

**Effekt av ulike immuniseringsregimer mot pankreassykdom (PD)  
hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), og betydningen av lakselus  
(*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) som stressfaktor  
ved immunisering.**

Master i fiskehelse

Lisa Marie Leknes



Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen

Juni 2016



# Innholdsfortegnelse

---

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>2</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>4</b>
1.1 Salmonid alfavirus (SAV) .....	<b>4</b>
1.1.1 Klinikk og patologi .....	<b>5</b>
1.1.2 Spredning av SAV .....	<b>7</b>
1.1.3 Viruskarakteristikk .....	<b>8</b>
1.2 Vaksinerings mot virussykdommer .....	<b>9</b>
1.3 Vertens immunrespons ved en SAV-infeksjon .....	<b>11</b>
1.4 Mål for studien .....	<b>13</b>
<b>2. Material og metoder</b> .....	<b>14</b>
2.1 Forsøksoppsett .....	<b>14</b>
2.1.1 Forsøksfisk, vaksiner og virus .....	<b>14</b>
2.1.2 Vaksinerings og smitte .....	<b>16</b>
2.1.3 Prøvetakning .....	<b>20</b>
2.2 RNA-ekstraksjon .....	<b>20</b>
2.3 Revers transkriptase (RT)- cDNA syntese.....	<b>21</b>
2.4 Polymerase kjedereaksjon (PCR) .....	<b>22</b>
2.5 Gel elektroforese .....	<b>23</b>
2.6 Real-time RT-PCR .....	<b>24</b>
2.7 Normalisering av data .....	<b>25</b>
2.8 Celledyrking/ re-isolering .....	<b>26</b>
2.9 Histologi .....	<b>27</b>
<b>3. Resultater</b> .....	<b>28</b>
3.1 Uttak før forsøksstart .....	<b>28</b>
3.2 Vekt .....	<b>28</b>
3.3 Dødelighet .....	<b>29</b>
3.4 Makroskopiske endringer og histologi .....	<b>31</b>
3.5 Real-time RT-PCR analyse av vevsprøver.....	<b>38</b>
3.5.1 Prevalens .....	<b>38</b>
3.5.2 Relativ kvantifisering av viralt RNA i hjertevev.....	<b>39</b>

---

---

3.6 Celledyrking og sekvensering.....	41
3.7 Del 2- Lakselus .....	41
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Konklusjoner .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Kildehenvisning.....</b>	<b>55</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>64</b>

---

## Forord

Denne studien ble utført hos Fiskesykdomsgruppen ved Universitetet i Bergen, i samarbeid med PHARMAQ AS.

Jeg ønsker å rette en stor takk til alle som på ulike vis har bidratt til denne oppgavens endelige form.

Uten PHARMAQ sin støtte hadde ikke dette arbeidet latt seg gjøre. De har stilt opp med økonomiske midler, veiledning og faglig ekspertise. Jeg vil spesielt rette en stor takk til Rolf Hetlelid Olsen. Det er ikke gitt for en student å møte en så god person, som med sitt kloke hode og reflekterte tanker har loset meg gjennom dette arbeidet. Mari Solheim, du har betydd mer enn du aner, både som kollega og venn. En stor takk til mine kollegaer Frode Finne-Fridell, Renate Johansen, Marius Karlsen og Espen Brudal for støtte, oppmuntring og for at dere raust delte deres faglige kunnskap.

Are Nylund, tusen takk for konstruktiv kritikk, lærerike tilbakemeldinger underveis og for at du ville være min veileder. Etter litt slinger i valsen, så kom vi i mål. Heidrun Nylund, jeg takker deg for all tålmodig og grundig veiledning på laboratoriet. Takk til Steffen Hageselle Blindheim for all hjelp på cellelaben.

Takk til Andreas Steigen, som oppfylte vår drøm ved å ta oss med til Uganda. Turen ga oss et spesielt samhold og en unik erfaring, og var en super oppvarming til et langt år med skriving av masteroppgave. Du er et av de mest dedikerte og helstøpte menneskene jeg kjenner!

Linda Andersen, takk for at du ville bruke av dyrebar tid og være min bi-veileder. Du er en faglig ressurs og du har et hjerte av gull.

Til mine klassekamerater. Takk for at dere har delt både oppturer og nedturer med meg i disse fem årene som har gått. Det har vært en glede å bli kjent med hver og én i sær. Deres fremtidige arbeidsgivere og kollegaer er utrolig heldige som får bli kjent med dere.

Sist, men ikke minst, min familie. Mamma, jeg er sikker på at det ikke finnes en jordmor i hele verden som kan så mye om PD og SAV som det du gjør nå. Tusen takk for gjennomgang av oppgaven, retting av skrivefeil og for at du alltid syntes jeg er best. Mormor, Frida, Robert og Alfred, jeg elsker dere.



Bergen 29.05.15

## Sammendrag

Den kommersielle vaksinestrategien som hittil har vært brukt i Norge for å bekjempe pankreassykdom (PD) har ikke hatt optimal effekt, ettersom en fremdeles opplever sykdom og dødelighet, til tross for vaksinasjon. Det er foreslått at tilstedeværelse av lakselus kan være en faktor som bidrar til å redusere effekten av vaksiner i felt. I denne studien er det testet ut to ulike immuniseringsmetoder for PD. Én fiskegruppe ble vaksinert mot PD med en inaktivert helvirusvaksine med SAV3 som én av komponentene (IHV-SAV3), og én fiskegruppe ble injisert i.p. med villtype SAV i ferskvann. Begge gruppene ble overført til sjøvann og smittet med SAV i en kohabitant smittemodell, 756 d/°C etter immunisering. Halvparten av karene ble tilsatt copepoditter av lakselus. Dette ble gjort for å undersøke i hvilken grad en slik stressfaktor ville kunne påvirke mottakelighet og beskyttelse av immuniseringen.

Det oppstod en signifikant bedre beskyttelse mot PD ved immunisering med levende virus, enn det en kunne se ved vaksiner med en inaktivert helvirusvaksine. Begge immuniseringsmetodene ga likevel beskyttelse mot SAV-indusert dødelighet, lesjoner i hjertevev og høye nivåer av virus.

Tilstedeværelse av lakselus førte til en redusert effekt av vaksinen IHV-SAV3. Den vaksinerte fisken som hadde blitt eksponert for lakseluscopepoditter hadde signifikant høyere nivåer av virus i hjertevev, sammenlignet med fisken som ikke var blitt utsatt for denne stressfaktoren.

Forsøket bekrefter tidligere studier, der en har sett at en ervervet immunitet mot SAV gir en svært god beskyttelse mot re-infeksjon av viruset. Det er også vist at lakselus har en negativ effekt på vaksineeffekt.

## Forkortelser

<b>Forkortelse</b>	<b>Forklaring</b>
<b>CHSE</b>	Chinooklaks embryo-celler
<b>CPE</b>	Cytopatogen effekt
<b>C<sub>t</sub></b>	Terskelverdi
<b>d/°C</b>	Døgngrader
<b>Dpi</b>	Dager etter smitte
<b>EF</b>	Elongeringsfaktor
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IHV</b>	Inaktivert helvirusvaksine
<b>IHV-SAV3</b>	Inaktivert helvirusvaksine, med SAV3 som én av syv komponenter
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILAB</b>	Stiftelsen Industrielaboratoriet
<b>MNE</b>	Gjennomsnittlig normalisert verdi
<b>NE</b>	Normalisert verdi
<b>NSAV</b>	Norsk salmonid alfavirus
<b>NSP</b>	Ikke-strukturelt protein
<b>ORF</b>	Åpen leseramme (open reading frame)
<b>PBS</b>	Fosfatbufret saltvann
<b>PCR</b>	Polymerase kjedereaksjon
<b>PD</b>	Pankreassykdom
<b>PRV</b>	Piscine reovirus
<b>RT-PCR</b>	Revers transkriptase- PCR
<b>SD</b>	Sleeping disease
<b>SDV</b>	Sleeping disease virus
<b>SPDV</b>	Salmon pancreas disease virus
<b>TCID<sub>50</sub></b>	50% Tissue culture Infective Dose, Mengden virus som vil forårsake en cytopatogen effekt i 50% av cellekulturen som inokuleres.
<b>TLR</b>	Toll-reseptorer

# 1. Innledning

## 1.1 Salmonid Alfavirus (SAV)

Pankreassykdom (PD) er en virussykdom forårsaket av Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV), også kjent som Salmonid Alfavirus (SAV). I Norge er sykdommen et omfattende problem i oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) og antall sykdomstilfeller har økt betraktelig de siste 10 årene (Hjeltnes et al. 2016). Området affisert av PD har samtidig ekspandert både nord og sør fra Vestlandet, som har blitt betraktet som sykdommens kjerneområde (Bornø og Lie 2014). PD er en av de mest alvorlige og tapsbringende sykdommene i norsk oppdrett av laksefisk. For å begrense tapene forårsaket av sykdommen er det blitt implementert en rekke forebyggende tiltak. Disse omfatter blant annet synkronisert brakklegging, meldeplikt ved sykdomsutbrudd, opprettelse av endemiske soner og vaksinasjon. Det ble i 2014 påvist 142 tilfeller av PD. For 2015 var tilsvarende tall 137 tilfeller. Sykdommen er listeført (liste 3) og ble i 2014 også rapportpliktig internasjonalt til verdens dyrehelseorganisasjon (OIE- World Organisation for Animal Health).

Pankreassykdom ble for første gang beskrevet i Skottland på 1970-tallet (Munro et al. 1984). Det tok ikke mange år før de første sykdomstilfellene også ble oppdaget i Norge og Irland (Pope et al. 1989; Murphy et al. 1992). Viruset som ble isolert fra syk fisk liknet et Togavirus, men det var ikke før i 1999 at det endelig ble bekreftet at viruset tilhørte slekten *Alfavirus* i familien *Togaviridae* (Nelson et al. 1995; Weston et al. 1999). Viruset var på det tidspunktet det eneste akvatiske alfaviruset en kjente til (Nelson et al. 1995). Parallelt med disse funnene ble det isolert et nytt alfavirus fra regnbueørret i ferskvann, Sleeping Disease Virus (SDV) (Castric et al. 1997). Dette viruset har i ettertid vist seg også å tilhøre arten SPDV (Boucher og Baudin 1996; Weston et al. 1999; Villoing et al. 2000).

Basert på genomsekvensering og fylogenetiske analyser, kan SAV-isolatene som er funnet frem til dags dato deles inn i 6 ulike subtyper (SAV 1-6) (Hodneland et al. 2005; Weston et al. 2005; Fringuelli et al. 2008). Ut i fra virusets evolusjonsrate og en tidsskala som er utarbeidet fra denne, er det foreslått at hver av de seks subtypene stammer fra et vilt reservoar, og at der er blitt introdusert til oppdrett av laksefisk seks separate ganger (Karlsen et al. 2014). I dag er SAV 1, 2, 4 og 5 påvist i Skottland, mens SAV 1, 4 og 6 i Irland og SAV 2 er påvist i



ferskvannsoppdrett av regnbueørret i Frankrike, Spania, Italia, Tyskland, Kroatia, Sveits, England og Polen (Bergmann et al. 2005; McLoughlin og Graham 2007; Fringuelli et al. 2008; Graham et al. 2012; Borzym et al. 2014). I Norge er det hittil blitt påvist to genotyper av SAV. SAV 2 er isolert fra fisk fra marine oppdrettsanlegg på Nord-Vestlandet og i Trøndelag. SAV3, også kalt Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) er assosiert med smoltanlegg og PD-utbrudd i sjø, hovedsakelig på Vestlandet (Christie et al. 1998; Nylund et al. 2003; Hodneland et al. 2005; Bratland og Nylund, 2009; Hjortaas et al.2013).

SAV3 ble for første gang isolert i 1997, men ble ikke presentert som en egen subtype før i 2003 (Christie et al. 1998; Hodneland et al. 2005). Isolatene fra denne gruppen er genetisk homogene, noe som tyder på et nylig felles opphav og én enkel introduksjon av viruset til norsk akvakultur (Karlsen et al. 2006). I 2007 ble det opprettet en endemisk sone for SAV 3 i Norge. Denne ble dannet for å forhindre en videre spredning av viruset nord for Hustadvika. Med unntak av enkelte sporadiske tilfeller i nord- Norge, har alle tilfeller av utbrudd forårsaket av SAV 3 forekommet innenfor den endemiske sonen. I 2011 ble SAV 2 for første gang isolert fra flere norske matfiskanlegg (Hjortaas et al. 2013) og en ny epidemi spredte seg raskt utenfor den opprinnelige sonen (Bornø og Lie, 2014). For å forhindre videre spredning ble det dannet en egen sonedeforskrift for SAV 2, med en kontrollsoner mellom Hustadvika i Møre og Romsdal og Nordland samt en observasjonssone/buffersone fra Nord-Trøndelag til Nordland (Bornø og Lie, 2014).

### **1.1.2 Klinikk og patologi**

Ved PD-utbrudd er ofte første tegn på sykdom endret appetitt hos fisken. Nedsatt matlyst kan oppstå 1-2 uker før man observerer klinisk sykdom (Taksdal et al. 2007). Det kliniske sykdomsbildet ved et PD-utbrudd varierer i stor grad, men fisken vil ofte være mørkpigmentert og ha en apatisk adferd. Den oppholder seg gjerne i vannoverflaten eller er samlet langs kanten av merden (McVicar, 1986; McLoughlin et al. 2002). En har også ved flere tilfeller sett at PD-syk fisk blir unormalt tynn og utvikles til såkalte ”pinnefisk”, grunnet manglende næringsopptak (McLoughlin et al. 2002).

Ved obduksjon av klinisk syk fisk er det ingen patognomoniske symptomer knyttet til PD, men det kan observeres at tarmen enten er tom eller har et gult, slimaktig innhold, punktblødninger i fettvevet rundt pylorusblindsekkene og lite kroppsfett (McLoughlin og

Graham, 2007; Taksdal et al. 2007). Man kan også observere symptomer på sirkulasjonsforstyrrelser, som eksofthalmi, ødem i skjellommer og bukvæske (ascites), blekt hjerte, gulaktig lever og hjertesprekk (Taksdal et al. 2007).

Det histopatologiske sykdomsbildet assosiert med en SAV-infeksjon viser at den alvorligste vevsforandringen som oppstår er degenerativ myopati i hjerte og rød skjelettmuskulatur (Ferguson et al. 1986). Andre histopatologiske forandringer, som tap av eksokrint pankreasvev, inflammasjon i hjerte og rød muskulatur, degenerasjon av hvit muskulatur og eosinofile granuler i nyreparenkymet, kan også forekomme (Ferguson et al. 1986; Poppe et al. 1989; Murphy et al. 1992; Taksdal et al. 2007). Flere sekvensielle studier av SAV-infisert fisk viser at lesjoner først oppstår i eksokrin pankreas og hjertemuskulatur, før lesjoner i skjelettmuskulatur opptrer 2-3 uker senere (McLoughlin et al. 2002; Taksdal et al. 2007).

Dødelighet forbundet med PD kan variere fra ubetydelig til 50-80% (McLoughlin og Graham, 2007). Én årsak til denne variasjonen kan antakeligvis være tilstedeværelse av andre patogener som påvirker både fiskens immunforsvar og/eller kan være primærårsaken til økt dødelighet (Nylund et al. 2011). Nylund et al. utførte blant annet en studie i 2011, der fisk fra 11 av 12 undersøkte PD-utbrudd viste seg også å være kraftig infisert med *Paranucleospora theridion* (*Desmozoon lepeophtherii*), noe som kan ha forverret sykdomsutbruddet. På den annen side er det nylig vist at en ko-infeksjon av PRV og SAV, hemmer SAV-replikasjon og utvikling av PD i Atlantisk laks (Lund et al. 2016). Det skjer en redusert oppregulering av gener relatert til hjertepatologi, sammenliknet med fisk som kun er smittet med SAV. Årsaken til dødelighet kan være knyttet til forhold som temperatur, fôrregimer, regionale forskjeller, virus-isolatforskjeller og smoltkvalitet (Hodneland, 2006).

Alvorlighetsgraden til et sykdomsutbrudd med PD, påvirkes trolig i stor grad av en rekke stressfaktorer, deriblant lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) som livnærer seg av vertens slimlag, skinn og blod (McVicar, 1987). Flere epidemiologiske studier viser til at lakselus kan ha en innvirkning på PD-sykdomsforløpet (McVicar, 1987; Rodger og Mitchell, 2007) og at det kan forekomme en synergistisk effekt mellom PD-utbrudd og lusebelastning (Ruane et al. 2005). Også utvikling av PD fra en subklinisk SAV-infeksjon kan fremprovoseres av stressinduserende faktorer (Brun et al. 2006).

### 1.1.3 Spredning av SAV

En viktig smittevei for SAV ser ut til å være horisontal overføring, blant annet via passiv drift i vannmassene eller transport av fisk (McVicar, 1986; Fringuelli et al. 2008; Kristoffersen et al. 2009). Under en viremi spres viruset til kohabiterende fisk innad i en merd/kar, via virusfrigivelse/"shedding" fra infisert fisk (Andersen et al. 2010). En antar at virusutskillelse skjer via sekreter, da det er påvist SAV-RNA i avføring og slim fra PD-syk laks (Graham et al. 2012; Hellebø et al. 2014). Frigivelsen av viruspartikler starter kort tid etter infeksjon og virus kan detekteres i vannet 4-13 dager etter i.p. smitte i laboratorieforsøk (Andersen et al. 2010). Antakeligvis reflekteres mengden virus som frigis til vannet av nivået av virusreplikasjon i fisken, og kan variere mellom ulike virusisolater (Andersen et al. 2007; Graham et al. 2011). Stene et al. (2015) har også påvist infektive viruspartikler i lipidfraksjoner som lekker fra fettvevet til død og råtnende PD-syk fisk. Man antar at disse lipidlekkasjene akkumulerer på havoverflaten og kan spres over store avstander og dermed være en viktig overføringsrute mellom oppdrettsanlegg (Stene et al. 2015). Muligheten for at viruset kan overføres vertikalt er blant annet påpekt av Bratland og Nylund i 2009. Det er tidligere kun SAV 2 (SDV) som har vært assosiert med ferskvannsutbrudd, men nyere studier viser til at også SAV 1 og SAV 3 er blitt påvist hos Atlantisk laks og regnbueørret i ferskvann (Nylund et al. 2003; Fringuelli et al. 2008; Bratland og Nylund, 2009; Lester et al. 2011). Bratland og Nylund (2009) viste i en studie at 40 av 384 undersøkte stamfisk var bærere av SAV 3. I samme studie ble det også funnet SAV 3 i rogn, øyerogn og yngel, noe som viser at også denne subtypen antakeligvis er viktig i ferskvannsfasen.

Det er foreslått at artropodene lakselus og skottelus (*Caligus elongatus*) kan være potensielle vektorer for SAV, og spre viruset horisontalt. I motsetning til terrestriske alfavirus, der overføring via en hematofag (blodsugende) artropod vektor er nødvendig, er ikke akvatiske alfavirus vektoravhengige (La Linn et al. 2001; Karlsen et al. 2006). Dette utelukker imidlertid ikke at slike vektorer kan foreligge og at de kan ha en rolle i spredning av viruset. Lusen kan opptre som en mekanisk vektor, ved å beite på SAV-infisert fisk og overføre dette til nærv fisk, eller som en biologisk vektor, dersom viruset kan replikere i lusens vev. Ved bruk av real-time RT-PCR har en funnet SAV RNA i *L. salmonis* fra PD-syk fisk (Karlsen et al. 2006; Petterson et al. 2009; Hellebø et al. 2014). Det er imidlertid ikke klart hvorvidt disse funnene skyldtes replikerende virus i lusens vev eller om viruset stammet fra ufordøyd blod/vev fra laksen (Karlsen et al. 2006; Petterson et al. 2009). En annen årsak til at man tror at det kan finnes en potensiell artropod vektor for SAV, er virusets lave substitusjonsrate.

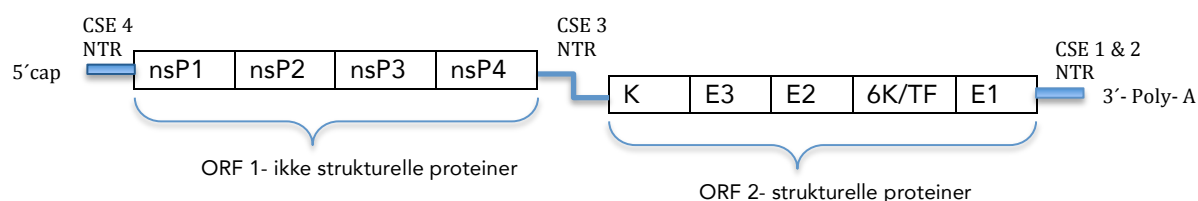
SAV3 sin substitusjonsrate ( $1.70 (\pm 1.03) \times 10^{-4}$  nt subst/site/year) er opptil 10 ganger lavere enn de fleste ikke- artropodbårne RNA-virusene (Karlsen et al. 2006). Etersom en livssyklus med to verter medfører en stabiliserende seleksjon, påpekte Jenkins et al. i 2002 muligheten for at vektorbårne virus har en lavere evolusjonsrate, og dermed en lavere substitusjonsrate, enn ikke-vektorbårne virus. For å undersøke om lakselusen kan være en biologisk vektor for overføring av SAV er man avhengig av å påvise virusets evne til replikasjon i lusen eller å se om lakselus fra SAV-infisert laks kan overføre viruset til naïv fisk som en mekanisk vektor.

I et forsøk der celler fra asiatiske tigermygg (*Aedes albopictus*) ble smittet med SAV, viste man at viruset var i stand til å fullføre en fullstendig replikasjonsyklus innad i cellen (Bowers et al. 1995). Til tross for flere passeringer av de infiserte cellene var viruset fremdeles infeksiosøst når embryoceller fra kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) ble smittet. Dette tyder på at SAV ikke utelukkende replikerer i fisk, men også har potensiale til å replikere i evertebrater (Hikke et al. 2013). Sydlig sjøelefantvirus (Southern elephant seal virus, SESV), som til nå er det eneste andre akvatiske alfaviruset man har kjennskap til, har også blitt assosiert med lus. Viruset er isolert fra sjøelefantlus (*Lepidophthirus macrorhini*) som beiter på sjøelefanter (*Mirounga leonine*) i de sørvestlige deler av Stillehavet (La Linn et al. 2001). Dette er imidlertid ikke et krepsdyr, slik som lakselus.

#### 1.1.4 Viruskarakteristikk

SAV- virionet er et kappekledd virus på ca 65 nm ( $\pm 4.3$ ) (Nelson et al. 1995), med et positivt (+), enkelttrådig RNAgenom på ca. 11.9 kb (Strauss og Strauss, 1994; Nelson et al. 1995). Genomet har en 5'-cap og en 3' poly-A hale (Knipe et al. 2007) og består av to åpne leserammer (ORF) (se figur 1). ORF1, som translateres direkte fra +ssRNA, koder for de 4 ikke-strukturelle proteinene nsP1, nsP2, nsP3 og nsP4. ORF2 translateres fra et subgenomt 26S RNA, og koder for de 6 strukturelle proteinene E1, E2, E3, 6K/TF og kapsidprotein (Firth et al. 2008). De transmembrane glykoproteinene E1 og E2 danner heterodimere som er ankret fast i virionets kappe (Strauss og Strauss 1994). E2 interagerer med reseptorer på vertscellen og er primært involvert i reseptorbinding og opptak i cellen (Mukhopadhyay et al. 2006), mens E1 er ansvarlig for membranfusjon mellom viruskappe og endosom (Voss et al. 2010). I tillegg til E1 og E2, er proteinet 6K tilknyttet membranen. Dette proteinets rolle er ikke fullstendig kartlagt (Gaedigk-Nitschko og Schlesinger, 1990; Lusa et al. 1991), men antas å være et viroporin (Melton et al. 2002) som blant annet er involvert i transport av proteiner gjennom ER, virionsammensetning og avknopping av viruspartikkelen (Loewy et al.

1995; Yao et al. 1996; Sanz og Carrasco, 2001; Sanz et al. 2003). Det er også vist å fungere som en signalsekvens for E1 (Liljestrøm og Garoff, 1991). I 2008 ble det oppdaget et nytt strukturelt protein, Transframe proteinet (TF), som stammer fra et ribosomalt-1 rammeskiift i 6K proteinet (Firth et al. 2008).



**Figur 1. Genomorganisering hos alfavirus.** I 5'enden av ORF1 og 3'enden av ORF2 er det ikke-translaterte regioner (NTR), som fremmer transkripsjon av RNA. Det er også en NTR mellom de to leserammene. Denne regionen fremmer transkripsjon av subgenomisk RNA, som korresponderer med leserammen som koder for de strukturelle proteinene (Strauss og Strauss, 1994; Weston et al. 2002; Jose et al. 2009). Det er identifisert 4 konserverte nukleotidsekvenser (conserved nucleotide sequence elements, CSE 1-4) i alfavirusgenomet. Dette er strukturelle elementer som er essensielle for replikasjon og transkripsjon, ved blant annet å fremme syntese av negativ- og positivtrådig RNA (Frolov et al. 2001; Jose et al. 2009).

## 1.2 Vaksiner mot virussykdommer

I Norge er de kommersielt tilgjengelige virusvaksinene basert på inaktiverede viruspartikler, med unntak av en rekombinant IPNV-vaksine (MSD Animal Health). Inaktiverede vaksiner består av det aktuelle patogen dyrket opp i høye konsentrasjoner, for så å inaktiveres uten at strukturen i antigenet ødelegges. Til dette benyttes som oftest formalin (Gudding, 2010). Vaksinen kan tilsettes en adjuvans for å forsterke og forlenge immunresponsen som oppstår (Aucouturier et al. 2001). Inaktiverede vaksiner er svært trygge i bruk, da den inaktiverede mikroben ikke kan mutere tilbake til en patogen tilstand. Dette fører imidlertid ofte til en svakere immunrespons enn den som kan oppnås ved bruk av levende vaksiner. Det kan også være vanskelig og lite kostnadseffektivt å dyrke opp tilstrekkelige mengder virus for å produsere en effektiv vaksine (Berg et al. 2006).

Ikke-levende vaksiner kan bestå av hele organismen eller produkter fra denne. Dersom det kun benyttes bestemte deler av patogenet, som regel renfremstilte proteiner, overflatekomponenter eller toksiner, benyttes betegnelsen subenhetsvaksine eller rekombinant subenhetsvaksine. En kan også benytte rekombinant DNA-teknologi for å produsere antigen-

molekyler fra mikroorganismen (Gudding 2010). Til tross for å være mer kostnadseffektive, vil subenhetsvaksiner primært stimulere en humoral, og dermed svakere, immunrespons enn inaktiverte helvirusvaksiner (Seder og Hill, 2000).

Det finnes i dag to kommersielle PD-vaksiner i form av et injiserbart preparat, basert på formalininaktivert SAV subtype 1 (Norvax®Compact PD og Aquavac PD7, MSD Animal Health). Frem til 2015 var det kun den monovalente vaksinen Norvax®Compact PD som var tilgjengelig på markedet. Effekten av vaksinen har vært omdiskutert, da en fremdeles opplever sykdom til tross for vaksinasjon. Likevel syntes kliniske symptomer å være mindre alvorlige hos vaksinert fisk (Bang Jensen et al. 2012). Data fra fiskehelse rapporten viser en viss nedgang i dødelighet etter at den første vaksinen ble tilgjengelig (Olsen og Hellberg, 2011; Bang Jensen et al. 2012). Med flerkomponentvaksinen Aquavac PD7 reduseres nivåene av virus i fisken, og vaksinert fisk skiller ut signifikant mindre virus til omgivelsene enn uvaksinert fisk (MSD Animal Health).

Det er også utviklet en inaktivert PD-vaksine, Alpha Ject micro 1 PD (PHARMAQ), basert på et norsk isolat av SAV-viruset (SAV3). Vaksinen har markedsføringsgodkjenning i Norge, UK og Irland, men er grunnet et patent på bruk av SAV i vaksine, ikke kommersielt tilgjengelig i disse landene (Karlsen et al. 2012). Smitteforsøk viser at vaksinen gir en relativ overlevelse på 98,5% og en tilnærmet total beskyttelse mot SAV-infeksjon i kohabitant smitteforsøk. I feltforsøk så man også en signifikant beskyttelse mot SAV-indusert dødelighet, men ikke en like god effekt som man så i smitteforsøk (Karlsen et al. 2012).

Inaktiverte vaksiner er per dags dato den eneste aktuelle immuniseringsmetoden mot virussykdom i norsk akvakultur, men det er gjort en rekke studier rettet mot andre vaksintyper og fremgangsmåter for å bekjempe SAV-viruset. Det er for eksempel foreslått at DNA- vaksiner kan være en aktuell fremgangsmåte for å bekjempe intracellulære patogener. En DNA-vaksine fremstilles ved at genkopier fra viruset inkorporeres i en plasmidvektor, som så injiseres i vertens muskel. Vertscellen vil produsere det rekombinante proteinet og uttrykke antigener på overflaten, som om cellen var infisert med et intracellulært patogen (Heppel og Davis, 2000). DNA-vaksinen er unik i form av dens evne til å inducere både humoral og cytotoxisk T-celle respons hos verten (Restifo et al. 2007; Whitton et al. 1999). Likevel viste en studie gjort av Xu et al. (2012a) at en DNA-vaksine mot SAV ikke ga en signifikant antistoffrespons mot SAV. Videre kunne ikke en beskyttende effekt i forhold til redusert dødelighet observeres i forsøket. I det aktuelle studiet til XU et al. ble E1 og E2

inkorporert i en eukaryot plasmidvektor (pMAX-GFP).

Også bruk av levende vaksiner er en lovende strategi for å kontrollere infeksjoner forårsaket av intracellulære patogener. Blant annet har levende rekombinant SDV vist å gi beskyttelse mot SD hos regnbueørret i opptil fem måneder (Morierte et al. 2006).

Levende vaksiner består av attenuerte mikroorganismer, som er svekket i en slik grad at de ikke fremkaller sykdom, men fremdeles kan replikere og indusere en immunrespons i verten (Alexandersen, 1996). Levende vaksiner kan bestå av genetisk manipulerede mikroorganismer (Cooper et al. 1996) eller mikroorganismer som gjentatte ganger er subinokulert på bestemte medier eller vev for å utvikle avirulente stammer (Hartmanog Noga, 1980; Alexandersen 1996). Vaksinen stimulerer både en humoral og en cellulær immunrespons, i tillegg til en mer korrekt presentasjon av antigenet for immunsystemet, enn det inaktiverede vaksiner gjør. Til tross for lovende resultater, og en åpenbar fordel ved å benytte levende vaksiner mot virussykdommer, må det utøves stor forsiktighet ved bruk av en slik immuniseringsmetode. Det attenuerte viruset kan mutere tilbake til en sykdomsfremkallende variant, og det er usikkerhet rundt hvorvidt levende vaksiner kan gi sykdom hos svekkede individer (Shoemaker et al. 2009). Det kan også være problematisk å skille smitteagens fra vaksineagens ved sykdomsovervåking, dersom det ikke benyttes en markørvaksine (Berg et al. 2006).

### **1.3 Vertens immunrespons ved en SAV-infeksjon**

Det ble tidlig hevdet at fisk som hadde gjennomgått et PD-sykdomsforløp, ikke utviklet gjentakende sykdom (Munro et al. 1984; Houghton og Ellis, 1996). I samsvar med feltobservasjoner, viste Houghton (1994) at parr og post-smolt som ble utsatt for en eksperimentell smitte med SAV, utviklet en immunitet som varte i 9 måneder etter infeksjon. Det var på den tiden ikke mulig å forklare hvordan immunforsvaret til fisken opprettholdt immuniteten ved en SAV-infeksjon, men det ble antatt at blant annet antistoffer var involvert i responsen (Houghton, 1994).

Ved en virusinfeksjon vil Pattern Recognition Receptors (PRR) i det uspesifikke immunforsvaret identifisere patogenassosierte molekylære strukturer (PAMPS), og mobilisere et forsvar mot disse (Alberts et al. 2002). Toll- reseptorer (TLR), som er en type PRR, setter i gang en intracellulær signaloverføring som resulterer i uttrykking av gener involvert i modning av dendrittceller, antivirale responser og inflammasjon (Chauduri et al. 2005). Det produseres blant annet interleukiner og interferon type 1 (1 IFN), cytokiner som spiller

sentrale roller i antivirale responser i vertscellen (Dinarello, 1997). 1 IFN sekreterer blant annet IFN- $\alpha$  og IFN- $\beta$ , som påvirker virusets proteinsyntese, vekst-suppresjon og apoptose av vertscellen (Honda et al. 2006). 1 IFN vil også føre til en raskere modning av dendrittceller, økt cytotoxicitet hos ikke-spesifikke cytotoxiciske celler (NCC) og økt differensiering av virusspesifikke cytotoxiciske T-lymfocytter (T<sub>c</sub>-celler) (Honda et al. 2006).

IFN beskytter nærliggende celler fra viral invasjon ved å binde seg til spesifikke reseptorer på nabocellene. Denne bindingen induserer en uttrykking av flere hundre interferon-induserte gener (Samuel, 2001; Robertsen, 2006). Disse antivirale genene inkluderer Mx, Viperin og ISG15 (Boudinot et al. 1999; Chin og Cresswell, 2001; Robertsen, 2006; Røkenes et al. 2007; Workenhe et al. 2010; Sun et al, 2011).

Desvignes et al. utførte i 2002 et studie der det ble sett på immunresponsen til Atlantisk laks smittet med SAV dyrket i CHSE-214 celler. En sterk inflammatorisk reaksjon kunne påvises i pankreas 9 dager etter smitte (dpi), og 16 dpi ble det også funnet nøytraliserende antistoffer mot SAV, som viste en tidsrelatert økning i titer og prevalens. En betydelig høyere fagocytisk aktivitet ble observert i hodenyreleukocytter ved samtlige uttak i forsøket. Spesielt var denne aktiviteten forhøyet 9 dpi. Også konsentrasjonen av lysosomer og komplementfaktorer økte under infeksjonen. Resultatene fra smittforsøket demonstrerer at både det medfødte- og det ervervede immunforsvaret stimuleres ved en SAV-infeksjon. Det ble i forsøket til Desvignes et al. ikke påvist IFN eller IFN-stimulerte gener. Likevel er det senere vist at interferonene IFN- $\gamma$  og IFN- $\alpha$  har en sterk antiviral aktivitet mot SAV 3 i celler fra Atlantisk laks (Xu et al. 2010; Sun et al. 2011). Det er også påvist en oppregulering av Mx-proteiner som respons på infeksjon med SAV *in vitro*, og antakeligvis har Mx en viktig antiviral funksjon mot viruset (Samuel 2001; Sun et al. 2011; Xu et al. 2012b).



#### **1.4 Mål for studien**

Hovedmålet med denne studien var å teste og sammenligne to ulike immuniseringsmetoder mot SAV. Én fiskegruppe ble vaksinert med en inaktivert helvirusvaksine mot PD og én fiskegruppe ble immunisert med villtypevirus, for å indusere en ervervet immunitet.

For å vurdere effektiviteten til de ulike immuniseringsmetodene ble ulikheter i dødelighet, kliniske symptomer, nivåer av virus i vev og histologiske funn etter endt dødelighet undersøkt.

Delmål i studien var å:

- Undersøke om en stressrespons forårsaket av lakselus fører til nedsatt effektivitet ved immunisering
- Teste om lakselus kan spre SAV fra PD- syk fisk til nærv fisk

## 2. Material og metoder

### 2.1 Forsøksoppsett

Formålet med studien var å sammenligne to ulike immuniseringsmetoder (naturlig smitte og vaksinasjon med inaktiverte virus) mot SAV, i en kohabitant smittemodell. I tillegg ble det undersøkt hvorvidt lakselus påvirker immuniseringen/sykdomsutviklingen, og om lakselus kan være en mekanisk vektor for SAV.

#### 2.1.1 Forsøksfisk, vaksiner og virus

Forsøket ble utført ved Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB) sine fasiliteter ved Høyteknologisenteret i Bergen. Forsøksfisken, totalt 301 fisk, tilhørte stammen SalmoBreed og var fisk egenprodusert og levert av ILAB. Fiskebatchen som ble benyttet i forsøket var forsøksfisk produsert ved Industrielaboratoriet (ILAB). Disse ble brakt til ILAB som øyerogn fra Sjøtroll, Jakta stamfisk på Osterøy. I forkant hadde gonadeprodukter fra foreldrefiskene blitt screenet for SAV, Piscine Reovirus (PRV), Piscine myokardittvirus (PMCV), Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) og Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV). Før salg av fisken undersøkes tilstedeværelse av utvalgte agens (ILAV, PRV, IPNV og PMCV) ved 5 og 15 grams størrelse. Til dette benyttes real-time RT-PCR. Hjerter fra disse fiskene blir i tillegg undersøkt histologisk.

Forsøksfisken (tabell 1) veide fra 25-40 gram ved mottak.

Tabell 1. Karakteristika for fisken benyttet i forsøket. For øvrig helseinformasjon.

<b>Art</b>	Atlantisk laks
<b>Stamme</b>	SalmoBreed
<b>Opphav</b>	ILAB
<b>Batch nr.</b>	ILAB 14/201
<b>Antall fisk</b>	301
<b>Størrelse</b>	Mellom 25-40 gram ved oppstart
<b>Vaksinasjonsstatus</b>	Ikke vaksinert
<b>Sykdomshistorie</b>	Uspesifikk patogen fri (virus)

PHARMAQ AS bistod forsøket med vaksiner og kontrollsubstanser. Ved ankomst av vaksinen ble denne oppbevart ved 4 °C. Vaksinen som ble benyttet i forsøket, er en inaktivert 7-komponentsvaksine med SAV3 som én av komponentene (IHV-SAV3), produsert av PHARMAQ AS. I tillegg til SAV inneholder vaksinen fem bakterielle antigen; *Aeromonas*

*salmonicida* subsp. *Salmonicida*, *Vibrio anguillarum* serotype O1 og O2a, *Aliivibrio salmonicida*, *Moritella viscosa* og ett viralt antigen; IPNV serotype Sp.

Viruset som ble benyttet til immunisering/pre-smitte av fiskegruppe 1 og til injeksjon av sheddere, er et virusisolat av SAV3, isolat nr: ALV413. Dette ble holdt ved -80°C fram til bruk. Til kontrollfisk ble det benyttet fosfatbufret saltvann (PBS).

Både fisk og kar ble overvåket på daglig basis. Ved unormal adferd, manglende appetitt eller uventet dødelighet hos fiskegruppene, ble dette notert. Eventuelle døde fisk ble lagt i frys eller tatt prøver av umiddelbart. Parameterne O<sub>2</sub> (%), temperatur og salinitet ble daglig overvåket og registrert. Endringer i miljøparametere underveis i forsøket ble utført av ILABs ansatte, i henhold til forsøksoppsett vist i tabell 2. Alle karene som ble benyttet i forsøket hadde et gjennomstrømningssystem med en vannstrøm på 300L/h og en gjennomsnittstemperatur på 11,9°C (11.4–12.5°C) .

**Tabell 2. Oversikt over miljøparametere og tidsforløp i forsøket.** Miljøparametere ble overvåket på daglig basis, og eventuelle endringer ble utført av ILABs ansatte. \*=Konstante verdier gjennom forsøket

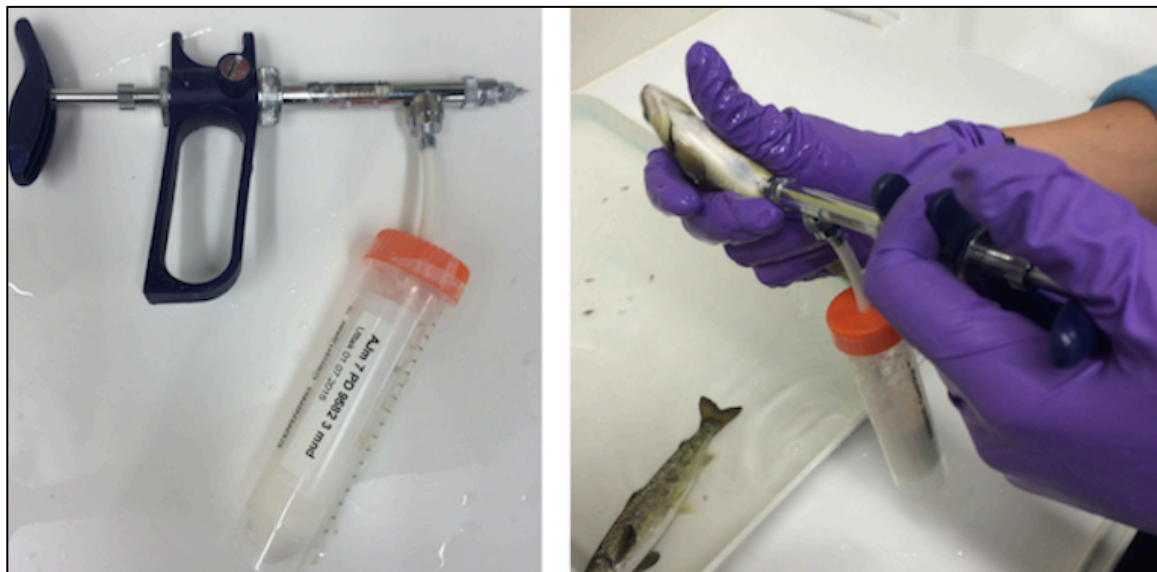
	<b>Miljøparametere: Temperatur, salinitet, lysregime, O<sub>2</sub>(%)</b>	<b>Forsøksuke</b>	<b>Uke nr.</b>
Akklimatisering	12°C*, 0 ‰, 12:12, 70-100%*	0	Uke 34
Vaksinering/immunisering	0 ‰, 12:12	1	Uke 35
Fisken ble satt over på 24:0 lys	0 ‰, 24:0	3	Uke 37
Fisken ble satt over på sjøvann	25 ‰, 12:12	7	Uke 41
Samlokalisering av fiskegruppene, smitte med lakselus	35 ‰, 12:12	8	Uke 42
Tilførsel av sheddere	35 ‰, 12:12	10	Uke 44
Terminering: Prøvetakning av overlevende fisk		13	Uke 47
Overføre lakselus fra overlevende fisk til naïv fisk	35 ‰, 12:12	13	Uke 47
Prøvetakning av fisk og lakselus		17	Uke 51

### 2.1.2 Vaksinerings og smitte

Fisken (n=301) ble akklimatisert i 10 dager og sultet i 48 timer før oppstart av forsøket. Vekt ble registrert fra 50 tilfeldige fisk ved forsøksstart, og ble målt til å være i gjennomsnitt 37,6 gram. Vaksinedoser og virustiter ble bestemt etter anbefalinger av produsenten (PHARMAQ AS).

Fiskegruppe 1 (n=80) ble smittet med en lav smittedose med villtype SAV (ALV413), for å inducere en "naturlig" ervervet immunitet. Fisken ble transportert i 20 L bøtter inn på smittecelle før immunisering. Fisken ble bedøvet i Tricain Pharmaq® (0,1 g/L vann, med tilsvarende dose natrium bikarbonat som buffer), merket med klipping av venstre maxillare (LM) og injisert i.p. med 0,1 ml fortynnet virussuspensjon ( $2,37 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml). I utgangspunktet skulle 80 fisk fra hver gruppe immuniseres, men det ble besluttet å tilsette 8 ekstra fisk i fiskegruppe 1 (n=88). Dette ble gjort for å ha en buffer, dersom det skulle oppstå dødelighet før tilsetting av sheddere.

Fiskegruppe 2 (n=80) ble vaksinert med IHV-SAV3. Fisken ble håvet tilfeldig fra karet og bedøvet ved bruk av bufret Tricain Pharmaq®. Ved tap av likevekt ble fisken merket ved å klippe høyre maxillare (RM). Fisken ble vaksinert intraperitonealt (i.p.) med en kalibrert Socorex pistol grip syringes (0,05 ml) og lagt over i friskt vann for oppvåkning. Ved endt vaksinerings ble vaksinepistolen kalibrert på nytt, for å kontrollere at vaksinedosen fremdeles var korrekt. Fiskegruppe 3 (n=80), som skulle være uvaksinert kontrollfisk, ble merket ved fettfinneklipping (AF), før de ble injisert i.p. med 0.1 ml PBS. Fiskegruppene som ble vaksinert og injisert med PBS ble holdt i ett kar frem til samlokalisering av alle gruppene.



**Figur 2.** Til venstre: Socorex vaksinepistol med vaksine. Vaksinepistolen ble benyttet til i.p. injeksjon av fiskegruppen som ble vaksinert med IHV-SAV3 og fiskegruppen som ble injisert med PBS. Til høyre: På bildet kan en se i.p. vaksinerings av fisk med IHV-SAV3

**Tabell 3** Oversikt over forsøksgrupper etter immunisering.

Fiskegruppe	Vaksine/virus	Ant. Fisk	Dose (ml)	Merke
1	IHV-SAV3	80	0,05	RM
2	ALV413	88	0,1 $2,37 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub> /fisk	LM
3	PBS	80	0,1	AF

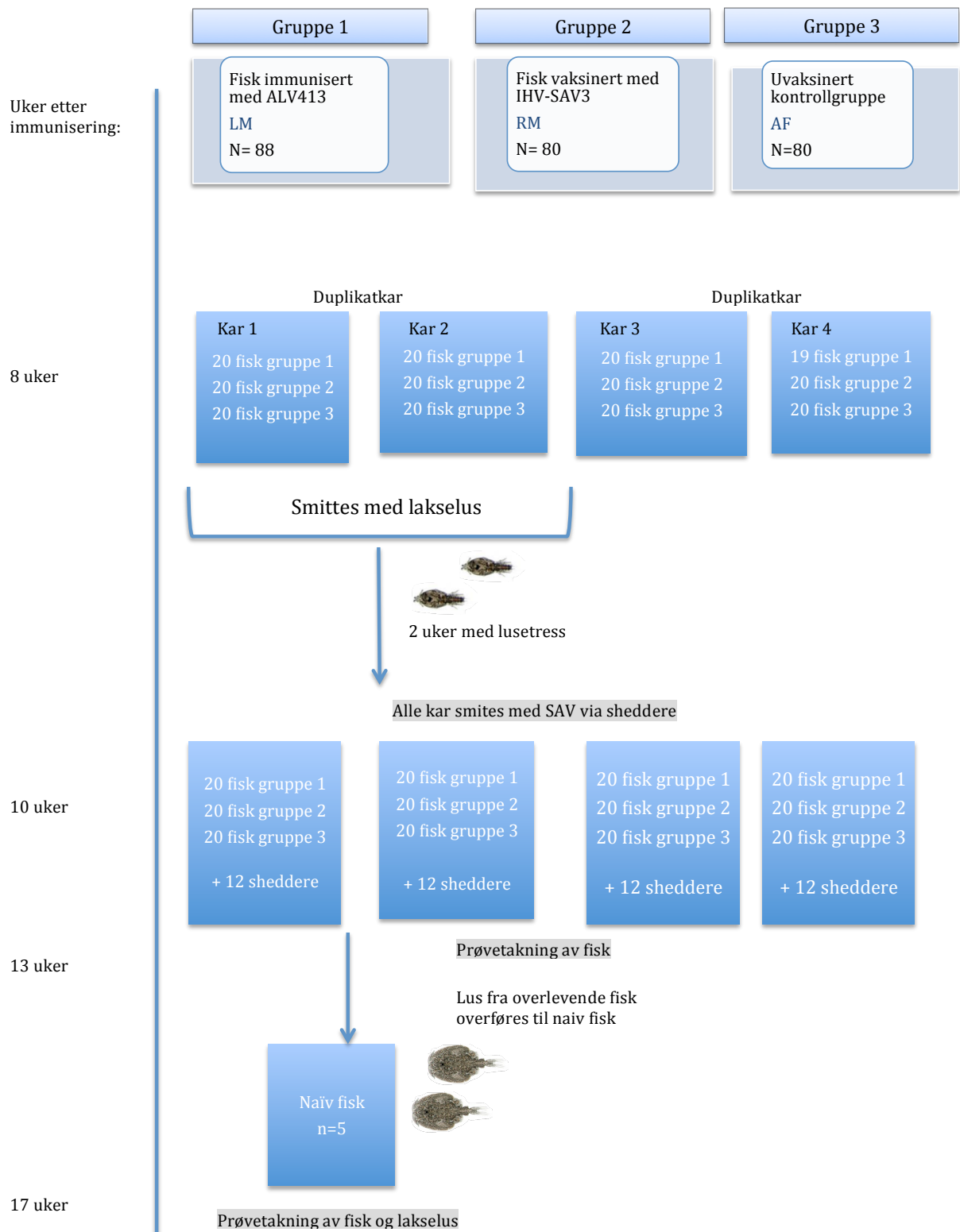
Etter 6 ukers smoltifisering ble 20 fisk fra hver fiskegruppe samlokalisert i nye kar (500 L) på smittecelle (n=60 pr kar). Det ble satt opp 4 slike kar, der to kar var duplikater av hverandre (1 og 2, 3 og 4). Fisken ble akklimatisert til karene i to døgn før kar 1 og 2 ble tilsatt totalt 1500 copepoditter av lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Lakselusen som ble benyttet i forsøket ble produsert av Institutt for biologi ved Universitetet i Bergen og var av stammen LsGulen. Ved tilsetning av lakselus ble vannet i karene tappet ned til ca. 2x fiskehøyde og vannflowen redusert. En homogen blanding av vann og lakselus ble forsiktig fordelt i hele karet. Fisken ble så overvåket i 30 minutter, inntil vannstanden var normalstilt.

I uke 10 i forsøket (756 d/°C etter vaksinerings) ble shedderfisk injisert med SAV ( $2,37 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/fisk) og fordelt på de fire karene. Shedderene utgjorde 10% av det totale antallet av fisk i karet, 12 fisk pr. kar (se tabell 4). Før shedderfisken ble smittet ble den sultet i 48 t. Fisken ble bedøvet med Tricain Pharmaq® (metacain, MS-222). En 1 ml sprøyte (Norm-Ject) med 0,6x4mm kanyle (Unimed) ble benyttet for i.p. injisering av smittestoffet.

Forsøket ble avsluttet 22 dager etter tilførsel av sheddere, og det ble tatt prøver av samtlige fisk. Overlevende lakselus ble samlet i en bøtte med rent sjøvann, og overført til 5 naïve fisk etter én time. Lakselusen gikk på denne fisken i 22 dager før fisken ble avlivet og det ble tatt prøver til real-time RT-PCR av fisk og overlevende lus.

**Tabell 4. Karoppsett etter tilsetning av shedderfisk.** Forsøksfisken er fordelt på fire kar, med 20 fisk pr. fiskegruppe i hvert kar. Kar 1 og 2 og kar 3 og 4 er duplikatkar. Ved tilsetning av sheddere utgjør disse 10% av det totale antallet i karet.

<b>Fiskegruppe</b>	<b>Kar</b>	<b>Antall fisk</b>
1. ALV413	<b>K1</b> <sup>m</sup> /lakselus	20
2. IHV-SAV3		20
3. PBS		20
Shedder		12
1. ALV413	<b>K2</b> <sup>m</sup> /lakselus	20
2. IHV-SAV3		20
3. PBS		20
Shedder		12
1. ALV413	<b>K3</b>	20
2. IHV-SAV3		20
3. PBS		20
Shedder		12
1. ALV413	<b>K4</b>	20
2. IHV-SAV3		20
3. PBS		20
Shedder		12



**Figur 3. Forsøksoppsett.** Figuren viser forsøksoppsett med fordeling av gruppene i fire kar; Fiskegruppe 1 ble immunisert med ALV413 for å inducere en ervervet immunitet. Fiskegruppe 2 ble vaksinert med IHV-SAV3, en inaktivert helvirusvaksine med SAV3 som én av komponentene. Fiskegruppe 3 er uvaksinert kontrollfisk, injisert med PBS. I hvert kar er 20 fisk fra hver gruppe samlokalisert med 12 shedderfisk. Kar 1 og 2, og kar 3 og 4 er duplikatkar. Lakselus ble tilsatt kar 1 og 2 som en stressfaktor. Til venstre i figuren er det en tidsskala for forsøket, vist i uker.

### 2.1.3 Prøvetakning

For prøvetaking ble all fisk avlivet med en overdose (0,2 g/ L H<sub>2</sub>O) metacain og fraktet til prøvetakingslaboratoriet. Eventuell klinikk eller makroskopiske funn ble notert og fotografert, og hver fisk ble nummerert og veid. Sammenlikning av vekt mellom- og innad i grupper ble gjort ved bruk av u-paret t-test med Welch's correction, der signifikante forskjeller defineres som  $p \leq 0,05$ . Vaksinebivirkninger hos fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3, i form av adheranser og melanisering, ble vurdert ved bruk av Speilbergs-skala (Midtlyng, 1996). Hvert individ ble gitt en score fra 0-6, basert på bivirkningenes alvorlighetsgrad. Tallet 0 representerer fisk uten bivirkninger og tallet 6 angir alvorlige bivirkninger med vesentlig innvirkning på vekst og velferd.

Ved forsøkets start ble det tatt ut 20 prøver fra hjerte. Disse ble undersøkt for tilstedeværelse av SAV ved bruk av real-time RT-PCR. Dette ble gjort for å bekrefte at fisken var sykdomsfri ved oppstart. Det ble også laget histologisnitt fra fem tilfeldige hjerter.

Hjerteprøver til real-time RT-PCR, ca. 3 mm<sup>3</sup> store, ble tatt fra hjerteapex. Hjerteprøvene ble tatt ut aseptisk, uten å penetrere bukhulen. Tilsvarende prøver ble tatt fra hodenyre. Prøvene ble lagt i 2 ml rør (Eppendorf Safe-Lock Tubes™) på is og lagret på -32°C. Det ble tatt ut to prøver av alle hjerte- og nyrevev. Prøver til histologi fra hjerte, muskulatur og pankreasvev ble fiksert i 100 ml ferdigfylte formalinrør (IDEXX laboratories). Disse ble oppbevart ved 4°C i 24 timer, frem til prosessering for innstøping i parafin hos IDEXX laboratories.

## 2.2 RNA- ekstraksjon

Vevsprøver, lagret ved -80°C, ble tint og tilsatt én steril 3 mm kule av rustfritt stål (QIAGEN). For å homogenisere prøvene ble hver prøve tilsatt 1 ml Isol-RNA lysis reagent og kjørt i Tissuelyser (Qiagen) i 5 min på 50 oscillerings/s. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Det ble tilsatt 200 µl kloroform til homogenatet og prøvene ble blandet før de ble inkubert i 5 min ved romtemperatur. Prøvene ble så sentrifugert (Thermo scientific™ Heraeus fresco 21) i 15 min (12000 rpm (runder per minutt)/4°C) for å danne en faseseparasjon, der RNA kun er tilstede i den øverste, vandige fasen. Omtrent 300 µl av dette laget ble pipettert over i et nytt microrør og tilsatt 500 µl isopropanol for å felle ut RNAet. Prøvene ble blandet, inkubert i 10 min ved romtemperatur og sentrifugert i 15 min (12000 rpm/4°C). Supernatanten ble fjernet, og pelleten som var igjen i røret ble vasket ved å tilsette



75% etanol og sentrifugert i 5 min (9500 rpm/4°C). For et nytt vasketrinn ble supernatanten igjen fjernet og røret tilsatt 98% etanol og sentrifugert i 5 min (9500 rpm/4). Etter å ha fjernet supernatanten ble pelleten lufttørket i 10 minutter og tilsatt 100 µl RNase-fritt vann (70°C) for å resuspendere pelleten.

For hver 11 prøve som ble behandlet ble det inkludert én negativ rensek kontroll (NK).

Konsentrasjonen av total-RNA (ng/ µl) i de ekstraherte prøvene ble målt i et spektrofotometer (NanoDrop®ND-1000). Spektrofotometeret kvantifiserer blant annet nukleinsyrer og evaluerer renheten til RNAet. Det er absorpsjonen ved 260/280 nm og 260/230 nm som gir et mål på renheten til RNAet, der verdier nært opp til 2,0 indikerer at RNAet ikke er kontaminert av blant annet proteiner. Før de respektive prøvene ble målt, ble sensoren vasket ved tilførsel av 1,5 µl RNase-fritt vann. Tilsvarende volum fra RNA-prøvene ble så tilført sensoren for måling. Mellom hver prøve ble sensoren tørket av med linsepapir. RNA-prøvene ble oppbevart ved -32°C frem til analyse.

### **2.3 Revers transkriptase (RT)- cDNA syntese**

For å kunne kjøre PCR for sekvensering av virusisolatet ALV413, ble rensert RNA transkribert til cDNA i en revers transkriptase (RT)- prosess.

Til denne prosessen ble det benyttet én uspesifikk primer (pd(N)<sub>6</sub>), og to spesifikke primere; F1600 og SAV20R. De spesifikke primerene dekker deler av kapsidet, hele E3 og en del av E2-genet, totalt 1347 nukleotider på den strukturelle leserammen (Karlsen et al. 2006).

Det ble laget en løsning bestående av 1µl F1600, 1µl SAV20R, 1 µl pd(N)<sub>6</sub>, 3 µl destillert vann (dH<sub>2</sub>O) og 4 µl RNA-templat. For å denaturere RNAets sekundærstruktur ble denne løsningen inkubert på 70°C i 5 min i en Arktik<sup>TM</sup> Thermal cycler. Blandingen kjøles raskt ned etter inkubering for at primerene skal kunne binde seg til mRNAet. En mastermix bestående av 5 µl M-MLV (Maloney Murine Leukemic Virus) 5x buffer, 4 µl dNTP (deoxyribonukleotid trifosfat), 0,5 µl M-MLV reverse transkriptase og 7 µl dH<sub>2</sub>O ble tilsatt løsningen til et totalt volum på 25 µl. Reaksjonen ble kjørt på 37 °C i 60 min. Enzymet M-MLV Revers transkriptase vil da binde seg til primerene, og ved tilstedeværelse av dNTP vil den komplementære cDNA-tråden syntetiseres.

## 2.4 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

PCR ble utført med cDNA fra virusisolatet ALV413.

PCR er et verktøy som blir benyttet for å oppformere spesifikke nukleotidsekvenser i en eksponentiell amplifikasjonsprosess. Amplifikasjonen ble basert på en standard reaksjonsmiksbestående av 2,5 µl dNTP, 1 µl forward- og 1 µl revers primer, 0,5 µl Taq DNA polymerase, 2,5 µl Taq DNA polymerase x10 buffer, 16 µl dH<sub>2</sub>O og 2 µl cDNA, i et totalt volum på 25 µl.

Reaksjonen ble utført under følgende betingelser i Applied Biosystems GeneAmp® PCR systems 9700: denaturering i 5 min på 94°C, 40 sykluser med; denaturering på 94°C i 30 sekunder, amplifisering på 59°C i 45 sek, 45 sekunder med elongering på 72°C og ekstensjon på 72°C i 10 min. I denatureringssteget benyttes høy temperatur for å separere dobbeltrådig DNA (dsDNA) til enkelttrådet DNA (ssDNA) som primere kan feste seg på. Ettersom det ble brukt sekvensspesifikke primere, vil disse binde seg til et bestemt område på DNAet.

Primerene som benyttes er designet til å hybridisere til motsatte, komplementære ssDNA-tråder (forward og revers primer), slik at begge trådene transkriberes samtidig. Primere benyttet i PCR-reaksjonen er listet opp i tabell 5. Under ekstensjonen vil Taq DNA polymerasen syntetisere en komplementær DNA-tråd, ved å binde nukleotider (dNTP) til den opprinnelige ssDNA-tråden. Disse syklusene repeteres til en har ønsket mengde DNA, i dette tilfellet 40 sykluser.

**Tabell 5. Primere benyttet under Revers transkriptase og PCR, med sekvens, posisjon i forhold til SAVH20/03-sekvensen og referanse.**

Primere	Sekvens	Posisjon	Referanse
<b>F1600 (Forward)</b>	5'-CGGCACTATCAGAGTGGAGGA-3'	8377-8397	
<b>F2234 (Forward)</b>	5'-CGGGTGAAACATCTCTGCG-3'	9015-9033	
<b>R2357 (Reverse)</b>	5'-AGGATGTAGTGGCCGGTGG-3'	9120-9138	Karlsen et al. (2006)
<b>SAV20R (Reverse)</b>	5'-GGCATTGCTGTGGAAACC-3'	9746-9763	

## 2.5 Gel elektroforese og sekvensering

Det ble benyttet gel-elektroforese for å visualisere PCR-produktet. I reaksjonen benyttes et elektrisk felt i en agarosegel for å separere DNA-fragmenter, basert på fragmentenes størrelse. Den elektriske spenningsforskjellen utnytter DNAets negative ladning, som tiltrekkes mot anoden. Vandringshastigheten vil avhenge av størrelsen på molekylet, spenningen koblet til løsningen og porestørrelsen i gelen. Små molekyler vil vandre raskere gjennom gelen enn større fragmenter, slik at DNAet sorteres i bånd, basert på antall basepar.

Gelen ble laget av 400 ml 1 X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer iblandet 4 gram agarose og tilsatt 1 µl GelRed<sup>TM</sup>, en fluoriserende farge som farger nukleinsyrer. Når gelen hadde stivnet ble den tildekket med 1 X TAE-buffer. Som en størrelsesmarkør for molekylær vekt, ble 2,5 µl SmartLadder (Eurogentec MW-1700-02) tilsatt første brønn i gelen. En blanding av 5 µl av PCR-produktet til den respektive prøven og 1 µl 6x loading dye ble tilsatt en brønn i gelen, som så ble koblet til 90 volt i 30 min. Programmet Carestream MI GelLogic 212 Pro ble brukt for å visualisere resultatene under UV-lys.

For å finne rekkefølgen til nukleotidene i DNA-molekylet, ble PCR-produktet sekvensert ved bruk av de to spesifikke primerene F1600 og R2357. Resultatene fra sekvenseringen kan brukes for å sammenligne virusisolatet benyttet i forsøket med tidligere beskrevne isolater. Sekvenseringsreaksjonen ble utført ved bruk av BigDye® Terminator 3.1 sekvenseringskit (Applied biosystems) i Veriti thermal cyclers (Applied biosystems). Reaksjonsblandingen bestod av 1 µL BigDye Terminator 3.1 version Ready Reaction Premix (2.5X) (Invitrogen), 1 µL BigDye® Terminator 3.1 version sequencing buffer, 1 µL primer, 6 µL dH<sub>2</sub>O og 1 µL rensert PCR-produkt. Reaksjonen ble kjørt under følgende betingelser: 96°C i 5 min, 30 sykluser med; 96°C i 10 sekunder, 58°C i 5 sekunder og 60°C i 4 minutter. Begge rørene ble tilsatt 10 µL dH<sub>2</sub>O og levert til sekvenseringslaboratoriet på Høyteknologisenteret i Bergen. Sekvensene ble satt sammen og analysert ved bruk av Vector NTI® v.9.0 (Invitrogen<sup>TM</sup>).

## 2.6 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR ble benyttet til relativ kvantifisering av SAV-spesifikt RNA (templat) i vevsprøvene. Antall amplifiseringssykluser som fører til en overstigning av dette nivået kalles terskelverdi ( $C_t$ -verdi), og gjenspeiler mengde templat i prøven i et utgangspunkt. Følgelig vil en lav  $C_t$  - verdi bety at terskelnivået overstiges etter få amplifiseringssykluser, grunnet en høy konsentrasjon av DNA i prøven.

For å lage en real-time RT-PCR reaksjonsmiks brukes AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Life Technologies). Reaksjonsmiksen bestod av, i et totalt volum på 12,5 µl pr. brønn; 6,25µl 2X RT-PCR Buffer, 1 µl Forward primer (10 µM), 1 µl Reverse primer (10 µM), 0,22 µl Probe (10 µM), 0,25 µl 25x RT-PCR enzym-mix, 1,78 µl dH<sub>2</sub>O og 2 µl RNA-templat. Primere og prober benyttet i studien er listet i tabell 6. Analysene ble kjørt i et 7500 Real Time PCR system (Applied biosystems™), med et standard Agpath temperaturregime: revers transkriptase på 45 °C i 10 min, polymerase-aktivering på 95°C i 10 min, 45 sykluser med DNA- denaturering på 95 °C i 15 sekunder og amplifisering og elongering på 60 °C i 45 sekunder.

For å oppdage en eventuell kontaminering under RNA-ekstraksjonsprosessen eller under oppsett av real-time RT-PCR, ble negative RNA-ekstraksjonskontroller (NK) og ikke-templat kontroller (NTC) inkludert i alle nalysene. Amplifikasjonskurven til reaksjonen ble analysert ved bruk av programvaren Applied Biosystem 7500 Software v.2.3 og gitt en terskelverdi på 0,1. Prøver over denne terskelverdien ble betraktet som positive.

Vev analysert med assayet QNSAV ble kjørt i triplikate, der positive prøver for SAV i triplikate og duplikate ble satt som positive, med en gjennomsnittlig verdi. Prøvene ble kjørt i triplikate for å styrke sikkerheten og presisjonen til verdiene. For hver prøve som ble analysert, ble det satt opp en PCR-reaksjon som målte mengde elongeringsfaktor i vevsprøven.

Elongeringsfaktorene er husholdningsgen som er nødvendige for basale celledfunksjoner, og uttrykkes alltid i tilnærmet konstant mengde i de fleste av fiskens celler. Disse er dermed gode endogene kontroller for å kvalitetssikre RNA-ekstraksjonen og at PCR-reaksjonen er vellykket. Noen prøver ble analysert ved PHARMAQ Analytiq sitt laboratorium, i henhold til deres standard rutiner.

**Tabell 6. Real-time RT-PCR assay for å detektere SAV (nsp1 og QNSAV), elongeringsfaktor hos laks og elongeringsfaktor hos *Lepeophtheirus salmonis***

Mål	Assay	Sekvens	Referanse
<b>Salmonid alfavirus, nsP1</b>	Q_nsP1 F	5'-CCG GCC CTG AAC CAG TT-3'	Hodneland og Endresen (2006)
	Q_nsP1 R	5'-GTA GCC AAC TGG GAG AAA GCT-3'	
	Q_nsP1 P	5'-TCG AAG TGG TGG CCA G-3'	
<b>Salmonid alfavirus, QNSAV</b>	Q_NSAV F	5'-CAG TGA AAT TCG ATA AGA AGT GCA A-3'	Hodneland et al. (2005)
	Q_NSAV R	5'-TGG GAG TCG CTG GTA AAG GT-3'	
	Q_NSAV P	5'-AGC GCT GCC CAA GCG ACC G-3'	
<b>Elongeringsfaktor for laks 1 Alfa</b>	EF1A F	5'-CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA-3'	Olsvik et al. 2005
	EF1A R	5'- CACA CG GCC CAC AGG TAC A-3'	
	EF1A P	5'-ATC GGT GGT ATT GGA AC-3'	
<b>Elongeringsfaktor for laks 1 Alfa/beta</b>	EF1ab F	5'- TGCCCCTCCAGGATGTCTAC-3'	Pharmaq Analytiq AS (2016)
	EF1ab R	5'- CACGGCCACAGGTACTG-3'	
	EF1ab P	5'- CCAATACCGCCGATTTT-3'	
<b>Elongeringsfaktor for <i>Lepeophtheirus salmonis</i> eEF1a</b>	LSelfa F	5'- TTA AGG AAA AGG TCG ACA GAC GTA-3'	Frost og Nilsen (2003)
	LSelfa R	5'- GCC GGC ATC ACC AGA CTT-3'	
	LSelfa P	5'- FAM ACG TAC TGG TAA ATC CAC-3'	

## 2.7 Normalisering av data

$C_t$ -verdier fra assayene nsp1 og QNSAV ble normalisert mot korresponderende  $C_t$ -verdier fra referansegenet elongeringsfaktor 1 (EF1a og EF1ab). Ved å normalisere  $C_t$ -verdiene korrigeres det for variasjoner mellom prøvene som følge av blant annet varierende mengde og kvalitet på vev og RNA ekstraksjon.

Den matematiske modellen (ligning 1) som benyttes for å regne ut de normaliserte verdiene (NE) er avhengig av effektiviteten (E) til det spesifikke målgenet ( $E_{\text{mål}}$ ) og det benyttede referansegenet ( $E_{\text{ref}}$ ). Primereffektivitetene til de benyttede assayene ble hentet fra tidligere utførte forsøk (se tabell 7).

For QNSAV, som ble kjørt i triplikate, ble det regnet ut en gjennomsnittlig normalisert verdi (MNE).

$$NE = \frac{E_{\text{ref}}^{C_t - \text{ref}}}{E_{\text{mål}}^{C_t - \text{målgen}}} \quad (1, \text{Simon, 2003})$$

**Tabell 7. Effektiviteten til de benyttede assayene.** Effektivitets-verdien er hentet fra tidligere utførte forsøk.

<b>Assay</b>	<b>Effektivitet</b>	<b>Referanse</b>
Salmonid alfavirus, nsp1	1,985	Skjold (2014)
Elongeringsfaktor for laks, EFA1a	1,987	Sveen (2010)
QNSAV	1,94	PHARMAQ Analytiq AS
Elongeringsfaktor for laks, EF1Ab	1,78	PHARMAQ Analytiq AS

De normaliserte verdiene ble omgjort til NE-foldsøkning ved å definere den prøven med lavest normalisert genuttrykk (NE) som 1, for deretter å kalibrere hver prøve enkeltvis mot denne. Dataene ble så log<sub>10</sub>-transformert i GraphPad Prism versjon 6 for Mac (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Dette programmet ble også anvendt til å lage grafer og for statistiske analyser. Det er de normaliserte dataene som benyttes ved fremstilling av kvantitative data fra real-time RT-PCR i grafer, med logaritmisk y-akse. Datapunktene vises med geometrisk middelvei, med 95 % konfidensintervall.

## **2.8 Celledyrking/ re-isolering**

Chinooklaks embryo-celler (CHSE-celler) var på forhånd kultivert i Nunclon™ celleflasker og hadde blitt passert 60 ganger. Cellekulturen ble vasket 3 ganger med PBS, før 1 ml Trypsin EDTA ble tilsatt, for å løsne cellene fra underlaget. Celleflasken ble tilsatt 15 ml forhåndslaget vekstmedium (10% EMEM, se vedlegg 1) og cellene ble så fordelt på tre mindre Nunclon™ celleflasker, 5 ml i hver flaske. Cellene ble inkubert ved 20°C og splittet hver andre uke. Når omlag 90% av bunnen i celleflasken var dekket av celler, ble disse smittet med det ufortynnede virusisolatet ALV413. Vekstmediet (10 %) ble erstattet med 2 % EMEM vedlikeholdsmedium, før cellene ble inokulert med virus (i en 1:10 fortytning). Én cellekultur ble smittet med SAV og én cellekultur ble brukt som negativ kontroll. Cellene ble inkubert ved 14°C. Kulturen smittet med virus ble mikroskopert daglig for å se etter tilstedeværelse og eventuelt utviklingen av cytopatogen effekt (CPE). Cellene som var infisert med SAV ble høstet 16 dager etter smitte for å sekvensere virusisolatet. Cellesuspensjonene (100 µl av supernatanten) ble sentrifugert i 10 min på 1000 rpm. Pelletten som ble dannet ved sentrifugering ble overført til et nytt microrør for videre analyse. Før sekvensering av viruset ble RNA ekstrahert fra prøven og transkribert til cDNA. Den resterende supernatanten ble lagret ved -80°C.

## 2.9 Histologi

Prøver av hjerte ble prosessert og støpt inn i parafinvoks, før det ble skåret ut tynne seksjoner (1,5-2 µm) av det parafininnstøpte hjertet. Snittene ble lagt på objektglass og farget med hematoksylin og eosin (HE). De histologiske bildene ble laget av IDEXX laboratories. Snittene ble undersøkt for histopatologiske vevsforandringer karakteristiske for en SAV-infeksjon. Hver prøve fikk en score basert på eventuelle vevsforandringers alvorlighetsgrad (se tabell 8).

Normal hjerte-histologi ble gitt score 0, mens fokal og multifokal degenerasjon og nekrose av kardiomyocytter ble gitt score 0.1-3. For score over 2, må det være inflammasjonsceller tilstede i vevet.

For et objektivt resultat av scoringen, ble lesjonene vurdert blindt (uten kjent merke).

**Tabell 8 kriterier brukt for å score histologiske lesjoner.** Scoringssystemet er basert på en tabell hentet fra Xu et al. (2012a).

Score	Hjerte, atrium	Hjerte, ventrikkel
<b>0 – 1.0</b>	Fokal infiltrasjon av inflammasjonsceller; 1-2 foci. Høyere score dersom større områder er involvert (>0.5)	<i>Akutt:</i> Fokal nekrose av myocytter (individuelle celler), 5-10 foci/celler pr prøve (apoptotiske celler) <i>Subakutt/kronisk:</i> Fokal/multifokale inflammatoriske forandringer (1-2 foci pr felt) inkludert noen få betennelsesceller (<5 per fokus) med eller uten nekrose.
<b>1.1 – 2.0</b>	Fokal infiltrasjon av inflammasjonsceller; 2-5 foci. Høyere score ved større område pr. foci (>1.5)	<i>Akutt:</i> multifokal nekrose, opp til 10 pr felt ved 20x forstørrelse. Dersom det, i tillegg til nekrose, kan ses infiltrasjon av betennelsesceller er det en mild betennelse med få celler. <i>Subakutt/kronisk:</i> Multifokale inflammatoriske forandringer (mellom >3 og <10 foci pr felt) med/uten nekrose, med >5 inflammasjonsceller per fokus. Områder med diffus inflammasjon.
<b>2.1 – 3.0</b>	Fokal infiltrasjon av inflammasjonsceller; >5 foci. → diffuse forandringer (inflammasjon og/eller nekrose). Diffuse forandringer (score >2.5)	<i>Akutt:</i> multifokal nekrose (>10 per felt ved 20x forstørrelse), med moderat til kraftig infiltrasjon av betennelsesceller. Distinkt hyperplasi i endotelet. <i>Subakutt til kronisk:</i> Diffuse inflammatoriske forandringer med/uten nekrose (score >2.5)

### 3. Resultater

#### 3.1 Uttak før forsøksstart

Ved bruk av real-time RT-PCR kunne ikke SAV-RNA påvises i nullprøvene tatt ut ved forsøket start. Det kunne heller ikke observeres patologi i form av degenerasjoner/nekroser eller inflammasjon i hjertevev ved histopatologisk undersøkelse av nullprøver.

#### 3.2 Vekt

Gjennomsnittsvekt ved vaksinerings var 37,6 gram (26,8 g -51,4 g). Fiskevekt ble også registrert hos eventuelle dødfisk og hos samtlige fisker ved tidspunkt for avslutning av forsøket (22 dager etter tilførsel av sheddere) (se tabell 9).

Den gjennomsnittlige vekten til uvaksinert kontrollfisk (PBS) var den høyeste ved terminering av forsøket (81,4 gram). Gjennomsnittsvekten til fisken vaksinert med IHV-SAV3 var lavere enn, og signifikant ulik fra uvaksinert kontrollgruppe (75,25 vs. 81,4 g,  $p=0.001$ ). Både fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3 og uvaksinert kontrollgruppe hadde signifikant høyere vekt enn fiskegruppen immunisert med ALV413 ( $p<0.0001$ ), der gjennomsnittsvekten for gruppen var 60,65 gram.

**Tabell 9. Gjennomsnittsvekt for samtlige fisk ved forsøksslutt, målt i gram.** Den gjennomsnittlige vekten til hver gruppe ble basert på 20 fisk pr kar, med unntak av shedderne der den er basert på 12 individer pr kar. Den laveste og den høyeste vekten registrert for gruppen i det enkelte karet er inkludert i parentes.

Fiskegruppe/ kar	Vekt i gram (min-maks)			
	K1 (m/lakselus)	K2 (m/lakselus)	K3	K4
1- ALV413	56 (38-71)	65,3 (40-84)	65,9 (45-81)	55,4 (35-79)
2- IHV-SAV3	78,6 (54-100)	75,2 (53-94)	71,1 (61-95)	76,1 (57-102)
3- PBS	75,4 (58-96)	85,5 (65-120)	83,8 (55-109)	81 (60-113)
Shedder	67 (56-77)	66,8 (47-88)	76 (63-98)	66,6 (49-99)



### 3.3 Dødelighet

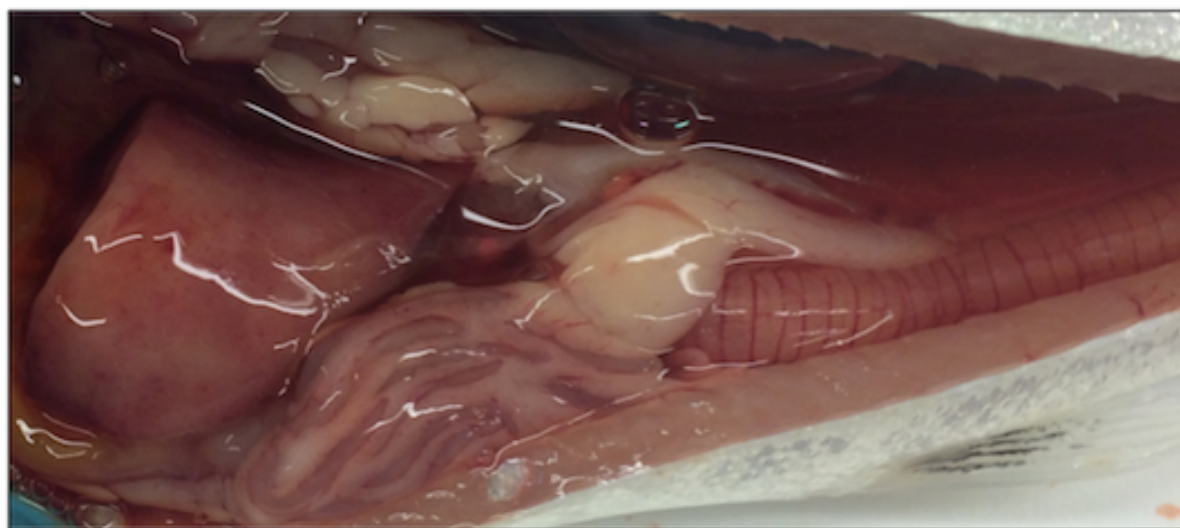
Det oppstod en periode med dødelighet hos fiskegruppen som ble immunisert med ALV413 (n=9 av 88), 19 dager etter i.p. injeksjon av virus. Dødeligheten startet 5 dager etter overgang til 24 t lys, i ferskvannsfasen, og avtok etter 6 dager. Sheddere var ikke tilsatt karene på dette tidspunktet. Hos de 9 individene som døde, kunne ascites i bukhulen ses hos samtlige fisk (se figur 4). En kunne også observere punktblødninger i det periviscerale fettvevet hos enkelte individer. Én av de døde fiskene hadde blek, marmorisert lever.



**Figur 4. Fiskegruppe 1, immunisert med ALV413,  $2,37 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Dødelighet før tilsetning av SAV-sheddere a)** Bildet viser et individ som har morfologiske karakteristika som tyder på at fisken var under smoltifisering på død tidspunktet. **b)** Samtlige fisker som døde før tilsetning av sheddere hadde ved obduksjon blodig ascites i bukhulen. Enkelte individer hadde også punktblødninger i det periviscerale fettvevet.

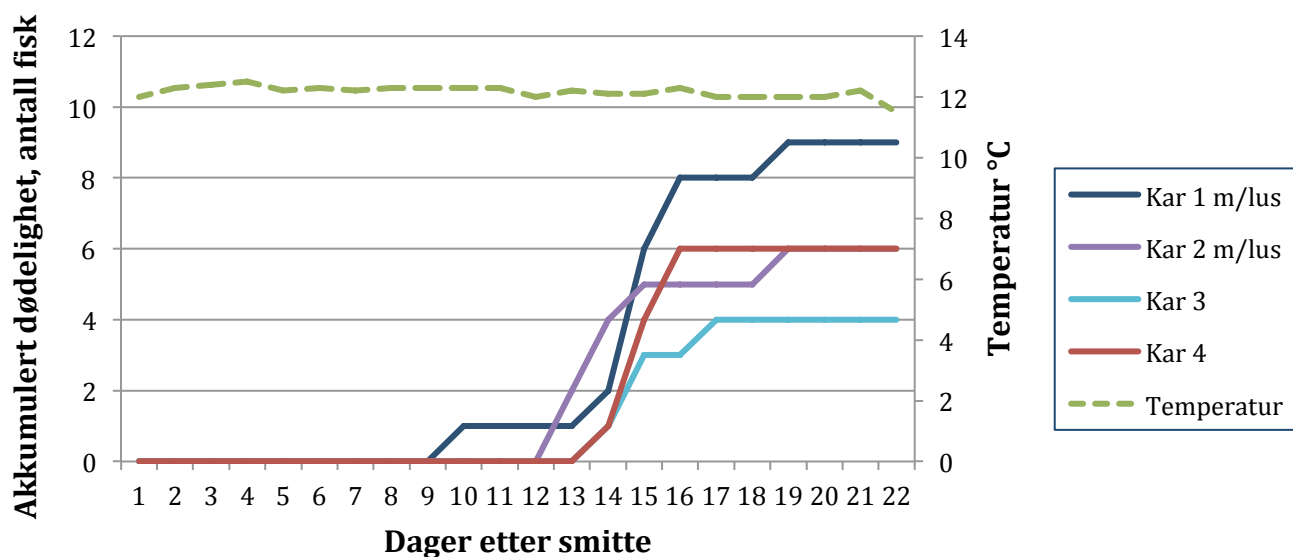
Dødelighet hos shedderfisk (i.p. injisert med ALV413  $2,37 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/fisk) begynte 10 dager etter smitte, og varte i kar 1 og 2 til 19 dpi (se figur 6). I dette tidsrommet ble det tatt ut totalt 15 døde shedderfisk fra disse to karene. I kar 3 og 4 oppstod det dødelighet 14 dager etter smitte. I disse karene døde det 10 shedderfisk i løpet av 4 døgn. Totalt i forsøket døde 52% av shedderene (n=25 av 48). Av de 25 fiskene som døde hadde 58% blitt utsatt for lusestress (n=15 av 25). Det ble ikke observert letargiske individer eller atferdsendringer før dødsfall hos noen av individene. Blodig ascites, punktblødninger i perivisceralt fettvev, tom tarm og blek lever ble observert hos alle shedderfisk (n=48) (se figur 5).

Det oppstod ingen dødelighet hos kohabitantfiskene etter tilsetning av shedderfisk. Effekten av immuniseringsmetodene ble derfor kun vurdert ut ifra kliniske symptomer, histopatologiske undersøkelser av hjerte og prevalens og kvantifisering av viralt RNA i hjertevev.



**Figur 5. Makroskopiske endringer som kunne ses ved obduksjon av shedderfisk.** På bildet ser en blodig ascites i bukhule, blek lever, punktblødninger i perivisceralt fettvev og lite fettvev rundt pylorusblindsekkene.

## Dødelighet hos shedderfisk



**Figur 6. Akkumulert dødelighet hos shedderfisk (i.p. injisert med ALV413  $2,37 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/fisk).** Det ble tilsatt 12 sheddere i hvert kar ved smitte (totalt n=48). Lakseluscopepoditter ble tilsatt kar 1 og 2 etter overføring til sjøvann. Vanntemperatur i karene etter tilsetning av sheddere er inkludert i figuren (gjennomsnittstemperatur: 12,1 °C). Saliniteten ble holdt konstant ved 35 ‰ etter overføring til sjøvann. Det oppstod ingen dødelighet hos kohabitantfiskene etter tilsetning av shedderfisk. Fiskene som ble avlivet ved avslutning av forsøket er ikke tatt med i figuren.

### 3.4 Makroskopiske endringer og histologi

Epikard mellom ventrikkel og atrium, og bulbus arteriosus, er på samtlige prøver svært cellerikt, noe som ikke er uvanlig hos oppdrettsfisk (pers. med. Renate Johansen). Dette området er derfor ikke tatt med i scoren. Histologiscore for samtlige undersøkte prøver er fremstilt i figur 7. Det var ikke ulikheter i histologiscore mellom fisken vaksinert med IHV-SAV3 og fisken immunisert med ALV413 (Kruskal-Wallis test,  $p > 0,9999$ ). Uvaksinert kontrollfisk hadde høyere histologiscore enn de andre gruppene ( $p < 0,0001$ ). Ingen videre analyser ble gjort på prøvene tatt ut fra pankreas og muskulatur.

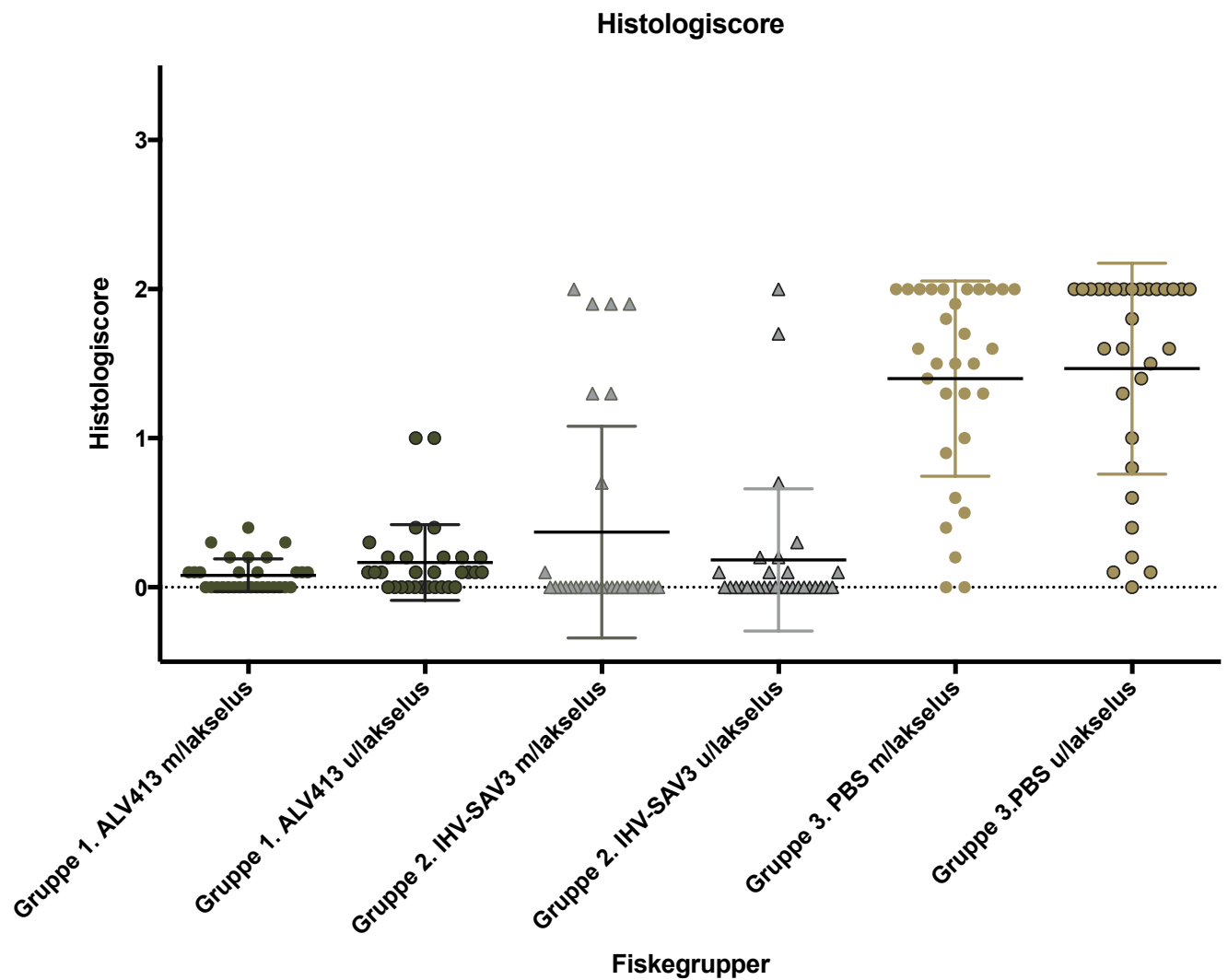
Visuelle observasjoner ved obduksjon av fiskegruppen immunisert med ALV413 ( $n=79$ ) viste tydelig avmagring, med lite fett rundt pylorusblindsekkene og tom tarm (se figur 8). Av 79 undersøkte fisk fra denne gruppen hadde 4 av disse makroskopiske, synlige punktblødninger i perivisceralt fettvev. Ved histologiske undersøkelser av hjertevev kunne det observeres patologi i form av noe hypercellularitet i overgangen mellom den kompakte og spongiøse delen av myokard hos enkelte individer. Det ble også observert foci med inflammasjonsceller, diffus inflammasjon og/eller epikarditt i ventrikkel hos 32 av 60 fisk (se figur 9-11).

Myocyttnekroser ble kun observert hos 4 individer

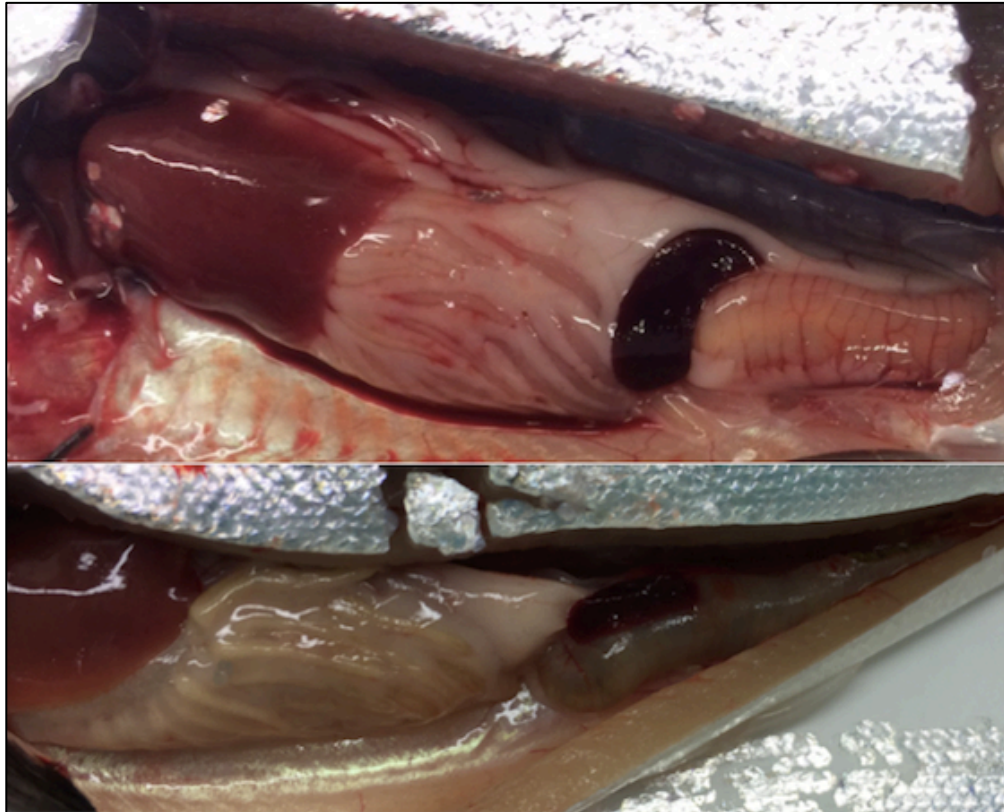
Hos fisken som hadde blitt vaksinert med IHV-SAV3 ( $n=80$ ), kunne få makroskopiske endringer ses. Tilnærmet alle fiskene hadde fôr i tarmen. Hos ett av individene kunne imidlertid punktblødninger i perivisceralt fettvev og ascites i bukhulen ses. Noe vaksinebivirkninger i form av adheranser (grad 0,5-1) og melanin (grad 0,5-1) rundt organpakken ble observert hos 7 av 80 fisk (se figur 12). Ved histologisk undersøkelse ble det observert fokale nekroser i ventrikkel av score 1 - 2 hos 8 av 60 individer (se figur 13).

Den uvaksinerte kontrollgruppen ( $n=80$ ) hadde høy prevalens av punktblødninger i perivisceralt fettvev (65%) og ascites (46%) (se figur 14), og 6 av 80 fisk hadde irregulær milt ("bringebærmilt"). Histopatologiske vevsforandringer kunne ses hos de fleste av fiskene fra denne fiskegruppen ( $n=57$  av 60). Prøvene hadde en høy tilstedeværelse av multifokale myocyttnekroser, med  $>10$  enkeltcelle-nekroser pr. synsfelt (ved 20 x forstørrelse) hos enkelte individer (se figur 15 og 16). Nekrosene ble observert i kompaktum og spongiosum i det ventrikulære myokardet, men var mest fremtredende i det spongiøse laget.

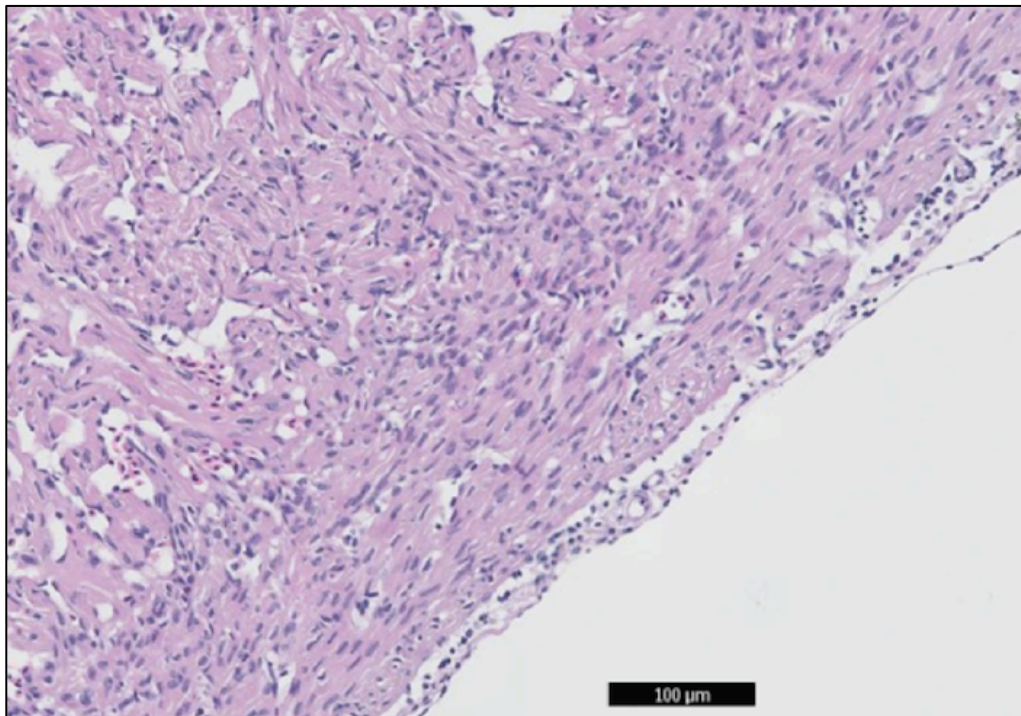
Inflammatoriske forandringer var fraværende både hos fisk vaksinert med IHV-SAV3 og uvaksinert kontrollfisk og ingen prøver fikk derfor score over 2 (se tabell 7).



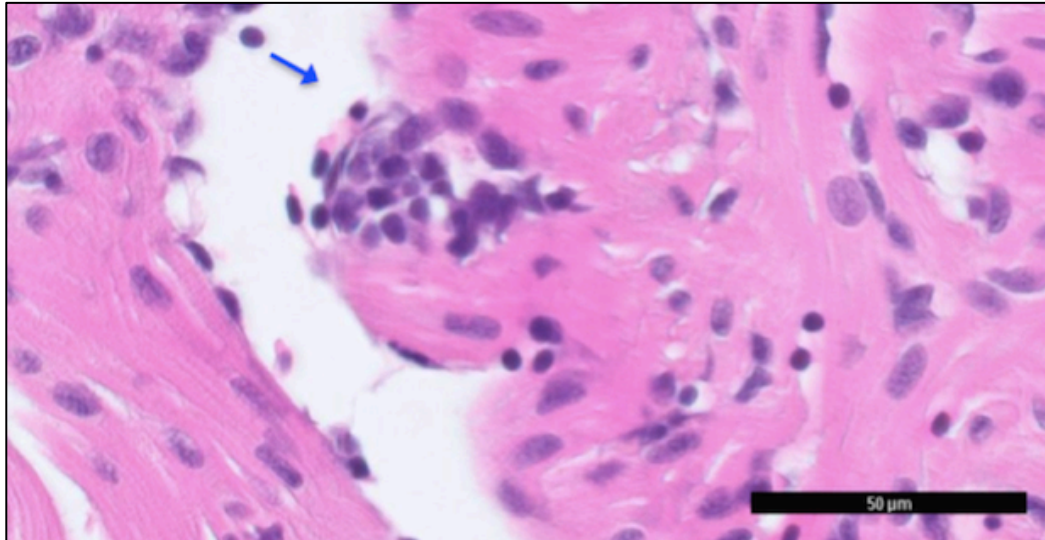
**Figur 7. Semi-kvantitativ histologiscore av hjertevev.** Histologiscoren (y-akse) er basert på et scoringssystem hentet fra Xu et al (2012a), med noen modifikasjoner. Hver gruppe (x-akse) representerer 60 fisk, 30 fisk med lakselus og 30 fisk uten lakselus i karet. Fiskegruppe 1= fisk immunisert med ALV413, fiskegruppe 2= fisk vaksinert med IHV-SAV3, fiskegruppe 3= fisk injisert med PBS. Lesjoner hos fisken i fiskegruppe 1 er hovedsakelig forenlige med et subakutt/kronisk sykdomsbilde, der inflammasjon i hjertet er den mest fremtredende forandringen. Hos fiskegruppe 2 og 3 er de observerte lesjonene i samsvar med et akutt sykdomsforløp, med degenerasjon og nekrose av myocytter. Ved fravær av inflammasjon ble det ikke gitt en høyere score enn 2.



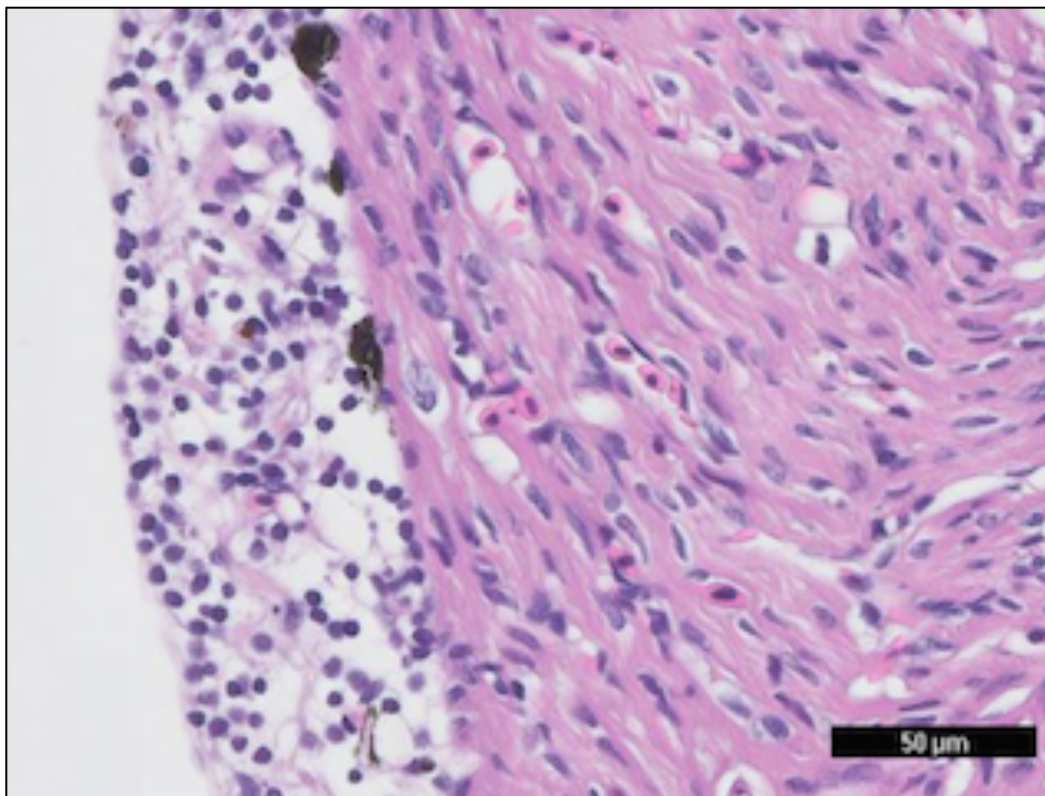
**Figur 8. Fiskegruppe 1, fisk immunisert med ALV413** a) Bildet viser et individ med blødninger i perivisceralt fettvev, gult innhold i tarm og svullen milt. b) Bildet viser et individ med lite fettvev rundt pylorusblindsekkene og svullen milt. Bildene er tatt ved avslutning av forsøket, 22 dager etter tilsetning av shedderfisk.



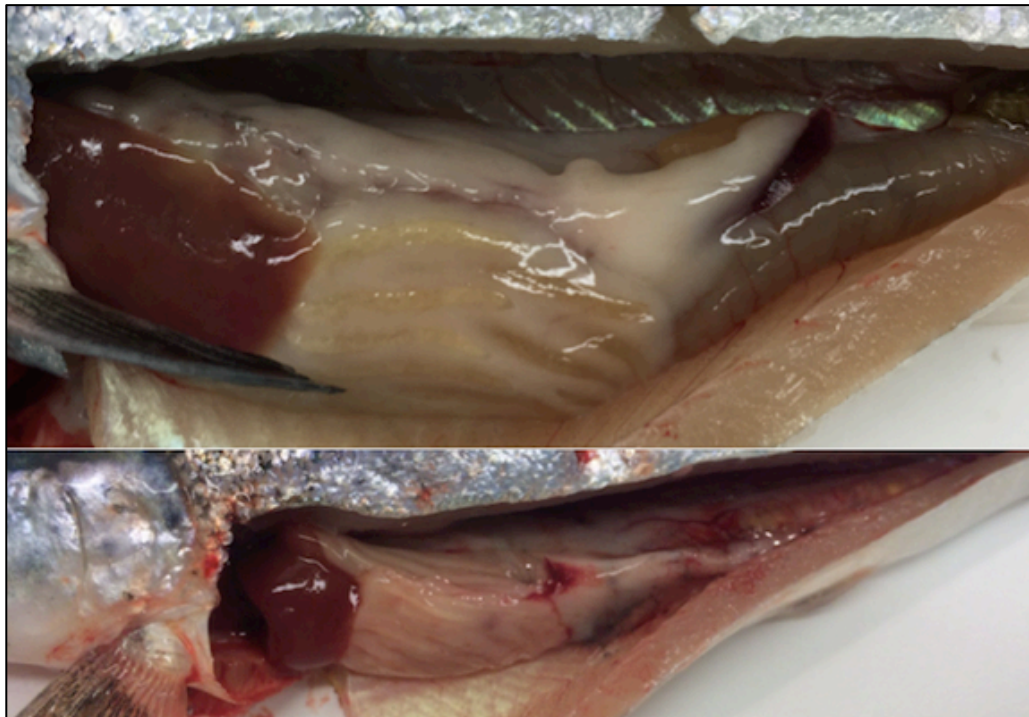
**Figur 9. Fiskegruppe 1, fisk immunisert med ALV413.** Bildet er av hjerte, med diffus inflammasjon i ventrikkel. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 10x forstørrelse. Målestokk=100  $\mu$ m



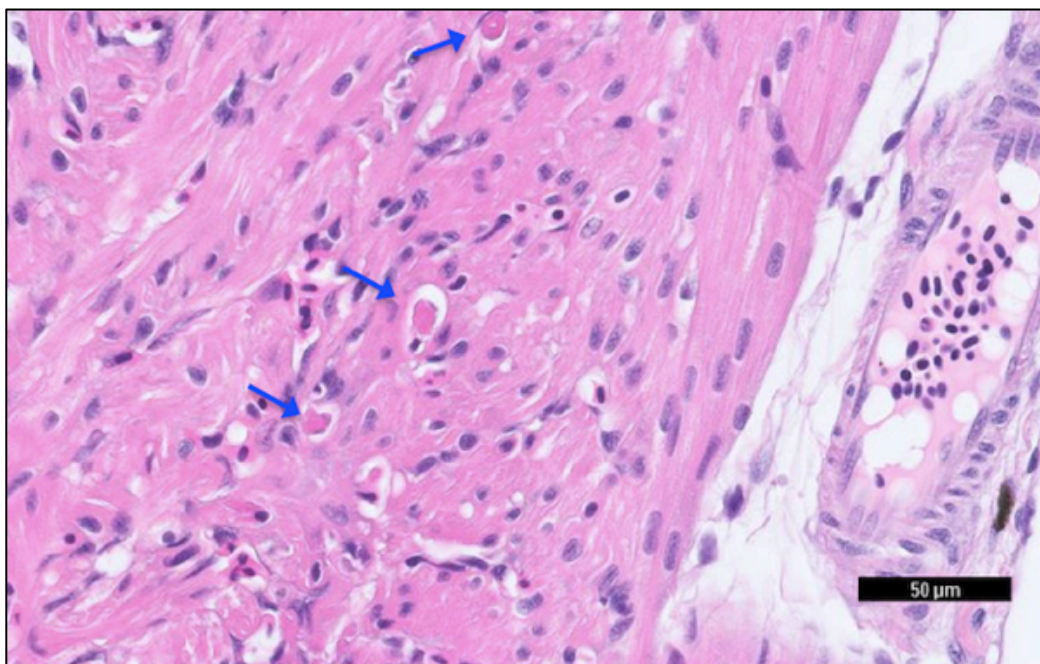
**Figur 10. Fiskegruppe 1, fisk immunisert med ALV413.** På bilden kan en se betennelsesfoci i det spongiøse lag i ventrikkel. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 40x forstørrelse. Målestokk=50 µm



**Figur 11. Fiskegruppe 1, fisk immunisert med ALV413.** Bildet viser epikarditt i ventrikkel. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 20x forstørrelse. Målestokk=50 µm



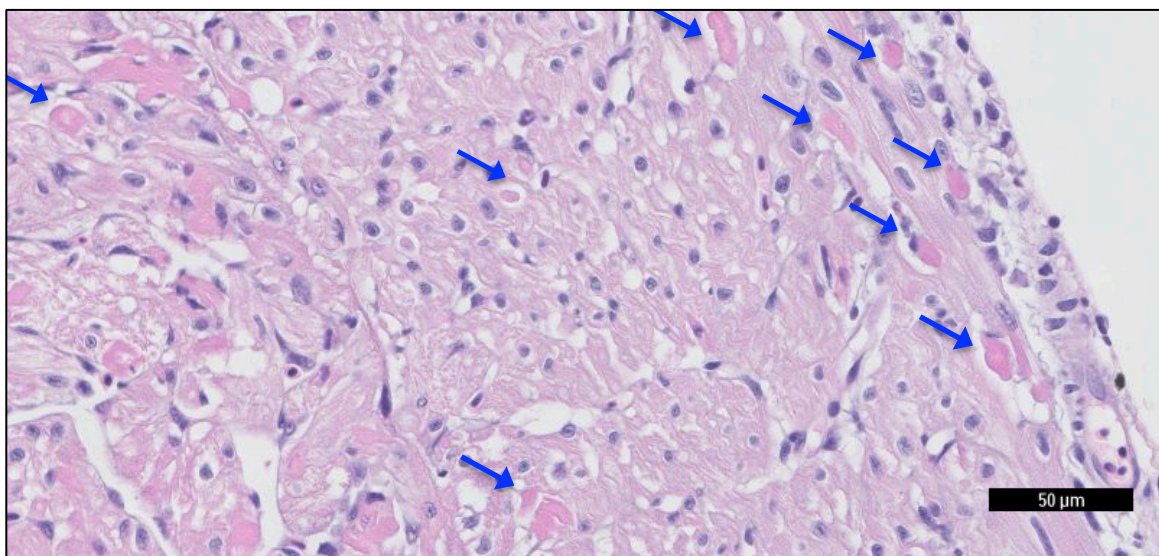
**Figur 12. Fiskegruppe 2, fisk vaksinert IHV-SAV3** a) Bildet viser et individ uten makroskopisk patologi b) På bildet kan en se vaksinebivirkninger i form av melanin og adhekanse rundt organene. Fisken har også gult innhold i tarm. Bildene er tatt ved avslutning av forsøket, 22 dager etter tilsetning av shedderfisk



**Figur 13. Fiskegruppe 2, fisk vaksinert IHV-SAV3.** På bildet kan en se nekroser av myocytter (blå pil) i ventrikkel. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 20x forstørrelse. Målestokk=50 μm

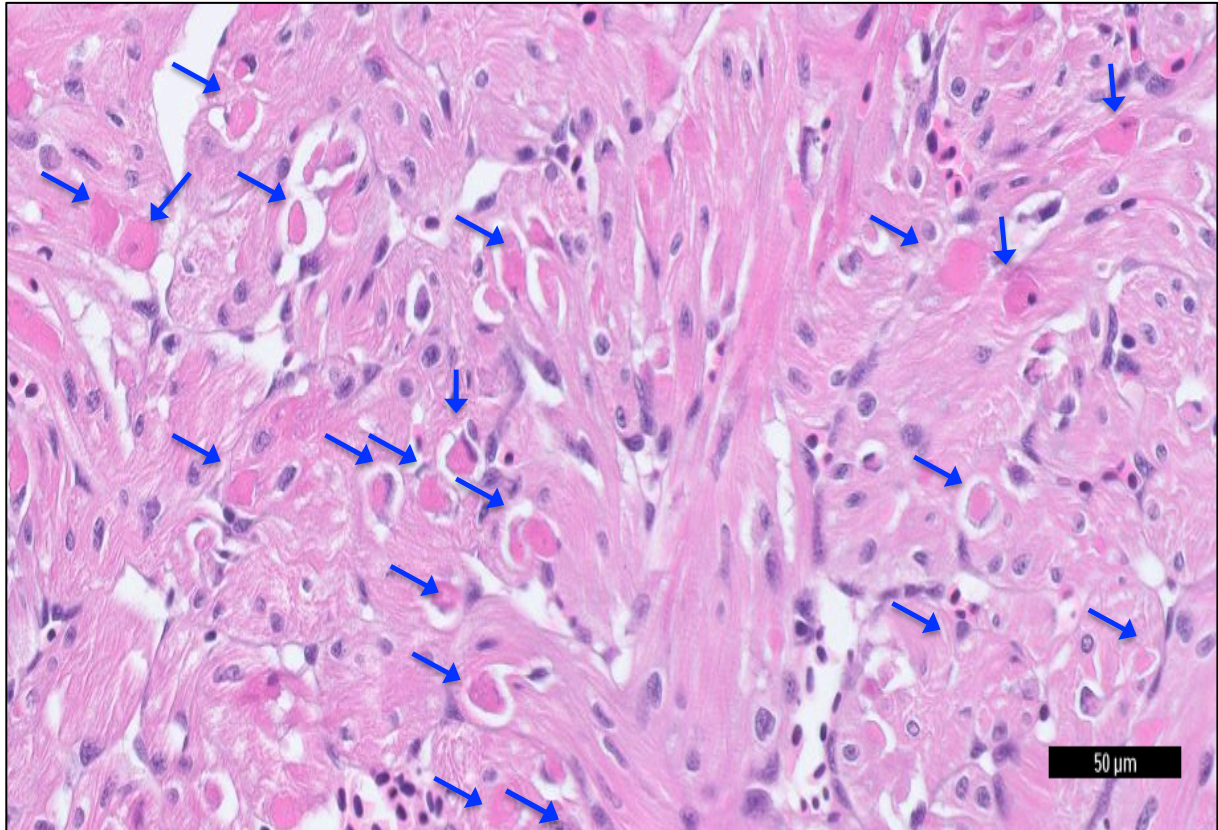


**Figur 14. Fiskegruppe 3, fisk injisert med PBS (uvaksinert kontrollfisk).** Bildet viser et individ med blodig ascites i bukhulen. Bildet er tatt ved avslutning av forsøket, 22 dager etter tilsetning av shedderfisk.



**Figur 15. Fiskegruppe 3, fisk injisert med PBS (uvaksinert kontrollfisk).** Multifokal nekrose av kardiomyocytter i både kompakt og spongios del av det ventrikulære myokardet. Nekrotiske eosinofile kardiomyocytter er merket med blå pil. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 20x forstørrelse. Målestokk=50 µm





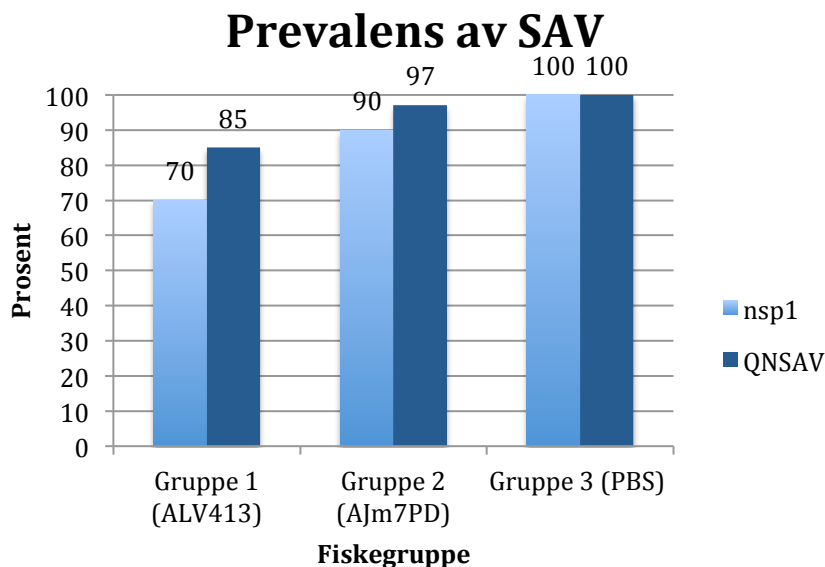
**Figur 16. Fiskegruppe 3, fisk injisert med PBS (uvaksinert kontrollfisk).** Hjerteventrikkel med multifokal nekrose av kardiomyocytter i det spongiøse lag. Nekrotiske eosinofile kardiomyocytter er merket med blå pil. Fisken ble avlivet 22 dager etter tilsetning av shedderfisk. Bildet er tatt med 20x forstørrelse. Målestokk=50 μm

### 3.5 Real-time RT-PCR analyse av vevsprøver

#### 3.5.1 Prevalens

Ved bruk av nsp1-assayet var det 100% prevalens av SAV hos shedderfisken. Tilsvarende var det 100% prevalens hos den uvaksinerte kontrollfisken. I fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3 og i fiskegruppen immunisert med ALV413 var prevalensen av SAV på henholdsvis 90 % og 70 %, etter analyse med nsp1-assayet. Grunnet høye  $C_t$ -verdier hos referansegenet, Elongeringsfaktor 1 (gjennomsnitt 19,55), var det mistanke om falske negative prøver ved bruk av nsp1-assayet. Alle prøvene fra kohabitantfisken ble derfor re-analysert i tripliket ved bruk av assayet QNSAV. Ved bruk av assayet QNSAV ble SAV påvist hos 58 av 60 fisk fra fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3 (97% prevalens). Det ble også detektert en tydelig økning i antall positive prøver i fiskegruppen immunisert med ALV413 ved bruk av QNSAV, med 83 % prevalens (se figur 17). Prevalensen i den uvaksinerte kontrollgruppen var 100% også ved bruk av QNSAV-assayet.

Det ble ikke observert noen sammenheng mellom SAV-påvisning ved real-time RT-PCR og tilstedeværelse av lakselus.



**Figur 17. Prevalens av fisk smittet med SAV, vist i prosent.** Hver kolonne representerer 60 fisk. Vevsprøvene fra hjerte er analysert ved bruk av real-time RT-PCR. De to kolonnene for hver gruppe representerer to ulike assayer, henholdsvis nsp1 og QNSAV. Analysene viser at assayet QNSAV er mer sensitivt enn nsp1, og er derfor det assayet som benyttes i videre fremstilling av resultater.

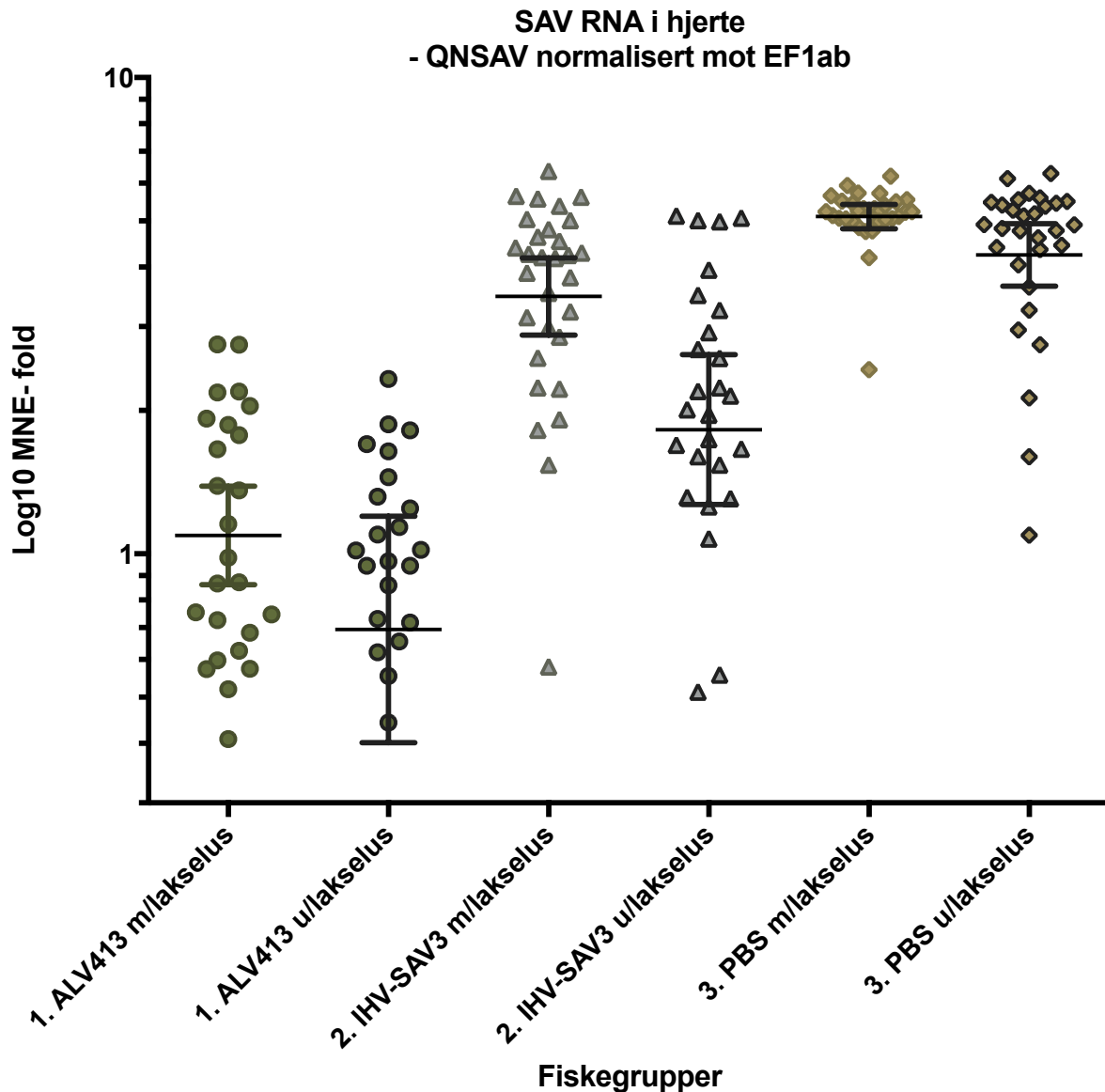
### 3.5.2 Relativ kvantifisering av viralt RNA i hjertevev

QNSAV-assayet var mer sensitivt enn nsp1, og lå i gjennomsnitt 1,1-2,2  $C_T$ -verdier lavere enn nsp1. Det ble derfor besluttet å benytte resultatene fra QNSAV ved presentasjon av data, med unntak av prøvene fra shedderfisken, der nsp1 er benyttet. For å sammenlikne variablene i datasettet ble Mann-Whitney test benyttet. Signifikante forskjeller mellom to fiskegrupper defineres som  $p \leq 0,05$ .

Den uvaksinerte kontrollfisken (PBS) hadde signifikant høyere nivåer av SAV-RNA enn både fisken vaksinert med IHV-SAV3 ( $p < 0.0001$ ) og fisken immunisert med ALV413 ( $p < 0.0001$ ). Det ble ikke detektert ulikheter i relativ mengde virus i hjertevev mellom kontrollfisk med og uten lus ( $p = 0.055$ ).

Svært lave nivåer av virus-RNA ble detektert i fiskegruppen immunisert med ALV413, og resultatene var signifikant lavere enn for de andre gruppene (se figur 18). Rådata (ikke-normaliserte  $C_T$ -verdier) for gruppen var i området 28,7-37,8, med en gjennomsnittlig  $C_T$ -verdi på 33,8. Dette til sammenligning med fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3, der den gjennomsnittlige  $C_T$ -verdien var 27,6.

Fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3 hadde lavere nivåer av virus enn uvaksinert kontrollgruppe, men høyere enn fiskegruppen immunisert med ALV413 ( $p < 0.0001$ ). Det var også en signifikant forskjell mellom den vaksinerte fisken som var utsatt for lus, og den fisken som ikke var utsatt for lus ( $p = 0.0037$ ) (se figur 18).



**Figur 18. Gjennomsnittlig normalisert uttrykking av SAV RNA-nivåer i hjertevev 22 dager etter tilførsel av sheddere, normalisert mot referansegenet EF1ab. MNE-verdiene er log<sub>10</sub>-transformert. Verdier er vist med geometrisk middelværdi med 95% konfidensintervall, og duplikatkar sammenslått. Fiskegruppe 1 = fisk immunisert med ALV413, fiskegruppe 2= fisk vaksinert med IHV-SAV3, fiskegruppe 3= fisk injisert med PBS. De høyeste nivåene av SAV-RNA ble detektert hos den uvaksinerte kontrollgruppen (PBS). Gruppen med lavest nivåer av viralt RNA fra SAV var henholdsvis fiskegruppe 1. Signifikante ulikheter mellom gruppene ble undersøkt ved bruk av Mann-Whitney ikke-parametrisk test. Det er en trend til at fiskegruppene utsatt for lakselus har høyere nivåer av virus i vevet enn tilsvarende grupper uten lakselus. Disse ulikhetene er imidlertid kun signifikante for fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3.**

### **3.6 Celledyrking og sekvensering**

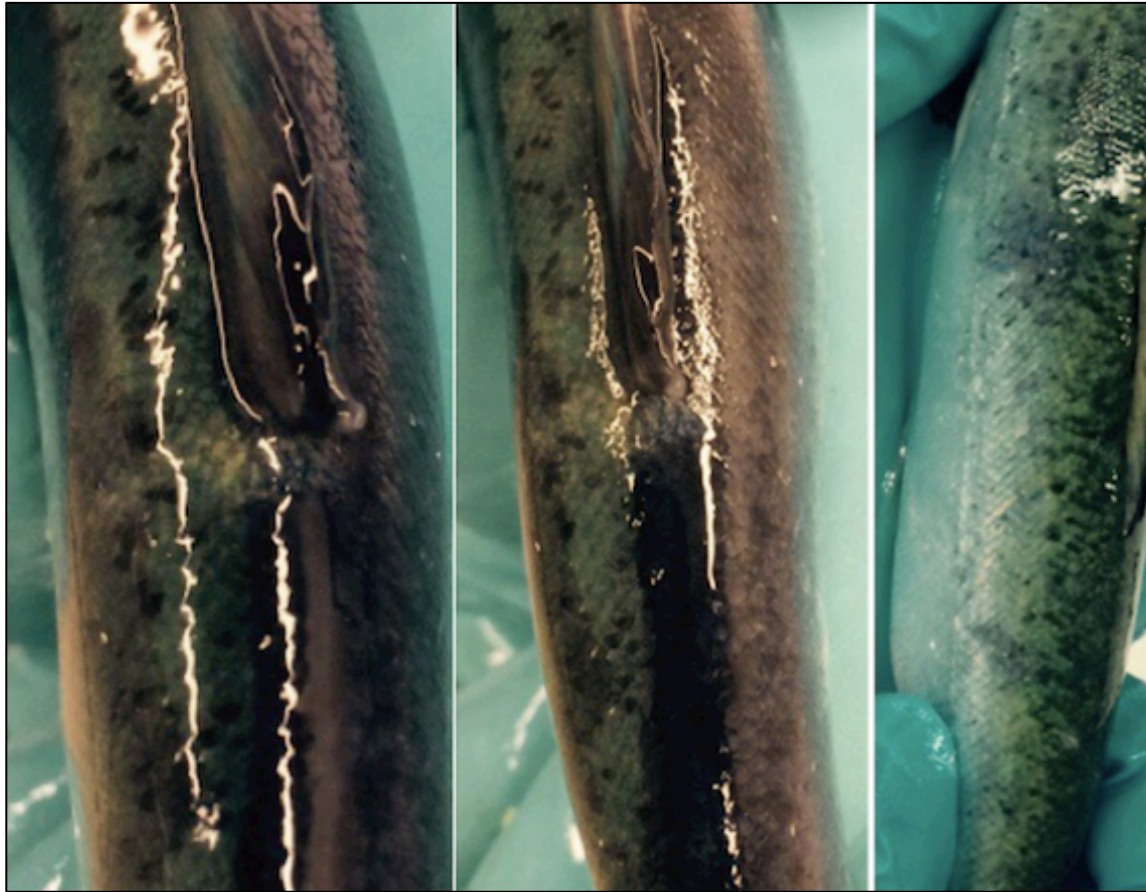
Virusisolatet ALV413 ble inokulert i CHSE-celler og undersøkt daglig for cytopatogen effekt (CPE). Synlige, morfologiske forandringer i cellene ble observert 5 dager etter smitte, og begynte som multifokale forandringer i cellemonolaget. Ved dag 14 etter smitte viste tilnærmet alle cellene CPE i form av pyknotiske, vakuoliserte, døde celler. Den usmittede kontrollflasken hadde på samme tidspunkt et monolag av levende celler.

For å verifisere at virusisolatet mottatt av PHARMAQ AS var av SAV subtype 3, ble PCR-produktet fra virusets E2-E3 glykoprotein sekvensert. Sekvensen ble sammenlignet med eksisterende sekvenser for viruset i GenBank®. Resultatene bekreftet at det reisolerte isolatet benyttet i dette forsøket tilhørte SAV3 gruppen.

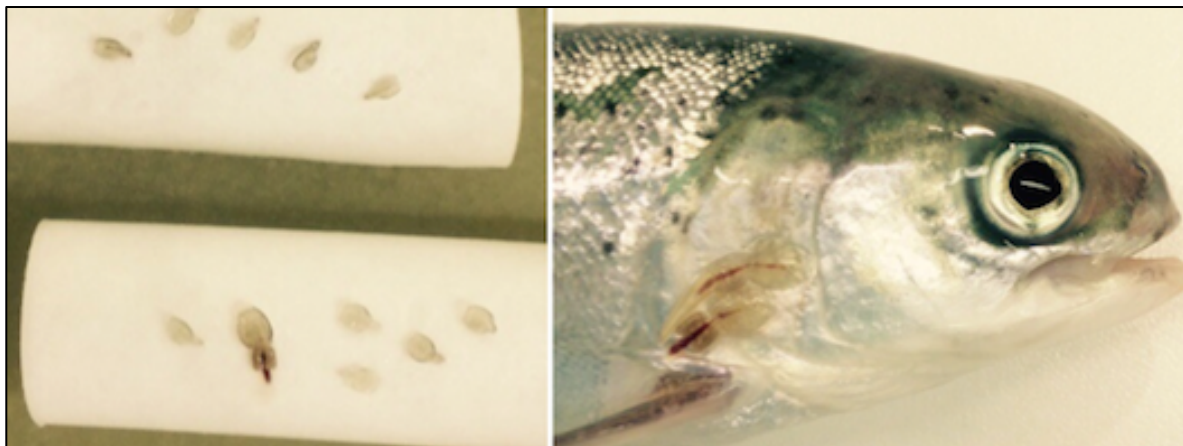
### **3.7 Del 2- Lakselus**

Ved avslutning av forsøket hadde kohabitantfisken vært infisert med lakselus i 36 dager. Gjennom forsøket kunne det observeres ca. 3-5 lus pr fisk. Tilstedeværelsen av lus avtok i stor grad før terminering, og det ble kun funnet totalt 33 lakselus, fordelt på 129 fisk, ved avslutning. Fisken utsatt for lusepress (kar 1 og 2) hadde en tydelig forekomst (n=28 av 120) av mekaniske skader i form av huderosjon posteriort- og anteriort for ryggfinner (se figur 19).

Overlevende lus ved avslutning av forsøket (n=33, se figur 20a) ble overført til fem naïve fisk, og gikk på denne fisken i 22 dager før fisk og lus ble avlivet. På dette tidspunktet ble 13 lus, alle kjønnsmodne (se figur 20b), plukket av fiskene. Ved obduksjon av den naïve fisken som ble smittet med lakselus kunne det ikke observeres noen makroskopiske endringer. Real-time RT-PCR analyser av denne fisken viste ikke tilstedeværelse av SAV. Grunnet feil under RNA-ekstraksjon fra lakselus ble kun 6 av 13 lakselus analysert. Disse prøvene var negative for SAV.



**Figur 19. Luseskader;** På bildet kan en se to individer med epidermal erosjon forårsaket av lakselus (a og b) kaudalt og (c) lateralt for ryggfinner. Fisken hadde på dette tidspunktet vært infisert med lakselus i 36 dager.



**Figur 20. a)** Lusesmitte av naiv fisk. Ved overføring av lakselus fra PD-syk fisk til naiv fisk legges lusen over på vannfaste ark og brettes over fisken. **b)** To kjønnsmodne hunnlus 22 dager etter lusesmitte av naiv fisk

## 4. Diskusjon

I denne studien er effekten av to ulike immuniseringsmetoder mot PD hos Atlantisk laks sammenlignet. Fiskegruppe 1 ble først smittet med SAV3 (ALV413) i ferskvannsfasen, for at en naturlig ervervet immunitet mot SAV-infeksjon skulle oppstå. Fiskegruppe 2 ble vaksinert med en syvkomponent vaksine, med SAV3 som én av komponentene (IHV-SAV3). Begge gruppene ble smittet med SAV i sjøvannsfasen i en kohabitant smittemodell, 756 d/°C etter immunisering. Lakselus ble tilsatt halvparten av karene som en stressfaktor, for å se om dette kunne ha en innvirkning på virusreplikasjonsnivåene i fisken. Det ble også forsøkt undersøkt om lakselus kunne opptre som en mekanisk vektor for SAV.

Det ble her vist at det ved SAV-smitte oppstår en ervervet immunitet som gir en god beskyttelse mot re-infeksjon med viruset. Denne immuniteten gir en bedre beskyttelse mot sykdom enn den som induseres ved vaksinering. Det ble også for første gang vist at tilstedeværelse av lakselus svekker vaksineeffekten ved vaksinering mot PD.

De lave nivåene av virus detektert hos fiskegruppen immunisert med ALV413 kan representere en situasjon der virusmengden er i ferd med å avta grunnet vertens immunrespons, eller at fisken befinner seg i en kronisk bærertilstand av viruset. Resultatene i denne studien bekrefter tidligere studier, der det ved flere tilfeller er vist at fisk som tidligere har hatt PD, opparbeider immunitet mot sykdommen. Denne trenden er observert både fra felt (Munro et al. 1984; McVivar 1986; McVicar 1987; Christie et al. 1998) og fra eksperimentell smitte (Houghton 1994; Lopez-Doriga et al. 2001). Immuniteten er vist å vedvare i opptil 9 måneder (Houghton 1994). I et forsøk utført av Houghton (1994) ble en gruppe Atlantisk laks smittet med nyrehomogenat fra PD-positiv fisk i ferskvann, for så å bli re-smittet etter sjøsetting. Fisk som ble utsatt for en sekundær smitte med SAV var svært godt beskyttet, og prevalensen av PD-positive fisk 9 måneder senere var kun 11%. Det ble ikke påvist bærerstatus av virus i det omtalte forsøket, men dette kan skyldes mangel på sensitive analysemetoder.

Det er få studier som viser til immunresponsen som oppstår ved SAV-infeksjon i laks. Det er imidlertid påvist tilstedeværelse av virusnøytraliserende antistoffer i serum kort tid etter infeksjon med SAV (McLoughlin et al. 1996) og det er vist at fisk som er passivt immunisert

med antiserum er beskyttet mot re-infeksjon (Houghton og Ellis, 1996). Antistofftitere øker etter hvert som sykdommen utvikler seg, og ved slutten av fiskens produksjonssyklus er det påvist antistoff hos 90-100% av populasjonen (McLoughlin et al. 1996; Graham et al. 2005; Jansen et al. 2010).

At fisken som allerede hadde vært utsatt for en SAV-infeksjon var bedre beskyttet enn fisken som ble vaksinert mot PD, kan trolig skyldes at intakt virus vil stimulere immunsystemet på en unik måte, som ikke lar seg gjøre ved bruk av inaktiverede vaksiner. Ved en virusinfeksjon vil antigen prosesseres inne i cellens cytoplasma og presenteres på cellens overflate sammen med MHC1. Dette vil føre til en cellulær immunrespons i det adaptive immunsystemet, der det produseres T-hjelpeselle 1 (Th1) og cytotoksiske T-celler (T<sub>c</sub>-celler) (Munang'andu et al. 2014). Det er antatt at generering av T<sub>c</sub>-celler er en av årsakene til at levende vaksiner medierer en bedre immunrespons enn inaktiverede vaksiner, da disse cellene har evnen til å destruere virusinfiserte celler. Også økte nivåer av antigen, kombinert med korrekt presentasjon av antigen for immunsystemet er viktige årsaker til at levende vaksiner/virus gir en bedre beskyttelse mot infeksjon.

Etter vaksinering med inaktivert helvirusvaksine (IHV) mot SAV, er det påvist nøytraliserende antistoffer ved smitte, noe som er vist å korrelere med beskyttelse mot infeksjon (Xu et al. 2012a). I høyerestående vertebrater er det antydning at antistoffer som induseres av alfavirusets glykoproteiner E1 og E2, er den viktigste immunresponsen ved beskyttelse mot alfavirusinfeksjon (Griffin 1995). Ved bruk av en subenhetsvaksine mot SAV basert på E1, kunne det ikke påvises virusnøytraliserende antistoffer ved smitte, eller reduserte nivåer av virus, men vaksinen medierte likevel en viss beskyttelse mot dødelighet (Xu et al. 2012a). En tilsvarende vaksine, basert på E2, førte til økt produksjon av nøytraliserende antistoffer, reduserte nivåer av virus og redusert dødelighet (Xu et al. 2012a). Det kan derfor antas at hovedmekanismen ved beskyttelse mot PD er nøytraliserende antistoffer. Dette baseres på at det kun oppstår en beskyttende effekt mot infeksjon ved bruk av vaksiner som fører til produksjon av virusnøytraliserende antistoffer (Griffin 1995; Xu et al. 2012a).

Det er også påvist en oppregulering av interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) og interleukin-2 (IL2) ved vaksinering med IHV mot PD. Dette er inflammatoriske cytokiner skilt ut av Th1 (Xu et al. 2012a), som er essensielle i vertens immunrespons ved en virusinfeksjon (Dinarello, 1997). Det ble derfor antydning at når ssRNA i vaksinen gjenkjennes, vil det skje en polarisering av Th1 gjennom Toll-reseptor(TLR)- signalisering. Det antas at en oppregulering av interferoner



og interferon-stimulerte gener sammenfaller med en høy viral belastning og lesjoner i affiserte organer. Det betyr at aktiveringen av medfødte immunresponser skjer for sent til å forhindre virusreplikasjon i vertscellene (Xu et al. 2012a).

I tillegg til nøytraliserende antistoffer, kan produksjonen av IFN og IL være en forklarende faktor for at vaksiner mot SAV med IHV gir beskyttelse mot infeksjon. At IHV aktiverer unike mekanismer i initieringen av immunresponsen er tidligere foreslått av Geeraedts et al. (2008). Immunresponsen som oppstår ved vaksiner mot PD er likevel ikke optimal, og det var i dette forsøket en høy prevalens av SAV-positive fisk, til tross for vaksinasjon. Dette skyldes blant annet at inaktivering av viruset ødelegger dets evne til replikasjon, og dermed korrekt presentasjon av antigen på infiserte cellers overflate, slik at det ikke produseres T<sub>c</sub>-celler. Likevel er viruset intakt, slik at immunsystemet gjenkjenner dets overflatestrukturer (E2/E1). Vaksinen i denne studien ga en svært god beskyttelse mot induksjon av makroskopisk patologi og lesjoner i hjertevev, sammenlignet med uvaksinert kontrollfisk (PBS). Det oppstod heller ikke dødelighet. Denne studien har derfor bekreftet at bruk av inaktiverede helvirusvaksiner mot SAV kan mediere en god beskyttelse mot PD. Det ble i midlertid observert en betydelig redusert effekt av vaksinen hos fisken som ble utsatt for en stressfaktor.

Stressinduserende faktorer som påvirker fiskens immunsystem, miljøfaktorer og ulikheter i mottakelighet for SAV blant ulike fiskestammer antas å være medvirkende faktorer for alvorlighetsgraden til et PD-utbrudd (Maule et al. 1989; Brun et al. 2006; McLoughlin et al. 2006). Tilstedeværelse av andre patogener i miljøet er også blitt assosiert med utvikling av PD hos SAV-infisert fisk. Disse inkluderer blant annet *Paranucleospora theridion*, *Parvicapsula pseudobranchicola*, *Aliivibrio* sp., Piscine reovirus og IPNV (Munro et al. 1984; Poppe et al. 1989; Christie et al. 1998; Nylund et al. 2011; Karlsen et al. 2012; Lund et al. 2016). Det er i tillegg foreslått at det kan forekomme en synergistisk effekt mellom PD-utbrudd og lusebelastning (Ruane et al. 2005), og det er flere epidemiologiske studier som antyder at et høyt lusepress er en risikofaktor for PD-utbrudd (Mc Vicar 1987; McLoughlin et al. 2003; Brun et al. 2005; Rodger og Mitchell, 2007).

For å simulere et mer naturlig sykdomsbilde i dette forsøket ble fisken tilsatt copepoditter av lakselus til halvparten av karene som en stressfaktor. Fra tidligere studier vet en at ved 12°C vil ca. en tredjedel av copepodittene som tilsettes karet finnes igjen på fisken som preadulte/adulte stadier (Hamre et al. 2009). Det skulle dermed resultere i et lusepress på

rundt 5 lakselus pr. fisk. Dette stemte relativt godt med resultatene fra dette forsøket, da det ble observert 3-5 lakselus pr. fisk under forsøket. I dagene før avslutning av forsøket ble det observert færre lus pr. fisk enn tidligere. Dette skyldes trolig at fisken gikk for trangt i karet, slik at lusen ble slått av fisken og skylt vekk i avløpet. Ved avslutning av forsøket var det derfor kun 33 lakselus igjen. Erfaringene fra forsøket tilsier at et høyere antall copepoditter ville økt sannsynligheten for flere overlevende lus ved endt forsøk.

Likevel har fiskene hatt et betydelig lusepress under infeksjonsforløpet, noe som har påvirket effekten av immuniseringsmetodene. Ulikheter mellom fisken som ble utsatt for lus og fisken som ikke hadde dette lusepresset, ser en hos fiskegruppen vaksinert med IHV-SAV3. I denne gruppen har vaksinen en signifikant dårligere effekt ved tilstedeværelse av lus. Det kan også sees en tydelig trend hos de andre fiskegruppene, der RNA-nivåene av SAV er lavere hos gruppene som ikke var blitt tilsatt lakselus i karet.

Disse resultatene kan forklares med at lakselus har en immundempende effekt hos laksefisk (Firth et al. 2000; Nolan et al. 2011). Immunsuppresjon som følge av lusepåslag er blitt undersøkt ved en rekke anledninger. Lakselus skiller blant annet ut PGE2 og trypsin-liknende proteaser som undertrykker immunsystemet til Atlantisk laks (Firth et al. 2000). Allerede én dag etter lusepåslag er det sett en induksjon av blant annet lektiner og akutfaseproteiner i milt (Tadiso et al. 2011). Dette er gener som er involvert i den medfødte immunresponsen. Det skjer også en oppregulering av immunoglobulintranskripter i hud og milt. Til tross for at dette er en indikasjon på en adaptiv immunrespons, fører ikke responsene til en tilstrekkelig beskyttelse mot lusepåslag (Tadiso et al. 2011). Funn indikerer også en nedregulering av makrofagaktivitet og antigenpresentasjon hos laks med lusepåslag (Tadiso et al. 2011). Parasitten er i tillegg vist å indusere en stressreaksjon i fisken ved påslag (Mustafa et al. 2000; Rodger og Mitchell, 2007; Nolan et al. 2011). Mustafa et al. (2000) fant at det ved 21 dager etter smitte med copepoditter, skjedde en økning i glukose- og kortisolverdier, samtidig med en nedregulert ”respiratory burst”, noe som tyder på en kronisk stressrespons.

Fisken som gikk i karene der det ble tilsatt lakselus hadde tydelige mekaniske hudskader i form av erosjoner, spesielt posteriort og anteriort for ryggfinnen. Nolan et al. (2011) utførte et studie der de blant annet fant at lusepåslag med opptil 10 voksne lus pr fisk resulterte i endringer i epitelstrukturen i hud og gjeller, med økt forekomst av apoptose og nekroser, redusert antall slimceller i hud, leukocytinfiltrasjon, epitelløfting og intercellulær svelling i gjellene. De fant også en høy fornyelsesrate av kloridceller grunnet en økning i  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktivitet. Resultatene deres viser at et relativt lavt lusepåslag, slik som i dette

forsøket, likevel fører til en stressrespons for fisken, og svekker hud og gjeller. Dette fører igjen til at fisken blir mer utsatt for sekundærinfeksjoner og kan føre til en forverring av et epidemisk utbrudd (Nolan et al. 2011).

I et vaksineforsøk utført av Karlsen et al. (2012) induserte en monovalent vaksine basert på SAV3 tilnærmet full beskyttelse mot virusreplikasjon, histopatologi og dødelighet etter en eksperimentell smitte. Ved feltutbrudd var fisken beskyttet mot dødelighet, men en observerte likevel at overlevende fisk hadde histopatologiske lesjoner forenlige med PD. I den omtalte studien ble det påvist både lakselus og *P. theridion* i fiskepopulasjonen. I samsvar med disse observasjonene kunne en også i dette forsøket se en trend til at det oppstod flere alvorlige histopatologiske vevsforandringer hos fisken som ble vaksinert med IHV-SAV3 og utsatt for lakselus, enn fisk som ikke var utsatt for lakselus.

Det er ikke tidligere blitt utført forsøk der en sammenligner effekt av PD- vaksinerings med og uten tilstedeværelse av lakselus. Til tross for at det sees en trend hos alle fiskegruppene til at lakselus medfører immunsupresjon, er det oppsiktsvekkende at vaksinen som ble benyttet i dette forsøket har en så redusert effekt på fisk med lus. I dagens næring opplever fisken et tilnærmet konstant lusepress, og næringen vil være avhengig av en vaksine som ikke mister effekt ved tilstedeværelse av lakselus.

For å undersøke om lakselus kan være en mekanisk vektor for SAV, slik det er blitt foreslått ved flere anledninger (Karlsen et al. 2006; Petterson et al. 2009), ble lakselus fra PD-infisert fisk overført til naïv fisk. Dette ble gjort 22 dager etter i.p. smitte av sheddere. Det er tidligere vist at høye virusnivåer kan ses under viremien på dette tidspunktet ved kohabitantsmitte (Andersen et al. 2010). Tidspunktet for overføring av lakselus ble derfor basert på sannsynligheten for at lakselusen som beitet på fisken ville få i seg virus fra fiskens blod. Ved bruk av real-time RT-PCR kunne ikke viralt RNA fra SAV påvises i naïv fisk eller i lakselus 28 dager etter påslag. Da det ikke ble foretatt blodprøver for å bekrefte en pågående viremi, kan vi ikke utelukke at viremien ble unngått og at lakselusen derfor ble flyttet ved feil tidspunkt. McLoughlin og Graham (2007) viste at viremien opptrer i forkant av kliniske symptomer og histopatologiske forandringer. Ettersom resultatene i dette forsøket viste både klinikk og vevslesjoner, kan det tyde på at viremien ikke var maksimal på tidspunktet lakselusen ble flyttet.

## **Dødelighet og patologi**

Høy dødelighet er som oftest forbundet med feltutbrudd av PD, og det har vist seg vanskelig å inducere en slik dødelighet i eksperimentelle smitteforsøk (Houghton et al. 1994; McLoughlin et al. 1996; Desvignes et al. 2002; Weston et al. 2002). Årsakene til denne trenden er antakeligvis mange, men det kan blant annet skyldes at det benyttes virusisolater som er passert gjentatte ganger i cellekultur. Dette har vist seg å kunne føre til attenuerte virus og redusert virulens (Flint et al. 2004). Ulikheter i virulens kan også skyldes mutasjoner som oppstår når en dyrker SAV i cellekultur (Karlsen et al. 2014). Det er tidligere vist at dødelighet hos sheddere ved virusinfeksjoner er knyttet til smittevei/introduksjonsvei, da virus ved i.p. smitte ikke vil nå målorganer/målceller like effektivt som ved en naturlig smitte (Taksdal et al. 1998; Ramstad et al. 2007).

I dette forsøket oppstod det i midlertid dødelighet hos over halvparten av shedderfisken ved i.p. smitte. Det ble benyttet et høyt virustiter ( $10^8$  TCID<sub>50</sub>/fisk) ved injeksjon av sheddere, og det var derfor grunn til å anta at det ville oppstå en høyere dødelighet i forsøket. Her er det nærliggende å tro at smittevei som ble valgt kan være en avgjørende faktor.

Det døde 9 fisk etter immunisering av fiskegruppe 1 med ALV413, før tilsetting av sheddere. Fisken gikk da fremdeles i ferskvann, men lysregimet hadde blitt endret til 24 timers lys, 5 dager før dødeligheten oppstod. Dette for å sette i gang smoltifiseringsprosessen. Enkelte individer hadde på tidspunktet de døde tydelige morfologiske tegn på at de gjennomgikk smoltifiseringsprosessen. I løpet av denne prosessen går fisken gjennom betydelige biologiske endringer, både morfologiske, fysiologiske, atferdsmessig og endokrine (Hoar 1988). Dette gjør at fisken er svært sårbar. Det er derfor grunn til å tro at fisken var immunsupprimert som en følge av smoltifiseringen (Maule et al. 1987) og at en allerede pågående subklinisk infeksjon ble forverret av disse endringene. Det ble ikke tatt ut prøver fra denne fisken, og årsaken til dødeligheten ble derfor ikke bekreftet.

Ved feltutbrudd med PD er dødeligheten svært varierende, og kan derfor ikke uten videre sies å være årsaken til størst økonomisk tap i forbindelse med et PD-utbrudd. Det er blitt foreslått at tap av vekst og utvikling av ”pinnefisk” gir dårligere økonomisk avkastning for oppdrettsnæringen (Taksdal et al. 2015). Flere forfattere har konstatert vekttap som en direkte årsak av SAV-infeksjon (Christie et al. 2007; Taksdal et al. 2015; Heidari et al. 2015; Jarungsriapisit et al. 2016). I dette forsøket ble det foretatt vektmålinger ved immunisering av fisk og ved avslutning av forsøket. Forsøket ble avsluttet for tidlig til å kunne si noe om en

ville sett en vektreduksjon over tid og om det ville forekommet ”pinnefisk”. Av praktiske årsaker ble det heller ikke inkludert en usmittet kontroll i forsøket, og det er derfor uvisst hvor stor betydning SAV-smitten har hatt på fiskens vekt generelt. Likevel var det signifikante ulikheter i vekt mellom forsøksgruppene ved avslutning av forsøket. Fiskegruppen immunisert med ALV413 hadde ved tidspunkt for terminering blitt eksponert for virus ved to ulike tidspunkt, noe som kan bety en redusert tilvekst som en direkte konsekvens av dette. Det har blitt undersøkt hvorvidt smerter i forbindelse med stikk i bukhulen er en medvirkende faktor for en eventuell stagnasjon i vekt. Det er imidlertid vist at fisk som kun ble injisert med saltvann ikke opplevde vekstreduksjon (Hoel og Lillehaug, 1997), og det foreligger derfor ingen indikasjoner på at smertefulle stikk i bukhulen fører til vekstreduksjon hos fisken. Heller ikke håndtering, bedøvelse eller selve injeksjonen i bukhulen påvirker fiskens vekst (Hoel og Lillehaug, 1997; Sørnum og Damsgård, 2004), og det er derfor nærliggende å tro at det utelukkende er SAV-infeksjonene fiskegruppen immunisert med ALV413 ble utsatt for som førte til en lavere vekt.

At den uvaksinerte kontrollgruppen hadde høyere vekt enn gruppen vaksinert med IHV-SAV3, skyldes sannsynligvis selve vaksineringsprosessen, selv om kontrollfisken viste seg å ha høyere nivåer av virus. Forskning har vist at det forekommer en vekstreduksjon 2-6 uker etter vaksinasjon, som antas å skyldes immunreaksjonen på vaksinen (Berg et al. 2006). Fisk som kun blir bedøvet og håndtert får ikke tilsvarende vektreduksjon som fisk injisert med oljebasert vaksine (Sørnum og Damsgård, 2004). Det er derfor grunn til å tro at kontrollfisken hadde en høyere vekt enn vaksinegruppen ved tidspunkt for smitte, da denne fisken ikke var utsatt for immunisering, og at vekten til vaksinegruppen ville normalisert seg med tiden.

Forandringer i hjerte observert ved histopatologisk undersøkelse i denne studien er i overensstemmelse med det som er beskrevet for PD i tidligere studier (Munro et al. 1984; Ferguson et al. 1986; Taksdal et al. 2007). Scoringssystemet som er anvendt for vurdering av histopatologiske lesjoner er en modifisert versjon av et scoringssystem hentet fra Xu et al. (2012a). Et slikt system baseres på en personlig evaluering, og er ikke nødvendigvis sammenlignbart med scoresystemer benyttet i andre studier.

Den alvorligste vevsforandringen som oppstår ved et PD-utbrudd antas å være degenerativ myopati i hjertemuskulatur (Ferguson et al. 1986). Basert på denne kunnskapen ble det kun laget histologisnitt fra hjertevev. Dersom forsøket hadde gått lenger ville det vært av interesse å lage histologisnitt av pankreas, for å undersøke om pankreas ble regenerert hos fisk i alle

fiskegruppene. Vanligvis vil det skje en fornying/regenerering av pankreas 3-6 uker etter smitte (feltobservasjoner) (McLoughlin et al. 2002). Dersom pankreas ikke regenereres vil fisken få redusert vekst og kan utvikle seg til bli en pinnefisk (McVicar 1987; McLoughlin og Graham, 2007). Basert på vektmålinger og observasjoner ved obduksjon, ville det spesielt vært av interesse å følge fiskegruppen immunisert med ALV413 videre. I denne fiskegruppen kunne det, i tillegg til en lavere gjennomsnittsvekt, observeres et gult, slimaktig innhold i tarm, en generell indikasjon på at fisken har dårlig appetitt, uavhengig av årsak (Taksdal et al. 2007). Det er tidligere vist at det oppstår histopatologiske pankreasforandringer, forenlige med kronisk PD, hos 10 % av en SAV-smittet fiskepopulasjon (Houghton, 1994)

Det kunne sees en trend til at økende virusmengde hos de ulike fiskegruppene sammenfalt med alvorlighetsgraden til de histopatologiske forandringene. Det er ved flere tilfeller sett en positiv korrelasjon mellom virale nivåer og histopatologiske forandringer (Xu et al. 2012a; Jarungsriapisit et al. 2016). Det må tas med i betraktningen at fisk som utsettes for SAV kort tid etter sjøsetting, som i dette forsøket, opplever mer omfattende histopatologiske vevsforandringer (Jarungsriapisit et al. 2016). Akutte lesjoner i hjerte forbundet med PD, opptrer som oftest samtidig, eller en tid etter akutte pankreaslesjoner. Disse forandringene skjer 1-2 uker etter smitte ved i.p. infeksjon. I henhold til Andersen (2012) vil infeksjon hos kohabitantfisk være forskjøvet med 7-10 dager, ved 12 °C, noe som stemmer godt med observasjonene gjort i denne studien.

Re-smitte med ALV413 ga tilnærmet full beskyttelse mot patologi i form av degenerasjoner i hjertevev.

Med bakgrunn i at det kun var fiskegruppen immunisert med ALV413 hvor inflammasjon i hjerte kunne ses, er det grunn til å tro at den inflammatoriske responsen stammer fra første smitte (immunisering), og at forsøket ble avsluttet for tidlig til at en slik respons kunne oppstå i de andre fiskegruppene. At lesjonene som oppstod i ALV413-gruppen antakeligvis både stammer fra en subakutt- og en akutt infeksjon, gjør at histologiscoren ikke nødvendigvis kan sammenlignes med de andre gruppene som kun ble preget av en akutt infeksjon.

Inflammasjon forbundet med PD kan variere fra fraværende til moderat celleinfiltrasjon (McLoughlin et al. 2002). I et forsøk utført av Desvinges (2002) er det vist at degenerasjoner og nekroser i hjerte hovedsakelig opptrådte 16 dpi (ved i.p. infeksjon) og var tilnærmet forsvunnet ved 30 dpi. Dersom en antar at infeksjonsløpet forskyves omtrent 7-10 dager ved

kohabitantsmitte, vil fisken i dette forsøket ha vært eksponert for virus i 12-15 dager. Den alvorlige myopati hos kontrollfisken i dette forsøk må kunne sies å tyde på at lesjonene opptrer tidligere enn beskrevet av Desvignes (2002). Dersom det oppstod degenerasjoner/nekroser i forbindelse med immunisering av fiskegruppe 1 med ALV413, ville disse ved avslutning av forsøket mest sannsynlig være regenerert. Hos enkelte individer fra fiskegruppe 1 kunne en se hypercellularitet i kontaktlaget mellom det kompakte og spongiøse myokardet. Hypercellularitet i dette området er tidligere blitt beskrevet ved sene stadier av PD (<35 dager etter smitte) (Murphy et al. 1992; Andersen et al. 2010; Andersen, 2012). Fra fisken først ble immunisert med SAV gikk det 84 dager før forsøket ble avsluttet, og mine observasjoner stemmer derfor godt med tidligere studier.

### **Forsøksoppsett**

Ved immunisering av forsøksfisken ble alle fiskegruppene injisert intraperitonealt (i.p.). Dette ble gjort for å kunne standardisere den infektive dosen, og for å kunne vite eksakt når fisken som ble immunisert med virus (fiskegruppe 1) ble eksponert for viruset første gang. Dersom en hadde benyttet kohabitering ved immunisering ville fisken ha blitt utsatt for patogenet over en lengre periode, og fisken ville trolig ha blitt smittet ved noe ulike tidspunkt. Dette ville ha gitt økt variasjon mellom individuelle fisk med tanke på smittedose og smittetidspunkt.

Likevel mimikerer ikke en i.p. injeksjon en naturlig infeksjonsvei og et naturlig virusopptak, noe som blant annet er svært viktig når en skal kartlegge sykdomsmekanismer. Ved kohabitantsmitte vil også viruset som smitter fisken trolig være mer likt det viruset som smitter mellom fisk i felt, fremfor det som er oppdyrket i cellekultur (Jarungsriapisit 2016). I utgangspunktet var hensikten å etterligne en naturlig immunisering for fiskegruppen immunisert med ALV413. Ettersom også denne fiskegruppen ble injisert i.p. med virus, vil dette forsøket derfor kun gi en indikasjon på effektiviteten til en naturlig ervervet immunitet mot SAV.

Fra tidligere vaksineforsøk med SAV, der det er benyttet både en i.p. og en kohabitant smittemodell, er det vist en redusert effekt av vaksinasjon ved bruk av kohabitantmodellen i forhold til i.p. modellen ved smitte (Karlsen et al. 2012). Dette skyldes antakeligvis at ved i.p. smitte vil viruset bli injisert i samme område som vaksinen, der det allerede er en pågående kronisk og aktiv inflammatorisk respons (Karlsen et al. 2012). Når fisken skulle smittes med SAV i sjøvannsfasen ble derfor dette gjort ved en kohabitantmodell, der shedderfisken ble

injisert i.p. med virus, før de ble overført direkte til forsøkskarene. For å få et noe mer kontrollert infeksjonsforløp kunne shedderfiskene gått i et eget kar frem til forventet maksimal utskillelse av virus, for så å ta ut shedderfiskene og tilsette kohabitantfiskene (Jarungsriapisit et al. 2016).

Ved immunisering av fiskegruppene ble virusisolatet ALV413 benyttet til gruppen som skulle utsettes for en pre-smitte med SAV i ferskvann (fiskegruppe 1). Isolatet ble fortynt fra opprinnelig titer til  $2,37 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Tilsvarende titer har tidligere blitt benyttet i smitteforsøk med SAV (Desvinges et al. 2001).

Ved i.p. injeksjon av shedderfisk ble det benyttet samme virusisolat (ALV413) som ved immunisering av fiskegruppe 1. Dette gjør det vanskelig å kunne spore tilbake til hvilket virus som forårsaket sykdom på de ulike tidspunktene for denne gruppen. Dersom det hadde blitt benyttet et annet isolat til den sekundære smitten, ville det være naturlig å sekvensere virus fra fisken ved avslutning av forsøket. Da kunne en ha verifisert om det var virus fra shedderfiskene som var det forårsakende agenset til infeksjon, viruset benyttet til immunisering eller begge virusisolatene. En kan heller ikke skille mellom en persistent og en pågående virusinfeksjon, dersom en ikke undersøker hvorvidt det er replikerende virus i vevet. For å bekrefte at fisken ikke hadde en pågående infeksjon ved re-smitte i sjøvann, kunne det blitt tatt ut prøver av fisken immunisert med ALV413 før ny smitte.

Virusisolatet ALV413 ble også benyttet til å infisere shedderfisk i et forsøk utført av Karlsen et al. i 2012. I det omtalte forsøket ble det benyttet et titer på  $1.15 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/fisk, tilsvarende denne studien, og det oppstod tilnærmet ingen dødelighet hos kohabitantfiskene forbundet med SAV. Den lave dødeligheten som oppstod i forsøket er blitt foreslått av Taksdal et al. (2015) å skyldes blant annet mengde virus som frigis til vannmassene fra shedderfiskene. En annen forklaring kan være at viruset kun er virulent i svært høye titer, og at dette ikke oppnås ved shedding (Taksdal et al. 2015). I midlertid oppstod det høye nivåer av virus i den uvaksinerte kontrollfiskene i dette forsøket, noe som bekrefter, i likhet med observasjonene gjort av Karlsen et al. (2012), at virusisolatet er virulent ved shedding. Det oppstod heller ikke i dette forsøket dødelighet hos kohabitantfiskene som var forbundet med smitte via SAV-sheddere.

Ved tilførsel av shedderfisk hadde kohabitantfiskene gått på fullt sjøvann i to uker, og morfologiske karakteristika indikerte at fisken var fullt smoltifisert. Likevel ville det å teste kortisolkonsentrasjon i blod, kondisjonsfaktor og/eller Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)-aktivitet i



gjellene kunne ha gitt en bedre indikasjon på om fisken var ferdig smoltifisert (Jarungsriapisit et al. 2016). Jarungsriapisit et al. (2016) viste at fisk som blir eksponert for SAV to uker etter sjøsetting er mer mottakelige for virusinfeksjon enn fisk eksponert for viruset 9 uker etter sjøsetting. Gruppen som ble tidlig eksponert i hennes forsøk hadde høyere prevalens av SAV, høyere nivåer av virus i hjerte, mer alvorlige histopatologiske lesjoner og høyere utskillelse av virus til vannmassene. Likevel kunne ikke disse funnene relateres til en pågående smoltifisering.

## 5. Konklusjoner

- Denne studien har bekreftet tidligere studier som viser at fisk som smittes med SAV i ferskvann oppnår en god beskyttelse mot re-infeksjon i sjøvannsfasen.
- Vaksinerings mot PD medierer god beskyttelse mot sykdom, sammenlignet med uvaksinert kontrollfisk. Dette kan ses som reduserte nivåer av virus i hjerte, en lavere forekomst av vevslesjoner og en lavere prevalens av SAV.
- Det erverves en bedre beskyttelse mot SAV når fisken immuniseres med villtypevirus (ALV413) enn den som oppnås ved vaksinerings mot PD.
- Immuniteten som oppstår ved vaksinerings mot PD blir svekket, og virkningen redusert, ved tilstedeværelse av lakselus.
- Overføring av SAV via en mekanisk vektor (lakselus), kunne ikke påvises i dette forsøket, da samtlige prøver fra naïv fisk og lakselus var negative ved real-time RT-PCR. Dette kan skyldes at det ble benyttet for få lus i forsøket og at lusen ble flyttet på feil tidspunkt.

## 6. Kildehenvisning

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. 4th edition, chapter 25- Pathogens, Infection, and Innate Immunity. New York: Garland science
- Alexandersen A (1996) Advantages and disadvantages of using live vaccines. Risks and control measures. *Acta Vet Scand Suppl* 1996, 90:89-100
- Andersen L, Bratland A, Hodneland K, Nylund A (2007) Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch Virol* 2007, 152(10):871-1883.
- Andersen L, Hodneland K, Nylund A (2010) No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Virol J* 2010, 7:198
- Andersen L (2012) Alphavirus infection in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. -Viral pathogenesis. Dr. scient thesis, University of Bergen
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001, 9:2666-2672
- Bang Jensen B, Kristoffersen AB, Myr C, Brun E (2012) Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis aquat org* 2012, 102: 23–31
- Berg A, Bergh Ø, Fjellidal P, Hansen T, Juell J, Nerland A (2006) Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger. Havforskningsinstituttet
- Bergmann SM, Castric J, Bremont M, Riebe R, Fichtner D (2005) Detection of sleeping disease virus (SDV) in Germany. 12th EAFP International Conference, Copenhagen, Denmark, 11-16 sept 2005 Book of abstract:154
- Boucher P, Baudin Laurencin F (1996) Sleeping disease and pancreas disease: Comparative histopathology and acquired cross protection. *J Fish Dis* 1996, 19: 303-310.
- Bornø G, Lie LM (red) Fiskehelse rapporten 2014, Harstad: Veterinærinstituttet 2015
- Borzym E, Maj-Paluch J, Stachnik M, Matras M, Reichert M (2014) First Laboratory Confirmation of salmonid Alphavirus Type 2 (SAV2) Infection in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014, 58(3):341-345
- Boudinot P, Massin P, Blanco M, Riffault S, Benmansour A (1999). Vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoeA family. *Virol J* 1999, 73(3): 1846-1852.
- Bowers DF, Abell BA, Brown DT (1995) Replication and tissue tropism of the alphavirus Sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. *Virology* 1995, 212:1–12

- Bratland A, Nylund A (2009) Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J Aquat Anim Health* 2009, 21:173-178
- Brun E, Olsen AB, Rørvik L (2005) Factors associated with outbreaks of pancreas disease in farmed Atlantic salmon. 12th EAFP International Conference, Copenhagen, Denmark, 11-16 sept 2005 Book of Abstracts:p 151
- Brun E, Olsen AB, Rørvik L (2006) Epidemiologiske forhold knyttet til pankreassykdom (PD) hos oppdrettslaks. *Norsk fiskeoppdrett* 2006, pp. 50-55
- Castric J, Baudin Laurencin F, Bremont M, Jeffroy J, Le Ven A, Bearzotti M (1997) Isolation of the virus responsible for sleeping disease in experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1997, 17:27-30
- Chanduri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I (2005) Tolllike receptors and chronic lung disease. *Clin Sci* 2005, 109(2):125-133
- Chin KC, Cresswell P (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(26):15125-15130.
- Christie KE, Fyrand K, Holtet L, Rowley HM (1998) Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J Fish Dis* 1998, 21:391-394
- Christie KE, Graham DA, McLoughlin MF, Villoing S, Todd D, Knappskog D (2007) Experimental infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Dis Aquat Org* 2007, 75:13-22
- Cooper IIRK, Shotts EB, Nolan LK (1996). Use of a mini-transposon to study chondroitinase activity associated with *Edwardsiella ictaluri*. *J Aquat Anim Health* 1996, 8: 319–324.
- Desvignes L, Quentel C, Lamour F, le VA (2002) Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). *Fish Shellfish Immunol.* 2002, 12:77-95
- Dinarelo CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997, Dec;8(4):253-65.
- Ferguson HW, Roberts RJ, Richards RH, Collins RO, Rice DA (1986) Severe degenerative cardiomyopathy associated with pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 1986, 20:95–98.
- Firth KJ, Johnson SC, Ross NW (2000) Characterization of proteases in the skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) infected with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in whole-body louse homogenate. *J Parasitol.* 2000, 86(6):1199-205.
- Firth AE, Chung BY, Fleeton MN, Atkins JF (2008) Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virology* 2008, 5:108
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM (ed) (2004) Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2nd edn. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington DC

- Fringuelli E, Rowley HM, Wilson JC, Hunter R, Rodger H, Graham DA (2008) Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J Fish Dis* 2008, 31:811-823
- Frolov I, Hardy R, Rice CM (2001) Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* 2001, 7(11):1638-51
- Frost P, Nilsen F (2003) Validation of reference genes for transcription profiling in the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, by quantitative real-time PCR. *Vet. Parasitol* 2003, 118(1):169
- Gaedigk- Nitschko K, Schlzesinger MJ (1990) The sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. *Virol J* 1990, 175: 274-281
- Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, Severa M, de Haan A, Pool J (2008) Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. *Plos Pathogens* 2008;4(August (8)):e1000138.
- Graham DA, Jewhurst VA, Rowley HM, McLoughlin MF, Rodger H, Todd D (2005) Longitudinal serological surveys of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using a rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus. *J Fish Dis* 2005, 28:373-379
- Graham DA, Fringuelli E, Wilson C, Rowley HM, Brown A, Rodger H, McLoughlin MF, McManus C, Casey E, McCarthy LJ, Ruane NM (2010) Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J Fish Dis* 2010, 33:123-135
- Graham DA, Frost P, McLaughlin K, Rowley HM, Gabestad I, Gordon A, McLoughlin MF. (2011) A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1-6 using an experimental cohabitation challenge model. *J Fish Dis* 2011, 34:273–86.
- Graham DA, Fringuelli E, Rowley HM, Cockerill D, Cox DS, Turnbull T, Rodger H, Morris D, Mc Loughlin MF (2012) Geographical distribution of salmonid alphavirus subtypes in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland and Ireland. *J Fish Dis* 2012, 35:755-756
- Griffin DE (1995) Roles and reactivities of antibodies to alphaviruses. *Seminars in Virology* 1995, 6(4):249–55.
- Gudding Roar (2010) Vaksinasjon av dyr. Scandinavian veterinary press. Oslo, 2010.
- Hamre LA, Glover KA, Nilsen F (2009) Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer 1837)) laboratory strains. *Parasitol Int.* 2009, 58: 451-460. 10.1016/j.parint.2009.08.009.
- Hartman JX, Noga EJ (1980) Channel catfish virus disease vaccine and method of preparation thereof and method of immunization therewith. US Patent No. 4,219,543.
- Heidari Z, Tinsley J, Bickerdike R, McLoughlin ME, Zou J, Martin SAM (2015) Antiviral and metabolic gene expression responses to viral infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 2015, 42:297–305.
- Hellebø A, Stene A, Aspehaug V (2014) Potensielle reservoarer for SAV og PMCV på marine akvakulturanlegg. Møreforskning MARIN, MA 14-07.

- Heppel J, Davis HL (2000) Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced drug delivery reviews* 2000, 43:29-43
- Heuch PA, Bjørn PA, Finstad B, Holst JC, Asplin L, Nilsen F (2005) A review of the Norwegian National Action Plan against Salmon Lice on Salmonids: the effect on wild salmonids. *Aquaculture* 2005, 246:79-92.
- Hikke MC, Verest M, Vlak JM, Pijlman GP. (2013) Salmonid alphavirus replication in mosquito cells: towards a novel vaccine production system. *Microb Biotechnol.* 2014, 7(5):480-4
- Hjeltnes H, Walde C, Bang Jensen B, Haukaas A (red) (2016). Fiskehelse rapporten 2015. Veterinærinstituttet 2016.
- Hjortaaas MJ, Skjelstad HR, Olsen AB, Johansen R, Bang-Jensen B, Ørpetveit I, Sindre H (2013) The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J Fish Dis* 2013, 36(1):71–74
- Hoar WS (1988) The physiology of smolting salmonids. *Fish Physiology* 1988, 11:275-
- Hodneland K, Bratland A, Christie KE, Endresen C, Nylund A (2005) New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Dis Aquat Org* 66:113-120
- Hodneland K (2006) Salmonid alphavirus (SAV): genetic characterisation of a new subtype, SAV3, and implementation of a novel diagnostic method. Dr. scient thesis, University of Bergen
- Hodneland K, Endresen C (2006) Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *J Virol Methods* 131:184-192.
- Hoel K, Lillehaug A (1997) Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* in experimental vaccines against *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol.* 7:365- 376.
- Honda K, Takaoka A, Taniguchi T, (2006) Type I Inteferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity* 2006, 25:849
- Houghton G (1994) Acquired protection in Atlantic salmon *Salmo salar* parr and post-smolts against pancreas disease. *Dis Aquat Org* 1994, 18:109-118
- Houghton G, Ellis AE (1996) Pancreas disease in Atlantic salmon: serum neutralisation and passive immunisation. *Fish Shellfish Immunol.* 1996, 6:465-472
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Hentet 10.11.2015 fra <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- Jansen MD, Wasmuth MA, Olsen AB, Gjerset B, Modahl I, Breck O, Haldorsen RN, Hjelmeland R, Taksdal T (2010). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J Fish Dis* 2010, 33(9): 723-736.
- Jarungsriapisit J, Moore LJ, Taranger GL, Nilsen TO, Morton HC, Fiksdal IU, Stefansson S, Fjelldal PG, Evensen O, Patel S (2016) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Post-smolts challenged two or nine weeks after seawater-transfer show differences in their susceptibility to salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3) *Virol J.* 2016, 11;13(1):66.

- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 2002, 54:156–165
- Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ (2009) A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol* 2009, 4:837-856
- Karlsen M, Hodneland K, Endresen C, Nylund A (2006) Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Arch Virol* 2006, 151:861-874
- Karlsen M, Tingbo T, Solbakk IT, Evensen O, Furevik A, Aas-Eng A (2012) Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Vaccine* 2012, 30:5688-5694
- Karlsen M, Andersen L, Blindheim SH, Rimstad E, Nylund A. (2014a) A naturally occurring substitution in the E2 protein of Salmonid alphavirus subtype 3 changes viral fitness. *Virus res.* 2014, 196:79-86
- Karlsen M, Gjerset B, Hansen T, Rambaut A (2014b) Multiple introductions of salmonid alphavirus from a wild reservoir have caused independent and self-sustainable epizootics in aquaculture. *J Gen Virol.* 2014, 95:52-59
- Knipe DM, Howley OM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strauss SE (2007) *Fields Virology*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins
- Kristoffersen AB, Viljugrein H, Kongtorp RT, Brun E, Jansen PA (2009) Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003-2007. *Prev Vet Med* 2009, 90:127-136
- La Linn M, Gardner J, Warrilow D, Darnell GA, McMahon CR, Field I, Hyatt AD, Slade RW, Suhrbier A (2001) Arbovirus of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *J Virol* 2001, 75:4103-4109
- Lester K, Black J, Bruno DW (2011) Prevalence of salmonid alphavirus in Scottish fish farms from 2006 to 2007. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2011, 31:199-204
- Liljestrom P, Garoff H (1991) Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol* 1991, 65:147-154
- Loewy A, Smyth J, von Bonsdorff CH, Liljeström P, Schleisinger MJ (1995) the 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J virol* 1995, 69: 469-475
- Lopez-Doriga MV, Smail DA, Smith RJ, Domenech A, Castric J, Smith PD, Ellis AE (2001) Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) in cell culture and its ability to protect against infection by the 'wild-type' agent. *Fish Shellfish Immunol.* 2001, 11:505-522
- Lund M, Røsæg M (2016) Eksperimentell ko-infeksjon av Piscine orthoreovirus og Salmonid alphavirus i Atlantisk laks. Hentet fra [http://www.fhf.no/media/105719/presentasjon\\_hsmimore\\_-fhf-010915.pdf](http://www.fhf.no/media/105719/presentasjon_hsmimore_-fhf-010915.pdf)
- Lusa S, Garoff H, Liuström P (1991) Fate of the 6K membrane protein of semliki forest virus during virus assembly. *J virol* 1991, 185: 843-846

- Løvoll M, Wiik-Nielsen J, Grove S, Wiik-Nielsen CR, Kristoffersen AB, Faller R, Poppe T, Jung J, Pedamallu CS, Nederbragt AJ, Meyerson M, Rimstad E, Tengs T (2010) A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). *Virology* 2010, 7:309
- Maule AG, Schreck CB, Kaattari SL (1987) Changes in the Immune-System of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) During the Parr-to-Smolt Transformation and after Implantation of Cortisol. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1987, 44:161-166
- McLoughlin MF, Nelson RT, Rowley HM, Cox DI, Grant AN (1996) Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Dis Aquat Org* 1996, 26:117-124
- McLoughlin MF, Nelson RN, McCormick JI, Rowley HM, Bryson DB (2002) Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 2002, 25:33-43
- McLoughlin MF, Peeler E, Foyle KL, Rodger HD, O'Ceallachain D, Geoghegan F (2003) An epidemiological investigation of the re-emergence of pancreas disease in Irish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in 2002. *Marine Environment & Health Series*, No.14, Marine Institute, Oranmore, Ireland.
- McLoughlin MF, Graham DA, Norris A, Matthews D, Foyle L, Rowley HM, Jewhurst H, MacPhee J, Todd D (2006) Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Dis Aquat Org*. 2006, 72:125-33.
- McLoughlin MF, Graham DA (2007) Alphavirus infections in salmonids-a review. *J Fish Dis* 2007, 30:511-531
- McVicar A (1986) Pancreas disease- a spreading threat to salmon. *Fish Farmer* 1986,18-19
- McVicar A (1987) Pancreas Disease of Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in Scotland:Epidemiology and Early Pathology. *Aquaculture* 1987, 67:71-78
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996) Experimental studies on the efficacy and side effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*. 1996, 6(5):335-350
- Moriette C, Leberre M, Lamoureux A, Lai TL, Bremont M (2006) Recovery of a recombinant salmonid alphavirus fully attenuated and protective for rainbow trout. *J Virol* 2006, 80:4088-4098
- MSD, Animal Health. Aquavac PD7, sustainable performance. Hentet 01.05.16 fra: [http://www.msds-animal-health.no/binaries/AQUAVAC\\_PD7\\_tcm84-178205.pdf](http://www.msds-animal-health.no/binaries/AQUAVAC_PD7_tcm84-178205.pdf)
- Mukhopadhyay S, Zhang W, Gabler S, Chipman PR, Strauss EG, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2006) Mapping the structure and function of the E1 and E2 Glycoproteins in Alphaviruses. *Cell press* 2006, 14:63-73
- Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen O (2014). Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Dev Comp Immunol* 2014, 43(2):184-96.
- Munro ALS, Ellis AE, McVicar AH, McLay HA, Needham EA (1984) An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 1984, 37:571-586



- Murphy TM, Rodger HD, Drinan EM, Gannon F, Kruse P, Korting W (1992) The sequential pathology of pancreas disease in Atlantic salmon farms in Ireland. *J Fish Dis* 1992, 15:401-408
- Mustafa A, MacWilliams C, Farnandez N, Matchett K, Conboy GA, Burka J (2000) Effects of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Kröyer, 1837) infestation on macrophage functions in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2000, 10:47-59
- Nelson RT, McLoughlin MF, Rowley HM, Platten MA, McCormick JI (1995) Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. *Dis Aquat Org* 1995, 22:25-32
- Nolan DT, Reilly P, Wendelaar Bonga SE (2011) Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2011, 56(6): 947-959
- Nylund A, Plarre H, Hodneland K, Devold M, Aspehaug V, Aarseth M, Koren C, Watanabe K (2003) Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. *Dis Aquat Org* 2003, 54:15-27.
- Nylund S, Andersen L, Sævareid I, Plarre H, Watanabe K, Arnesen CE, Karlsbakk E, Nylund A (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Dis Aquat Org* 2011, 94:41-57
- Olsen AB & Hellberg H (red) Fiskehelse rapporten 2011. Oslo: Veterinærinstituttet, 2012
- Olsvik PA, Lie KK, Jordal AEO, Nilsen TO, Hordvik I (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* 2005, 6: 21
- Petterson E, Sandberg M, Santi N (2009) Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 2009, 32:477-479
- Pickering A, Pottinger T (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 1989, 7:253-258
- Poppe T, Rimstad E, Hyllseth B (1989) Pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol* 1989, 9:83-85
- Ramstad A, Romstad AB, Knappskog DH, Midtlyng PJ (2007). "Field validation of experimental challenge models for IPN vaccines." *J Fish Dis* 2007, 30(12):723-731.
- Restifo NP, Ying H, Hwang L, Leitner WW (2000) The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Therapy* 2000, 7(2):89-92.
- Robertsen B (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunol.* 2006, 20:172-191
- Rodger H, Mitchell S (2007) Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J Fish Dis* 2007, 30:157-167
- Rokenes TP, Larsen R, Robertsen B (2007). "Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections." *Mol Immunol* 2007, 44(5):950-959.

- Ruane N, Rodger H, Graham D, Foyle L, Norris A, Ratcliff J, Murphy K, Mitchell S, Staples C, Jewhurst H, Todd D, Geoghegan F, Cinneide ÓM (2005) Research on pancreas disease in Irish farmed salmon 2004/2005- current and future initiatives. *Marine Environment and Health Series* 2005, 22:1649-0053
- Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14:778–809.
- Sanz MA, Carrasco L (2001) Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J Virol* 2001, 75:7778-7784
- Sanz MA, Madan V, Carrasco L, Nieva JL (2003). Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J Biol Chem* 2003, 278(3):2051-2057.
- Seder RA, Hill AVS (2000) Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 2000, 406:793–797.
- Shoemaker CA, Klesius PH (2009) Use of modified live vaccines in aquaculture. *J world aquacult Soc* 2009, 40:573-585
- Simon P (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 2003, 19:1439- 1440.
- Skjold P (2014) Survival of Salmonid alphavirus in seawater under different physical conditions. Akademisk avhandling. Universitetet i Bergen
- Stene A, Hellebø A, Viljugrein H, Solevåg SE, Devold M, Aspehaug V (2015) Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J Fish Dis* 2015, 39(5):531-537.
- Strauss JH, Strauss EG (1994) The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 1994, 58:491-562
- Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, Zou J, Jorgensen J, Robertsen B (2011) Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *J Virol* 2011, 85:9188-9198
- Sveen S (2010) Tidsstudie av infeksjonsforløp med Paranucleospora theridion hos vår- og høstutsatt laksesmolt. Akademisk avhandling. Universitetet i Bergen
- Sørum U, Damsgård B (2004) Effects of anaesthetization and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2004, 232:333-341.
- Tadiso TM, Krasnov A, Skugor S, Afanasyev S, Hordvik I, Nilsen F (2011) Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC Genomics* 12:141
- Taksdal T, Ramstad A, Stangeland K, Dannevig BH (1998) Induction of infectious pancreatic necroses (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *J Fish Dis* 1998, 21:193-204
- Taksdal T, Olsen AB, Bjerkas I, Hjortaas MJ, Dannevig BH, Graham DA, McLoughlin MF (2007) Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J Fish Dis* 2007, 30:545-558

- Taksdal T, Bang Jensen B, Böckerman I, McLoughlin MF, Hjortaas MJ, Ramstad A, Sindre H (2015) Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *J Fish Dis* 2015, 38:1047-61.
- Villoing S, Castric J, Jeffroy J, Le Ven A, Thiery R, Bremont M (2000) An RT-PCR-based method for the diagnosis of the sleeping disease virus in experimentally and naturally infected salmonids. *Dis Aquat Org* 2000, 40:19-27.
- Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Rey FA (2010) Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010, 468:709-712
- Weston JH, Welsh MD, McLoughlin MF, Todd D (1999) Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Virology* 1999, 256:188-195
- Weston J, Villoing S, Bremont M, Castric J, Pfeffer M, Jewhurst V, McLoughlin M, Rodseth O, Christie KE, Koumans J, Todd D (2002) Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *J Virol* 2002, 76(12):6155-63
- Weston JH, Graham DA, Branson E, Rowley HM, Walker IW, Jewhurst VA, Jewhurst HL, Todd D (2005) Nucleotide sequence variation in salmonid alphaviruses from outbreaks of salmon pancreas disease and sleeping disease. *Dis Aquat Org* 2005, 66:105-111
- Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE (1999) DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine* 1999, 17(13-14):1612-9.
- Workenhe ST, Rise ML, Kibenge MJ, Kibenge FS (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Mol Immunol* 2010, 47(16): 2525-2536.
- Xu C, Guo TC, Mutoloki S, Haugland O, Marjara IS, Evensen O (2010) Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro. *J Virol* 2010, 84:8903-8912
- Xu C, Mutoloki S, Evensen Ø (2012a) Superior protection conferred by inactivated whole virus vaccine over subunit and DNA vaccines against salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine* 2012, 30:3918-3928
- Xu C, Guo TC, Mutoloki S, Haugland O, Evensen O (2012b) Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. *Vet Res.* 2012, 43:10.
- Yao JS, Strauss EH, Strauss JH (1996) Interactions between PE2, E1 and 6K required for assembly of alphaviruses studied with chimeric viruses. *J Virol* 1996, 70:7910-7920

# Vedlegg 1

## Reagenser

Reagens	Produsent
25X RT-PCR enzym	Ambion®
6 X Loading buffer	BigDye®
Absolute ethanol	Sigma-Aldrich®
AgPathID™ One-Step RT-PCR kit	Life Technologies
Antibiotic Antimycotic solution	Sigma®
BigDye Terminator 3.1 version Ready Reaction Premix	Invitrogen
BigDye® Terminator 3.1 version sequencing buffer	Invitrogen
Dnase/RNase-fritt vann (dH <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich®
dNTP	Sigma, LifeScience ?? VWR®??
ExoSAP-IT®	Illustra™
Fetal Bovine Serum	Sigma®
Finquel Vet™	PHARMAQ AS
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium Inc.
Gentamicin sulfate	BioWhittaker ®
Hepes Buffer	Sigma®
Ikke-essensielle aminosyrer (NEAA)	Sigma®
Isol-RNA Lysis reagent	5-PRIME
Isopropanol Prima	Kemetyl
Kloroform	Sigma-Aldrich®
L-glutamine	Sigma®
M-MLV revers transkriptase	Promega
M-MLV RT 5X buffer	Promega
Minimum Essential Medium Eagle (EMEM)	Sigma®
PBS	Sigma®
Primere	Invitrogen
SmartLadder	Eurogentec MW-1700-02
Taq DNA polymerase	VWR®
Trypsin EDTA	BioWhittaker ®

## Oppskrifter

### 1% agarose gel

. SeaKem® LA Agarose (Cambrex) blandet i 400 ml 1x TAE-buffer

. - Varmet i mikroovn og oppbevart ved 60°C

### 10% EMEM vekstmedium

500 ml Eagles Minimum Essential Medium (EMEM)

50 ml Fetal Bovine Serum (FBS)

200 µl gentamicin sulfat

5 ml L-glutamin

5 ml Antibiotic Antimycotic Solution (A5955)

5 ml Hepes buffer

5 ml ikke-essensielle aminosyrer, NEAA

### 2% EMEM vedlikeholdsmedium

500 ml Eagles Minimum Essential Medium (EMEM)

10 ml Fetal Bovine Serum (FBS)

200 µl gentamicin sulfat

5 ml L-glutamin

5 ml Antibiotic Antimycotic Solution (A5955)

5 ml Hepes buffer

5 ml ikke-essensielle aminosyrer, NEAA

### 1 x TAE buffer (Tris-acetate-EDTA)

Tris base (Merck) 48,4 gr

Glacial acetic acid 11,4 ml

EDTA (0,5 M) 3,8 gr

dH<sub>2</sub>O (totalt volum 1 liter)

### Primer / Probe

1 del primer/probe 9 deler µl dH<sub>2</sub>O

### dNTP 2,5 mM

10 µL 100 mM dATP

10 µL 100 mM dTTP

10 µL 100 mM dGTP

10 µL 100 mM dCTP

360 µL dH<sub>2</sub>O

### Ligninger:

$$^1 \text{ Prevalens (\%)} = \frac{\text{Antall positive prøver}}{\text{Totalt antall prøver}} \times 100$$

### Vedlegg 3

Figur 21. Figuren viser et alignment av ALV413 mot de nærmeste slektningene i SAV3 genotypen. Videre er det inkludert en sekvens fra SAV2 (Accession no: AJ316246 ) og en fra SAV3 (Accession no: AJ316244).

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	
ALV_413	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
JQ799139	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122920	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KF668076	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122919	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122922	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122918	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122923	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122924	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122925	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
KC122926	:	CGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
AJ316246	:	CGGCAATAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	91				
AJ316244	:	TGGCACTAT	CAG	AGTGGAGGACAATGTCGTAATTGACGCGAGCGGCAGAGGTAAGCCGGG	TGACAGTGGAAAGGCCATTACCGACAAC	:	88				
		CGGCacTAT	CAG	AGTGGAGGACAATgTcGTAAtTgAcGcGcAGCGGCAGAGgTtAAGCCGGG	TGACAGTGGaAGGgCcAtTtACCGACAAC						

		100	*	120	*	140	*	160	*	180	
ALV_413	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
JQ799139	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122920	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KF668076	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122919	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122922	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122918	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122923	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122924	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122925	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
KC122926	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGCATTGTCCTCGGAGGGGACCCGACGGCAGGCGCACACGCCCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
AJ316246	:	TCAGGAAAGGTTGTTGGTATTGTCCTCGGAGGGGACCCGATGGTAGGCGCACACGCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	182							
AJ316244	:	TCGGGAAAGGTTGTTGGTATTGTCCTCGGAGGGGACCCGATGGTAGGCGCACACGCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGATGAAGG	:	179							
		TCaGGAAAGGTTGTTGGcAttGTCCTCGGAGGGGACCCGAcGGcAGGCGCACACGcCTCTCCGTGATAGGTTTCGACAAGAAGaTGAAGG									

		*	200	*	220	*	240	*	260	*	
ALV_413	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
JQ799139	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122920	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KF668076	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122919	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122922	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122918	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122923	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122924	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122925	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
KC122926	:	CTAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATA	CCTTGGACACG	IGCTCCAGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
AJ316246	:	CCAGAGAGATCGCCTACAGCGAGGCCATC	CCTTGGACACG	CCACCAGCT	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	273	
AJ316244	:	CTAGGAGATCGCCTACAGCGATGCCATA	CCTTGGACACG	CGCTCCGGCC	CTCCTGCTGCTGCC	CATGGTCATCG	CTGTACCTACAAC	CTC	:	270	
		CtAGaGAGATCGCCTACAGcGAgGCCATaCCTTGGACACGtGctCCaGcCcCTCCTGCTGCTGCCcATGGTcAtGcCcTGtACCTACAACtC									

		280	*	300	*	320	*	340	*	360	
ALV_413	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
JQ799139	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122920	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KF668076	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122919	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122922	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122918	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122923	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122924	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122925	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
KC122926	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGTTGAAGGACAACCTG	:	361							
AJ316246	:	CAATACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGTTGTATCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGGCTATGCTGAAGGACAACCTG	:	364							
AJ316244	:	CAACACCTTTGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGACTGCTGCTATTACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGACCATGCTGAAGGACAACCTG	:	361							
		CAAcACCTTTtGATTGCTCCAAACCGTCTGCCAGGAcTGTtGTAtCACTGCTGAACCAGAGAAGGCCATGgCtAtGtTGAAGGACAACcCTG									



	*	740	*				
ALV_413	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
JQ799139	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122920	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KF668076	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122919	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122922	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122918	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122923	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122924	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122925	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
KC122926	:	AGTGC	CGAT	GTGCTGCAGGCCAC	CGGCC	:	752
AJ316246	:	AGTGT	TGAC	GTGCTGCAGGCCAC	TGGCC	:	755
AJ316244	:	AGTGC	GAC	GTGCTGCAGGCCAC	TGGCC	:	752
		AGTGC	cGAt	GTGCTGCAGGCCAC	cGGCC		