig at en probe rettet mot nsP3 ville vært i stand til å skille mellom SAV 2 og SAV 3. Men siden det allerede var utviklet en SAV

3 probe mot nsP2 (L.Andersen, *ikke publisert*) ble det valgt å gjøre det samme for SAV 2 slik at resultatene ved bruk av de to probene kunne vurderes opp mot hverandre.

Det er også mulig å studere den intracellulære beliggenheten av RNA ved *in situ* hybridisering, dette kan blant annet gjøres ved å benytte fluoressens-merking. Cellene kan deretter undersøkes med et konfokalmikroskop som vil vise den intracellulære lokaliseringen av viralt RNA da det med dette mikroskopet er mulig å ta bilder i flere optiske plan. Denne metoden ble også benyttet i dette studiet ved å bruke anti digoxigenin fluoresscein, men det oppsto imidlertid svært mye bakgrunnsfarging og det var ikke mulig å skille spesifikk hybridisering fra bakgrunnsfargingen. Dette førte til at den intracellulære lokaliseringen av SAV-spesifikt RNA ikke er undersøkt med konfokalmikroskopi. Men ISH ved bruk av anti-digoxigenin alkaline phosphatase viste at viralt RNA var lokalisert til cytoplasma. Metoden bør imidlertid optimaliseres ytterligere for å undersøke hvorvidt den har potensial for påvisning av SAV og studier av den intracellulære lokaliseringen av viralt RNA. Det kan blant annet være mulig at resultatene blir bedre ved bruk av et annet sekundærantistoff, eller ved å optimalisere inkuberingsstider og buffere som benyttes.

Som nevnt innledningsvis dannes det en komplementær negativ tråd under replikasjonen av alfavirus (Hodneland 2006). Denne vil det i teorien være mulig å påvise ved bruk av sense proben, men da det forekommer en betydelig lavere andel negativ tråd enn positiv tråd (Knipe & Howley, 2007) vil det trolig være vanskeligere å påvise denne. Det ble ikke vist hybridisering til den negative tråden ved uttesting av sense probene i dette studiet. Men da dette er avhengig av å skje på et tidspunkt hvor det er mye negativ tråd til stede kan man anta at det vil være mulig å påvise negativ tråd dersom probene benyttes ved et tidspunkt hvor virusreplikasjonen er høy. En slik påvisning av negativ trådet RNA vil være nyttig da dette gir klare indikasjoner på at replikasjon forekommer i den aktuelle cellen eller vevstypen.

En fordel med *in situ* hybridisering i forhold til immunocytokjemi er at det generelt sett er hurtigere å lage en probe enn å produsere antistoff, noe som har ført til at ISH i er blitt en metode som benyttes ofte (Beesley, 2001). Ved *in situ* hybridisering er det også mulig å påvise ulike sekvenser ved bruk av ulike signalmolekyl slik at man får en dobbel-merking i det aktuelle vevet (Brend & Holley, 2009, Wilkinson, 1999). Dette gjør det f.eks mulig å studere ulike gensekvenser samtidig under utvikling av embryo. Det er også mulig å kombinere *in situ* hybridisering med metoder for immunlokalisering av antigen (Wilkinson

1999). Dette gjør at man samtidig kan påvise både arvestoff og antigen og dermed oppnår en sikrere identifisering av for eksempel virus, samt at mulighetene for hva som kan studeres økes. En fordel ved bruk av whole mount ISH sammenlignet med ISH på vevssnitt er at det dannes et tredimensjonalt overblikk over infeksjonen (Karlsen et al. 2008), noe som ikke er mulig å oppnå i tynne vevssnitt.

Metylfarging av celler etter ISH ga gode resultater når det ble utført umiddelbart etter hybridiseringen, mens det kan se ut for at det er vanskeligere å få en fin kontrastfarging dersom cellene blir liggende en stund etter hybridiseringen før de kontrastfarges. Dette tyder på at kontrastfarging bør utføres umiddelbart etter ISH for å oppnå best resultater.

Smitte av yngel

Proben var også tenkt å benyttes til whole mount *in situ* hybridisering på SAV 2 og SAV 3 infisert plommeseckkyngel av laks for å se på infeksjonsvei, målceller og målorgan for SAV. Det var dermed nødvendig å utføre et smitteforsøk hvor plommeseckkyngel ble badsmittet med SAV 2 og SAV 3. Til forsøket ble det valgt å benytte plommeseckkyngel både fordi de var av en størrelse som egnet seg for whole mount ISH og fordi de ble antatt og være mer følsom for SAV-infeksjoner en eldre fisk. Det sistnevnte ble også antatt av Villoing *et al* (2000b) da de valgte å benytte 0,5 grams regnbueørret for smitte med ulike SAV subtyper. Smitte av yngelen viste seg derimot å være mer komplisert enn først antatt og det var nødvendig med tre forsøk på å smitte yngelen før det var mulig å påvise SAV fra yngelen.

Disse uforutsette problemene førte imidlertid til at det ikke er blitt utført whole mount ISH på SAV-infisert yngel og proben har derfor bare blitt testet ut på cellekultur. Dette resulterte også i at antall yngel ble betraktelig lavere enn hva som opprinnelig var planlagt, både med tanke på vannprøvene som ble tatt ut og antall yngel som kunne tas ut ved hvert prøveuttak. Samt at det også førte til at det måtte dyrkes opp mer smittestoff til det tredje smitteforsøket og virustiter ble da betydelig lavere enn det som var ønskelig.

Ved real-time RT-PCR analyse av yngel fra de to første smitteforsøkene var det ikke mulig å påvise SAV-positiv yngel i noen av gruppene. Dette kan indikere at plommeseckkyngel av laks har lavere mottakelighet for SAV enn eldre laks, men da det er analysert et forholdsvis lavt antall yngel er det ikke mulig å dra noen slutninger ut i fra disse resultatene. Analyser av yngel fra tredje smitteforsøk viste at det var mulig å påvise SAV-positiv yngel fra alle

gruppene, inklusive kontrollgruppen. Ct-verdier for alle de badsmittede SAV-positive ynglene var forholdsvis høye (gjennomsnittlig 36,4), noe som indikerer at tilstedeværelsen av viralt RNA var lav, da ct-verdi og mengde templat er omvendt proporsjonal til hverandre. Det faktum at virus også ble påvist fra kontrollgruppen indikerer at yngelen kan ha vært bærer av SAV, vertikalt smittet eller horisontal smittet i ferskvann før forsøkene ble iverksatt. Som nevnt tidligere har det vært vist av Bratland og Nylund (*i trykk*) at det er mulig å finne SAV i egg og 2-4 grams lakseyngel og muligheten for at det eksisterer en vertikal smittevei for SAV er også foreslått her. Basert på den geografiske utbredelsen av SAV samt funn av SAV 3 i ferskvann eksisterer det også teorier om at SAV kan ha et ferskvannsreservoar og at overføring av SAV skjer i ferskvann (Karlsen *et al.* 2006). Dersom dette er tilfelle er det mulig at yngelen allerede var infisert med SAV, men at virusreplikasjon i yngelen undertrykkes. Det er blant annet vist at Sindbis virus kan forekomme i en ikke-produktiv form hos mus som følge av en effektiv humoral immunrespons (Levine & Griffin, 1992), men hvorvidt dette er tilfelle for SAV er ikke kjent. Det er imidlertid ikke mulig å dra noen slutninger omkring dette ut i fra de oppnådde resultatene da antall yngel analysert var svært lavt. Det forekommer ikke anadrom fisk i ferskvannskilden til sykdomscellene ved ILAB og denne kan dermed utelukkes som en potensiell smittekilde.

For å undersøke dette nærmere kan det benyttes real-time RT-PCR assay for påvisning av de ulike subtypene slik som beskrevet av Hodneland og Endresen (2006). Det er også mulig å isolere virus fra yngelen og sekvensere dette for å avklare hvilken subtype fisken var infisert med. Dermed ville det vært mulig å si om den SAV 2 smittede yngelen var infisert med SAV 2 eller SAV 3 og dermed om den var smittet med SAV 2 i forsøket eller infisert med SAV 3 før forsøket ble iverksatt.

For å undersøke om det var mulig å smitte yngel når smitteveien ble omgått ble 5 yngel (holdt i et eget kar) i.p. smittet med 10 μ l av samme SAV 3 isolat som ble benyttet ved badsmitte tredje gang. Real-time RT-PCR analyser viste da at alle de 5 i.p. smittede ynglene var positive for SAV. Ct-verdier var her betydelig lavere enn hos den badsmittede yngelen og lå mellom 16-18. Da det ble benyttet lik terskelverdi (0,01) for alle analysene og RNA mengden i de ulike prøvene var tatt hensyn til viser dette at det var stor forskjell i mengde templat til stede i den i.p. smittede yngelen i forhold til den badsmittede. Ct-verdiene for inokulum benyttet til i.p. smitte var også betydelig høyere (35) enn det ct-verdiene var hos den i.p. smittede yngelen. Dette indikerer at replikasjon av virus har funnet sted i den i.p smittede yngelen.

Når det gjelder undersøkelse av virustiter for SAV 2 ble det i mangel på antistoff rettet mot SAV 2 benyttet antistoff mot E2 hos SAV 3. Dette kan ha ført til en lavere binding av antistoff til SAV 2 på grunn av mulige epitopforskjeller mellom SAV 2 og SAV 3 og dermed gitt et virustiter som var lavere enn det som faktisk var tilfelle. Som gjennomgått av Fringuelli *et al.* (2008) er E2 et protein som inneholder en rekke nøytraliserende epitoper og det er også kjent at det er flere ulikeheter i E2 sekvensen mellom de ulike subtypene. Dette kan, sammen med de lave virustiterene som ble funnet for SAV 2, tyde på at dette antistoffet ikke var like godt egnet til bruk ved titrering for SAV 2 som det var til titrering for SAV 3. Smittestoff ble imidlertid sjekket ved real-time RT-PCR og resultatene fra disse indikerte også et lavt virustiter (ct-verdi 34,7) når man sammenlignet med resultater fra Hodneland & Endresen, 2006. Det ble imidlertid også funnet relativt lave virustiter ved titrering for SAV 3 og dette, sammen med de høye ct-verdiene for smittestoffet, indikerer at virustiter har vært lavt ved siste smitteforsøk.

Virusutskillelse

Vannprøver tatt ut under smitteforsøk med SAV 3 i.p. smittet laks i sjøvann har vist at virus skilles ut mellom 4 og 10 dager etter smitte (Andersen *et al.*, ikke publisert). Analysene av vannprøvene viste at det kun var mulig å detektere SAV-spesifikt RNA ved dag 5 og dag 7 fra den SAV 2 smittede gruppen. Mens det fra karet med SAV 3 smittet yngel ble påvist SAV-spesifikt RNA fra dag 1, 3, 7 og 9. Gjennomsnittlig ct-verdi for de SAV-positive vannprøvene lå på 36,9 og viser at tilstedeværelsen av viralt RNA i vannet var lav. Dette skyldes trolig at det i tillegg til å være påvist lave mengder SAV fra yngelen også var svært få yngel (18 stk ved dag 1) i forhold til vannmengde (ca 70 liter). Dette kan ha ført til at biomassen var for lav i forhold til vannmengde til å gi en høy nok virusutskillelse til at viruskonsentrasjonen i vannet oversteg deteksjonsgrensen for SAV ved real-time RT-PCR analyser etter virusfiltrering gjennom elektropositive filtre.

Når det gjelder vannprøver fra kontrollfisk ble det ved dag 5 funnet at 1 av 3 triplikater var positiv for SAV. Dette kan enten skyldes kontaminering av prøven eller en mulig virusutskillelse fra yngelen da det også ble funnet SAV-positiv yngel fra kontrollgruppen. Det ble ikke tatt ut vannprøver fra karet med de 5 i.p. smittede ynglene da det ble antatt at dette var for lavt antall fisk til å gi en detekterbar virusutskillelse. At det ikke ble gjort større funn

av virus fra vannprøvene som ble tatt ut skyltes trolig at en eventuell virusreplikasjon hos den badsmittede yngelen var for lav og at virusutskillelsen fra yngelen dermed ble tilsvarende lav.

Konklusjoner og fremtidsperspektiver

I denne oppgaven har det blitt utviklet en SAV-spesifikk RNA probe til bruk ved *in situ* hybridisering. Proben har vist seg å være et utmerket verktøy for påvisning av SAV i cellekultur. Metoden har ikke blitt utprøvd på vev, men de gode resultatene som er oppnådd ved uttesting på SAV-infisert cellekultur indikerer at dette også kan være et nyttig verktøy for påvisning av SAV i vev, samt for identifisering av målceller og undersøkelser omkring virusets infeksjonsvei. For å undersøke dette nærmere vil det imidlertid være nødvendig med videre uttesting av proben på SAV-infisert yngel.

I løpet av dette studiet ble det også vist at plommeseckyngel av laks ikke ble infisert med SAV 2 eller SAV 3 ved badsmitte. Det forelå imidlertid indikasjoner på at 0,5 grams lakseyngel kan badsmittes med SAV 2 og SAV 3, men funn av SAV-positiv yngel fra kontrollgruppen kan også indikere at yngelen var infisert med SAV i forkant av forsøket. Det ble også vist at 0,5 grams lakseyngel kan i.p smittes med SAV 3 og real-time RT-PCR analyser av yngelen ga sterke indikasjoner på at virusreplikasjon hadde forekommet i yngelen. For å undersøke nærmere om plommeseckyngel og yngel av laks er mottakelig for SAV kan man forsøke å smitte yngelen ved høyere virustiter enn det som ble benyttet i dette studiet. Yngel bør også undersøkes for tilstedeværelse av SAV før forsøket iverettes og det bør analyseres et større antall yngel enn det som ble analysert i dette studiet.

For å kontrollere at virusisolatet som benyttes er infektivt i laks kan dette også benyttes til både badsmitte og i.p. smitte av større laks som er vist og være mottakelig for SAV. Da SAV 2 i all hovedsak er vist å infisere regnbueørret i ferskvann bør det også utføres et smitteforsøk med regnbueørret slik at proben også kan testes ut på SAV 2 infisert regnbueørret.

Referanser:

- Alonso M.C., Cano L., Castro D., Perez-Prieto S.I. and Borrego J.J. (2004) Development of an *in situ* hybridisation procedure for the detection of sole aquabirnavirus in infected fish cell cultures. *Journal of virological methods* 116, 133-138.
- Andersen L., Bratland A., Hodneland A. and Nylund A. (2007) Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV 1 and SAV 3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of virology* 152, 1871-1883.
- Andersen L., Skotheim S., Sandvik Berg E., Hodneland K. and Nylund A. (unpublished) The effect of reduced oxygen levels on the severity of salmonid alphavirus (SAV) infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)
- Beesley J.E. (2001) *Immunocytochemistry and in situ hybridisation in the biomedical sciences*. Birkhäuser Boston.
- Brend T. and Holley S.A. (2009) Zebrafish whole mount high-resolution double fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of visualized experiments* 25, doi: 10.3791/1229
- Boucher P. and Baudin Laurencin F. (1994) Sleeping disease (SD) of salmonids. *Bulletin of the European Association of fish pathologists* 14, 179-180.
- Boucher P. and Baudin Laurencin F. (1996) Sleeping Disease and Pancreas Disease: comparative histopathology and acquired cross- protection. *Journal of fish diseases* 19, 303-310.
- Bratland A. and Nylund A. (*in press*) Studies on the possibility of vertical transmission of NSAV in production of Atlantic salmon in Norway.
- Brown C. (1998) *In situ* hybridisation with riboprobes: An overview for veterinary pathologists. *Vet. Pathol* 35, 159-167.
- Bustin S.A. and Nolan T. (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques* 15, 155-166.
- Cano I., Ferro P., Alonso M.C., Sarasquete C., Garcia-Rosado E., Borrego J.J. and Castro D. (2009) Application of *in situ* detection techniques to determine the systemic

condition of lymphosystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L. Journal of fish diseases 32, 143-150.

- Castric J., Baudin Laurencin F., Brémont M., Jeffroy J., Le Ven A., Bearzotti M. (1997). Isolation of the virus responsible for Sleeping disease in experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 17, 27-30.
- Christie K.E., Fyrand K., Holtet L. and Rowley H.M. (1998). Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. Journal of fish disease, 21: 391-394.
- Christie K.E., Graham D.A., McLoughlin M.F., Villoing S., Todd D. and Knappskog D. (2007) Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. Diseases of aquatic organisms 75, 13-22.
- Crocford T., Menzies F.D., McLoughlin M.F., Wheatley S.B. and Goodall E.A. (1999) Aspects of the epizootiology of pancreas disease in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Ireland. Diseases of aquatic organisms 36, 113-119.
- Devold M., Krossøy B., Aspehaug V. and Nylund A. (2000) Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Diseases of aquatic organisms 40, 9-18.
- Ferguson H.W., Roberts R.J., Richards R.H., Collins R.O. and Rice D.A. (1986) Severe degenerative cardiomyopathy associated with pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of fish diseases 20, 95-98.
- Firth A.E., Chung B.Y.W., Fleeton M.N. and Atkins J.F. (2008) Discovery of frameshifting in alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. Virology journal 5, doi:10.1186/1743-422X-5-108
- Fringuelli.E., Rowley.H.M., Wilson.J.C., Hunter.R., Rodger.H. and Graham.D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on parital E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. Journal of fish diseases 31, 811-823.
- Gardner, C.L., Burke, C.W., Tesfay, M.Z., Glass, P.J., Klimstra, W.B. and Ryman, K.D. (2008) Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. Journal of virology 83, 10634-10646

- Graham D.A., Rowley H.M., Walker I.W., Weston J.H., Branson E.J. and Todd D. (2003a) First isolation of sleeping disease virus from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *Journal of fish diseases* 26, 691-694.
- Graham D.A., Jewhurst V.A., Rowley H.M., McLoughlin M.F. and Todd D. (2003b) A rapid immunoperoxidase-based virus neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *Journal of fish diseases* 26, 407-413.
- Graham D.A., Jewhurst H., McLoughlin M.F., Sourd P., Rowley H.M., Taylor C. and Todd D. (2006a) Sub-clinical infection of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with salmonid alphavirus – a prospective longitudinal study. *Diseases of aquatic organisms* 72, 193-199.
- Graham D.A., Taylor C., Rodgers D., Weston J., Khalili M., Ball N., Christie K.E. and Todd D. (2006b) Development and evaluation of a one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection of salmonid alphaviruses in serum and tissues. *Diseases of aquatic organisms* 74, 47-54.
- Graham D.A., Rowley H.M., Fringvelli E., Bovo G., Manfrin A., McLoughlin M.F., Zarza C., Khalili M., and Todd D. (2007a) First laboratory confirmation of salmonid alphavirus infection in Italy and Spain, *Journal of fish diseases* 30, 569- 572.
- Graham D.A., Staples C., Wilson C.J., Jewhurst H., Cherry K., Gordon A. and Rowley H.M.(2007b) Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influence of temperature and pH on virus survival. *Journal of fish diseases* 30, 533- 543.
- Garoff H. and Simons K. (1974) Location of the spike glycoproteins in the Semliki Forest Virus membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* 71, 3988-3992.
- Garoff H., Sjöberg M. and Holland Cheng R. (2004) Budding of alphaviruses, *virus research* 106, 103-116.
- Helvik J.V., Rødahl E., Drivenes Ø. and Haarr L.(2009) Identification and characterization of two zebrafish Nectin-1 genes that are differentially expressed in the developing eye and brain. *Developmental dynamics* 238, 43-55.
- Hodneland K., Bratland A., Christie K.E., Endresen C., Nylund A.(2005). New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Diseases of aquatic organisms*, 66: 113-120.

- Hodneland, K. and Endresen, C. (2006) Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®) *Journal of virological Methods* 131, 184-192.
- Hodneland K., (2006). Salmonid Alphavirus (SAV) - Genetic characterisation of a new subtype, SAV3, and implementation of a novel diagnostic method. Dissertation for the degree doctor scientiarum (dr.sient), University of Bergen, Norway. ISBN: 82-308-0282-3. 2006.
- Houghthon G. and Ellis A.E. (1996) Pancreas disease in Atlantic Salmon: serum neutralisation and passive immunisation. *Fish & shellfish immunology* 6, 465- 472.
- Jewhurst V.A., Todd D., Rowley H.M., Walker I.W., Weston J.H., McLoughlin M.F. and Graham D.A. (2004) Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases* 27, 143-149.
- Johansen R., Kongtorp R.T., Bornø G., Ringbø Skjelstad H., Olsen A.B., Flesjå K., Colquhoun D., Ørpetveit I., Hansen H., Garseth Å.H. og Hjeltnes B. (2008) Helsesituasjonen hos oppdrettsfisk 2008. Veterinærinstituttet.
- Karlsen M., Hodneland K., Endresen, C., and Nylund A. (2006) Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Archives of virology* 151, 861-874.
- Karlsen M., Nylund A., Watanabe K., Helvik J.V., Nylund S. and Plarre H. (2008) Characterization of ‘*Candidatus Clavochlamydia salmonicola*’: an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environmental microbiology* 10, 208-218.
- Kent M.L. and Elston R.A. (1987). Pancreas disease in pen-reared Atlantic salmon in North America. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7 (2), 29- 31.
- Kielian M.C. and Helenius A. (1984) Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *Journal of virology* 52, 281-283.
- Knipe D.M. and Howley P.M.(2007), *Fields Virology fifth edition volume I*, Lippincott Williams & Wilkins kap 30, side 1002-1015.
- Kongtorp R.T., Taksdal T., and Lyngøy A. (2004) Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms* 59, 217-224.

- Koonin E.V. and Dolja V.V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 375-430.
- Kristoffersen A.B., Viljugrein H., Kongtorp R.T., Brun E. og Jansen P.A. Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003-2007. *Prev. Vet. Med.* (2009) doi:10.106/j.prevetmed.2009.04.003.
- Kryvi H. og Totland G.K. (1997) *Fiskeanatomi*. Høyskoleforlaget AS, Kristiansand.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A. and Zoric N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95-125.
- Levine B. and Griffin D.E. (1992) Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis. *Journal of virology* 66, 6429-6435
- Linn.M.L., Gardner.J., Warrilow.D., Darnell.G.A., McMahon.C.R., Field.I., Hyatt.A.D., Slade.R.W. and Shurbier.A. (2001) Arbovirus of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, lepidophthirus macrorhini. *Journal of virology* 75, 4103-4109.
- Lòpez-Dòriga. M. V., Smail. D. A., Smith. R. J., Domènech. A., Castric. J., Smith. P.D. and Ellis. A. E. (2001) Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) in cell culture and its ability to protect against infection by the `wild-type` agent. *Fish and shellfish immunology* 11, 505-522.
- McCarthy Ú.M., Urquhart K.L. and Bricknell I.R. (2008) An improved *in situ* hybridization method for the detection of fish pathogens. *Journal of fish diseases* 31, 669-677.
- McLoughlin M.F., Nelson R.T., Rowley H.M., Cox D.I. and Grant A.N. (1996) Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Diseases of aquatic organisms* 26, 117-124.
- McLoughlin M. (1997) The differential diagnosis of the major pancreatic disorders of salmonids, a diagnostic challenge. *Bulletin of the European Association of fish pathologists* 17, 205-208.
- McLoughlin M.F., Graham D.A., Norris A., Matthews D., Foyle L., Rowley H.M., Jewhurst H., MacPhee J. and Todd D. (2006) Virological, serological and

- histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Diseases of aquatic organisms* 72, 125-133.
- McLoughlin, M.F. and Graham, D.A. (2007) Alphaviruses in salmonids- a review. *Journal of fish diseases* 30, 511- 531.
 - McLoughlin M.F., Nelson R.N., McCormic J.I., Rowley H.M. and Bryson D.B. (2002) Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases* 25, 33-43.
 - McVicar, A.H. (1987) Pancreas Disease of farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and early pathology. *Aquaculture* 67, 71-78.
 - Moneke E.E., Kibenge M.J.T., Groman D., Johnson G.R., Ikede B.O., and Kibenge F.S.B. (2003) Infectious salmon anemia virus RNA in fish cell cultures and in tissue sections of Atlantic salmon experimentally infected with infectious salmon anemia virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 15, 407-417.
 - Moriette C., LeBerre M., Kerbart Boscher S., Castric J. and Brémont M. (2005) Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the sleeping disease virus, an aquatic alphavirus. *Journal of general virology* 86, 3119- 3127.
 - Munro, A.L.S., Ellis, A.E., McVicar, A.H., Anne McLay, H., & Needham, E.A. (1984) An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgoländer meeresunters.* 37, 571-586.
 - Nelson R.T., McLoughlin M.F., Rowley H.M., Platten M.A., McCormick J.I. (1995). Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmon salar* with pancreas disease. *Diseases of aquatic organisms*, 22: 25-32.
 - Nylund. A., Plarre. H., Hodneland K., Devold M., Aspehaug V., Aarseth M., Koren C., Watanabe K (2003) Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. *Diseases of aquatic organisms* 54, 15-27.
 - Olsvik P.A., Lie K.K., Jordal A-E.O., Nilsen T.O. and Hordvik I. (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology* 6, doi:10.1186/147 1-2199-6-21.
 - Ottem K.F. (2005) Expression of Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) structural protein E2 in E.coli. Master i fiskehelse, UiB.
 - Ozden S., Huerre M., Riviere J.P., Coffey L.L., Afonso P.V., Mouly V., Monredon J.D., Roger J.C., El Amrani M., Yvin J.L, Jaffar M.C., Frenikel M.P., Sourisseau M., Schwarts O., Butler-Browne G., Desprès P., Gessain A. and Ceccaldi P.E. (2007)

Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. PLoS One 6, e527.

- Park E. and Griffin D.E. (2009) The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice, *Virology*, doi:10.1016/j.virol.2009.03.031.
- Petterson E., Sandberg M. and Santi N. (2009) Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtherius salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases* 32, 477-479.
- Poppe T., Rimstad E. and Hylleseth B. (1989) Pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the European Association of fish pathologists* 9, 83- 85.
- Rodger H. and Mitchell S. (2007) Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *Journal of fish diseases* 30, 157-167.
- Skotheim S.A. (2009) Co-infection with Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Chinook Salmon Embryo Cells (CHSE-214), Master i fiskehelse, UiB.
- Strauss J.H., and Strauss E.G. (1994). The Alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiological reviews* 58, 491- 562.
- Taksdal, T., Olsen, A.B., Bjerkås, I., Hjortaa M.J., Dannevig, B.H., Graham, D.A. and McLoughlin, M.F. (2007) Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of fish diseases* 30, 545-588.
- Todd D., Jewhurst W.A., Welsh M.D., Borghmans B.J. Weston J.H., Rowley H.M., Mackie D.P. and McLoughlin M.F. (2001) Production and characterization of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Diseases of aquatic organisms* 46, 101-108.
- Villoing, S., Bèarzotti, M., Chilmonczyk, S., Castric, J and Brèmont, M. (2000a) Rainbow Trout Sleeping Disease Virus is an atypical alphavirus. *Journal of virology* 74, 173-183.
- Villoing, S., Castric, J., Jeffroy, J., Le Ven, A., Thiery, R. and Brèmont, M. (2000b) An RT-PCR- based method for the diagnosis of the sleeping disease virus in

- experimentally and naturally infected salmonids. *Diseases of aquatic organisms* 40, 19-72.
- Wahlberg J.M. and Garoff H. (1992) Membrane fusion process of Semliki Forest virus I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *The journal of cell biology* 116, 339-384.
 - Welsh M., Weston J., Borghmans B.J., Mackie D., Rowley H., Nelson R., McLoughlin M. and Todd D. (2000) Biochemical characterization of salmon pancreas disease virus. *Journal of general virology* 81, 813-820.
 - Weston J.H., Welsh M.D., McLoughlin M.F. and Todd D. (1999) Salmon Pancreas Disease Virus, an Alphavirus infecting farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Virology* 256, 188-195
 - Weston J.H., Villoing S., Brèmont M., Castric J., Pfeffer M., Jewhurst V., McLoughlin M., Rødseth O., Christie K.E., Koumans J. and Todd D. (2002) Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *Journal of virology* 76, 6155-6163.
 - Weston J.H., Graham D.A., Branson E., Rowley H.M., Walker I.W., Jewhurst V.A., Jewhurst H.L. and Todd D. (2005) Nucleotide sequence variation in salmonid alphaviruses from outbreaks of salmon pancreas disease and sleeping disease. *Diseases of aquatic organisms* 66, 105-111.
 - Wilkinson D.G. (1999) *In situ* hybridisation – a practical approach, second edition. Oxford university press, New York.

Vedlegg 1

Løsninger og buffere benyttet:

Prehybridiseringsløsning

100 ml 50 % deionisert Formamide

50 ml 20x SSC

4 g 2 % blokkings reagent

0,2 g 0,1 % N-lauroylsarcosine

10 ml 0,5 % SDS

40 ml DEPC H₂O

Low stringency wash buffer (LSWB)

10 ml 20x SSC

10 ml 0,5 % SDS

0,2 g 0,1 % N-lauroylsarcosine

179,8 ml DEPC H₂O

High stringency wash buffer (HSWB)

1 ml 20x SSC

10 ml 0,5 % SDS

0,2 g 0,1 % N-lauroylsarcosine

188,8 ml DEPC H₂O

DIG Buffer

1x Maleatbuffer (pH 7,5)

Blokkeringsbuffer

1 % blokkings reagent (0,5g)

1 x Maleatbuffer (50ml)

Til ISH av cellene også 150µl tween 20

Varmes i varmeskap til blokkings reagent er løst opp.

Fremkallingsbuffer

45 ml 1x Maleatbuffer

5 ml 1x Triz/NaCl (5 ml 1M Triz HCl, 1ml 5M NaCl) pH 9,5

Anti-Digoxigenin AP fortynning

0,3% Tween 20 (75 µl)

1% blocking reagent (25 ml blokkeringsbuffer)

12,5 µl Anti-DIG AP (for at det skal bli fortynnet 1:2000)

Fremkalling dot blot

Fremkallingsbuffer

10 µl NTB (4-Nitro blue tetrazolium chloride) per 10 ml fremkallingsbuffer

37,5µl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) per 10 ml fremkallingsbuffer.

Hybridiseringsløsning til cellekultur 100ml

50 ml 50 % deionisert formamide

25 ml 20x SSC

0,6 mg/µl yeast tRNA

2 g 2% blokkering reagent (blokkeringspulver)

0,05mg/ml Heparin

100µl 0,1% Triton X-100

1x PBS DEPC

100 ml 10x PBS

900 ml dH₂O

1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonate, C₆H₁₀O₅)

0,1 % DEPC H₂O

1000 ml dH₂O

1 ml DEPC

8 % Paraformaldehyd i DEPC vann

100 ml 1x 1x PBS DEPC H₂O

8 g paraformaldehyd (pulverform)

10 % vekstmedium

500 ml Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)
5 ml Hepes Buffer (BioWhittaker™)
5 ml Non- Essential Amino Acid Solution (Sigma®)
5 ml L-glutamin (Sigma®)
50 ml FBS
200 µl Gentamicin sulfate (BioWhittaker®).

2 % vekstmedium

500 ml Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)
5 ml Hepes Buffer (BioWhittaker™)
5 ml Non- Essential Amino Acid Solution (Sigma®)
5 ml L-glutamin (Sigma®)
10 ml FBS
200 µl Gentamicin sulfate (BioWhittaker®).

0 % vekstmedium

500ml Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)
5ml Hepes Buffer (BioWhittaker™)
5ml Non- Essential Amino Acid Solution (Sigma®)
5ml L-glutamin (Sigma®)
200µl Gentamicin sulfate (BioWhittaker®).

PCR

5µl 10x Thermo pol buffer (NEB)
4µl 2,5mM dNTP
nsP-sdvF primer
nsP-sdvR primer
0,3µl Taq DNA polymerase (NEB)
37µl dH₂O
2µl cDNA (50-500ng)

1% agarose gel

0,25 g SeaKem® LA Agarose (Cambrex)

25 ml 0,5x TBE

1 dråpe etidiumbromid.