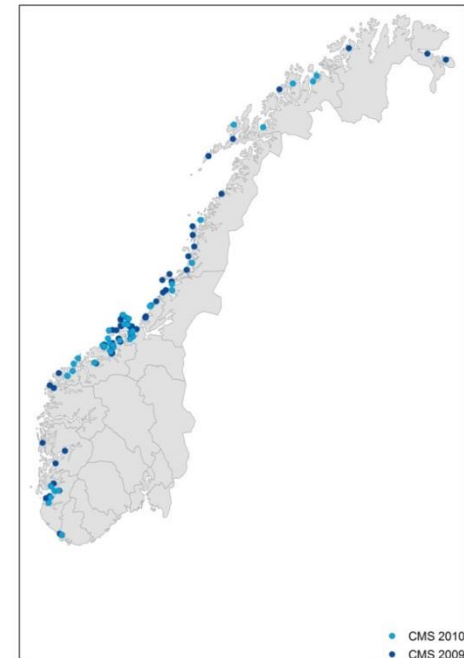


Studier av *in vitro* ekspresjon av virusproteiner hos PMCV

Øyvind Haugland, Aase Mikalsen og Øystein Evensen
Norges veterinærhøgskole

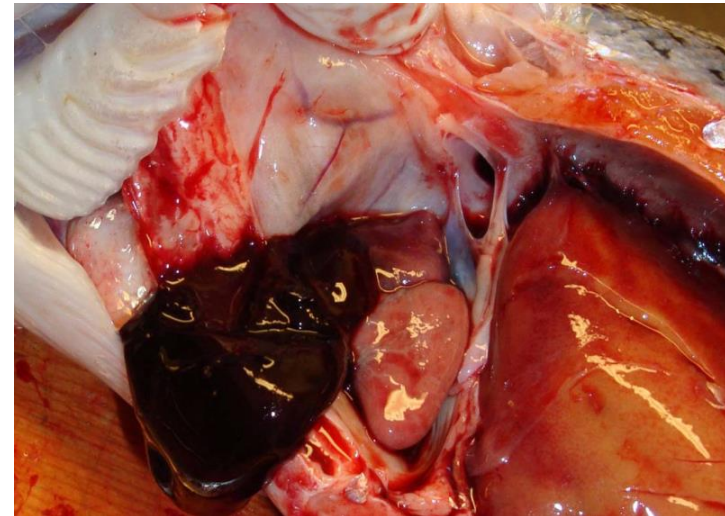
Kardiomyopatisyndrom - CMS - “Hjertesprekk”

- CMS gir en alvorlig kronisk betennelse i hjertet hos laks
- Først diagnostisert i Norge i 1985
 - Sykdommen senere også påvist i Skottland og på Færøyene
 - Mistenkte tilfeller er også rapportert fra Canada
- Langs hele kysten
- Registrerte utbrudd (Fiskehelse rapporten)
 - 89 i 2012
 - 74 i 2011
 - 53 i 2010
 - 76 i 2009
 - 75 i 2008
- Sykdommen er ikke meldepliktig/listeført verken i Norge eller i Verdens dyrehelseorganisasjon OIE
 - Dermed vanskelig å fastslå samlet tap pga CMS
 - Estimater ligger på 50-200 millioner NOK per år

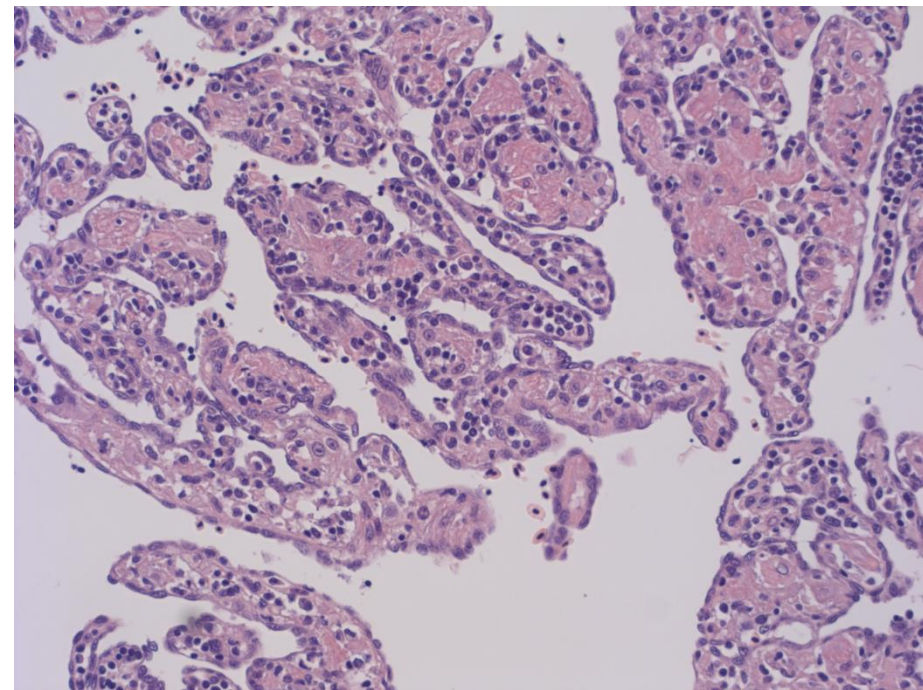
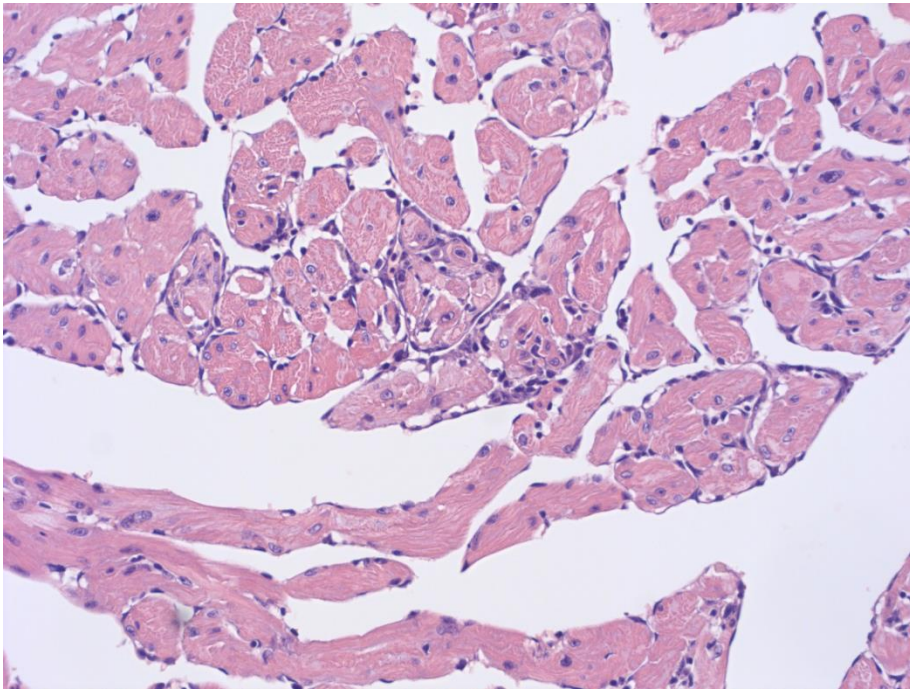


Bakgrunn CMS

- Rammer typisk stor og slaktemoden fisk (dvs i siste del av sjøvannsfasen)
 - De økonomiske tapene kan derfor være betydelige
- Dødeligheten er vanligvis moderat, men kan være forhøyet i lengre perioder
- Obduksjonsfunn ved CMS:
 - Relatert til sirkulasjons-forstyrrelser
 - Et svekket hjerte klarer ikke å gjøre jobben sin.
- Klassiske funn:
 - Forstørret atrium/sinus venosus
 - Sirkulasjonssvikt
 - Ruptur av veggen i hjertets forkammer/blod i hjertesekken



Histologiske forandringer



- Klassiske forandringer ved CMS:
 - Degenerasjon og nekrose av hjertemuskulatur og infiltrasjon av betennelsesceller (lymfocytter og makrofager)
- I forkammer og den indre spongiøse del av hjertekammeret
 - Vanligvis ikke forandringer hjertekammerets ytre kompakte muskellag

Identifisering av Piscint Myokardittvirus - PMCV -kausalt agens for CMS

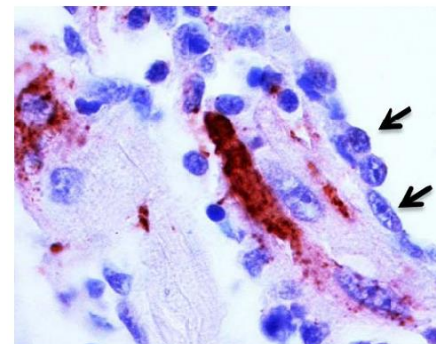
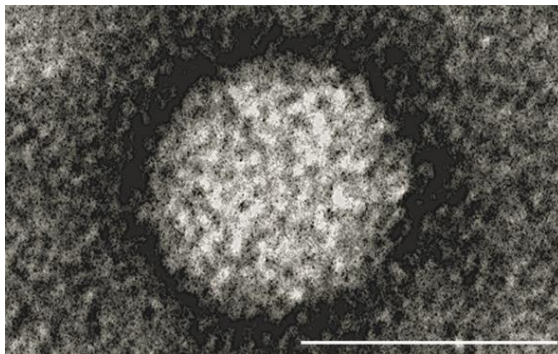
JOURNAL OF VIROLOGY, June 2011, p. 5275–5286
0022-538X/11/\$12.00 doi:10.1128/JVI.02154-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 85, No. 11

Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the *Totiviridae* Family[∇]

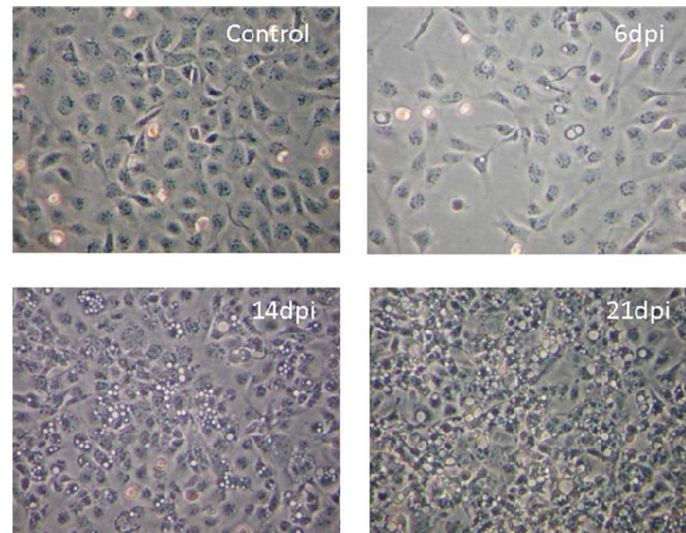
Øyvind Haugland,¹ Aase B. Mikalsen,^{1¶} Pål Nilsen,^{2¶} Karine Lindmo,^{2¶} Beate J. Thu,¹
Trygve M. Eliassen,² Norbert Roos,³ Marit Rode,² and Øystein Evensen^{1*}

Norwegian School of Veterinary Science, Department of Basic Sciences and Aquatic Medicine, P.O. Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway¹; Pharmaq AS, P.O. Box 267, N-0213 Oslo, Norway²; and Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, P.O. Box 1041, Blindern, Oslo, Norway³



Prosjekt no. 190473 and no. 200511 NFR

Utgangspunkt i supernatant fra infisert celle-kultur



Virus

Rester fra døde/nekrotiske celler

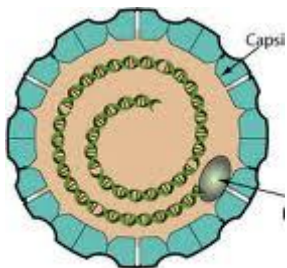
- Celle debris
- DNA
- RNA

Konsentrert ved ultrasentrifugering

Fjernet ved:

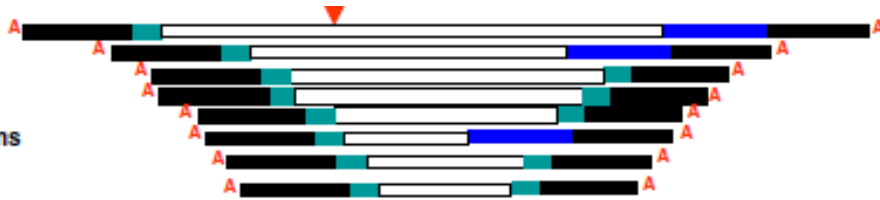
- Sterilfiltrering
- DNase behandling
- RNase behandling

Virusets genom ikke fordøyd (spist opp) av DNase/RNase da det ligger beskyttet av et protein capsid

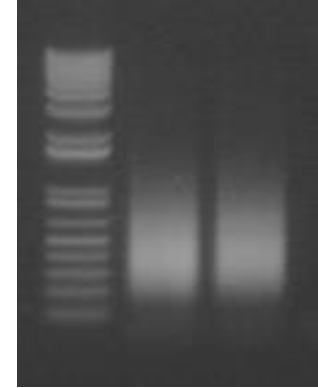


Random primer PCR amplifisering

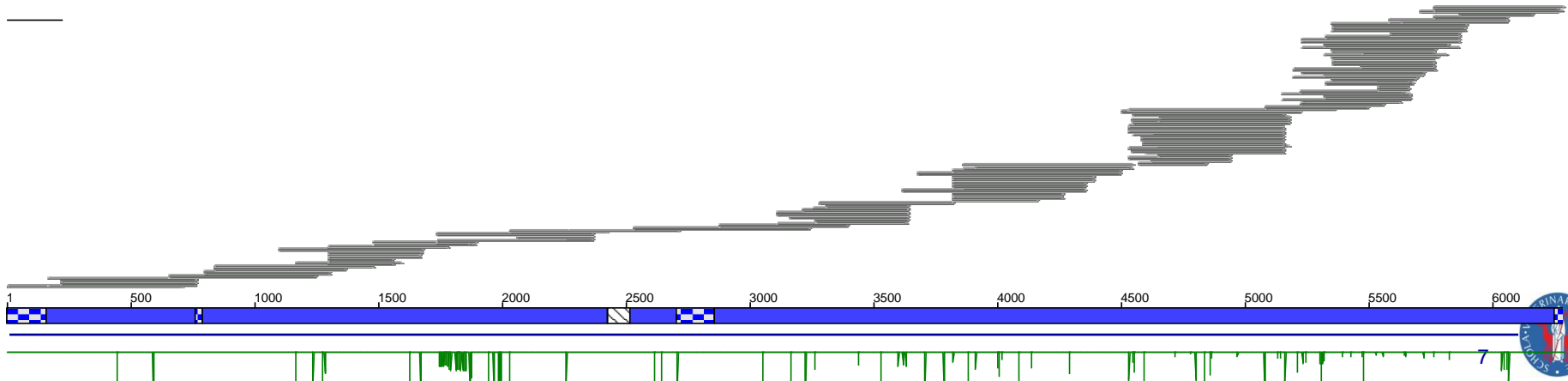
D PCR amplicons



TA Cloning of 500 – 1000 nt amplicons and sequencing



Kloning og sekvensering



Et virus uten nære “slektninger”

BlastX

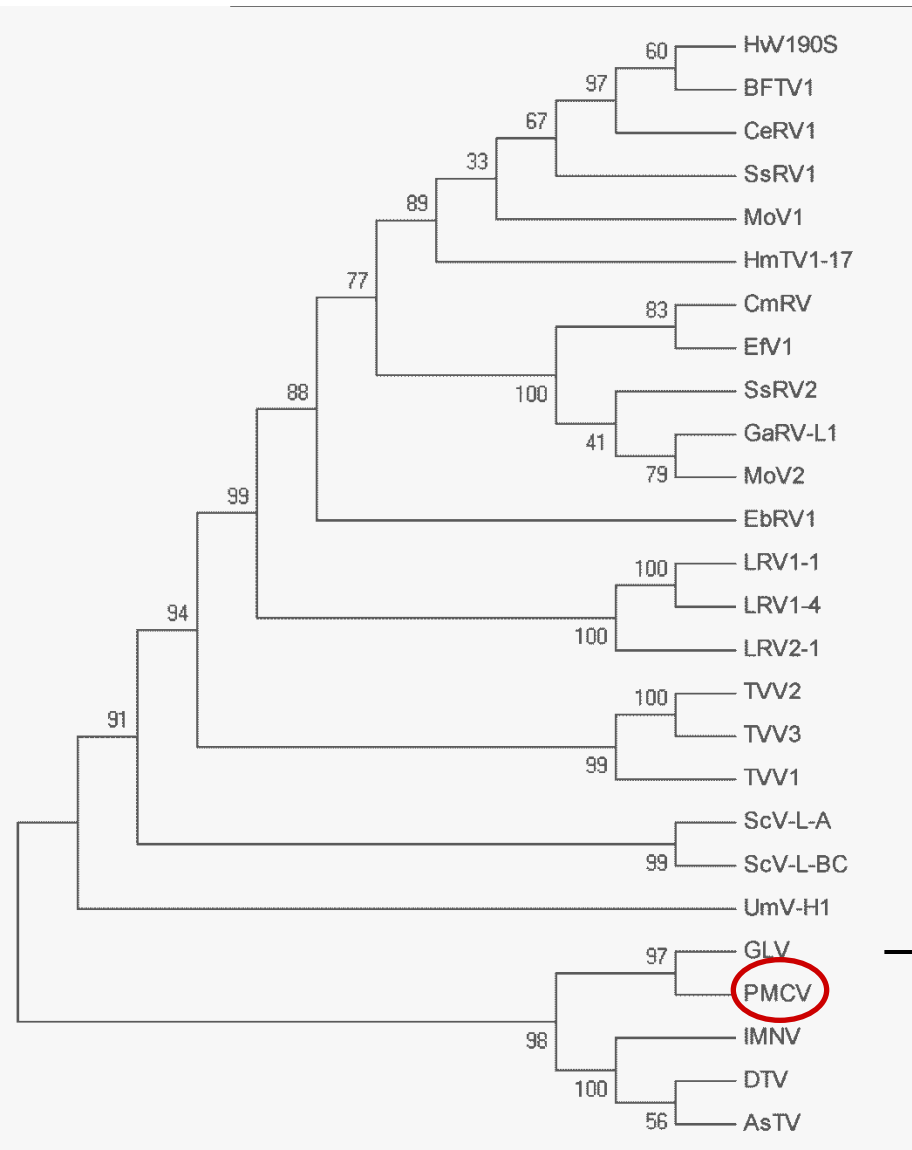
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NP_620070.1 gag-pol fusion protein [Giardia lamblia virus]	49.7	1e-04
gb AAB01579.1 gag-pol fusion protein [Giardia lamblia virus]	49.7	1e-04
gb AAM77694.1 gag-pol fusion protein [Giardia lamblia virus]	49.7	1e-04
gb ABB36743.1 gag-pol fusion protein [Giardia canis virus]	49.7	1e-04
ref YP_001109580.1 RNA-dependent RNA polymerase [Botryotinia...]	40.8	0.050
ref YP_122352.1 putative RNA dependent RNA polymerase [Magna...]	39.3	0.15
gb ABX79995.1 putative RNA-dependent RNA polymerase [Aspergi...]	38.5	0.25
ref NP_047558.1 RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sa...]	38.1	0.33
ref YP_001649206.1 RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe...]	37.4	0.56
ref NP_041191.1 RNA dependent RNA polymerase [Leishmania RNA...]	35.8	1.6
ref YP_094312.1 hypothetical protein lpg0258 [Legionella pne...]	35.0	2.8
ref YP_001249676.1 hypothetical protein LPC_0335 [Legionella...]	34.7	3.6

-Giardia lamblia virus
-Botryotinia fuckeliana totivirus
-Sphaeropsis sapinea RNA virus 1
-Leishmania RNA virus
-Black raspberry cryptic virus

- Gav svært svake treff mot heller «rare» virus
 - Kun BLAST-treff i Polymerase-delen av genomet (RdRp)
 - Ellers svært ulikt alle andre kjente virus
- Hva er «totivirus»??
 - Som utgangspunkt er dette virus som persistent infiserer sopp og protozoer
- Hva gjør PMCV i denne familien??



Fylogenetisk analyse av PMCV viser slektskap med Giardiavirus (GLV) i familien *Totiviridae*



Infiserer:

Victorivirus

Sopp



Leishmanivirus

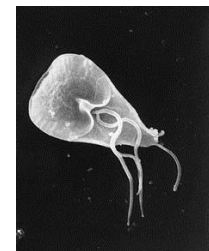
Protozoer

Trichomonasvirus

Protozoer

Totivirus

Sopp



Giardiavirus

Protozoer

Artivirus

Nye Totiviridae-lignende virus!

Totiviridae - ekspanderende familie av dsRNA virus

- «Nye» og mer komplekse *Totiviridae*-lignende virus er oppdaget
 - Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus (IMNV) - Poulos et al. 2006
 - *Armigeres subalbatus* totivirus - AsTV (Mosquito) - Zhai et al. 2010
 - *Drosophila melanogaster* totivirus - DTV (Bananflue) - Wu et al. 2010
 - *Omono river virus* - OMRV (*Culex* - Mosquito)

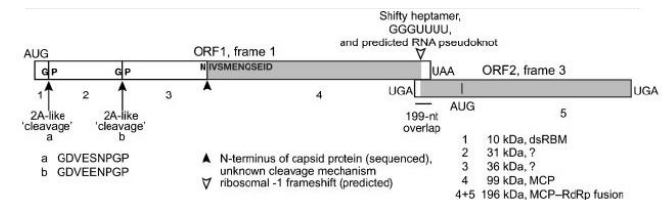
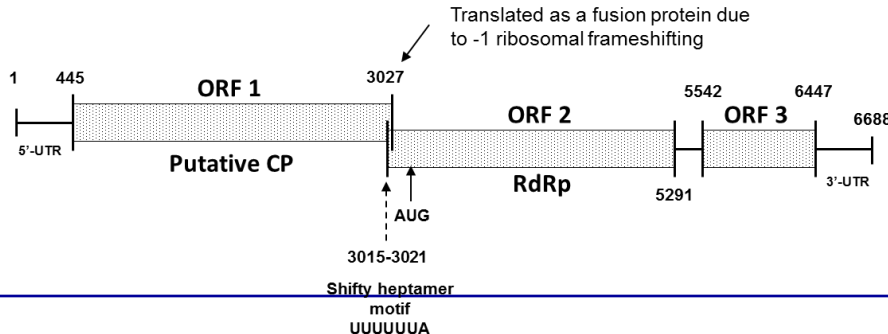


Alle fra artropoder:
Foreslått nytt genus: Artivirus
- Avledet fra Arthropod totivirus

- Piscine myocarditis virus (PMCV)
- Forskjell i genomstruktur mellom PMCV og de «nye» Artivirus

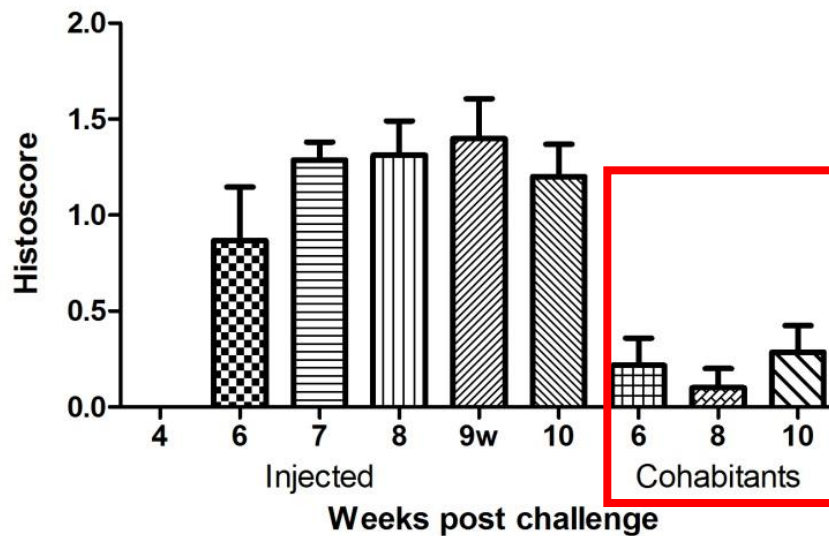


Det første *Totiviridae* som infiserer et virveldyr

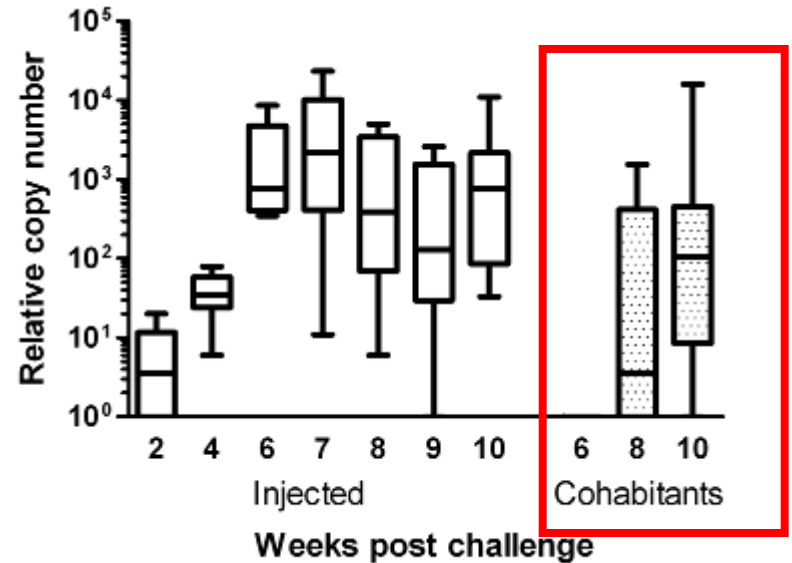


Eksperimentelle smitteforsøk viser at PMCV smitter horisontalt

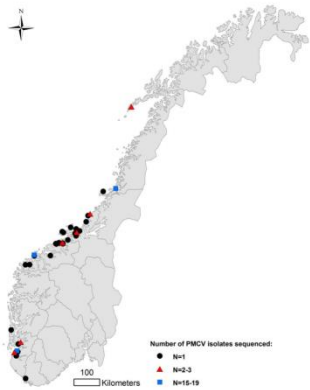
Histoscore



Viral load by qRT-PCR



Horizontal transmission

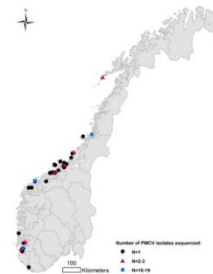


Sekvensvariasjon i isolater av piscint myokarditt virus (PMCV) langs norskekysten

- Jannicke Wiik-Nielsen¹, Marta Alarcón¹, Birgitte Fineid¹, Marit Rode² and Øyvind Haugland³
 - ¹Norwegian Veterinary Institute
 - ²PHARMAQ AS
 - ³Norwegian School of Veterinary Science

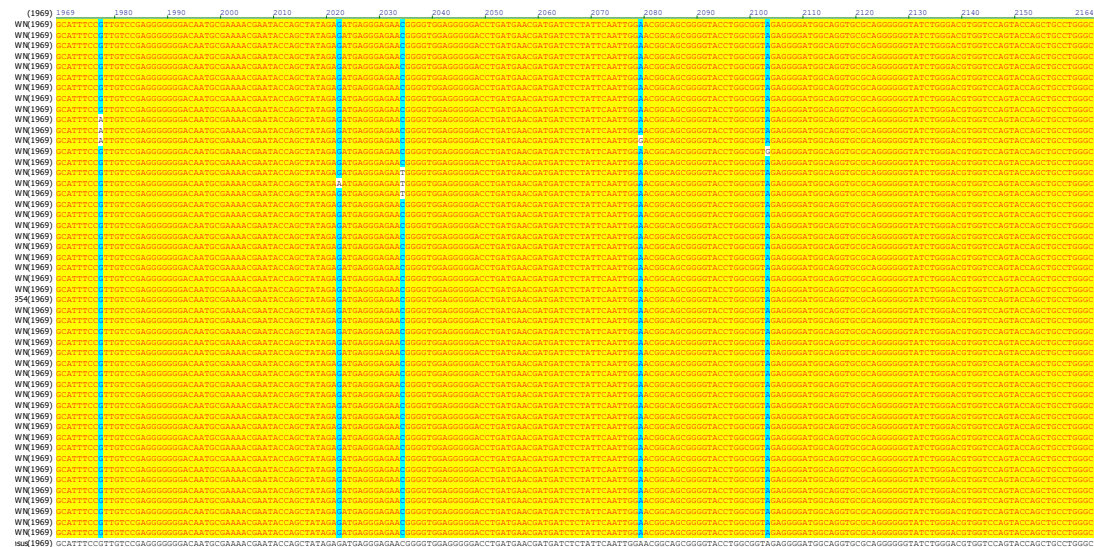


Liten variasjon i de norske virusisolatene



- Virusstammer fra totalt 36 forskjellige lokaliteter spredt geografisk ble sekvensert
- Resultatene viste at norske PMCV stammer viser lite variasjon.
- Nyttig for diagnostiske metoder
 - Universelle primere for deteksjon av PMCV kan brukes
 - Bra for vaksineutvikling

ORF1



Viktig for diagnostikk!

Horizontal overføring viktigst for CMS-smitte

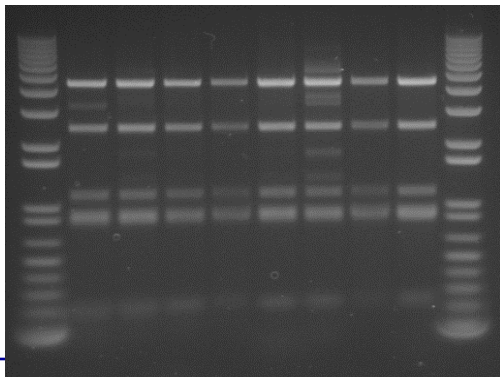
- **Fylogenetisk analyse viste geografisk “clustering” av virusstammer**
 - horisontal smitteveg i sjø ser ut til å være viktig for spredning av CMS
- **Kunne ikke påvise sammenheng mellom nært beslektede virusisolater og opprinnelsen av egg (stamfisk), smoltprodusenter, forprodusenter og oppdrettsselskaper**
- **Er spesielle varianter av viruset mer patogene enn andre?**
 - Vanskelig å skaffe gode data basert på dødelighetstall for anlegg
 - Trenger eksperimentelle studier under kontrollerte forhold



Ta i bruk revers genetikk som verktøy

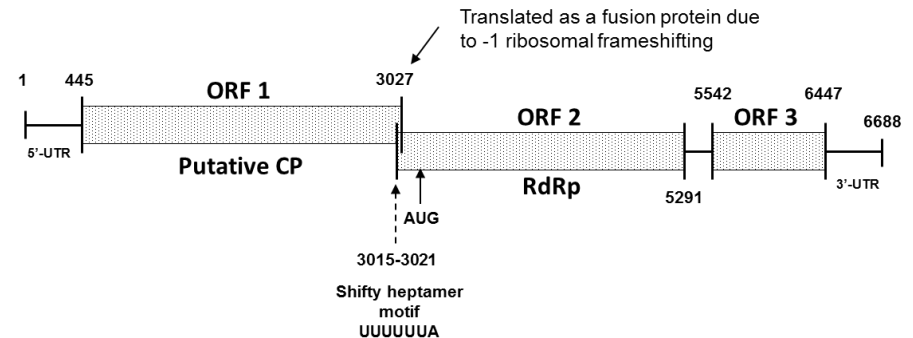
Revers genetikk - kopi av virusets genom klonet inn i en ekspresjonsvektor (plasmid)

- For produksjon av rekombinant virus
- Flere fordeler
 - Kan lage virus fra definerte sekvenser, med muligheter for manipulering
 - Omgå problemet med dyrking
- Erfaring - ustabil?
 - Sekvensen er muligens ikke helt stabil
 - Viktig å sjekke regelmessig
 - Har vært utfordrende både å lage og jobbe med

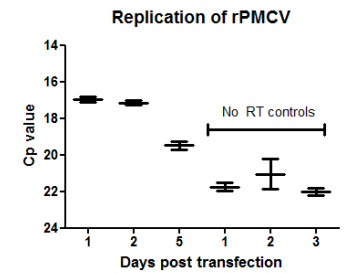


T7 promoter
For *in vitro* T7 transcription

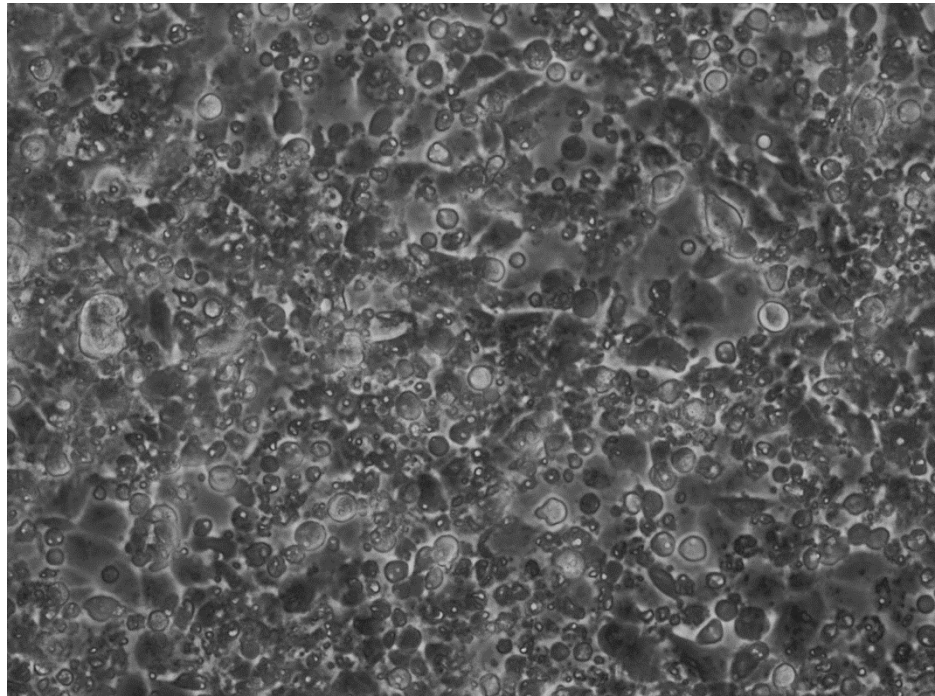
CMV promoter
for expression of
transgenes in mammalian
cells



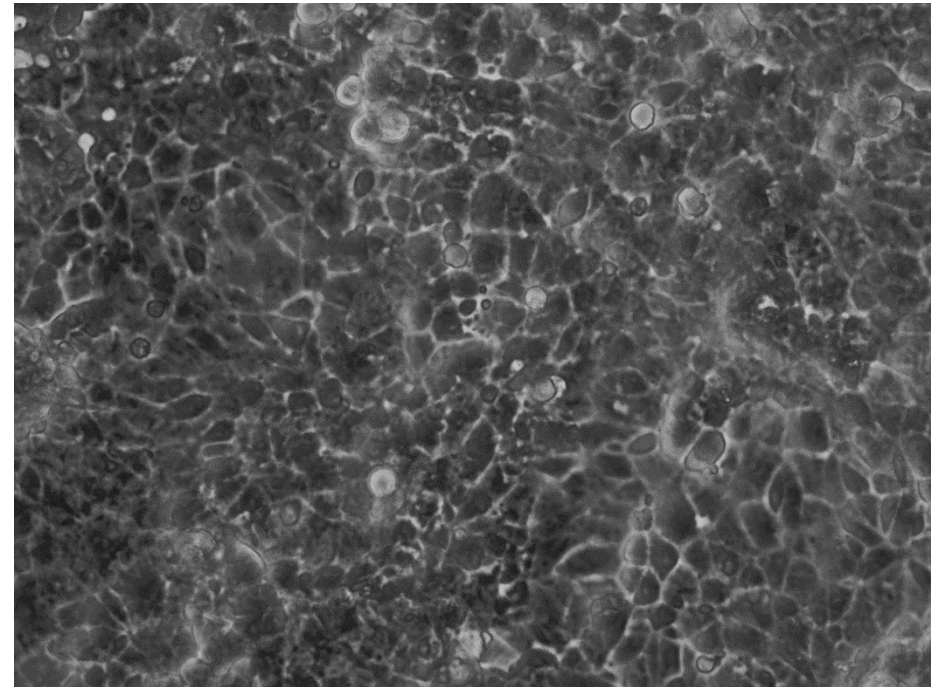
Transfeksjon av CHH-1 celler



PMCV i vektor



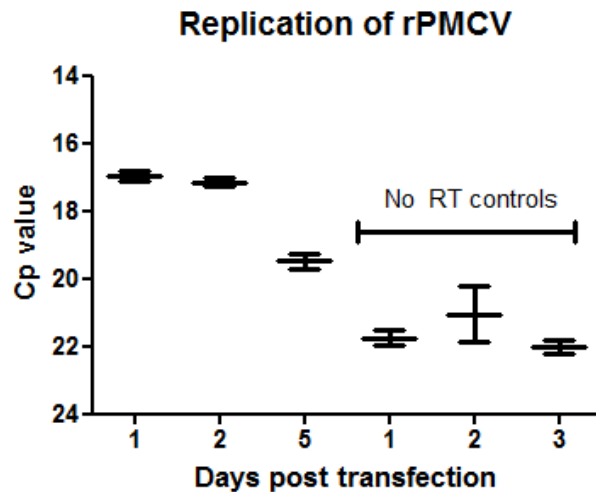
Kun vektor (Kontroll)



- Forskjeller - men usikker på betydning
 - Ikke CPE ved passering

Transfecting CHH-1 cells

-qPCR data



- Plasmid blir uttrykt
 - Opp til dag 5 (minst)
- DNA kontaminering et stort problem
 - Selv ved «on-column DNase behandling»!!!
 - Ikke deteksjon vha. immunostaining av protein

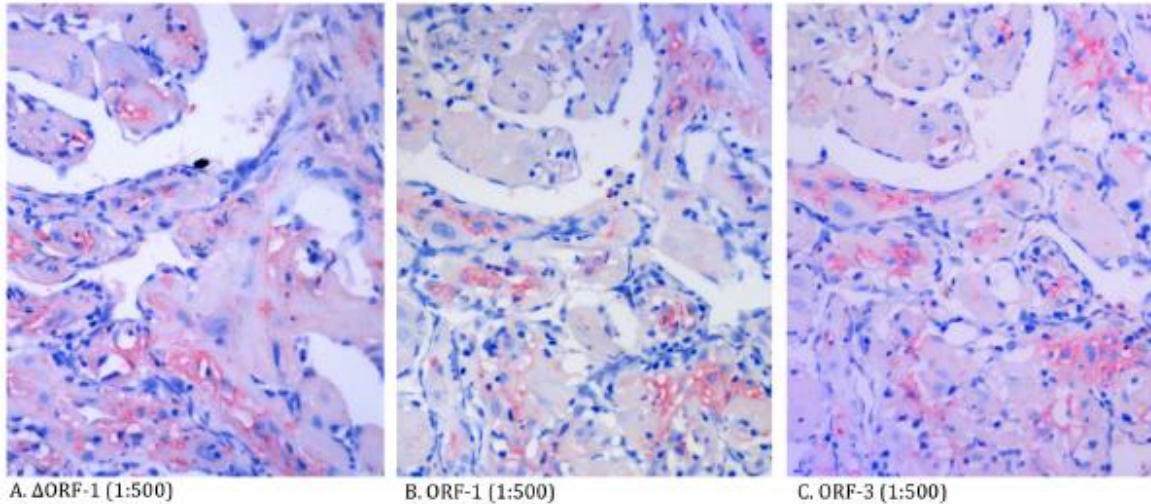


Spørsmål om sensitivitet??



Nytt og bedre antistoff til IFAT tilgjengelig
-Monoklonalt ORF1

Polyclonal antibodies against recombinant proteins -produced by PHARMAQ



- **Specific staining for virus within CMS lesions obtained**

- Suboptimal for use in diagnostics with regard to sensitivity and specificity
- Different outcomes on different samples- why?

- **Non-specific staining**

- Connective tissues
- Transition between spongy and compact myocardium

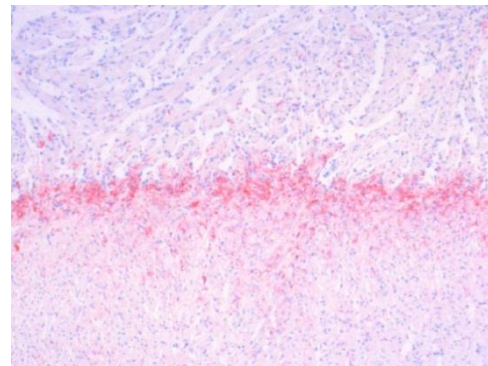
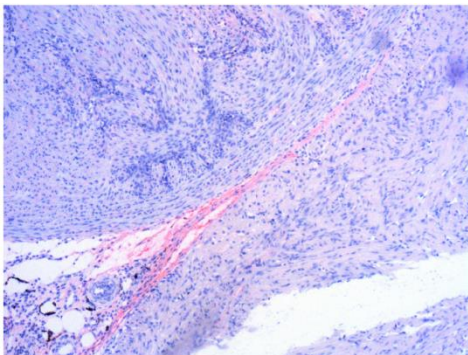


Figure 24: Staining of connective tissue in negative control section (ΔORF-1, 1:500).