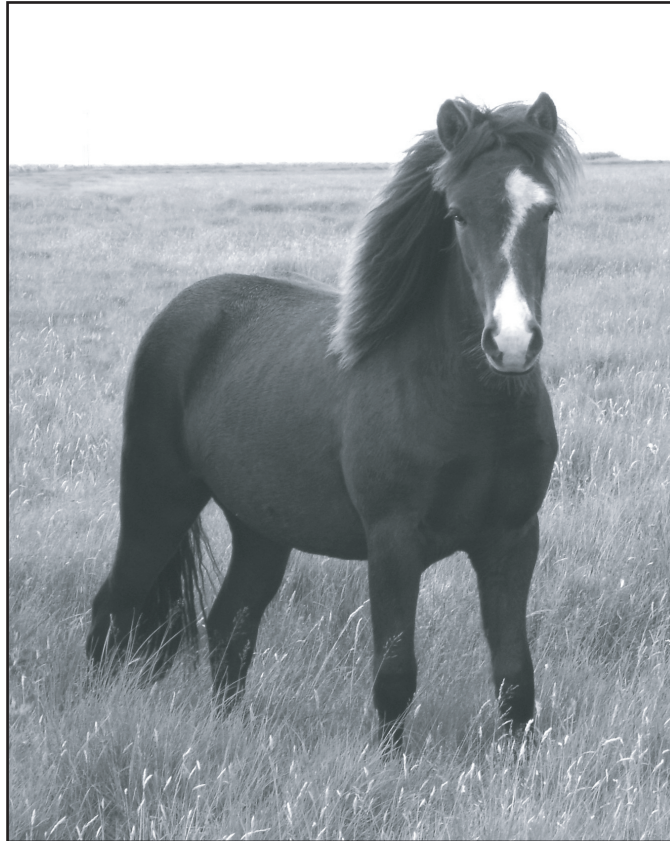


Vísindadagur á Keldum

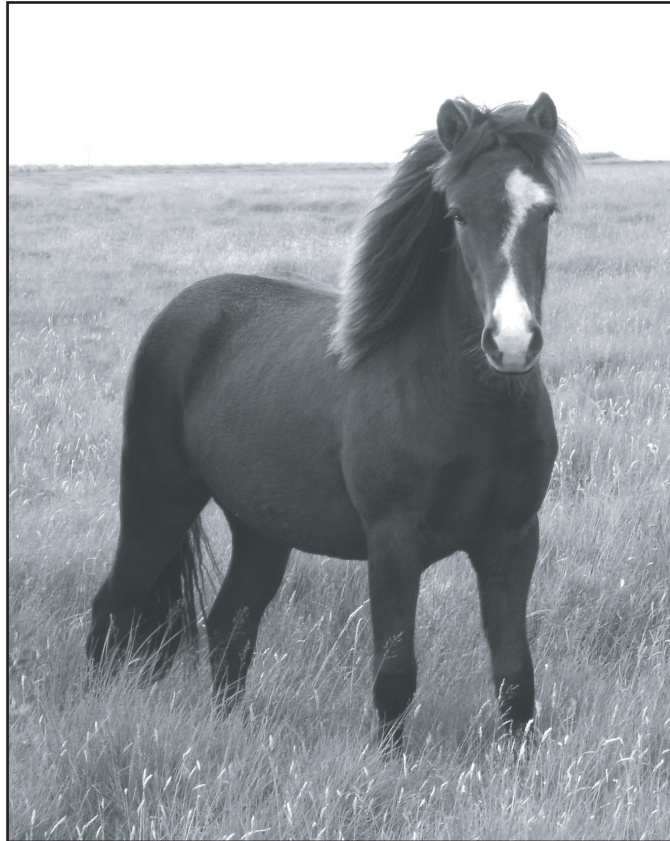
28. apríl 2006.



Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Vísindadagur á Keldum

28. apríl 2006.



Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

GLITNIR



Vísindadagur á Keldum 28. apríl 2006

Inngangur

Vísindadagur er nú haldinn á Keldum í þriðja sinn en þeir fyrri voru haldnir árin 2002 og 2004. Um er að ræða eins dags ráðstefnu sem er opin öllum áhugasömum.

Fyrri hluti dagsins er tileinkaður rannsóknum á sumarexemi í hrossum og af því tilefni voru fengnir tveir erlendir gestafyrirlesarar. Sumarexem er ofnæmi gegn prótínnum sem berast í hross við bit mýflugna af ættkvíslinni *Culicoides*, en tegundir af þeirri ættkvísl lifa ekki á Íslandi. Hestarnir fá því ekki ofnæmið hérlendis en það er algengt vandamál í íslenskum hestum sem fluttir hafa verið úr landi. Undanfarin ár hafa farið fram rannsóknir á sumarexemi á Keldum í samstarfi við Háskólann í Bern í Sviss. Markmið rannsókna er að þróa bóluefni eða aðra ónæmismeðferð gegn ofnæminu. Kynntar verða niðurstöður úr samstarfsverkefninu. Dr. Eliane Marti frá dýrasjúkdómadeild Háskólans í Bern mun flytja yfirlitsfyrirlestur og vísindamenn frá Keldum styttri erindi. Fjallað verður um erfðir og umhverfisáhrif, Dr. Sofia Mikko frá Landbúnaðarháskólanum í Uppsölum í Svíþjóð mun kynna nýtt rannsóknarverkefni um erfðapætti í sumarexemi. Þar sem sýkingarsaga og reynsla ónæmiskerfisins skiptir miklu máli við þróun ofnæmis lýkur fyrri hluta dagsins með erindum um veiru- og sníkjudýrasýkingar í hestum á Íslandi.

Seinni hluta dags eru fyrirlestrar um ýmis verkefni í príon-, veiru-, bakteríu- og sníkjudýrafræðum. Einnig er veggspjaldasýning þar sem kynnt verða fjölbreytileg verkefni. Þeir sem segja frá rannsóknaniðurstöðum og túlkunum á þeim eru margir hverjir með áratuga reynslu af vísindastarfi. Auk þess eru yngri vísindamenn, s.s. rannsóknánámsnemendur, með kynningu á verkefnum sínum en hlutur þeirra í starfi Tilraunastöðvarinnar hefur farið vaxandi á sl. árum.

Ljóst er af dagskrá að margt hefur áunnist og kynntar verða rannsóknir sem eru í fremstu röð. Einkum er um að ræða íslenskar rannsóknir á dýrasjúkdómum, sem margar hverjar hafa hlotið alþjóðlegar viðurkenningar. Vísindadagurinn er mikilvægur liður í að kynna viðkomandi rannsóknir fyrir ráðamönnum þjóðarinnar, háskólasamfélaginu, dýralæknum og íslensku samfélagi almennt. Einnig er dagurinn mikilvægur þáttur í upplýsingstreymi innan Tilraunastöðvarinnar til að samráð verði sem best.

Ég þakka Guðna Ágústssyni landbúnaðarráðherra fyrir stuðning við vísindadaginn. Í vísindanefndinni eru Eggert Gunnarsson, Sigurbjörg Þorsteinsdóttir og Sigurður H. Richter og vil ég þakka þeim fyrir að skipuleggja ráðstefnuna, sem og Helga S. Helgasyni framkvæmdastjóra sem með þeim starfaði. Einnig vil ég þakka þeim sem studdu vísindadaginn fjárhagslega.

Sigurður Ingvarsson, forstöðumaður

Mynd á forsíðu: Klökkur Glámsson frá Melaleiti

Tími		Dagskrá Fyrirlesari	Titill erindis
8:45-9:00		Guðni Ágústsson landbúnaðarráðherra	Ráðstefna sett
9:00-9:45	Yfirlit	Eliane Marti	Summer eczema in the Icelandic horse: an excellent model to study the natural course of allergy
9:45-10:00	E-1	Sigurbjörg Þorsteinsdóttir	Possibilities of preventing summer eczema by focusing the immune response of horses
10:00-10:15	E-2	Guðbjörg Ólafsdóttir	Development of expression vectors for focusing the immune response of horses
10:15-10:45		Kaffi og veggspjaldasýning	
10:45-11:00	E-3	Þórunn Sóley Björnsdóttir	Expression and purification of proteins from <i>Culicoides</i> spp. as potential allergens in summer eczema
11:00-11:15	E-4	Sigríður Björnsdóttir	Summer eczema in Icelandic horses. Effect of environmental and intrinsic factors
11:15-11:30	E-5	Sofía Mikko	Exploring the genetics regulating susceptibility to equine allergic eczema
11:30-11:45	E-6	Vilhjálmur Svansson	Viral infections in horses in Iceland
11:45-12:00	E-7	Matthías Eydal	Internal parasites of horses in Iceland
12:00-13:00		Matur og veggspjaldasýning	
13:00-13:15	E-8	Bergljót Magnadóttir	Tilraunir með ónæmisörvun þriggja árganga þorsklirfa
13:15-13:30	E-9	Sigríður Guðmundsdóttir	Leitað að bætibakteríum til að bæta afkomu þorsks á fyrstu vikunum eftir klak
13:30-13:45	E-10	Johanna Hentschke	Site directed mutagenesis of the AsaP1 exotoxin of <i>Aeromonas salmonicida</i>
13:45-14:00	E-11	Sigurður H. Richter	Sníkjudýr urriða (<i>Salmo trutta</i>) og bleikju (<i>Salvelinus alpinus</i>) í Elliðavatni og Hafravatni
14:00-14:15	E-12	Karl Skírnisson	Um hringorma í fiski og sýkingar af þeirra völdum í mönnum á Íslandi
14:15-14:45		Kaffi og veggspjaldasýning	
14:45-15:00	E-13	Katrín Ólafsdóttir	Smíði á flúrljómandi visnuveirufurjum
15:00-15:15	E-14	Valgerður Andrésdóttir	Lentiveiruhindrar
15:15-15:30	E-15	Stefanía Þorgeirsdóttir	Notkun elisuprófs til skimunar fyrir riðu í kindum
15:30-15:35		Sigurður Ingvarsson	Ráðstefnu slitið
15:35-17:00			Léttar veitingar

Erindi

8:45-9:00

Ráðstefna sett

Guðni Ágústsson landbúnaðarráðherra

9:00-9:45 **Yfirlitserindi.**

Summer eczema in the Icelandic horse: an excellent model to study the natural course of allergy (Sumarexem í íslenskum hestum; gott líkan til að rannsaka framvindu ofnæmis)

Eliane Marti

9:45-10:00 **E-1**

Possibilities of preventing summer eczema by focusing the immune response of horses (Möguleikar á að verjast sumarexemi með því að stýra ónæmissvari í hestum)

Sigurbjörg Þorsteinsdóttir, Vilhjálmur Svansson, Guðbjörg Ólafsdóttir, Mieke Roelse, Helga Árnadóttir and Eliane Marti

10:00-10:15 **E-2**

Development of expression vectors for focusing the immune response of horses

(Þróun á tjáningarferjum til að stýra ónæmissvari í hestum)

Guðbjörg Ólafsdóttir, Vilhjálmur Svansson, Eliane Marti and Sigurbjörg Þorsteinsdóttir

10:15-10:45

Kaffi og veggspjaldasýning

10:45-11:00 **E-3**

Expression and purification of proteins from *Culicoides spp.* as potential allergens in summer eczema (Tjáning og hreinsun á ofnæmisvökum sumarexems)

Þórunn Sóley Björnsdóttir, Vilhjálmur Svansson, Guðbjörg Ólafsdóttir, Lisa Harwood, Eliane Marti and Sigurbjörg Þorsteinsdóttir

11:00-11:15 **E-4**

Summer eczema in Icelandic horses. Effect of environmental and intrinsic factors

(Áhrif erfða og umhverfis á sumarexem í íslenska hestinum)

Sigríður Björnsdóttir, Jakobína Sigvaldadóttir, Mia Hellsten and Lena Johanna Reiher

11:15-11:30 **E-5**

Exploring the genetics regulating susceptibility to equine allergic eczema

(Athugun á erfðapáttum sumarexems)

Katja Grandinson, Louise Lindberg, Susanne Eriksson, Hans Broström, Rebecka Frey, Matthew Binns, Marie Sundquist, Sofia Mikko and Gabriella Lindgren

11:30-11:45 **E-6**

Viral infections in horses in Iceland (Veirusýkingar í hestum á Íslandi)

Vilhjálmur Svansson

11:45-12:00 **E-7**

Internal parasites of horses in Iceland (Innri sníkjudýr í hrossum á Íslandi)

Matthías Eydal

12:00-13:00

Matur og veggspjaldasýning

13:00-13:15 E-8

Tilraunir með ónæmisörvun þriggja árganga þorsklirfa

Bergljót Magnadóttir, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Sigrún Lange, Agnar Steinarsson, Matthías Oddgeirsson, Slavko Bambir og Sigríður Guðmundsdóttir

13:15-13:30 E-9

Leitað að bætibakteríum til að bæta afkomu þorsks á fyrstu vikunum eftir klak

Sigríður Guðmundsdóttir, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir, Agnar Steinarsson, Berglind Gísladóttir, Bergljót Magnadóttir, Maja Herold Pedersen, Birgitte Budde og Hélène Liette Lauzon

13:30-13:45 E-10

Site directed mutagenesis of the AsaP1 exotoxin of *Aeromonas salmonicida*

Johanna Hentschke, Ólafur H. Friðjónson, Arnþór Ævarsson, Guðmundur Ó. Hreggviðsson, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

13:45-14:00 E-11

Sníkjudýr urriða (*Salmo trutta*) og bleikju (*Salvelinus alpinus*) í Elliðavatni og Hafravatni

Sigurður H. Richter og Árni Kristmundsson

14:00-14:15 E-12

Um hringorma í fiski og sýkingar af þeirra völdum í mönnum á Íslandi

Karl Skírnisson

14:15-14:45

Kaffi og veggspjaldasýning

14:45-15:00 E-13

Smíði á flúrljómandi visnuveirufurjum

Katrín Ólafsdóttir, Sigríður Matthíasdóttir og Valgerður Andrésdóttir

15:00-15:15 E-14

Lentiveiruhindrar

Valgerður Andrésdóttir, Stefán Ragnar Jónsson og Reuben S. Harris

15:15-15:30 E-15

Notkun elísuprófs til skimunar fyrir riðu í kindum.

Stefanía Þorgeirsdóttir og Jóna Aðalheiður Aðólfssdóttir.

15:30-15:35

Ráðstefnu slitið

Sigurður Ingvarsson

15:35-17:00

Léttar veitingar

Veggspjöld

V-1

Tjáning á magnþættinum C3 í þroskunarferli lúðu (*Hippoglossus hippoglossus* L.)
Sigrún Lange, Alister W. Dodds, Slavko H. Bambir, Ian Bricknell, Tim Bowden, Sigríður Guðmundsdóttir, Sigrún Espelid og Bergljót Magnadóttir

V-2

Tjáning á magnþættinum C3 og apolipoprotein A I í þroskunarferli þorsks (*Gadus morhua* L.) – hugsanlegt hlutverk í þroskun og jafnvægisstýringu?
Sigrún Lange, Alister W. Dodds, Sigríður Guðmundsdóttir, Slavko H. Bambir og Bergljót Magnadóttir

V-3

Óvirkjun á AsaP1 úteitri *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* og áhrif þess á eiturvirkni bakteríuseytis í laxi og þorski
Helga Árnadóttir, Sarah Burr, Valgerður Andrésdóttir, Joachim Frey og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

V-4

Samanburður á sýkingarmætti *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* og AsaP1 neikvæðs stökkbrigðis bakteríunnar í laxi og þorski
Helga Árnadóttir, Sarah Burr, Valgerður Andrésdóttir, Joachim Frey, og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹

V-5

Meinafræðilegur samanburður í laxi, sýktum með *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* og AsaP1 neikvæðu stökkbrigði bakteríunnar
Helga Árnadóttir, Sarah Burr, Valgerður Andrésdóttir, Joachim Frey og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

V-6

Einangrun og lýsing á peptíðasa úr seyti bakteríunnar *Moritella viscosa*
Bryndís Björnsdóttir Valgerður Andrésdóttir og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

V-7

Sjúkdómsbreytingar í laxi og sandhverfu af völdum seytis bakteríunnar *Moritella viscosa*
Bryndís Björnsdóttir, Slavko H. Bambir, Sigríður Guðmundsdóttir og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

V-8

***Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* sýkingar í íslenskum eldisþorski (*Gadus morhua*)**
Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Matthías Eydal og Slavko H. Bambir

V-9

Óþekkt hnísildýr í íslenskri hörpuskel (*Chlamys islandica*) - hugsanleg orsök affalla í stofninum
Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Slavko H. Bambir og Matthías Eydal

V-10**Greining *Campylobacter* smits í saur alifugla – samanburður á PCR tækni og hefðbundnum ræktunaraðferðum**

Sigríður Hjartardóttir, Vala Friðriksdóttir, Signý Bjarnadóttir, Guðbjörg Jónsdóttir, Katrín Ástráðsdóttir, Eggert Gunnarsson og Jarle Reiersen

V-11**Faraldsfræði *Campylobacter* smits í kjúklingum – getur hænan smitað eggjö/ungann?**

Vala Friðriksdóttir, Eggert Gunnarsson, Guðbjörg Jónsdóttir, Katrín Ástráðsdóttir, Kolbrún Birgisdóttir, Signý Bjarnadóttir, Sigríður Hjartardóttir, Jarle Reiersen, Ruff Lowman, Kelli Hielt, Ken Callicott, Norman J. Stern og “Campy-on-Ice” hópurinn

V-12**Eftirlit með *Campylobacter* sýkingum í mönnum og alifuglum á Íslandi**

Jarle Reiersen, Hjördís Harðardóttir, Eggert Gunnarsson, Vala Friðriksdóttir, Guðrún Sigmundsdóttir og Karl G. Kristinsson

V-13**Sýklalyfjaónæmi í *Salmonella* spp. úr kjúklingum og svínum á Íslandi árin 2001-2005**

Þórunn R. Þorsteinsdóttir, Karl G. Kristinsson og Eggert Gunnarsson

V-14**Járn og járn/mangan-hlutfall í heyi á íslenskum sauðfjárbúum: Tengsl við riðu**

Kristín Björg Guðmundsdóttir, Sigurður Sigurðarson, Jakob Kristinsson, Tryggvi Eiríksson og Þorkell Jóhannesson

V-15**Selen í hrútum: Metið með ákvörðunum á GPX-virkni í blóði**

Sigurður Sigurðarson, Kristín Björg Guðmundsdóttir, Jakob Kristinsson, Þorkell Jóhannesson og Tryggvi Eiríksson

V-16**Stökkbreytingagreining á LIMD1 og LF í æxlum**

Þórgunnur Eyfjörð Pétursdóttir, Unnur Þorsteinsdóttir, Stefan Imreh, Valgarður Egilsson, Jóhannes Björnsson, Sigurður Ingvarsson

V-17**Taugasækni mæði-visnuveirunnar**

Þórður Óskarsson, Hulda S. Hreggviðsdóttir, Ólafur S. Andrússon, Sigurður Ingvarsson og Valgerður Andrúsdóttir

V-18**Stökkbreytinggreining Vif próteins mæði-visnuveiru**

Sigríður Rut Franzdóttir, Sigríður Matthíasdóttir, Ólafur S. Andrússon og Valgerður Andrúsdóttir

V-19**Notkun RNA þöggunar til að slá á tjáningu cystatin-c og PrP^C í frumuræktum**

Birkir Þór Bragason, Stefania Þorgeirsdóttir og Ástríður Pálsdóttir

YFIRLITSERINDI

**Summer eczema in the Icelandic horse:
An excellent model to study the natural course of allergy**
(Sumarexem í íslenskum hestum; gott líkan til að rannsaka framvindu ofnæmis)

Eliane Marti

*Division of Clinical Research, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse
Faculty, University of Berne, Switzerland*

Summer eczema (SE) is an IgE-mediated allergic dermatitis caused by bites of *Culicoides* and possibly also *Simulium* spp. SE does not occur in Iceland, due to the lack of *Culicoides* spp. The prevalence of SE is very high in Icelandic horses born in Iceland and imported to continental Europe (called 1st generation Icelandic horses). Conversely, the prevalence of SE in Icelandic horses born in Europe (called 2nd generation Icelandic horses), where *Culicoides* spp. are present, is much lower. Thus, additionally to genetic factors, other factors such as being born in an environment where the causative allergens are present or absent, plays a crucial role for susceptibility or resistance to SE. Specific immunotherapy (SIT) has been proposed as a potential cure for SE but unsatisfactory results have been found in SIT studies, probably due to the crude nature of the whole body extracts used.

The aims of the present project are (i) to identify and clone the specific allergens causing SE and produce them as recombinant allergens in order to develop an effective SIT for SE and (ii) to characterize and compare the immune response of 1st and 2nd generation Icelandic horses

The search of the allergens causing SE is performed both at the protein levels and through screening of phage display libraries from salivary glands of *S. vittatum* and *C. nubeculosus*.

The immune response was studied in SE-affected and healthy 1st and 2nd generation Icelandic horses. Furthermore, 100 horses were followed and blood samples taken before their export from Iceland and over a period of three years following import into Switzerland. Total serum IgE levels were measured¹, IgE and IgG subclass responses to proteins of *C. nubeculosus* salivary gland extract (SGE) determined², and an *in vitro* sulfidoleukotriene release assay with *C. nubeculosus* and *S. vittatum* whole body extract was performed³. Furthermore, we determined whether PBMC of healthy and diseased 1st and 2nd generation horses stimulated *in vitro* with allergen extract or polyclonally show a bias towards a Th1 or Th2 reaction. Levels of the T regulatory cytokine IL-10 were also determined⁴.

Immunoblot analysis with sera of SE-affected horses indicates that *C. nubeculosus* SGE contains at least 10 IgE-binding protein bands with MW between 75 and 12 kDa². Screening of the *S. vittatum* phage display library has allowed to isolate and clone seven IgE-binding proteins, which have been expressed in *E. coli* and purified. We are presently testing whether these recombinant proteins are relevant allergens for SE.

The findings of the different immunological studies indicate that, even though *S. vittatum* are present in Iceland and seem to contain some allergens for SE, and horses living in Iceland have high levels of total serum IgE, they do not seem to be sensitised against *S. vittatum* and/or *C. nubeculosus* allergens. After importation into Europe and thus exposure to bites of *Culicoides* and *Simulium* spp., they show an immune response which differs from that of horses born in Europe: compared to horses born in Europe their immune

response is Th2-biased, both after antigen-unspecific (i.e. polyclonal) and specific (*C. nubeculosus* extract) stimulation. Presumably as a result of this Th2-biased immune response, IgE-mediated reactions against *Culicoides* allergens are more frequent and stronger than in horses born in Europe. We hypothesize that this may be due to a lower frequency or activity of T regulatory cells as PBMC from 1st generation Icelandic horses produce lower levels of IL-10 than 2nd generation Icelandic horses. Further studies are needed to understand which regulatory immune mechanisms prevent outbreak of SE in a part of 1st generation horses, which are also exposed to bites of *Culicoides* and remain healthy.

Summer eczema (SE) in Icelandic horses is thus a unique natural model to study the natural course of allergy in an outbred population, as horses can be followed prior to the first contact with the allergen (i.e. in Iceland) until outbreak of the disease. As soon as the major allergens for SE have been produced, both curative and preventive SIT studies can be performed which will lead to a better causal treatment of SE and possibly to prevention of outbreak of SE in Icelandic horses through preventive immunisation before first exposure to the causative allergens.

This work was supported by the Swiss National Science Foundation grant No. 31-63449.00, by grants from the Agricultural Productivity Fund of Iceland, by grants of the Department of Clinical Veterinary Medicine of the University of Berne and by a Vetsuisse grant.

¹Wilson, A. D. et al. (2006). *Vet Immunol Immunopathol* (in press).

²Hellberg et al. (2006) *Vet Immunol Immunopathol* (accepted).

³Baselgia et al. (2006) *Equine Vet. J.* 38, 40-46.

⁴Hamza et al. (2006) The role of T cells in the development of insect bite hypersensitivity in Icelandic horses. Manuscript in preparation.

E-1

Possibilities of preventing summer eczema by focusing the immune response of horses

(Möguleikar á að verjast sumarexemi með því að stýra ónæmissvari í hestum)

Sigurbjörg Þorsteinsdóttir¹, Vilhjálmur Svansson¹, Guðbjörg Ólafsdóttir¹, Mieke Roelse¹, Helga Árnadóttir¹, Eliane Marti²

1) Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavík, Iceland.

2) Division of Clinical Research, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse Faculty, University of Berne, Switzerland

Summer eczema (SE) is a recurrent seasonal dermatitis of horses. All horse breeds can be affected but Icelandic horses born in Iceland and exported to the continent are strongly affected. Furthermore there is a lower incidence of SE in Icelandic horses born outside Iceland compared with those born in Iceland. Summer eczema is a type I hypersensitivity, IgE mediated allergic reaction to the bites of *Culicoides* spp., insects that are not native to Iceland.

The aim of this study is to develop expression vectors and test adjuvants that can be used to modulate the immune response of horses, with the future purpose of developing immunotherapy for SE. To obtain this we have established a model in horses with human serum albumin (HSA) gene and protein. Antibody response IgG, IgG subclasses and IgE was measured in ELISA and cytokines with quantitative real time PCR, after *in vitro* antigen stimulation of peripheral blood mononuclear cells.

For allergic controls a strong and stable IgE response was induced in 4 horses by subcutaneous (s.c.) injections with HSA protein and alum. These horses had also strong IgG(T) response but much lower IgGa and IgGb. For a Th1 type reaction the immune response against the equine gamma herpes virus 2/5 (EHV 2/5), which is latent in majority of all horses, was measured. The EHV2/5 specific response was primarily IgGb and considerably more IFN- γ than IL-4.

Two expression vectors, Vect-A and Vect-B of pcDNA3.1 origin with the HSA gene and differing in CpG motifs were tested. Horses, two with each vector, were immunised repeatedly intramuscular (i.m.) and intradermal and responded with weak HSA specific IgG. After challenge with HSA protein and alum the Vect-A horses responded with strong IgE and IgG(T) similar to the allergic controls but the IgGa and IgGb was lower. Vect-B horses were boosted s.c. with HSA protein and then responded with strong IgE and IgG(T) but the IgE response was transient and only restored to a low level, for a short time with the third protein boost. The high IgG(T) and low IgGa and b did however not change.

Four horses were immunised three times s.c. and i.m. with HSA protein and Mono-phosphoryl-lipid A (MPL) adjuvant that has shown to be Th1 focusing in humans. The IFN- γ /IL-4 ratio was slightly higher in the HSA/MPL horses than HSA/alum horses. However horses in both groups responded with very high IgG(T), low IgGa and hardly no IgGb. The IgE response was boosted to high levels in the HSA/MPL horses but was more transient than the response of the HSA/alum horses.

The HSA specific response is neither Th1 focused in the vector nor the MPL immunized horses as compared to the EHV2/5 response. However the horses respond differently from the allergic controls and in this respect it would be of interest to look at the T regulatory cytokines.

The investigation is supported by The Agricultural Productivity Fund of Iceland, The Icelandic Science Foundation and The Research Fund of The University of Iceland.

E-2

Development of expression vectors for focusing the immune response of horses

(Þróun á tjáningarferjum til að stýra ónæmissvari í hestum)

*Gudbjörg Ólafsdóttir¹, Vilhjálmur Svansson¹, Eliane Marti²
and Sigurbjörg Þorsteinsdóttir¹.*

¹*Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavík, Iceland,*

²*Division of Clinical Research, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse
Faculty, University of Berne, Switzerland*

Summer eczema (SE) or equine insect bite hypersensitivity (IBH) is a recurrent seasonal dermatitis of horses, an allergy to the bites of *Culicoides* spp. (midges). It is a Th2 immune reaction, a type I hypersensitivity with IgE antibody production and release of inflammatory molecules. All breeds of horses can be affected but Icelandic horses born in Iceland and exported to the continent, are more strongly affected than most other breeds, but *Culicoides* spp. are not native to Iceland.

DNA vaccines have attracted great interest being the vaccines of the future as they induce strong and lasting immune response in experimental animals. Their ability to modulate the immune response and to shift it from Th2 to Th1 holds a promise for treatment of allergies and cancer. In large animals and humans DNA vaccines have, however, not lived up to this expectation where their major drawback is low and short lived immune response. This is thought to be due to limited expression of the gene product involved and few activated antigen presenting cells. Therefore it is necessary to improve their efficacy by increasing their immunogenicity, broadening their crossprotective range, as well as by developing immunomodulators that can be coadministered with the vaccine antigen.

The aim of this study was to develop vectors that are efficiently expressed in horse cells. For this purpose the expression of the human serum albumin gene in different vectors was compared in primary horse cell lines of different origin.

The vectors are of pcDNA and pUC origin. They all have the cytomegalovirus (CMV) promoter and the pUC vectors contain CMV intron A whereas the pcDNA do not. We have previously immunized horses with two of the pcDNA vectors containing the HSA gene. Both generated a very low immune response. Plasmids were altered by using PCR and other conventional molecular methods, propagated in the DHS α strain of *E.coli*, harvested and purified by QIAGEN Plasmid Midi Kits. The expression of HSA was tested by transfection of COS-7 and the primary horse cells (derived from lung, kidney, skin and duodenum) using Lipofectamin 2000 and monitored in Western blot by staining for V5.

Intron A was ligated into pcDNA vector and Kozak sequence (GCCGCCATG) was added upstream of the HSA gene on pUC vectors. Insertion of intron A did not have a significant effect on the expression of the pcDNA vectors whereas insertion of a kozak sequence upstream of the gene in two types of pUC vectors increased significantly the *in vitro* expression both in COS-7 cells and primary horse cells lines.

The pUC vectors with the Intron A and Kozak sequence are more efficiently expressed in horse cells than the two pcDNA vectors that we tested *in vivo*. They should therefore be more suitable to use in a DNA vaccine for horses.

The investigation is supported by The Agricultural Productivity Fund of Iceland, The Icelandic Science Foundation and The Research Fund of The University of Iceland.

E-3

**Expression and purification of proteins from *Culicoides* spp.
as potential allergens in summer eczema**

(Tjáning og hreinsun á ofnæmisvökum sumarexems)

*Pórunn Sóley Björnsdóttir*¹, *Vilhjálmur Svansson*¹, *Guðbjörg Ólafsdóttir*¹, *Lisa Harwood*²,
*Eliane Marti*² and *Sigurbjörg Þorsteinsdóttir*¹

1) *Institute for Experimental Pathology at Keldur, University of Iceland, Reykjavík, Iceland*

2) *Division of Clinical Research, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse
Faculty, University of Berne, Switzerland*

Summer eczema (SE) or equine insect bite hypersensitivity (IBH) is a recurrent seasonal dermatitis of horses. All breeds of horses can be affected but Icelandic horses born in Iceland and exported to the continent, are more strongly affected than most other breeds. It has been shown that there is a lower incidence of summer eczema in Icelandic horses born outside Iceland compared with those born in Iceland. SE is a type I hypersensitivity, allergic reaction to bites of *Culicoides* spp., (biting midges) which are not indigenous to Iceland. We have isolated two candidate allergen genes from *C. nubeculosus* from a cDNA library, rCul n 1, coding a ribosomal P0 protein* and PP2C coding a protein phosphatase. Produced in *E.coli* they bind IgE from some horse sera, for obtaining the correct conformation of the proteins we have expressed them in insect cells.

The aim of the study is to express, produce and purify the allergens causing SE. The two genes, PP2C and rCul n 1 were amplified by PCR from a bacterial vector. They were ligated into the FastBac HT vector which contains 6x His Tag and transformed into DH10 *E.coli* giving a recombinant plasmid. For the production of viral particles Sf-9 insect cells were transfected with isolated recombinant plasmid DNA. The recombinant virus constructs were analyzed by Western blotting with a polyclonal antibody against 6xHis. The rCul n 1 protein of 15-16 kDa is found in the supernatant of lysed Sf-9 cells. The supernatant was purified directly on HiTrap Chelating columns. The PP2C of 28-30 kDa is in inclusions in Sf-9 precipitate matter. The precipitate matter was therefor washed sequentially in various buffers and urea, each step followed by brief sonication and centrifugation. Most of the PP2C protein was found in the supernatant of the first and last wash which was applied to HiTrap chelating columns for purification. The peak fractions of both proteins were analyzed by silver staining of SDS-PAGE gels and Western blotting.

The two proteins are being tested for allergenicity in summer eczema horses and antibodies are being produced in mice. We are also in the process of expressing other candidate allergens for purification and testing.

The investigation is supported by The Agricultural Productivity Fund of Iceland, The Icelandic Science Foundation and The Research Fund of The University of Iceland.

* Althaus, H. et al. (2004) Cloning and sequencing of a cDNA expressing a ribosomal P0 peptide from *Culicoides nubeculosus* (Diptera). *Vet Immunol. Immunopathol.* 2004 May;99(1-2):99-111

E-4

Summer eczema in Icelandic horses
Effect of environmental and intrinsic factors
(Áhrif erfða og umhverfis á sumarexem í íslenska hestinum)

Sigríður Björnsdóttir¹, Jakobína Sigvaldadóttir, Mia Hellsten and Lena Johanna Reiher
¹Icelandic Agricultural Authority, Hólar IS-551 Saudárkrókur, Iceland

Summer eczema (SE) is an allergic reaction to the bite of *Culicoides* spp. Due to the absence of the biting midges in Iceland, the disease is not seen in the native horse population but is a serious problem in exported Icelandic horses and also known in Icelandic horses born abroad. SE is therefore a threat to the export of horses and the horse industry in Iceland.

A clinical study was performed to estimate the prevalence of SE in Icelandic horses that had been exported and to analyze the influence of environmental and genetic factors. The material consisted of 330 Icelandic horses exported to Denmark, Sweden and Germany. SE was diagnosed in 114 of the horses or 34.5%. If more than two years had passed since export (n=213), the prevalence was 49.5%. For horses that had lived for more than two years in areas known to be heavily infested by *Culicoides* spp. (n=130), the prevalence was as high as 54%. Information about the time of onset of the disease was available for 49 horses and ranged from 1 to 8 year after export. Most commonly the first signs of SE were detected 2 years after export (mean 2.4 years). Additional 191 horses exported to Norway and Sweden were examined clinically for SE. Horses that had been living on areas known to be infested by *Culicoides* spp. for two years or longer were selected. Eighty nine of them or 46.6% were found to have SE. No significant association was found between sire and the prevalence of SE in exported horses.

For comparison, the prevalence of SE in the population of Icelandic horses born in Germany was estimated by an interview of the owners of 1192 horses. For horses in the age range of 3 – 15 year, 4.6 % were affected by SE. The mean age when the first signs were recognized was 2.9 years, ranging from 1 to 11 years. The prevalence was significantly higher if the parents (one or both) were affected by SE compared with offspring of horses without the disease, indicating a genetic effect. Country of origin of the fathers seemed also to effect the predisposition of the offspring in favor for the Icelandic born stallion.

It was concluded that exported Icelandic horses are predisposed for SE as a result of a lack of exposure to the biting midges in the early live and the great environmental changes following the export. The Icelandic horse does not seem to be more sensitive for the disease compared to other breeds, if the horses are born in comparable environment, inhabited by the “responsible” insect. The influence of genetic factors on the predisposition for the disease must be studied further.

E-5

Exploring the genetics regulating susceptibility to equine allergic eczema (Athugun á erfðapáttum sumarexems)

Katja Grandinson¹, Louise Lindberg¹, Susanne Eriksson¹, Hans Broström², Rebecka Frey³,
Matthew Binns⁴, Marie Sundquist⁵, Sofia Mikko¹ and Gabriella Lindgren⁶

¹Dept of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. ²Dept of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. ³Norrsholms Animal Hospital, Norrköping, Sweden. ⁴Royal Veterinary College, London, UK. ⁵Östra Greda Research Group, Borgholm, Sweden. ⁶Dept of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Sweden

E-mail: gabriella.lindgren@imbim.uu.se

Allergic eczema, or sweet itch, in the horse is a type I hypersensitivity reaction in the skin causing considerable discomfort for the affected horses as well as economical loss for the horse owners. The most frequently assigned allergens are various species of biting midges of the *Culicoides* genus. Similar chronic, pruritic inflammatory skin conditions associated with increased production of immunoglobulin E (IgE) are known in man, dogs and cats as well as many other species. The disease shows a clear genetic variation in humans, dogs and horses. The prevalence of allergic eczema in Icelandic horses born on the European continent is 6-7%, while it is very rare in Iceland. In contrast 20-30% of the horses exported from Iceland develop allergic eczema.

We use the Icelandic horse as our model population to explore the genetics behind equine allergic eczema. The ultimate goal of this study is to identify genes controlling susceptibility to allergic eczema. We will scan the genome with genetic markers and subsequently perform a genome-wide association study. Further, we are analyzing already known candidate genes for allergic eczema detected by studies in other species. A questionnaire was used to collect information on allergic eczema in Icelandic horses born in Sweden 1991-2001. The questionnaire resulted in clinical data (healthy, mild, moderate and severe symptoms) on eczema for 1211 Icelandic horses born in Sweden from 33 different stallions. The disease data was used to estimate genetic parameters for allergic eczema, as well as to identify horse families with multiple affected individuals for future mapping studies. The heritability for allergic eczema was estimated at 0.14 (\pm 0.06) in a linear animal model.

Viral infections in horses in Iceland (Veirusýkingar í hestum á Íslandi)

Vilhjálmur Svansson

Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavik, Iceland

The native Icelandic horse is the only horse breed in Iceland. The horses were brought to the country during the early Viking settlement in the 10th century. After time there are no records of import of horses until in 1867 when an Icelandic gelding was reimported to Iceland.

Due to the geographic isolation the genetic selection of the breed has mainly been determined by volcanic activity and harsh weather conditions rather than infectious diseases. This may have reduced the resistance of the breed to some of the agents known to infect horses worldwide.

There are two records in the 19th century of contagious diseases in Icelandic horses. Since then there have been no major outbreaks of disease with viral character in the Icelandic horse population until February 1998 when an epidemic of infectious pyrexia occurred.

The pyrexia was first observed in horses on a training station in the Reykjavik area. Only few horses were affected during the first days. One week later similar cases were noted in other stables and in the next days the contagious nature of the disease was confirmed. From the primary foci the disease spread through out the country. The epidemic was over in October but few cases were recorded on isolated farms until February 1999.

According to the main clinical symptoms the disease was named infectious pyrexia (IP). Some horses got diarrhea after having high fever and a few were affected by severe colic as a complication. Eclampsia in mares prepartum or in early lactation was commonly seen especially if the weather conditions were critical.

Clinical signs, negative bacterial isolation together with the mode of transmission strongly pointed toward a viral infection. In spite of extensive investigations no viruses previously known to infect horses could be connected to the disease.

Virus isolation attempts, electron microscopical examinations and experimental infection of foals indicate that the cause of the epidemic was non-cultivable virus most likely belonging to the picornaviridae family.

The virological examinations of the IP added new information to our knowledge of viral infections in the Icelandic horse population and revealed the unique infection status of the population. At present indications of 9 different virus infections have been found in horses in Iceland. Clinical symptoms of equine papilloma virus can often be seen in young horses. Lesions resembling equine coital exanthema caused by Eq. herpesvirus (EHV) 3 have been noted and two gammaherpesviruses, EHV-2 and 5 isolated. In serum samples antibodies to Eq. rhinopneumonitis virus (EHV-4) Eq. rhinovirus 1 and 2, Bernevirus and coronavirus were detected. The clinical relevance of infections with some of these viruses remains uncertain as their presence has been identified without any connection to clinical disease.

In the spring 2004 a new infection with Eq. adenovirus type 1 was noted in horses in Iceland with almost 100% morbidity. This once again is a reminder of how vulnerable the immunologically naive horse population in Iceland is to new introduction of viruses endemic in horses outside Iceland.

Internal parasites of horses in Iceland

(Innri sníkjudýr í hrossum á Íslandi)

Matthías Eydal

Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavik, Iceland

Various studies have been performed on endoparasites of the Icelandic horse in Iceland during the last 2-3 decades. These include identification of the helminth species occurring in the gastrointestinal tract, studies on the seasonal fluctuation in fecal worm egg output, the effect of anthelmintic treatments, and a study on pasture larval contamination.

The following internal parasites have been found:

Protozoans: *Eimeria leuckarti* in foals, being rare and *Cryptosporidium parvum* which seems to be common in foals.

Nematodes: A total of 29 nematode species inhabiting the intestinal tract have been identified. This includes 16 species of small strongyles (*Cyathostomum*, *sensu lato* (14 species), *Gyalocephalus capitatus*, *Poteriostomum* sp.) and 8 species of large strongyles (*Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus*, *Strongylus vulgaris*, *Triodontophorus* spp., *Craterostomum acuticaudatum*, *Oesophagodontus robustus*). Strongyle worms are very common in horses of all ages. The small strongyles occur in much higher numbers than the large ones, as shown by post mortem worm counts. Differentiation of infective strongyle larvae, cultured from strongyle eggs in fecal samples, shows that small strongyles usually account for 90-100% of the strongyle eggs passed in feces. The number of strongyle eggs passed in faeces reaches a peak in June-August and is followed by a rise in the number of infective strongyle larvae on pasture in late summer (August-October). The effect of antiparasitic treatment on the number of strongyle eggs in faeces in field trials is dependent upon the time of the year, and the class and form of the antiparasitic compound used. After treatment against endoparasites the fecal egg count usually drops to zero but eggs reappear in faeces 5-12 weeks after treatment, the eggs of small strongyles reappear first, while the eggs of large strongyles reappear later. In a group of horses of all ages (5 months – 20 years old) with little exposure to anthelmintics the diversity of strongyle species (identified as infective larvae from fecal samples) was greatest in 2-3 years old horses. The number of strongyle eggs in feces increased significantly with age, which verifies that horses do not acquire immunity against this important group of parasites.

The stomach worm *Trichostrongylus axei*, principally a parasite of ruminants, is occasionally found. The ascarid *Parascaris equorum* and the pinworm *Oxyuris equi* are very common and primarily seen in foals and young horses, which are often heavily infected, immunity being acquired at young age. The threadworm *Strongyloides westeri* is commonly found in very young foals, disappears at about half year of age. The common minute pinworm *Probstmayria vivipara*, is considered of minor importance.

In addition, a case of fatal infection by *Halicephalobus gingivalis* in the brain of a horse was recently identified, a rare finding in horses worldwide.

Tapeworm: *Anoplocephala perfoliata* is common in horses of all ages.

Horses in Iceland host most of the internal parasites found in horses in other countries. Strongyle nematodes usually account for most of the worm burden in horses of all ages, in addition there are other nematodes and protozoan species characteristic of foals.

Tilraunir með ónæmisörvun þriggja árganga þorsklirfa

Bergljót Magnadóttir¹, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹, Sigrún Lange¹, Agnar Steinarsson², Matthías Oddgeirsson², Slavko Bambir¹ og Sigríður Guðmundsdóttir¹

¹Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,

²Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar á Stað

Mikil afföll á lirfustigi, sem að einhverju leyti má rekja til sýkinga, er vandamál í þorskseldi. Ónæmiskerfi þorsks er ekki fullþroska fyrr en 2 – 3 mánuðum eftir klak og því er hefðbundin bólusetning gagnslaus fyrir þann tíma. Fyrstu vikurnar eru þorsklirfur því háðar ósérvirkum ónæmisþáttum til varnar sýkingum. Fjölmörg efni (ónæmisörvar), oft unnin úr bakteríum, sveppum, plöntum eða skelfisk, geta örvað þessa ósérvirku ónæmisþætti.

Á þremur klaktímum, 2001, 2002 og 2003, á Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar á Stað við Grindavík voru áhrif ýmissa ónæmisörva á lifun og sjúkdómshol þorsklirfa og seiða rannsökuð. Bæði var meðhöndlað með böðun og fôðrun. Upptaka LPS á mismunandi tímum eftir klak var einnig könnuð bæði með ónæmisvefjaskoðun og flúrsmásjárskoðun.

Eitt þeirra efna sem prófað var, fitufjölsykrur (LPS) úr bakteríunni *Aeromonas salmonicida* (As, undirteg. *salmonicida* eða *achromogenes*), virtist gefa góða raun í fyrstu tilraunum og bæta lifun og sjúkdómshol. Önnur efni höfðu lítil eða engin áhrif og endurteknar prófanir með As-LPS ullu vonbrigðum. Upptakan var takmörkuð á fyrstu dögum eftir klak en jókst 30 dögum eftir klak.

Ljóst er að þörf er á frekari rannsóknum á vænlegum ónæmisörvum og áhrifum þeirra á þorsklirfur.

Leitað að bætibakteríum til að bæta afkomu þorsks á fyrstu vikunum eftir klak

Sigríður Guðmundsdóttir¹, Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹, Agnar Steinarsson², Berglind Gísladóttir¹, Bergljót Magnadóttir¹, Maja Herold Pedersen³, Birgitte Budde³ og Hélène Liette Lauzon⁴

¹ Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

² Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar, Stað við Grindavík,

³ Den Kongelige Veterinær - og Landbohøjskole, Kaupmannahöfn,

⁴ Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, Skúlagötu 4, Reykjavík

Í verkefninu “Forvarnir í fiskeldi” er leitað leiða til að greina og bæta umhverfisþætti á frumstigum í eldi lúðu og þorsks, þ.e. frá klaki til loka lírfuskeiðs, þegar afföllin eru hvað mest. Í erindinu verður fjallað um leit að og fyrstu prófanir á s. k. bætibakteríum (probiotica) til hugsanlegra nota á frumstigum þorskeldis.

Fyrsta skrefið var kortlagning örveruflórunnar fyrir og eftir klak á hrognum, í lírfum, og seiðum og umhverfi þeirra, með og án efnameðhöndlunar. Þetta var gert á Tilraunaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar, Stað við Grindavík, vorið 2004. Sérstök leit var gerð að þekktum sjúkdómsvaldandi bakteríum og varð þeirra ekki vart. Eftir greiningar og grunnprófanir voru í safni Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins um 450 bakteríustofnar flokkaðir í 189 hópa. Einn fulltrúi úr hverjum hópi var valinn til að prófa hindrandi eiginleika gagnvart þremur sjúkdómsvaldandi bakteríum (*Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes*, *Listonella anguillarum* og *Vibrio salmonicida*). Sams konar athugun var gerð á tveimur bakteríustofnum úr safni Fisksjúkdómadeildar (*Vibriobakteríunni* K-1 og *Carnobacterium piscicola*) og frönskum stofni af *Carnobacterium divergens*. Eftir þessar athuganir voru 39 stofnar valdir til frekari prófana á myndun hindrandi efna og vaxtarhraða við mismunandi hitastig. Að því loknu voru þrettán stofnar prófaðir með tilliti til viðloðunargetu á fjórum frumulínum úr fiski. Að lokum voru valdar 5 bakteríur sem prófaðar voru *in vivo* vorið 2005.

Í annarri tilrauninni var tveimur bakteríum, sem einangraðar voru á Stað, ásamt gersveppi bætt í ræktir fæðudýra. Í hinni tilrauninni voru hrogn, lírfur og seiði böðuð nokkrum sinnum með blöndu þriggja baktería, tveggja sem voru einangraðar á Stað og einni frá Frakklandi. Afkoma meðhöndlaðra lírfa benti til þess að bætibakteríurnar hefðu haft jákvæð áhrif. Seltuþolsprófanir sem reyna á lífsmátt lírfanna gáfu sömu niðurstöður. Í ljósi þess að mikil frávik voru innan hópanna verða þessar tilraunir endurtekna. Böðun hroгна sýndi minni mun milli hópa en böðun lírfa. Haustið 2005 voru 30g seiði böðuð með hverri þessara þriggja baktería. Aukinn vöxtur mældist í einum hópnum. Þetta þarf einnig að sannprófa.

Vonir standa til þess að notkun bætibaktería í fiskeldi muni geta orðið hentug leið til að bæta eldisumhverfið, auka lifun og vöxt og draga úr notkun sýklalyfja.

Verkefnið er styrkt af AVS sjóðnum, styrkur nr. R 41-04

E-10

Site directed mutagenesis of the AsaP1 exotoxin of *Aeromonas salmonicida*

*Johanna Hentschke*¹, *Ólafur H. Friðjónson*¹, *Arnhóor Ævarsson*¹, *Guðmundur Ó. Hreggviðsson*¹, *Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir*²

¹ *Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavík, Iceland.*

² *Prokaria, Reykjavík, Iceland*

Aeromonas salmonicida is a pathogenic bacterium, which infects various fish species (e.g. salmon and cod). The exoprotease AsaP1 is one of its main virulence factors. This protein was identified as a novel exotoxin at Keldur in 1990. Since then, it has been studied intensively and the encoding gene cloned and expressed in *E. coli*.

The aim of the study was to create an inactive mutant of the AsaP1-protease through site directed mutagenesis for an application as a potential vaccine. The mutated protein should function as an antigen to induce anti-AsaP1 antibody production, but show no proteolytic activity or any toxicity against the fish.

Amino acids, presumably involved in substrate binding and catalytic activity of the enzyme were identified by modelling the AsaP1 protein structure. The corresponding codons were exchanged with site-directed mutagenesis. Thus, glutamate in the active side of the protease was changed to glutamine and alanine. Tyrosine in the specific binding site of the protease was changed to phenylalanine and alanine.

The success of the mutagenesis was verified with sequencing. Immunostaining of the recombinant proteins indicated correct folding of the protein. The lack of activity was verified with activity staining following casein gel electrophoresis.

Rannsókn á sníkjudýrum urriða (*Salmo trutta*) og bleikju (*Salvelinus alpinus*) í Elliðavatni og Hafravatni

Sigurður H. Richter og Árni Kristmundsson
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Elliðavatn og Hafravatn eru í nágrenni Reykjavíkur. Í þau bæði renna ár og aðrar úr þeim til sjávar. Enda þótt vötnin séu svipuð að staðsetningu og stærð, þá eru ýmis lífsskilyrði talsvert ólík, einkum dýpt og vatnsmagn. Auk urriða og bleikju eru í vötnunum hornsíli, áll og lax.

Á árunum 2002-2005 voru alls veiddir 5 urriðar og 5 bleikjur í hvoru vatni að vorlagi og 5 urriðar og 5 bleikjur í hvoru vatni að haustlagi. Samtals 20 urriðar og 20 bleikjur. Fiskarnir voru veiddir í gildrur, með ádrætti eða net sem jafnóðum var vitjað um. Lengd og þyngd fiskanna var skráð og aldur greindur. Fiskarnir voru síðan krufnir vandlega í leit að sníkjudýrum, þau greind til tegundar eða ættkvíslar og fjöldi þeirra talinn eða metinn. Sérstök áhersla var lögð á að leita að dýrum af fylkingum Protozoa og Myxozoa en fram að þessu hefur vitneskja um þau verið mjög takmörkuð. Teknar voru myndir af öllum tegundum og sýni tekin, til staðfestingar á réttum greiningum og til samanburðar við tegundir fundnar annarsstaðar Munur á tegundasamsetningu og tíðni sníkjudýra milli hýsiltegunda, vatna og árstíma hefur verið skoðaður.

Að minnsta kosti 21 tegund sníkjudýra hefur fundist. (Greiningu nokkurra þeirra til tegundar er þó ólokið.)

Protozoa: *Hexamita salmonis*, *Apiosoma* sp. *Capriniana piscium*, *Trichodina* sp., *Dermocystidium branchiale*.

Myxozoa: *Chloromyxum (truttae)* sp., *Myxidium (truttae)* sp., *Myxobolus arcticus*, *Myxobolus cerebrealis*, *Myxobolus neurobius*, *Sphaerospora* (?) sp.

Metazoa: *Apatemon gracilis*, *Diplostomum (spathaceum)* spp., *Crepidostomum farionis*, *Phyllodistomum conostomum*, *Diphyllobothrium (dendricum)* sp., *Eubothrium crassum*, *E. salvelini*, *Philonema oncorhynchi*, *Capillaria salvelini* og *Salmincola (edwardsi)* sp.

Sex tegundir; *Dermocystidium branchiale*, *Chloromyxum (truttae)* sp., *Myxidium (truttae)* sp., *Myxobolus arcticus*, *Myxobolus neurobius* og *Sphaerospora* (?) sp. höfðu ekki fundist áður hér á landi.

Meirihluti tegundanna fannst í báðum vötnunum og/eða í báðum hýsiltegundunum. Magn sumra þessara tegunda virðist þó breytilegt eftir vötnum og/eða hýsiltegundum.

Unnið er að grein um niðurstöður rannsókna.

E-12

Um hringorma í fiski og sýkingar af þeirra völdum í mönnum á Íslandi

Karl Skírnisson
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Þriðja stigs lirfur fjögurra hringormstegunda eru algengar í holdi flestra fisktegunda sem lifa í sjó umhverfis Ísland. Lirfur sjást einnig stundum í fiskum sem ganga úr sjó í ferskvatn. Tvær tegundanna; *Pseudoterranova decipiens* og *Anisakis simplex* geta lifað mánuðum saman í mönnum en ormarnir ná aldrei fullum þroska í fólki. Fyrirnefnda tegundin lifir fullorðin í maga sela en síðarnefnda tegundin í maga tannhvala. Berist lifandi lirfur þessara tegunda ofan í fólk leitar sú fyrirnefnda gjarnan upp í munn eftir vélindanu eða berst rétta boðleið út úr líkamanum. *Anisakis simplex* er jafnan talin hættulegri því ormar þeirrar tegundar bora sig mun oftast út úr maga eða þörmum og fara á flakk í kviðarholi með tilheyrandi sársauka, blæðingum og líffæraskaða.

Síðustu misserin hafa þrjár manneskjur leitað að Keldum eftir að hafa fangað í munni sér sprykklandi hringorm. Ormarnir voru greindir til tegundar og upplýsinga aflað um það hvenær og hvernig fólkið líklega smitaðist.

Í öllum tilvikum átti *Pseudoterranova decipiens* í hlut. Allar höfðu lirfurnar þroskast upp á 4. stig á tímanum sem liðinn var frá því að vikomandi töldu sig hafa smitast. Skemmst liðu fimm dagar og í því tilviki var lirfan 33 mm löng, í öðru tilvikinu var lirfan 34 mm löng eftir sex daga og í þriðja tilfellinu kom 47 mm lirfa upp í kok eftir 10 daga. Lirfurnar voru í tveimur tilvikum upprunnar úr illa hituðum steinbít en í þriðja tilfellinu var lirfan í illa hitaðri þorsklifur.

Hringormar í fiskholdi drepast við hitun upp fyrir 70°C í eina mínútu eða í 20°C frosti í vikutíma. Hefðbundnar aðferðir hér á landi við að matbúa fisk, þar sem þess hefur verið gætt að sjóða eða gegnumsteikja fisk, duga til að koma í veg fyrir að hringormar komist lifandi ofan í menn. Síðustu ár og áratugi hefur neysla á hráu eða lítt hituðu sjávarfangi færst í vöxt hér á landi. Af því getur stafað veruleg hættu, einkum þegar um er að ræða uppsjávarfiska sem sýktir eru af lirfum *Anisakis simplex* eða ránfiska sem hafa safnað þessum lirfum í sig. Dæmi eru um að íslenskir sjómenn neyti hrárra loðnuhrogna. Veruleg hættu er á að slíkt leiði fyrir en síðar til *Anisakis simplex* sýkingar. Sama hættu fylgir neyslu á hráum síldarhrognum og hráum fiski almennt.

Undanfarin ár hefur neysla á hráum fiski í tilbúnum fiskréttum færst í vöxt. Brýnt er að fiskur sem notaður er í slíka rétti hafi áður verið vandlega ormahreinsaður (gegnumlýstur á ljósaborði) en öruggast er þó að hráefnið hafi áður verið fryst það lengi að lirfur í því séu örugglega dauðar.

Smíði á flúrljómandi visnuveirufurju

*Katrín Ólafsdóttir, Sigríður Matthíasdóttir og Valgerður Andrésdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

Mæði-visnuveiran (MVV) tilheyrir flokki lentiveira og er því náskyld eyðniveirunni (HIV). Í rannsóknum á lentiveirum er mikilvægt að hanna kerfi þar sem hægt er að nema veiruna á skjótan og afgerandi hátt. *EGFP* genið (enhanced fluorescent protein) er talið vera góður kostur í þessu sambandi því það flúrljómar án nokkurra hjálparþátta. Kerfi þar sem smíðuð er heil sýkjandi veira með *EGFP* gen innlimað í stað annars gens hafa verið útbúin bæði fyrir HIV og MVV. Ekki hefur enn tekist að fá sýkjandi veirur í MVV en það hefur tekist í HIV.

Rannsóknir hafa sýnt að Tat prótein MVV og geitavisnuveirunnar (caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) hefur litla sem enga trans-virkjunarvirkni miðað við í HIV-1 og nýlegar rannsóknir benda til þess að Tat í MVV og CAEV sé samsvarandi við Vpr prótein í HIV-1. Í CAEV hefur verið sýnt fram á að veirur án *tat* gens eftirmyndast bæði *in vivo* og *in vitro*.

Í þessari rannsókn var smíðuð heil visnuveirufurja þar sem *EGFP* gen var innlimað í stað *tat* gens veirunnar. *Tat* genið var klippt út að mestu, og þess var gætt að splæsiset væru ósnert. *EGFP* genið var innlimað í sama lesamma og fyrsta amínósýra *tat* gensins. Einnig var smíðaður MVV klónn án *tat* (MVV_{Δ tat}). Tjáning á *EGFP* MVV_{Δ $tat/EGFP$} var staðfest með flúorsmásjá. *Tat* genið í MVV virðist vera nauðsynlegt fyrir eftirmyndun veirunnar því hvorki MVV_{Δ tat} né MVV_{Δ $tat/EGFP$} ferjur mynduðu sýkingahæfar veirur.

Lentiveiruhindrar

Valgerður Andrésdóttir¹, Stefán Ragnar Jónsson^{1,2} og Reuben S. Harris²

¹*Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,*

²*Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis*

Á síðustu árum er sífellt að koma betur í ljós að lífverur hafa komið sér upp ýmsum vörnum gegn veirusýkingum. Veirurnar hafa á hinn bóginn þróað tæki til að komast hjá þessum vörnum. Nýlega fannst prótein í mannafrumum sem hefur það hlutverk að eyðileggja erfðaeftni retroveira jafnóðum og það myndast með því að afaminera cytidine í uridine í nýmynduðu einþátta DNA. Þetta prótein, sem nefnist APOBEC3G, veldur því þannig að annað hvort er veiru-DNAið brotið niður eða það verða stökkbreytingar. Þar sem C breytist í U í mínus þætti veiru-DNAsins verða lokastökkbreytingarnar G-A. Lentiveirur hafa komið sér upp mótleik við þessu, sem er próteinið Vif, sem óvirkjar þennan afaminasa. APOBEC3G þakast í veiruagnir um leið og þær myndast ef Vif próteinið er ekki til staðar, en Vif virðist koma í veg fyrir það með því að leiða próteinið til niðurbrots. Rannsóknir okkar á Vif úr mæði-visnuveiru hafa leitt í ljós að það sama virðist gerast í kindufrumum. Líklegt er að ekki séu öll kurl komin til grafar varðandi virkni Vif. Rannsóknir okkar benda til að tengsl séu milli hylkispróteins veirunnar og Vif, þar sem stökkbreyting á prólín-ríku svæði í C-enda Vif próteinsins veldur því með stökkbreytingu í hylkispróteini að veirurnar vaxa illa í markfrumum sínum. Prótein, sem hafa það hlutverk að verja frumur gegn retroveirusýkingum og tengjast hylkispróteini veiranna hafa fundist, og má þar nefna Lv-1, Ref-1 og TRIM5_. Ef til vill hefur Vif einnig því hlutverki að gegna að hindra slíkt prótein.

APOBEC3 prótein er einungis að finna í spendýrum, en þó er mikill munur á fjölda þeirra innan spendýrafánunnar, menn og mannapar hafa 8 slík prótein en mýs og önnur nagdýr einungis eitt. Ekki er vitað um aðra prótein fjölskyldu þar sem orðið hefur slík margföldun á þeim tíma sem liðinn er frá tilkomu spendýra. APOBEC3 próteinin eru einnig sérstök að því leyti að þau eru undir einhverju sterkasta jákvæða vali sem þekkist. Þetta val virðist hafa átt sér stað lengur en sambúðin við lentiveirur og Vif. Sú tilgáta hefur verið sett fram, að eitt af upphaflegum hlutverkum APOBEC3 próteinanna hafi verið að hindra endogen retroveirur í því að valda ójafnvægi í erfðamenginu. Í þessari rannsókn var tilvist og fjöldi APOBEC3 próteina í kindum og öðrum klaufdýrum könnuð.

Raðir úr gagnabönkum voru notaðar til að spá fyrir um basaröð próteinanna byggt á skyldleika próteinanna og varðveislunni. APOBEC3 úr kinda- svína- og kúufrumum voru klónuð og virkni þeirra og sértækni könnuð. Í ljós kom að APOBEC3 úr öllum þessum tegundum hafði cytidine deaminasavirkni og gat hindrað HIV-1. Basasértækni og virkniset próteinanna benda hins vegar til að þau séu þróunarlega nær mús en manni. Niðurstöðurnar geta gefið innsýn í upprunalegt hlutverk APOBEC3 próteina sem enn er óljóst.

E-15

Notkun elísuprófs til skimunar fyrir riðu í kindum

*Stefanía Þorgeirsdóttir og Jóna Aðalheiður Aðólfsdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

Á árinu 2005 var byrjað að nota elísupróf (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) til riðuskimunar í sláturfé á Tilraunastöðinni á Keldum í stað hefðbundinnar vefjalitunar, en árið 2004 höfðu um 3000 sýni verið send til Noregs til prófunar. Þessi aðferð, eða próf sem byggjast á sambærilegri tækni, eru nú notuð í flestum löndum Evrópu og víðar til að skima fyrir kúariðu í eldri nautgripum sem slátrað er og fyrir riðusmiti í heilbrigðu sláturfé auk áhættuhópa, en það er skylda í öllum Evrópusambandslöndum og þar sem þörf er á að fylgja þeirra stöðlum. Áætlað er að prófa a.m.k. þrjú þúsund sláturhúsasýni árlega úr fullorðnu fé fyrir embætti yfirdýralæknis, auk sýna sem koma til prófunar vegna gruns um riðu.

Í elísuprófinu er magn riðusmitefnisins (PrP^{Sc}) í heilasýnum kindanna mælt með einstofna mótefnum. Notuð eru TeSeE purification og TeSeE detection kit frá Bio-Rad. Elísuskimunin er næmari en skimun með vefjameinafræðilegri skoðun, sem hefur verið notuð hingað til við riðuskimun á sláturhúsasýnum og getur einnig numið óhefðbundin riðuafríðni sem hafa fundist víðs vegar í Evrópu á síðustu árum. Til að staðfesta riðusmit ef sýni reynast jákvæð í elísuprófi, er notað próteinþrykk (western blot) eða ónæmislitun (IHC) fyrir PrP^{Sc} á vefjasneiðum ef slík sýni eru til staðar.

Nú hafa verið prófuð um 3500 sýni úr síðustu haustslátrun (frá 2005) með elísu-aðferðinni á Keldum. Reyndust þau öll vera neikvæð fyrir riðusmiti. Hins vegar greindist riða á tveimur bæjum árið 2005, í báðum tilvikum í kindum með sjúkleg einkenni. Úr hjörðunum voru samtals 109 sýni til viðbótar prófuð með elísuprófi og fannst riðusmit í sex sýnum auk upprunalegu riðusýnanna. Einnig hefur verið skimað fyrir riðusmiti með elísuprófi í 355 sýnum úr fullorðnu fé úr riðuhjörð frá 2004, þar sem greindist Nor98 riðuafríðni. Reyndist eitt þeirra vera jákvætt fyrir riðusmiti. Hafa því fundist tvö jákvæð sýni í þessari hjörð sem er sjaldgæft í sambærilegum tilfellum sem rannsökuð hafa verið erlendis.

Til að taka upp þessa nýju aðferð við riðuskimun var komið upp sérstakri rannsóknar-aðstöðu á Tilraunastöðinni, þar sem eingöngu er unnið að rannsóknum á riðusjúkdómnum. Riðusmitefnið er afar þolið og því nauðsynlegt að halda því á einangruðu svæði. Með næmari aðferð getum við hugsanlega fundið fleiri tilfelli og fyrr á sjúkdómsferlinum þ.a. smit út frá hverju tilfelli verður minna. Þessi nýja aðferð gæti þannig flýtt fyrir útrýmingu riðusjúkdómsins á Íslandi. Auk skimunar á sláturhúsasýnum fyrir embætti yfirdýralæknis og staðfestingarprófa á riðutilfellum, verður aðstaða og tæki nýtt til grunnrannsókna á riðu.

V-1

Tjáning á magnabættinum C3 í þroskunarferli lúðu (*Hippoglossus hippoglossus* L.)

*Sigrún Lange¹, Alister W. Dodds², Slavko H. Bambir¹, Ian Bricknell³, Tim Bowden⁴,
Sigríður Guðmundsdóttir¹, Sigrun Espelid⁵ og Bergljót Magnadóttir¹*

¹*Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,*

²*MRC Immunochemistry Unit, University of Oxford, Englandi,*

³*FRS Marine Laboratory, Aberdeen, Skotlandi,*

⁴*Department of Zoology, University of Aberdeen, Skotlandi,*

⁵*Norwegian Structural Biology Centre, University of Tromsø, Noregi*

Magnakerfi (complement system) fiska er vel þroskað og gegnir mikilvægu hlutverki í ónæmisvörnum þeirra. Magnabátturinn C3 er lykilprótín allra þriggja ferla magnakerfisins, er aðal áthúðunarþáttur magnakerfisins og nauðsynlegur fyrir frumurofsferli magnakerfisins. Mjög lítið er vitað um þroskun magnakerfisins í fiskum.

Í þessari rannsókn var C3 greint í lúðulirfum frá 37°d til 1050°d, þ.e. 5 – 99 dögum eftir klak. Vefjasneiðar voru ónæmislitaðar með mótefni sem framleitt var gegn α -keðju lúðu C3 og einnig var tjáning á C3 greind með staðbundinni þáttatengingu með DIG-merktum mRNA þreifara fyrir 1548 bp búi af lúðu C3.

Á mismunandi þroskunarstigum greindist C3, bæði prótínið og mRNA, í vöðva, lifur, heila, brjóski, mænu, auga, hjarta, meltingarvegi og nýrum þ.e. C3 er tjáð staðbundið í mörgum líffærum allt frá fyrstu þroskunarstigum.

Niðurstöðurnar sýna að magnakerfið tekur þátt í myndun og þroskun mismunandi líffæra auk þess sem það gegnir hlutverki í ónæmisvörnum lúðu.

V-2

Tjáning á magnapættinum C3 og apolipoprotein A I í þroskunarferli þorsks (*Gadus morhua* L.) – hugsanlegt hlutverk í þroskun og jafnvægisstýringu?

¹Sigrún Lange, ²Alister W. Dodds, ¹Sigríður Guðmundsdóttir, ¹Slavko H. Bambir og ¹Bergljót Magnadóttir
¹Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,
²MRC Immunochemistry Unit, University of Oxford, Englandi

Magnakerfið er mikilvægt bæði í meðfæddu (innate) og áunnu (adaptive) ónæmis-svari. Það tekur þátt í vörnum gegn sýkingu og í viðhaldi jafnvægis t.d. í kjölfar bráðasvars eða vegna stýrðs frumudauða. C3 er lykilprótín allra ferla magnakerfisins og tekur þátt í áthúðun og frumurofi. Sýnt hefur verið fram á að Apolipoprotein A-I (ApoLP A-I), prótín þáttur eðlisþungra fitupróteína í sermi, hindrar frumurofsferlið í sermi þorsks og hefur þannig hugsanlegu stjórnhlutverki að gegna. Í þessu verkefni var tjáning C3 og ApoLP A-I greind í þorskalirfum auk stýrðs frumudauða.

Sýni voru tekin í formalín af frjóvguðum þorskhrognum og lirfum frá 4 til 57 dögum eftir klak og steipt í vax fyrir vefjaskoðun. Digoxigenine merktir þreififarar voru útbúnir fyrir C3 og ApoLP A-I og staðbundin þáttatenging (*in situ* hybridisation) notuð til að greina tjáningu þessara próteína. TUNEL litun fyrir DNA niðurbroti var notuð til að greina stýrðan frumudauða.

Samhliða tjáning á C3 og ApoLP A-I greindist í heila og miðtaugakerfi, augum, nýra, lifur, vöðva, meltingarfærum og brjóski á flestum þroskastigum. Stýrður frumudauði greindist í heila og fleiri líffærum 4 dögum eftir klak en svarið var útbreiddara og öflugra í sýnum sem tekin voru frá og með 28 dögum eftir klak.

Niðurstöðurnar sýna að C3 og ApoLP A-I eru tjáð í mörgum líffærum á þroskunarferli þorsks og ásamt stýrðum frumudauða. Þessir þættir gegna sennilega mikilvægu hlutverki í líffæramyndun og stjórnun jafnvægis auk þess að taka þátt í sjúkdómsvörnum á fyrstu aldurstigum þorsks.

V-3

Óvirkjun á AsaP1 úteitri *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* og áhrif þess á eiturvirkni bakteríuseytis í laxi og þorski

Helga Árnadóttir*¹, Sarah Burr², Valgerður Andrésdóttir¹, Joachim Frey²
og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir

¹ Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

² Institute for Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland

Fjölmargir sýkiþættir hafa verið skilgreindir í sýkingarferli fisksýkilsins *Aeromonas salmonicida*, þ.á.m. AsaP1 úteitur (19 kDa). AsaP1 er málmháður peptíðasi af fjölskyldu aspzincin peptíðasa og er aðalúteitur hjá ýmsum *A. salmonicida* stofnum, þ.á.m. hjá undirtegund *achromogenes*. Seyti bakteríunnar er frumudrepanði í ýmsum fiskafrumulínum (RTG, BF-2 og EPC). AsaP1 úteitur hefur ekki þessa frumudrápsvirkni sem bendir til að í seyti bakteríunnar séu aðrir frumudrepanði þættir.

Tilgangur rannsóknarinnar var að búa til *A. salmonicida* undirt. *achromogenes* (Asa) stofn með óvirkt gen AsaP1 úteiturs og bera síðan saman eiturvirkni seytis (ECP) frá stökkbrigði og villigerð í laxi (*Salmo salar*) og þorski (*Gadus morhua*).

Gen AsaP1 úteiturs var óvirkjað með því að melta virkniset peptíðasans út úr *asaP1* geninu og koma í staðinn fyrir kanamycin geni. Óvirku *asaP1* geni var síðan komið fyrir í villigerðar Asa stofni með tengiæxlun og endurröðun. PCR var framkvæmt til greiningar á *asaP1* geni í erfðamengi bakteríunnar. Kasín virknipróf og ónæmisþrykk voru gerð til að athuga hvort AsaP1 peptíðasinn væri til staðar í seyti bakteríunnar eða ekki.

Seyti bakteríunnar var einangrað með því að rækta bakteríuna á sellófonþöktum BHI (brain hear infusion) agar. Laxa- og þorskseiði voru sprautuð í kviðarhol (i.p.) eða í vöðva (i.m.) með 0,1 mL af seyti í mismunandi styrk. Viðmið voru sprautuð með 0,1 mL af PBS. Laxinum var fylgt eftir í 3 vikur en þorskinum í 1 viku. Dauði var skráður daglega og stórsæ einkenni athuguð.

AsaP1 neikvætt stökkbrigði Asa bakteríunnar (AsaP1⁻) var búið til. Seyti stökkbreytta stofnsins var banvænt, bæði eftir i.p. og i.m. sprautun í lax og þorsk. Hins vegar lifði fiskurinn lengur heldur en fiskur sprautaður með seyti frá villigerðarstofni. Vefjaskemmdir við stungustað, sem eru þekkt einkenni eftir sprautun á seyti frá villigerð, voru ekki greinanlegar í laxi sprautuðum með seyti frá stökkbrigði. Eiturvirkni seytis frá báðum stofnum var meiri í laxi en í þorski.

Niðurstöður benda til þess að AsaP1 úteitur *A. salmonicida* undirt. *achromogenes* hafi þýðingarmikil áhrif á sýkingarmátt bakteríunnar en einnig, að bakterían framleiði annað/önnur eitur sem að hafi ekki eins fljótvirk eituráhrif og AsaP1.

V-4

Samanburður á sýkingarmætti *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* og AsaP1 neikvæðs stökkbrigðis bakteríunnar í laxi og þorski

Helga Árnadóttir*¹, Sarah Burr², Valgerður Andrésdóttir¹, Joachim Frey²
og Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir¹

¹ Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

² Institute for Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland

Aeromonas salmonicida undirtegund *achromogenes* (Asa) er Gram neikvæð baktería sem veldur kylaveikibróður í laxfiskum og öðrum fisktegundum. Sjúkdómurinn er sá bakteríusjúkdómur sem mestum skaða hefur valdið í íslensku fiskeldi og hefur greinst í nær öllum sjávartegundum sem reynt hefur verið að ala hérlandis. Málmháði peptíðasinn AsaP1, ~ 19 kDa, er utanfrumubáttur og aðalúteitur margra atýpískra *A. salmonicida* stofna og þar á meðal hjá týpustofni undirtegundarinnar *achromogenes*. AsaP1 úteitur hefur verið skilgreint sem eitur sem uppfyllir skilyrði Kochs. AsaP1 neikvætt stökkbrigði *A. salmonicida* undirt. *achromogenes* (AsaP1⁻) var búið til með merkigena útskiptingu.

Tilgangur rannsóknarinnar var að bera saman sýkingarmátt Asa villigerðarstofns og AsaP1⁻ stökkbrigðis í laxi (*Salmo salar* L.) og þorski (*Gadus morhua* L.).

Villigerðarstofni og stökkbrigði var umsað þrisvar sinnum í fisk áður en að sýkingartilraunir voru framkvæmdar. Fiskur var síðan sýktur annars vegar með sprautun í kviðarhol (i.p.) og hins vegar með böðun í bakteríulausn. Laxaseiði voru sprautuð i.p. með 0,1 mL af bakteríulausn í mismunandi styrk. Laxa- og þorskseiði voru baðsmituð í 2 klst í bakteríulausn (5×10^6 CFU/mL) annars vegar með villigerðarstofni og hins vegar með stökkbrigði. Í öllum tilraunum var fisknum fylgt eftir í 4 vikur eftir sýkingu og sáð var úr framnýra dauðra fiska til að staðfesta sýkingu með viðkomandi bakteríu.

Niðurstöður leiddur í ljós að stökkbrigðið var sýkingarhæft, bæði í laxi og þorski. Í báðum sýkingartilraunum lifði fiskur sem var sýktur með stökkbrigði lengur heldur en fiskur sýktur með villigerð. Fimmtíu prósent banaskammtur (LD₅₀) beggja stofna var sambærilegur eftir i.p. sýkingu í lax. Uppsafnaður dauði (%) í þorski, baðsmituðum með stökkbrigði var marktækt lægri heldur en í þorski baðsmituðum með villigerð (32% vs. 60%, $p = 0,0409$). Uppsafnaður dauði í baðsmituðum laxi var sambærilegur milli stofna.

Niðurstöður sýna fram á að AsaP1 úteitur *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* sé mikilvægur sýkiþáttur í sýkingarferli bakteríunnar en ekki nauðsynlegur fyrir sýkingarmátt bakteríunnar, hvorki í laxi né þorski.

**Meinafræðilegur samanburður í laxi,
sýktum með *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes*
og AsaP1 neikvæðu stökkbrigði bakteríunnar**

*Helga Árnadóttir**¹, *Sarah Burr*², *Valgerður Andrésdóttir*¹, *Joachim Frey*²
og *Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir*¹

¹ *Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

² *Institute for Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland*

Málmháði aspzincin peptíðasinn, AsaP1, er aðalúteitur Gram neikvæðu bakteríunnar *Aeromonas salmonicida* undirtegund *achromogenes* (Asa). Einangrað AsaP1 úteitur veldur sambærilegum meinafræðilegum breytingum í laxi og fiskur sýktur með bakteríunni. AsaP1 neikvætt stökkbrigði *A. salmonicida* undirt. *achromogenes* var búið til með merki- gena útskiptingu.

Tilgangur rannsóknarinnar var að bera saman meinafræði í laxi, baðsmituðum annars vegar með Asa villigerðarstofni og hins vegar með Asa stökkbrigði.

Lax var sýktur með því að baða fiskinn í 2 klst í bakteríulausn (5×10^6 cfu/mL) annars vegar með villigerðarstofni og hins vegar með stökkbrigði. Fylgst var með fiskunum í 4 vikur eftir sýkingu og sáð var úr frammýra dauðra fiska til að staðfesta sýkingu með viðkomandi bakteríu. Stórsæjum einkennum var lýst og sýni úr dauðvona fiski voru tekin til í vefjameinifræðilegrar skoðunar.

Blæðingar og sáramyndanir í húð voru algeng ytri einkenni í laxi eftir baðsmit með villigerðarstofni. Hreisturlos var hins vegar meira áberandi í laxi baðsmituðum með stökkbrigði. Krufning leiddi í ljós að blóðleysi í innri líffærum var áberandi einkenni í laxi baðsmituðum með villigerðarstofni. Blæðingar og rauðlitaður kviðarholsvökvi voru hins vegar meira áberandi í laxi baðsmituðum með stökkbrigði. Smásjárskoðun á vefjasýnum gaf til kynna svipuð einkenni blóðsóknar, blæðinga og vefjadreps í helstu líffærum, hvort sem að fiskurinn var sýktur með villigerð eða stökkbrigði. Hins vegar var vefjadrep og niðurbrot í vöðva meira áberandi í fiski sýktum með villigerð. Í helstu líffærum lax (t.d. hjarta, lifur og nýra) og einnig í tálknun, var útbreiðsla stökkbreyttu bakteríunnar og kólóníumyndun miklu meiri heldur en útbreiðsla villigerðarstofns í samsvarandi vefjum.

Óvirkjun á AsaP1 úteitri *Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* hafði þýðingarmikil áhrif á meinafræði bakteríunnar í laxi. Aukin útbreiðsla stökkbreyttu bakteríunnar í ýmsum líffærum lax bendir til að AsaP1 geti átt þátt í því að virkja varnar- svar hýsilsins.

V-6

Einangrun og lýsing á peptíðasa úr seyti bakteríunnar *Moritella viscosa*

Bryndís Björnsdóttir, Valgerður Andrésdóttir og Bjarnheiður K. Gudmundsdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Bakterían *Moritella viscosa* veldur sjúkdómi, sem nefnist roðsár í laxfiskum og þorski (*Gadus morhua*). Lítið er enn vitað um sýkingarmátt bakteríunnar, en einangrað seyti *M. viscosa* veldur einkennum sem líkjast sjúkdómseinkennum vetrarsára og leiðir til dauða, sé því sprautað í nægum styrk í laxa (*Salmo salar*). Tveir sýkiþættir hafa greinst í seyti bakteríunnar, sem eru málmháður peptíðasi, nefndur MvP1, og frumurofsensím af gerð glycerophospholipid:cholesterol acyltransferasa, nefnt MvGCAT. Þekkt er að málmháðir peptíðasar margra baktería, sem sýkja fisk, eru virkir sýkiþættir. Markmið verkefnisins var að einangra MvP1 úr seyti *M. viscosa* og skilgreina virkni hans.

Seyti *M. viscosa* var einangrað frá bakteríurækt, sem óx upp í næringaræti við 15°C. Seytið var þétt með saltfellingu og MvP1 einangraður úr því með súluskiljun bæði á gelsíunar- og jónskiptasúlum. Virkni ensímsins á ýmsum hvarfefnum var prófuð. Kasín var notað sem hvarfefni til að mæla hindrun af völdum mismunandi ensímhindra og virkni við ólíkt hitastig. Rafdráttur í SDS-PAGE með kasíni var notaður til að greina stærð peptíðasans.

Röð amínósýra (aa) á N-enda peptíðsins var greind í Applied Biosystems Procise Sequencer. Ýmis netforrit s.s. BLAST voru notuð til að bera aa röðina saman við þekktar raðir annarra ensíma.

Niðurstöður sýndu að MvP1 hefur mólþunga nálægt 39 kDa. Ensímið er framleitt í veldisfasa bakteríuvaxtar og það rýfur bæði kasín og kollagen en ekki elastín. Virkni ensímsins í seyti bakteríunnar hélst stöðug við 4°C í a.m.k. 4 sólahringa. Virkni greindist við hærri hitastig allt að 50°C. Virkni ensímsins var mest við 30°C. Málmensímhindrarnir OPA og EDTA hindruðu peptíðasann, en ekki aðrir hindrar s.s. serín ensímhindrinn PMSF. Sjúkdómseinkenni komu fram í laxaseiðum, sem sprautuð voru með hreinum MvP1. Röð fyrstu 21 aa á N- enda MvP1 leiddu í ljós að MvP1 tilheyrir hópi þermolysína, sem eru í fjölskyldu M4 málmháðra peptíðasa (MEROPS).

Hlutverk MvP1 sem sýkiþáttar *M. viscosa* er enn óþekkt, en nokkur ensím í hópi þermolysína hafa verið tengd sýkingarhæfni viðkomandi baktería.

Sjúkdómsbreytingar í laxi og sandhverfu af völdum seytis bakteríunnar *Moritella viscosa*

*Bryndís Björnsdóttir, Slavko H. Bambir, Sigríður Gudmundsdóttir og
Bjarnheiður K. Guðmundsdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

Moritella viscosa veldur sjúkdómi sem nefnist vetrarsár í laxfiskum og þorski (*Gadus morhua*). Sýkiþættir *M. viscosa* hafa ekki enn verið skilgreindir, en sýnt hefur verið fram á að seyti bakteríunnar er banvænt laxi (*Salmo salar*). Ennfremur hefur verið sýnt að seyti bakteríunnar getur orsakað sjúkdómseinkenni hliðstæð þeim sem einkenna vetrarsár. Rannsóknir hafa líka sýnt að sandhverfa (*Scophthalmus maximus*) er næm fyrir *M. viscosa* smiti (Björnsdóttir et al., 2004). Markmið verkefnisins var að meta og lýsa sjúklegum breytingum í laxi og sandhverfu í kjölfar sprautunar í vöðva með seyti *M. viscosa*.

Seyti *M. viscosa* var einangrað frá bakteríurækt, sem óx upp á sellófanþöktum agar-skálum. Seytinu var sprautað í vöðva (i.m.) laxs (110 g) og sandhverfu (15 g) í þynningum með mismikinn próteinstyrk, 1.6–50 µg próteini í hvert seiði. Fiskurinn var síðan alinn við 9°C og fylgst með honum í 25 daga. Allar stórsæjar breytingar voru skráðar og sýni fyrir smásjárskoðun tekin úr deyjandi fiski. Vefjasýni voru fixeruð í formalíni, skorin og lituð með Giemsa.

Lax drapst í hópum sem fengu 25 µg eða meira af seytispróteinum. Útreiknaður fimmtíuþúsundtíu prósent banaskammtur (LD₅₀) seytispróteina í laxi var 0.36 µg/gram fisks eftir 7 daga og 0.15 µg/gram fisks eftir 25 daga. Í húð og vöðva umhverfis stungustað komu fram miklar blæðingar og drep. Blæðingar og aukin blóðsókn sáust í ýmsum innri líffærum og í tálknum sást vægur ofvöxtur (hypertrophy). Glærhrörnun (hyalinization) og punktblæðingar sáust í hjarta. Minnsti banaskammtur sandhverfu var svipaður og laxsins, en LD₅₀ í sandhverfu var marktækt hærri en hjá laxi, eða 2.36 µg/gram fisks eftir 7 daga en 0.83 µg/gram fisks eftir 25 daga. Blæðingar, bjúgur og drep sáust í vöðva umhverfis stungustað. Í nýra voru blæðingar, drep og vöðvaskemmdir vegna loftbólumyndunar og glærhrörnun sást í hjarta sumra sandhverfa. Í tálknum voru fanir samvaxnar á nokkrum stöðum og einnig sást þar ofvöxtur.

Seyti *M. viscosa* er banvænt bæði laxi og sandhverfu og skýrt samband greindist á milli dauða og próteinmagns, sem sprautað var í seiðin. LD₅₀ var marktækt herra í sandhverfu en laxi, sem er í samræmi við það að lax er næmari en sandhverfa fyrir smiti bakteríunnar. Sjúklegar breytingar af völdum seytis *M. viscosa* voru hliðstæðar í laxi og sandhverfu, en höfðu þó almennt meiri útbreiðslu í laxinum.

V-8

***Aeromonas salmonicida* undirt. *achromogenes* sýkingar í íslenskum eldisþorski (*Gadus morhua*)**

*Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Matthías Eydal og Slavko H. Bambir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

Þorskeldi hefur verið stundað í nokkur ár á Íslandi. Í einni eldisstöðvanna eru villiseiði, 1-4 grömm að þyngd, veidd og alin í kerum í níu mánuði. Auk villiseiðanna er á sama stað alinn nokkur fjöldi seiða úr hrognum úr klakstöð Hafrannsóknastofnunarinnar á Stað við Grindavík. Sjó er dælt af 30 m dýpi í kerin. Eftir u.þ.b. níu mánaða keraeldi, eru seiðin, þá 100-200 g, flutt í sjókvíar og alin í 18-24 mánuði til slátrunar. Fylgst hefur verið reglulega með heilsufari þriggja árganga fiska í þessari stöð, bæði í kerum og í kvíum. Á þeim tíma hefur fjöldi fiska aukist, úr 60 þús fyrsta árið, 700 þús annað árið og í 1 milljón það þriðja.

Einn þeirra sýkla sem greindust var bakterían *Aeromonas salmonicida* undirtegund *achromogenes* (*Asa*) en hún veldur kýlaveikibróður í laxfiskum. Eftir því sem liðið hefur á eldisferlið hefur *Asa* valdið vaxandi vanda í eldinu, bæði í strandeldi og kvíum, en sjúkdómsfaraldrar tengjast jafnan óhagstæðum umhverfisaðstæðum. Þetta er ekki síst alvarlegt fyrir þá sök að ekki eru enn tiltæk virk bóluefni gegn sjúkdómnum. Þetta er ólíkt reynslu annarra þjóða sem stunda þorskeldi, en þar hefur *Asa* ekki enn valdið teljandi tjóni.

Af öðrum sýklum sem valda vaxandi vanda í íslensku þorskeldi er sníkjudýrið *Loma* sp. og bakterían *Listonella anguillarum*.

Óþekkt hnísildýr í íslenskri hörpuskel (*Chlamys islandica*) -hugsanleg orsök affalla í stofninum-

Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Slavko H. Bambir og Matthías Eydal
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Mikil afföll hafa orðið á íslenska hörpuskeljastofninum við Ísland síðustu ár og er stofnvísitalan nú aðeins um 20% af meðaltali árána 1996-2000. Afföllin virðast bundin við eldri skeljar (veiðistofn). Frumrannsókn á nokkrum skeljum, leiddi í ljós miklar hnísildýrasýkingar. Það varð upphaf að því verkefni sem hér er lýst.

Markmið verkefnisins er að tegundagreina hnísildýrin og kanna hugsanleg áhrif þeirra á heilsu hörpuskeljanna. Sýni hafa verið tekin úr Breiðafirði, Arnarfirði, Hvalfirði og Húnaflóa. Lifandi dýr eru rannsökuð, sníkjudýrin tegundagreind, tíðni og umfang sýkinga metin og vefjaskemmdir samfara sýkingum rannsakaðar. Kannað er samband sýkinga við aldur/stærð skelja, búsvæði og sjávarhita.

Tvær tegundir hnísildýra hafa greinst: 1) *Pseudoklossia/Margolisiella* tegund sýkir hjartapelsfrumur. Sýkingartíðni er nær 100% í öllum stærðarhópum skelja og á öllum sýnatökusvæðum. Samkvæmt nýjustu niðurstöðum (kemur ekki fram á veggspjaldi) er samband sýkingarmagns og stærðar skelja veikt. Engar afgerandi vefjaskemmdir hafa greinst samfara þessum sýkingum. 2) Óþekkt hnísildýr ("hnísildýr X") sýkir blóðfrumur og veldur einnig skemmdum á vöðvafrumum. Sníkjudýrið finnst í skeljum frá öllum sýnatökusvæðum og er sýkingartíðni nálægt 100% í stærri skeljum á öllum sýnatökusvæðum (>3sm) en talsvert lægri í minni skeljunum. Marktækt jákvætt samband er milli sýkingarmagns og stærðar skelja. Í miklu sýktum skeljum sjást stórsæ sjúkdóm-seinkenni í aðdráttarvöðva og vefjaskemmdir samfara sýkingunum eru oft umfangsmiklar. Sníkjudýrið er ólíkt öllum hnísildýrum sem þekkt eru í skeldýrum. Lífsform eru mörg, bæði kyn- og kynlaus, en það bendir til þess að lífsferill sníkjudýrsins sé allur í hörpuskelinni.

Ein *Pseudoklossia* tegund, *P. pectinis*, hefur áður greinst í *Pecten maximus*, sem er skyld hörpuskel. Svo virðist sem tegundin í hörpuskelinni sé áður óþekkt. Ekki virðist samband milli sýkingar þessarar tegundar og affalla í hörpuskeljastofninum. Hnísildýr X virðist einnig vera áður óþekkt tegund. Vefjaskemmdir og stórsæ einkenni fylgja mikilli sýkingu og marktækt samband er á milli smitmagns og affalla í hörpuskeljastofninum.

Greining *Campylobacter* smits í saur alifugla – samanburður á PCR tækni og hefðbundnum ræktunaraðferðum

*Sigríður Hjartardóttir¹, Vala Friðriksdóttir¹, Signý Bjarnadóttir¹, Guðbjörg Jónsdóttir¹,
Katrín Ástráðsdóttir¹, Eggert Gunnarsson¹ og Jarle Reiersen²*

¹*Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,*

²*Embætti yfirdýralæknis*

Campylobacter sýking er algengasta orsök matarsýkinga á Íslandi í dag. Ein aðaluppspretta sýkingarinnar eru alifuglar, sérstaklega þó kjúklingar en neysla á kjúklingum hefur stóraukist á kostnað annarra kjötafurða hin síðari ár.

Á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum er unnið við eftirlit á *Campylobacter* mengun í alifuglaeldi. Eftirlitið byggir á því að tekin eru saursýni úr fuglunum fyrir slátrun og þeim sáð út með hefðbundnum aðferðum á sértækan agar sem greinir *Campylobacter* þyrpingar frá öðrum bakteríum í saur. Þeim eldishópum sem greinast *Campylobacter* jákvæðir er slátrað sér og kjötið fryst. Jafnframt eru tekin botnlangasýni úr hverjum sláturhóp og ræktað frá þeim á sama hátt og saursýnunum.

Stundum kemur fyrir að *Campylobacter* greinist við slátrun en ekki í eldi. Þá getur krossmengun átt sér stað milli neikvæðra og jákvæðra hópa í sláturhúsinu og hætta á að menguð vara fari á markað. Mikilvægt er að fá að vita með sem stystum fyrirvara ástand eldisstofnsins áður en til slátrunar kemur. Ein þeirra aðferða sem kemur til álita að nota er PCR tækni.

Tekin voru sýni úr eldisfuglum yfir sumarmánuðina árið 2004.. Saursýnunum var sáð á 2 tegundir af sértækum agar auk þess sem DNA var einangrað úr sýnunum. Notaðir voru vísar sem magna upp raðir á 16S rRNA baktería sem tilheyra flokki *Campylobacter spp.*

Niðurstaðan er sú að sameindalíffræðilega aðferðin, PCR tæknin, er bæði næmari og hraðvirkari en hefðbundnu ræktunaraðferðirnar en hún tekur u.þ.b. 8 klst á móti 48 klst sem ræktanirnar taka.

Til þess að tryggja sé að menguð vara blandist ekki saman við ómengaða við slátrun þarf að stytta þann tíma sem tekur að greina *Campylobacter* í saur eldisdýra. PCR aðferðin er kjörin til þessara nota.

Faraldsfræði *Campylobacter* smits í kjúklingum – getur hænan smitað eggjö/ungann?

*Vala Friðriksdóttir¹, Eggert Gunnarsson¹, Guðbjörg Jónsdóttir¹, Katrín Ástráðsdóttir¹,
Kolbrún Birgisdóttir¹, Signý Bjarnadóttir¹, Sigríður Hjartardóttir¹, Jarle Reiersen², Ruff
Lowman³, Kelli Hielt⁴, Ken Callicott⁴, Norman J. Stern⁴ og “Campy-on-Ice” hópurinn
¹Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,
²Embætti yfirdýralæknis,
³Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario, Canada,
⁴USDA-ARS, Russell Research Center, Athens, Georgia, USA*

Campylobacter smit af innlendum uppruna var frekar sjaldgæft í mönnum hérlendis þar til upp kom faraldur 1998-2000 sem rakinn var til neyslu á ferskum kjúklingum. Í framhaldi af þeim faraldri varð *Campylobacter* eftirlit hluti af reglubundnu eftirliti í alifuglaframleiðslu.

Árið 2001 var hleypt af stökkunum samstarfsverkefni “Sources and Risk Factors for *Campylobacter* in Poultry and Impact on Human Disease in a Closed System”. Tekin hafa verið tekin sýni á mismunandi stigum kjúklingaeldis til að reyna að rekja *Campylobacter* smit í kjúklingum og koma auga á helstu smitleiðir. Hér verður lýst þeim hluta sem snýr að athugun á því hvort “lóðrétt smit” (vertical transmission) geti átt sér stað í kjúklingaeldi, þ.e. hvort smit geti borist frá foreldri til afkvæmis í gegnum egg.

Á tímabilinu júní 2001- júní 2003 voru tekin sýni úr forfeðrahópum í Svíþjóð (í tengslum við innflutning á frjóvuguðum eggjum), úr foreldrafuglum 6 vikum eftir klak og úr sömu hópum 19 vikna gömlum. Við ræktun á *Campylobacter* voru notaðar hefðbundin NMKL aðferð og Campy-Cefex aðferð.

Campylobacter ræktaðist úr helmingi forfeðrahópa í Svíþjóð á sama tíma og sýni úr 6 vikna foreldrafuglum í sóttkví voru öll neikvæð. Þegar sömu hópar foreldrafugla voru svo prófaðir aftur 19 vikna gamlir voru um 70% hópanna orðnir jákvæðir. Ekki fannst samræmi á milli *Campylobacter* stofna sem einangruðust úr forfeðrahópum og stofna sem fundust í foreldrafuglum við 19 vikna aldur.

Okkar niðurstöður sýna, að þó að egg komi til landsins úr fuglum sem smitaðir eru af *Campylobacter* þá finnst bakterían ekki í afkvæmum þessara fugla eftir klak. Þegar *Campylobacter* ræktast síðan úr afkvæmunum þegar þau eldast er það vegna ytri aðstæðna þ.e. umhverfis og umgengni, en ekki vegna smits frá foreldrum.

Eftirlit með *Campylobacter* sýkingum í mönnum og alifuglum á Íslandi

Jarle Reiersen¹, Hjördís Harðardóttir², Eggert Gunnarsson³, Vala Friðriksdóttir³,
Guðrún Sigmundsdóttir⁴ og Karl G. Kristinsson²

¹Embætti yfirdýralæknis,

²Sýkladeild Landspítala Háskólasjúkrahúss,

³Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,

⁴Embætti sóttvarnarlæknis

Frá því í júní 1998 til mars árið 2000 var nánast faraldur hér á landi í fólki af völdum *Campylobacter* sýkla. Faraldurinn mátti að mestu rekja til aukningar á smiti innanlands. Í byrjun árs 2000 var komið á laggirnar öflugu eftirliti með *Campylobacter* í alifuglaframleiðslu. Þetta eftirlitskerfi lagði grunn að íhlutandi aðgerðum með alifuglaframleiðslu. Gert var að skyldu að frysta allar alifuglaafurðir úr eldishópum sem reyndust jákvæðir m.t.t. *Campylobacter* við sýnatöku 2 – 3 dögum fyrir slátrun. Þessar aðgerðir leiddu til umtalsverðrar fækkunar á *Campylobacter* sýkingum í fólki. Meðalfjöldi innlends smits sem hlutfall af heildar fjölda smitaðra á árunum 2000 – 2004 var 85/172 (frá 51 – 117 af 91 - 245) á móti 326/435 árið 1999. Þetta jafngildir fækkun á tilfellum af innlendum toga um 74 % og 60 % fækkun heildarfjölda *Campylobacter* sýkinga. Meðal árlegt sýkingarhlutfall eldishópa árin 2000 – 2004 var 16. 7 % (13.7 % - 19,2 %). Hittni ræktunar á eldissýnum var frá 53.5 % til 67. % og voru afurðir þessara eldishópa frystar eftir slátrun. Þrátt fyrir aðgerðir sem miðuðu að því að útrýma *Campylobacter* í alifuglaeldi sýna niðurstöður eftirlitssýna enga marktæka minkun *Campylobacter* mengunar í eldishópum. Hins vegar hefur eftirlitskerfið reynst gagnlegt til þess að ákveða hvaða eldishópar skuli frystir eftir slátrun.

Til þess geta beitt viðdeigandi ráðstöfunum í því skini að draga úr hættu á smiti í menn telja höfundar því mikilvægt að greina þá eldishópa sem eru mest smitaðir. Lækkun tíðni *Campylobacter* sýkinga í mönnum sýnir að öflugt eftirlit með alifuglaframleiðslunni skilar árangri.

Sýklalyfjaónæmi í *Salmonella* spp. úr kjúklingum og svínum á Íslandi árin 2001-2005

*Þórunn R. Þorsteinsdóttir*¹, *Karl G. Kristinsson*² og *Eggert Gunnarsson*¹
¹*Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum,*
²*Sýkladeild, Landspítali Háskólasjúkrahús*

Síðustu ár hafa áhyggjur yfir auknu ónæmi baktería fyrir sýklalyfjum farið vaxandi um allan heim. Ónæmir stofnar verða sífellt stærra hlutfall af stofnum einangruðum úr sýkingum í mönnum og margar rannsóknir hafa sýnt fram á að ónæmir stofnar sem sýkja menn, þar á meðal stofnar *Salmonella* sp., eru oft upprunnir úr dýrum.

Lítið er vitað um sýklalyfjaónæmi baktería í dýrum á Íslandi og hafa engar rannsóknir verið gerðar á þessu sviði hér á landi. Megin markmið þessarar rannsóknar var að kanna tíðni sýklalyfjaónæmis og serótýpudreifingu *Salmonella* sp. einangruðum úr kjúklingum og svínum á Íslandi á fimm ára tímabili.

102 stofnar *Salmonella* sp., sem einangraðir voru úr heilbrigðum kjúklingum og svínum í reglubundnu eftirliti á sýkladeild Keldna árin 2001-2005, voru prófaðir fyrir næmi fyrir 12 sýklalyfjum. Til að meta ónæmi var notuð svokölluð MIC (Minimum Inhibitory Concentration) aðferð. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) rafdráttaraðferð var notuð til að bera saman ónæma stofna og meta hvort um sama eða skylda klónastofna var að ræða. Ónæmir *S. Typhimurium* stofnar voru einnig greindir til fagatýpu (DT).

Alls greindust 13 ónæmir stofnar, þar af voru 11 upprunnir úr svínum en 2 úr kjúklingum. Tólf ónæmu stofnanna voru af serótýpu *S. Typhimurium* en einn af serótýpu *S. Infantis*. *S. Infantis* stofninn var einangraður úr svínum og var ónæmur fyrir einu sýklalyfi. Níu stofnar af serótýpu *S. Typhimurium* voru fjölonæmir og tilheyra DT 104, sem er vel þekktur sýkingarvaldur bæði í dýrum og mönnum. Greindust þessir stofnar bæði í svínum og kjúklingum og skiptust í 2 mjög lík PFGE mynstur. Aðrir *S. Typhimurium* stofnar einangruðust úr svínum og tilheyrðu DT 3 og DT 208 og voru ónæmir fyrir einu til þremur sýklalyfjum. Greindust þessir þrír stofnar einnig í 2 mjög lík PFGE mynstur sem þó voru frábrugðin þeim mynstrum sem einkenndu DT 104 stofnana.

Tíðni *Salmonella* sp. í kjúklingum og svínum er mjög svipuð á Íslandi og hinum Norðurlöndunum og niðurstöður þessarar rannsóknar benda til þess að tíðni ónæmra stofna sé það einnig. DT 104 virðist vera ráðandi týpa meðal ónæmra stofna á Íslandi. Hún virðist vera viðloðandi á einstaka búum þar sem hún kemur ítrekað upp en einnig getur hún borist inn á ný bú með fóðri.

Járn og járn/mangan-hlutfall í heyi á íslenskum sauðfjárbúum: Tengsl við riðu

*Kristín Björg Guðmundsdóttir¹⁾, Sigurður Sigurðarson²⁾, Jakob Kristinsson³⁾
Tryggvi Eiríksson⁴⁾ og Þorkell Jóhannesson³⁾*

1) Rannsóknadeild dýrasjúkdóma, Keldum,

2) Rannsóknadeild dýrasjúkdóma, Keldum, og Landbúnaðarstofnun,

3) Rannsóknastofa í lyfja- og eiturefnafræði, Háskóla Íslands

4) Landbúnaðarháskóli Íslands, Keldnaholti

Riðuveiki (riða) í sauðfé hefur um árabil verið kostnaðarsamasti sjúkdómurinn í íslensku búfé. Þrátt fyrir harðar aðgerðir gegn riðu kemur hún enn upp í fé á bæjum einkum á svæðum norðan-, sunnan- og austanlands. Það hversu þrálát veikin er á vissum svæðum gæti bent til þess að þættir í umhverfinu, t.d. snefilefni í fóðri, skipti máli fyrir uppkomu hennar. Markmið þessarar rannsóknar var að kanna hvort einhver tengsl væru milli járnþéttni í heyi og staksettrar (sporadic) uppkomu klínískrar riðu í sauðfé á bæjum á nokkrum svæðum á Íslandi. Þar sem járn og mangan eru talin vera andvirk efni (antagonists) í plöntum, bæði með tilliti til samkeppni um frásog frá jarðvegi og bindingu við ensím (Adriano 2001), voru járn/mangan-hlutföll í heysýnunum jafnframt reiknuð. Var í því efni notast við niðurstöður fyrri manganákvarðana í sömu sýnum.

Safnað var samtals 172 heysýnum á 47 bæjum af uppskerum árána 2001, 2002 og 2003. Bæjunum var skipt í 4 flokka eftir því hvort og hvenær riða hefur komið þar upp. 1. *Riðulausir bæir á riðulausum svæðum*: Bæir á svæðum þar sem riða hefur aldrei verið greind. 2. *Riðulausir bæir á riðusvæðum*: Bæir sem hafa verið riðulausir a.m.k. frá 1960, á svæðum þar sem riða hefur margoft komið upp á öðrum bæjum eftir þann tíma. 3. *Fjárskiptabæir*: Bæir þar sem riða hefur komið upp eftir 1980 og fé verið fargað og síðan aftur verið fengið heilbriggt fé af riðulausum svæðum. 4. *Riðubæir*: Bæir þar sem riða var í gangi á rannsóknatímabilinu (2001 - 2004). Járn og mangan var ákvarðað í sýnunum með ICP-tækni.

Mest var af járn í heyi frá riðubæjunum og var það að meðaltali marktækt meira ($P = 0,001$) en í heyi frá bæjum í hinum flokkunum. Meðal-járn/mangan-hlutfall í heyi frá riðubæjum var einnig marktækt hærra en í heyi frá riðulausum bæjum (flokkar 1 og 2) og fjárskiptabæjum, og munurinn var hámarktækur ($P < 0,001$).

Járn í íslensku heyi virðist vera mikið, og raunar svo mikið, ef tekið er mið af erlendum tölum, að jaðri við ofgnótt eða eitrun í plöntum í vissum tilvikum. Þetta á einkum við hey frá riðubæjum. Við höfum áður bent á að þéttni mangans væri að meðaltali marktækt minni í heysýnum frá riðubæjum en í heysýnum frá fjárskiptabæjum eða riðulausum bæjum (flokkar 1 og 2 saman). Í okkar rannsóknum fór því saman mikið járn og lítið mangan í heysýnum frá riðubæjum og svo aftur á móti minnkandi járn/mangan-hlutfall í heysýnum eftir því sem uppkoma klínískrar riðu var talin ólíklegri. Samanlagt teljum við því að þetta bendi eindregið til þess að hey frá riðubæjum sé með tilliti til þéttni þessara snefilefna öðruvísi en hey frá bæjum í öðrum riðuflokkum.

Nánari rannsókn á járn og mangan í jarðvegi og fóðri á sauðfjárbúum kann því að vera lykillinn að frekari skilningi á því hvers vegna riða kemur þrífaldlega upp á sumum sauðfjárbúum en ekki öðrum búum í næstu grennd.

Selen í hrútum metið með ákvörðunum á GPX-virkni í blóði

*Sigurður Sigurðarson¹⁾, Kristín Björg Guðmundsdóttir²⁾, Jakob Kristinsson³⁾,
Þorkell Jóhannesson³⁾ og Tryggvi Eiríksson⁴⁾*

1) Rannsóknadeild dýrasjúkdóma, Keldum, og Landbúnaðarstofnun,

2) Rannsóknadeild dýrasjúkdóma, Keldum,

3) Rannsóknastofa í lyfja- og eiturefnafræði, Háskóla Íslands,

4) Landbúnaðarháskóli Íslands, Reykjavíkurstur, Keldnaholti

Vitað er að selenþéttni er lítil í heyi af ræktuðu landi hérlendis, og einkenni um selen-skort í sauðfé (einkum lömbum) eru útbreidd. Við höfum bent á að þéttni selens í blóði áa telst nægjanleg að hausti, en er að vori oftast nærri skortsmörkum. Þetta kemur heim og saman við það að meðganga veldur álagi á selenbúskap ána, og magn selens í heiða- og hálendisgróðri virðist samkvæmt eldri rannsóknum vera mun meira en í gróðri á ræktuðu landi og útjörð á láglandi. Fram til þessa hefur selen nær ekkert verið rannsakað í hrútum á Íslandi. Ensímið glútationperoxídasi (GPX) í blóði sauðfjár (og fleiri dýrategunda) inniheldur selen. Þar sem ákvarðanir á GPX-virkni eru mun ódýrari en selenmælingar, eru GPX-gildi oft notuð til að fá hugmynd um selenbúskap húsdýra, einkum við skimun á selen. GPX-virkni í blóði sem er minni en 100 einingar/g hemóglóbíns (Hb), bendir á selenskort.

Efni og aðferðir: Alls var á tímabilinu nóvember 2005 – janúar 2006 safnað blóðsýnum úr 23 hrútum, 2ja–5 vetra, á 8 bæjum. GPX-virkni var ákvörðuð með ljósgleypni (spectrophotometric assay). Niðurstöður eru gefnar upp sem einingar/g Hb.

Niðurstöður: GPX-gildi í blóði hrútanna voru á bilinu 83-704 ein./g Hb. Fimm hrútar á einum bæ höfðu sumarlangt og fram á haust gengið á mýrlendi, uns þeir voru teknir á hús í byrjun nóvember. Þeir höfðu verið fóðraðir á heyi, en ekki fengið nein sölt eða annað fóður. GPX-gildi þeirra voru innan við 100 ein./g Hb eða lítið eitt þar yfir, enda þótt GPX-virkni í blóðsýni úr ánum á bænum, sem gengið höfðu sumarlangt í fjalllendi, væri með einni undantekningu yfir þessum mörkum, og venjulega langt yfir þeim.

Á hinum bæjunum sjö voru GPX-gildi í blóði allra hrúta, að tveimur undanskildum, vel umfram 100 ein./g Hb. Athygli vakti, hve GPX-gildi voru há í tveimur hrútum sem eingöngu voru fóðraðir á há, og í einum hrúti sem gengið hafði í fjalllendi yfir sumar-tímam, en ekki fengið neina selenuppbót eftir að hann var tekinn á hús.

Ályktanir: Ofangreind skimun á selen í 23 hrútum, dæmt á grundvelli GPX-gilda í blóði, er ekki tæmandi. Hún gefur þó vísbendingu um að gjöf selens á formi saltsteina, fóðurbætis eða stungulyfs (með eða án E-vítamíns) tryggi að GPX-gildin séu oftast vel ofan ætlaðra skortsmarka. Þessu var öðruvísi farið um hrúta, sem verið höfðu á mýrlendi og ekki höfðu fengið neina selenuppbót eftir að hafa verið teknir á hús. Þessir hrútar gætu því hafa verið nærri skortsmörkum. Há GPX-gildi í blóði þess hrúts sem gekk í fjalllendi benda hins vegar til þess að fjallagróður sé öflugur selengjafi og hið sama virðist einnig eiga við um há, ef dæma má út frá háum GPX-gildum í blóði þeirra tveggja hrúta sem fóðraðir voru á há eingöngu eftir að þeir voru teknir inn.

Selenskortur er engu minna mál í hrútum en ám og því er full þörf á ítarlegri rannsókn á selenbúskap hrúta. Sérstakt mál er svo að kanna vægi háar sem selengjafa.

Leit að stökkbreytingum í *LIMD1* og *LTF* genum á CER1 svæði á mannalitningi 3p21.3 í 10 mismunandi æxlisgerðum

Dórgunnur Eyfjörð Pétursdóttir¹, Unnur Þorsteinsdóttir², Stefan Imreh³, Valgarður Egilsson¹, Jóhannes Björnsson¹, Sigurður Ingvarsson⁴

1) Rannsóknarstofa í meinafræði, Landspítali Háskólasjúkrahús,

2) Íslensk erfðagreining,

3) Karolinska stofnunin, Stokkhólmur, Svíþjóð

4) Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Stutti armur litnings 3 í mönnum er afbrigðilegur í flestum æxlum. Et (elimination test) er próf sem var hannað til að finna litningasvæði sem eru líkleg til að innihalda æxlisbæligen. Prófið byggir á því að örfrumur sem innihalda aðeins einn litning (3 í þessu tilviki) eru látnar renna saman við illkynja krabbameinsfrumur úr mús eða manni. Við samrunan varð bæling á æxlismyndunargetu samrunafrumanna í ónæmisbældum músum. Eftir nokkrar sáningar gátu þessar frumur þó aftur farið að mynda æxli. Við nánari athugun með FISH og microsatellite greiningu kom í ljós að ákveðið svæði á 3p21.3 hafði tapast af viðbætta litningnum í öllum æxlum sem höfðu myndast. Svæðið var nefnt CER1 (common eliminated region 1). Á svæðinu eru 34 virk gen, miðað við núverandi þekkingu á þeim genum sem á svæðinu eru koma 2 þeirra helst til greina sem æxlisbæligen. Þetta eru *LIMD1* (LIM domain containing gene 1) og *LTF* (lactotransferrin). Nokkrar rannsóknir benda til þess að *LTF* próteinið eigi þátt í að verjast myndun bæði krabbameina og meinvarpa. Rannsókn sem var gerð bæði með lungnakrabbameins frumulínu og æxlisvef úr lungum leiddi í ljós að *LIMD1* próteinið virkar í pRB (Retinoblastoma prótein) ferlinu, sem er vel þekktur og mikilvægur ferill í tengslum við æxlisbælingu.

Efniviðurinn samanstendur í heild af 576 mannaæxlum frá 10 líffærum. Gerð var LOH greining með microsatellite erfðamörkum. Útraðir voru skimaðar fyrir stökkbreytingum með SSCP aðferð og mögulegar stökkbreytingar síðan skilgreindar með raðgreiningu.

Við rannsökuðum úrfellingatíðni á CER1 og bárum saman við tíðni úrfellinga í sama efnivið á tveimur öðrum þekktum æxlisbæligena svæðum á 3p. Úrfellingatíðnin var hæst á CER1 svæðinu (84%). Við skimuðum æxlin fyrir stökkbreytingum í *LIMD1* með SSCP og fundum fjölbreytileika í nokkrum æxlum. Til þess að skilgreina eðli þessa fjölbreytileika raðgreindum við sýnin. Engar stökkbreytingar reyndust vera í *LIMD1* geninu. Samskonar leit að stökkbreytingum stendur nú yfir í tengslum við *LTF* genið.

Þar sem við fundum mjög háa tíðni úrfellinga á CER1 bendir það til þess að á svæðinu geti verið eitt eða fleiri æxlisbæligen. Úrfellingarnar voru ekki vefjasértækar þar sem há tíðni fannst í öllum æxlisgerðum eða 70-94% nema í sarkmeinum þar sem tíðnin var 40%. Þó að *LIMD1* genið sé ekki stökkbreytt í æxlum úr mönnum höfum við ekki útilokað að um æxlisbæligen geti verið að ræða. Við munum kanna tjáningu þess í æxlum og bera saman við eðlileg sýni. Ef tjáning er minnkuð munum við kanna hvort um “epigenetiskar” breytingar geti verið að ræða.

V-17

Taugasækni mæði-visnuveirunnar

Þórður Óskarsson, Hulda S. Hreggviðsdóttir, Ólafur S. Andrésson, Sigurður Ingvarsson og Valgerður Andrésdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Mæði-visnuveira (MVV) tilheyrir flokki lentiveira og er því náskyld eyðniveirunni (HIV). Veiran sýkir kindur og veldur aðallega lungnabólgu (mæði), en oft veldur hún einnig heilabólgu (visnu). Veiran gekk hér á landi á árunum 1933-1965 og var lungnabólga algengust þó að visna væri aðaleinkenni í sumum kindahjörðum. Sett hefur verið fram sú tilgáta að sumir MVV stofnar séu heilasæknari en aðrir, og hafa slíkar tilgátur einnig verið settar fram um HIV-1 stofna.

Aðalmarkfrumur MVV eru átfrumur. MVV stofnar úr mæðilungum og visnuheilum hafa verið rannsakaðir á Keldum, og hefur fundist basaröð í stjórnröðum (LTR; long terminal repeat) sem þarf að vera tvöföld til þess að veiran geti vaxið í öðrum frumum en átfrumum, þ.e. æðaflækjufrumum, liðþelsfrumum og fibroblöstum.

Í þessari tilraun voru veirur úr heila- og lungnasýnum úr kindum sem höfðu verið með visnu eða mæði skoðaðar og athugað hvort tvöföldunin væri til staðar í þeim. DNA var einangrað úr heila- og lungnasýnum í vaxkubbum. LTR svæðið var magnað upp með PCR, klónað í vektor og raðgreint. Átta lungnasýni (úr mæðikindum) frá árunum 1954-1965 og fjögur heilasýni (úr visnukindum) frá 1949 og 1954 voru skoðuð. Í ljós kom að visnusýnin voru með tvöföldun, en mæðisýnin ekki. Niðurstöðurnar benda því til þess að veirur með þessa tvöföldu basaröð í LTR séu taugasæknari en veirur með einfalda röð. Líklegt er að veirur sem geta vaxið í frumum sem hindra flutning úr blóði í heila (mynda blood-brain barrier), t.d. æðþelsfrumum smáæða heilans, eigi greiðari leið inn í heila en veirur sem aðeins geta vaxið í átfrumum.

Stökkbreytingu Vif próteins mæði-visnuveiru

*Sigríður Rut Franzdóttir, Sigríður Matthíasdóttir, Ólafur S. Andr sson og
Valgerður Andr sdóttir*

Tilraunastöð Háskóla Íslands   meinafræði að Keldum

Mæði-visnuveira (MVV) er af hópi lentiveira og náskyld HIV veirunni. Allar lentiveirur nema hrossaveiran EIAV bera *vif* gen og er afurð þess nauðsynleg fyrir s kingargetu veiranna. Nýlega kom   ljós að Vif prótein HIV-1 veiru ver erfðaefni hennar gegn afam neringu cytid ns   meðan   víxlritun stendur með því að koma   veg fyrir innlimun cytid n deam nasans APOBEC3G og skyldra próteina  r myndunarfrumu   veiruagnir. APOBEC3 virðist vera að finna   öllum spend yrum og fyrri niðurstöður hafa bent til þess að Vif prótein MVV verji veiruna gegn slíkum próteinum. Rannsóknin beindist að þessu hlutverki Vif.

Stökkbreytingar voru innleiddar   *vif* genið með PCR aðferð og áhrif þeirra   veiruv xt og afam neringu v xlritunarafur a metin.   afl kjufurur og f sturli pelsfurur  r kindum voru s ktar með st kkbreyttum veirustofnum og veirufj lgun metin með því að m la veiru-RNA með rauntíma RT-PCR. Einnig var veiru cDNA kl na  og ra greint.

Breytingar bæði   C- og N-helmingi Vif próteinsins höfðu áhrif   s kingarh fni veiranna sem rekja m tti til aukinnar tíðni G-A stökkbreytinga   veirunum en þær eru vísbendingar um afam neringu cytid ns. Ein innleidd breyting   C-helmingi Vif hafði engin áhrif ein og s r en dró  r s kingarh fni veiranna þegar hún var kl nu    veiru með breytt hylkispr tein. Veirur með þessa breytingu urðu ekki fyrir afam neringu og benda niðurstöðurnar til þess að Vif gegni fleiri en einu hlutverki og að fleiri frumuþ ttir en cytid n deam nasar komi þ r við sögu.

V-19

Notkun RNA þöggunar til að slá á tjáningu cystatin-c og PrP^C í frumuræktum

*Birkir Þór Bragason, Herborg Hauksdóttir, Stefanía Þorgeirsdóttir og Ástríður Pálsdóttir
Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum*

Þöggun á genatjáningu með stuttum RNA sameindum (RNA interference) er aðferð sem verður sífellt fyrirferðameiri í birtum greinum innan sameindalíffræðinnar. Aðferðin byggir á því að nýta ensímkerfi sem fyrir er í frumum margra tegunda, m.a. spendýrafrumum, og er varðveitt í þróunarfræðilegum skilningi. Afurð þessa ensímkerfis eru stuttar RNA sameindir, og RNA þöggun grundvallast á samsvörun þeirra við mRNA, með þeim afleiðingum að þýðing mRNA sameindanna er hindruð, í sumum tilfellum vegna beins niðurbrots á mRNAinu. Líffræðilegt hlutverk ensímkerfisins er m.a. vörn gegn veirum og stökklum, auk þess gegnir það mikilvægu hlutverki í stjórnun genatjáningar í þroskun. Fyrir utan að vera athyglisvert í líffræðilegum skilningi, þá er hægt að nota RNA þöggun til að slá á tjáningu ákveðinna gena markvisst, t.d. í frumuræktum, og getur það verið gagnlegt rannsóknartæki í frumulíffræði.

Á Keldum er verið að vinna að rannsóknum á arfgengri heilablæðingu og riðuveiki. Í báðum sjúkdómum gegnir eitt prótein lykilhlutverki, þ.e. cystatin-c í arfgengri heilablæðingu og príon-próteinið (PrP^C) í riðu. Innan þessara verkefna er unnið að því að finna stuttar RNA sameindir sem geta slegið á tjáningu cystatin-c og PrP^C, til að nota við rannsóknir á frumulíffræði próteinanna. Notaðar hafa verið frumur sem eru genaleiddar með plasmíðum sem tjá annaðhvort cystatin-c-EGFP eða PrP^C-EGFP (EGFP: grænt flúrprótein) auk plasmíðs sem tjáir eina stutta RNA sameind. Þrjár mismundi RNA sameindir hafa verið prófaðar fyrir cystatin-c og tvær fyrir PrP^C. Áhrif þeirra á tjáningu PrP^C og cystatin-c hafa verið metin með flúrljómun og með prótein-þrykki. Þær niðurstöður sem fyrir liggja verða kynntar.

Í stuttu máli þá höfðu fjórar af fimm RNA sameindum áhrif, mismikil þó. Mest þöggun fékkst með RNA sameindunum gegn PrP^C.

GLITNIR

