

Eksperimentell eksponering av laksefiskyngel for salmonid alphavirus (SAV3)

—

Sammenligning av mottakelighet og konsekvens hos brunørret (*Salmo trutta* L.) og atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Master i fiskehelse

Anne Moberg Vossgård



Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen

Desember 2018

Forord

Dette arbeidet ble utført som en del av profesjonsstudiet i fiskehelse ved Universitetet i Bergen (UiB). Studien ble gjort i samarbeid med, og finansiert av Havforskningsinstituttet i Bergen som en del av Prosjekt 14896 (Smittespredning) i Havforskningsinstituttets akvakulturprogram.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere ved UiB og Havforskningsinstituttet, Egil Karlsbakk, Bjørn Olav Kvamme og Abdullah Sami Madhun for tålmodighet og oppmuntringer gjennom året som har gått. Takk for at dere har tatt dere tid til å gi tilbakemeldinger og tips og for at dere har svart på alle spørsmål som jeg har kommet med underveis.

Jeg vil også takke Håkon Berg-Rolnes og Stig Mæle for god og grundig opplæring og hjelp på labben på tross av en travel hverdag. Ingrid U. Fiksdal og Dawit B. Ghebretsaie har vært til uunnværlig hjelp på histologilabben og har i tillegg bidratt med et smittende godt humør.

Jeg vil også rette en takk til Joachim Nordbø og Enrique P. Garzia som har hatt ansvar for forsøksfisken og vært til stor hjelp under uttak, og til Craig Morton for hjelp med viruset og for titrering.

Takk til Tom Hansen, Per Gunnar Fjelldal, Lise Dyrhovden og Ivar Helge Matre ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon i Matre som leverte fisken til dette prosjektet, og Sonal Patel fra Vaxxinoa for titrering av vannprøver og levering av virus.

I tillegg til dette vil jeg takke alle andre på Havforskningsinstituttet som på ulike måter har bidratt til arbeidet med dette studiet og som har gjort at jeg har følt meg velkommen.

Sist men ikke minst vil jeg rette en takk til mine medstudenter for et kjekt og motiverende studiemiljø og til min familie for all støtte og oppmuntring gjennom de siste fem årene.

Sammendrag

Salmonid alfavirus (SAV) forårsaker pankreassyke (PD) hos laksefisk i oppdrett. PD er utbredt i Norge og var den mest rapporterte virussykdommen i 2017. Det er en bekymring at rømt oppdrettsfisk som er infisert med viruset kan spre smitte til vill laksefisk, særlig sårbare laksefiskyngel i elvene.

I denne studien er det gjort smitteforsøk med SAV3 på yngel av brunørret (*Salmo trutta* L.) og atlantisk laks (*Salmo salar* L.) for å undersøke om disse artene er mottakelige for viruset på dette stadiet og for å avklare konsekvensene av en eventuell infeksjon. Fisken ble utsatt for smitte enten gjennom bading i virusholdig vann fra sheddere, eller gjennom en modifisert «kohabitant» smittemodell der fisken ble kontinuerlig eksponert for vann fra sheddere. Ekte kohabitering lot seg ikke gjøre på grunn av predasjon. Det ble tatt ut prøver (qPCR og histologi) 1, 2, 3, 4, 6 og 8 uker etter forsøksstart. I tillegg ble vekt, lengde og dødelighet registrert.

I laksegruppene ble all fisk smittet med viruset i løpet av forsøket. Virustetthet (målt som Ct) varierte mye frem til uke fire før den stabiliserte seg med Ct mellom 30 og 20 i de fleste fiskene. Hos laks var både vekt og lengde lavere i smittegruppene enn i kontrollgruppen i slutten av forsøket.

Kondisjonsfaktoren ble ikke påvirket. Histopatologien i laks- «kohabitantgruppen» ble undersøkt 6 uker etter infeksjonsstart. Her hadde alle de undersøkte fiskene utviklet histopatologiske forandringer i pankreas og hjerte, og alle utenom én i skjelettmuskulatur. Dødeligheten var høy i begge laksegruppene, særlig i kohabitantgruppen.

I ørretgruppene ble færre fisk smittet sammenlignet med laks, og den maksimale andelen positive fisk var kun 13 % (bad) og 50 % («kohabitant»). Det var stor variasjon i virustetthet i vevsprøvene, men Ct var høyere enn 25 i de fleste fiskene. Det var ingen forskjell i ørretens vekst i smittegruppene og kontrollgruppen ved slutten av forsøket. Histopatologiske endringer ble funnet i kun fire av 16 kohabitant-ørret 6 uker etter infeksjonsstart. Sammenlignet med laksen var disse forandringene mindre alvorlige i pankreas og hjerte, men av lignende omfang i skjelettmuskulatur. Det var ingen påviselig dødelighet som følge av eksponering for SAV3 i noen av ørretgruppene.

Eksperimentene tyder på at eksponering av laksefiskyngel for SAV3 kan føre til infeksjon med alvorlig patologiske forandringer og høy dødelighet. Derimot virker ørreten mindre mottakelig for viruset enn laks, og konsekvensene av infeksjon er mindre alvorlige. Funnene tyder på at ville laksepopulasjoner kan påvirkes av SAV eksponering fra smittet rømt oppdrettsfisk, mens dette virker mindre sannsynlig for ørret.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	2
1.0 Introduksjon	6
2.0 Metode	11
2.1 Forsøksfisk.....	11
2.2 Fasiliteter.....	12
2.3 Virus isolat.....	12
2.4 Forsøksoppsett.....	12
2.5 Vannprøver.....	15
2.6 Prøveuttak.....	15
2.7 RNA isolering.....	17
2.8 Viruskvantifisering med kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR).....	18
2.9 Histologi.....	21
2.10 Statistiske analyser.....	23
3.0 Resultater	24
3.1 Uttak før forsøksstart	24
3.2 Virus i vannprøver	24
3.3 Makroskopiske sykdomstegn	24
3.4 Vekt, lengde og kondisjonsfaktor.....	25
3.5 qPCR	28
3.5.1 SAV3 smitte-dynamikk i den badeksponerte gruppen med laks	28
3.5.2 SAV3 smitte-dynamikk i kohabitantgruppen med laks	28
3.5.3 SAV3 smitte-dynamikk i den badeksponerte gruppen med ørret	28
3.5.4 SAV3 smitte-dynamikk i kohabitantgruppen med ørret	28
3.6 Forskjeller i mottagelighet mellom laks og ørret	34
3.7 Histologi.....	36
3.7.1 Histopatologiske funn i hjertet hos kohabitant laks	36

3.7.2 Histopatologiske funn i pankreas hos kohabitant laks.....	38
3.7.3 Histopatologiske funn i skjelettmuskulatur hos kohabitant laks	40
3.7.4 Histopatologiske funn i hjertet hos kohabitant ørret	41
3.7.5 Histopatologiske funn i pankreas hos kohabitant ørret.....	43
3.7.6 Histopatologiske funn i skjelettmuskulatur hos kohabitant ørret	44
3.7.7 Histologiske bifunn	46
3.7.8 Sammenligning av histologisk skår hos kohabitant laks og ørret 6 uei.....	46
3.8 Dødelighet	47
4.0 Diskusjon	48
5.0 Konklusjon	56
Referanser	57
Vedlegg 1: Oppskrift for RNA stabiliseringsløsning.....	64
Vedlegg 2: Tabeller histologi	65
Vedlegg 3: Histologiskårer.....	67

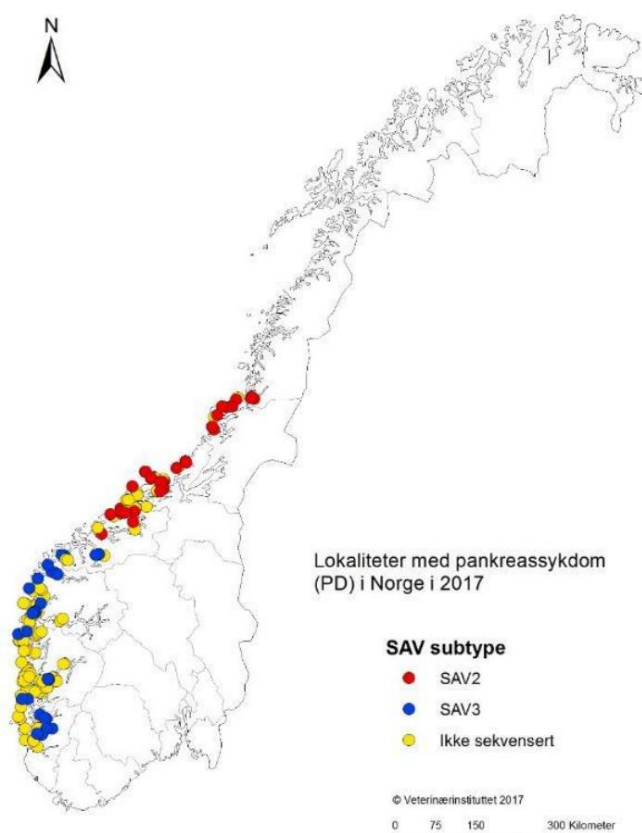
1.0 Introduksjon

Akvakultur slik vi kjenner det i dag startet på slutten av 1960-tallet og har siden da gjennomgått en kraftig utvikling og vekst. I følge Statistisk sentralbyrå ble det i 2017 produsert 1 219 235 tonn atlantisk laks (*Salmo salar*) og 65 447 tonn regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Nært sagt all fisk som blir produsert i sjø i Norge blir kultivert i åpne not-baserte merder. I slike anlegg vil det være stor grad av utveksling av vann og interaksjon med miljøet. Høy individtetthet med mange infiserte eller syke individer i kombinasjon med åpne merder vil føre til et høyere smittepress hos villfisk som oppholder seg i området rundt et anlegg. Bakterielle infeksjoner var lenge den viktigste årsaken til sykdom og dødelighet i Norsk fiskeoppdrett. De bakterielle sykdommene kaldtvannsvibriose (*Aliivibrio salmonicida*) og furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) førte til store tap i næringen og var den viktigste årsaken til det høye forbruket av antibiotika fra tidlig 1980-tallet til sent 1990-tallet (Poppe and Breck, 1997, Gudding, 2014). På 1990-tallet ble det innført endringer som vaksinerings, segregering av årsklasser, obligatoriske helsekontroller og smittesoner som førte til bedre kontroll over smittespredning og sykdom i oppdrettsnæringen (Erdal and Reitan, 1992, Poppe and Breck, 1997). På tross av dette er det fortsatt store utfordringer knyttet til sykdom i norsk oppdrett i dag. Utenom lakselus er virussykdommer den største helsemessige utfordringen innen norsk laksefisk-oppdrett. De vanligste

virussykdommene i norsk oppdrett i dag er pankreassykdom (PD), kardiomyopatisyndrom (CMS), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksiøs pankreasnekrose (IPN) og infeksiøs lakseanemi (ILA) (Hjeltnes et al., 2018). Med et høyt antall årlige utbrudd blir PD ansett som den viktigste av disse.

Pankreassyke affiserer atlantisk laks og regnbueørret i oppdrett og fører til store tap for næringen (Aunsmo et al., 2010, Jansen et al., 2017).

Pankreassyke forårsakes av salmonid alfavirus (SAV) som er et kappekledd, positivt trådet RNA-virus i familien *Togaviridae*, slekten *Alphavirus*



Figur 1: Kart over lokaliteter med PD i Norge i 2017 (Bang Jensen et al., 2018).

(McLoughlin and Graham, 2007, Taksdal et al., 2007, Deperasińska et al., 2018). Det finnes 6 subtyper av SAV (SAV1-6), men kun to av disse har blitt påvist i Norge (SAV2 og SAV3). SAV3 har til nå kun blitt funnet i Norge og affiserer både laks og regnbueørret i sjø. (Karlsen et al., 2006, Deperasińska et al., 2018). SAV3 var lenge bare påvist på Vestlandet, men har siden 2006 blitt spredd både nord- og sørover langs kysten (Hjortaas et al., 2016). Før 2011 var alle påviste PD utbrudd forårsaket av SAV3. SAV2 ble påvist for første gang i oppdrettslaks i Nord-Trøndelag og siden da har det vært et økende antall PD-utbrudd forårsaket av SAV2 i Norge (Hjortaas et al., 2013, Bang Jensen et al., 2018). Det er sannsynlig at SAV2 har blitt introdusert til Norge via brønnbåter eller import av smolt (Karlsen et al., 2014, Hjortaas et al., 2016). I dag forekommer utbrudd med SAV3 i hovedsak mellom Rogaland og Hustadvika, mens de fleste SAV2 utbrudd blir registrert på Nordmøre og Trøndelagskysten, nord for Hustadvika. Med dette anses de to variantene som to forskjellige epizootier i Norge og forvaltes deretter.

SAV smitter horisontalt ved at infisert fisk skiller ut virus i vannet, i slim og avføring (Graham et al., 2012, Jarungsriapisit et al., 2016b, Skjold et al., 2016). Virusopptaket er trolig gjennom gjellene eller via fordøyelseskanalen (OIE, 2018). Vertikal overføring av SAV har blitt antydnet (Bratland & Nylund 2009), men er ikke ansett som en viktig smittevei (McLoughlin and Graham, 2007, Bratland and Nylund, 2009, Kongtorp et al., 2010).

Den viremiske perioden kan starte raskt etter infeksjon, og lengden kan variere fra noen dager til flere uker. Infisert fisk kan være smittsom også etter at de kliniske tegnene på sykdom forsvinner eller etter at fisken dør (Graham et al., 2012, Stene et al., 2016). I tilfeller med kroniske SAV infeksjoner kan SAV-RNA detekteres i verten lenge etter infeksjon (Andersen et al., 2007, McLoughlin and Graham, 2007, Jansen et al., 2010). SAV blir regnet som et relativt robust virus som kan overleve lenge i vann utenfor verten. Overlevelsen er lengst i sjøvann og ved lave temperaturer (Graham et al., 2007).

Utbrudd med PD skjer ofte de første månedene etter sjøsetting, men sykdommen kan forekomme gjennom hele sjøfasen (McLoughlin and Graham, 2007, Olsen et al., 2017). De kliniske tegnene som blir observert i sammenheng med PD er ofte få og vage. Fisken kan vise nedsatt appetitt, bli sløve og det kan observeres «flyteskit» i merden. Senere i forløpet kan økt dødelighet og redusert vekst observeres (McLoughlin and Graham, 2007, Deperasińska et al., 2018). Ved obduksjon kan fisken ha mangel på fettvev rundt pylorusblindsekkene samt mangel på fôr i tarm. Dersom det er store skader på hjertet kan det også observeres klinikk som er typisk ved sirkulasjonssvikt som utstående øyne (eksoftalmus) og væske i bukhulen (ascites). (Rodger et al., 1991, Taksdal and Sindre, 2016). Skader på hjertet kan også gjøre fisken dårligere rustet til å håndtere stress og kan føre til plutselig forhøyet dødelighet ved håndtering (for eksempel avlusing) også lenge etter utbruddet (McLoughlin and

Graham, 2007).

I etterkant av et utbrudd kan overlevende fisk være tynne og ha lite kroppsfett dersom pankreas er ødelagt. Denne fisken vil være mer mottakelig for sekundærinfeksjoner og kan med dette bidra til et økt smittepress (McLoughlin and Graham, 2007). Dersom fisken har større lesjoner i skjelettmuskulaturen kan det observeres spiralsvømming eller fisk som hviler på bunnen av merden.

Den vanligste histopatologien som blir observert i forbindelse med PD er skader i pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur. Det har også blitt funnet patologi i hjerne, nyrer og i muskulaturen rundt spiserøret i forbindelse med PD, men dette er ikke like typisk (McLoughlin et al., 1996, Desvignes et al., 2002, Christie et al., 2007, Boscher et al., 2006, Herath et al., 2016).

Histopatologiske tegn på PD er betennelse og degenerasjon av eksokrin pankreas, hjerte- og skjelettmuskulatur (Taksdal and Sindre, 2016). Patologi blir først sett i pankreas og hjertet etterfulgt av patologi i skjelettmuskulatur litt senere i sykdomsforløpet (McLoughlin and Graham, 2007).

Påvisning av PD krever i dag at enten PCR eller dyrking er positive for SAV, samtidig må det forekomme klinikk eller patologiske forandringer som er forenlig med PD (OIE, 2018).

«Sleeping disease» (SD) er nært beslektet med PD, og forårsakes av ferskvannstypen av SAV2. SD forekommer hos regnbueørret i store deler av Europa. Histopatologiske funn i forbindelse med SD ligner det en ser hos PD-syk fisk (Deperasińska et al., 2018).

Smitte med SAV mellom oppdrettsfisk og villfisk kan skje ved horisontal smitte med virus frigjort i vann, eller gjennom kontakt med infisert eller syk rømt fisk. Det er en bekymring at kontakt mellom rømt oppdrettsfisk og villfisk kan føre til smitte, sykdom og økt dødelighet blant villfisken (Madhun et al., 2015, Skilbrei et al., 2015, Madhun et al., 2017, Grefsrud et al., 2018).

Rømming fra oppdrett kan skje ved feil på utstyr, etter uvær eller lignende. Det forekommer sannsynligvis også «drypprømminger» som følge av, for eksempel, små rifter i noten som ikke oppdages. Det er derfor antatt at rømning fra oppdrett er kraftig underrapportert (Skilbrei and Wennevik, 2006, Skilbrei et al., 2015, Madhun et al., 2017).

Rømt oppdrettsfisk i PD regionene kan være bærere av SAV (Madhun et al., 2015, Madhun et al., 2017) og det er kjent at SAV smitter i ferskvann (McLoughlin et al., 1995). Når infisert eller syk oppdrettsfisken kommer opp i elvene er det en fare for at det kan overføres virusinfeksjoner til villfisken, inkludert juvenile laksefisk som kan være særlig mottagelige for infeksjoner (Johnson et al., 1982, Zapata et al., 2006, Magnadóttir, 2006). I motsetning til ved genetisk interaksjon vil det i teorien kun kreves én smittsom fisk i en elv for å starte en epizooti, som kan gi store konsekvenser for en bestand. Det er uavklart om det forekommer sykdom og dødelighet som følge av slik smitte (Grefsrud et al., 2018). Dette skyldes blant annet at det er vanskelig finne syke eller døde individer i

naturen (Wobeser, 2013). Både brunørret og atlantisk laks er anadrome laksefisk som finnes i deler av Europa. Brunørreten kan være anadrom (da sjøørret), men gjennomfører ofte hele livssyklusen i ferskvann (Jonsson, 1985, Klemetsen et al., 2003). Anadrome populasjoner av begge artene viser stor variasjon i hvor lenge fisken blir i ferskvann, størrelse ved smoltifisering og hvor lenge den blir i sjø før den returnerer til elvene for å gyte. Denne diversiteten gjør det mulig for mindre populasjoner å overleve i møte med utfordringer som varierende temperatur, vannkvalitet eller patogener (Klemetsen et al., 2003).

Etter smoltifisering vil laksen migrere til beiteområder i åpent hav, mens sjøørreten oftest forblir i fjordene eller langs kysten for å beite. Dette medfører at ørreten vil kunne tilbringe mer tid i umiddelbar nærhet til oppdrettsanlegg enn villaks, og er derfor mer utsatt for smitte (Jonsson, 1985, Klemetsen et al., 2003). Det er derfor viktig å avklare hvorvidt ørreten blir smittet, er bærer eller dør av patogenene som er vanlig i oppdrett.

Et viktig spørsmål er mottageligheten til yngel av laks og brunørret for SAV, da disse kan tenkes å bli eksponert for virus fra smittet rømt oppdrettslaks som går opp i elvene (Madhun et al., 2015). På lakseyngel er det gjort noen få forsøk med forskjellige smittemetoder og subgrupper av SAV. Lakseyngel (0,5 g) badsmittet (vann fra sheddere) med SAV3 viste omfattende dødelighet (60 %) i perioden 20 - 50 dager etter smitte, men patologien ble ikke undersøkt i dette forsøket (Gonen et al., 2015). Dette er det eneste studiet som er gjennomført med SAV3 og yngel (0,5 g), og her ble ikke patologien hos yngelen undersøkt, men den høye dødeligheten ble tilskrevet PD. Større lakseyngel (0,9 g) badsmittet med SAV1 viste lav kumulativ dødelighet (<1,2 %), men høy virusprevalens og histopatologiske endringer som er karakteristiske ved PD (Cano et al., 2015).

I et annet forsøk med stor lakseyngel (1,8 g) smittet med SAV1 fant man også dødelighet, omtrent 10% etter bad- og kohabitantsmitte, og hele 43% etter injeksjon. Her var alle de badeksponerte fiskene SAV positive 17 dager etter smitte, og histopatologiske undersøkelser viste at fisken utviklet PD (Herath et al., 2017). Dette viser at lakseyngel er mottagelige for SAV-infeksjoner, og synes å utvikle PD. Større parr og postsmolt smittet med SAV3 utvikler PD, men dødeligheten i eksperimentelle forsøk er oftest lav (Christie et al., 2007, Taksdal et al., 2015, Jarungsriapisit et al., 2016b)

Det finnes ikke tilsvarende studier av effekten SAV eksponering kan ha på yngel av brunørret, og generelt er kunnskapen om SAV3 i brunørret svært mangelfull. Brunørret (42 g) injisert med nyrehomogenat (ukjent SAV subtype) fra PD syk laks utviklet kun begrensede fokale nekroser i pankreas, mens laks som fikk det samme homogenatet hadde fullstendig tap av eksokrin pankreas (Boucher et al., 1995). Det ble konkludert at brunørret ikke utviklet PD, og sannsynligvis var resistent. Forsøket til Boucher et al. (1995) ble gjort før SAV ble karakterisert, og ble sannsynligvis gjennomført

med SAV1 eller 2. I en upublisert studie fra Havforskningsinstituttet ble post-smolt av brunørret og laks eksponert for SAV3 ved badsmitte og kohabitering. Dette forsøket viste at færre ørret enn laks ble infisert og at de kvittet seg med viruset raskere enn laksen. Histopatologien var også mildere i ørret enn i laks (Kvamme et al., 2018). Madhun et al. (2016) undersøkte 843 sjøørret fanget i forskjellige fjorder på Vestlandet (Sogn og Fjordane, Hordaland, Rogaland) og i Finnmark. Ingen av disse var positive for SAV med qPCR, selv om fisken fra Vestlandet var fra områder hvor SAV er utbredt blant oppdrettsfisk. Disse funnene støtter derfor opp under hypotesen om at større at brunørret er forholdsvis resistent mot SAV3. Som nevnt, finnes det ingen studier av effekten av SAV på brunørretyngel.

For å undersøke mottakelighet for og konsekvenser av infeksjon med SAV3 på yngel av norsk brunørret og laks, ble det satt opp forsøk med badsmittede og kohabitant-smittede grupper av hver art. Forsøket gikk over 8 uker og det ble tatt ut prøver til histologi og qPCR underveis, samt at veksten til fisken ble registrert. Dødelighet for begge artene ble registrert hver dag.

Målet med denne studien var å øke kunnskapen rundt påvirkning av virusinfeksjoner på vill laksefiskyngel ved å svare på følgende spørsmål:

- Er ørretyngel mottakelig for SAV3?
- Blir ørret- og lakseyngel syk av SAV3 infeksjon?
- Vil infeksjonene med SAV3 påvirke vekst hos ørret- og lakseyngel?
- Fører SAV3 infeksjon til økt dødelighet hos ørret- og lakseyngel?

2.0 Metode

2.1 Forsøksfisk

Det ble brukt tre typer fisk i smitteforsøket; yngel og parr av atlantisk laks (*Salmo salar*, heretter «laks»), og yngel av brunørret (*Salmo trutta*, heretter «ørret»). All fisk som ble brukt i forsøket ble produsert ved Havforskningsinstituttet sine fasiliteter på Matre. Lakseyngelen som ble brukt i forsøket var av en stamme fra Etneelva og ørreten var av en stamme fra Matre-elva.

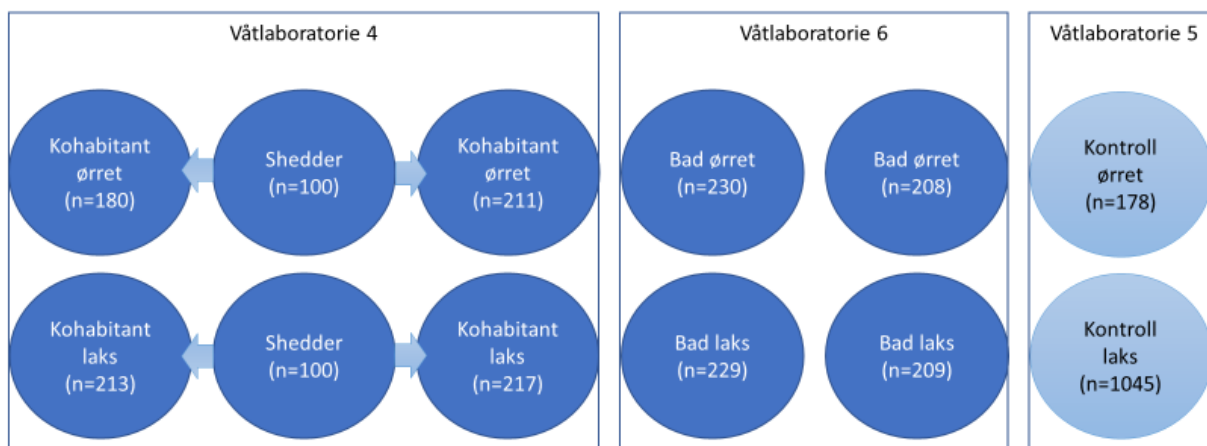
Den 23. februar 2018 ble lakseparren flyttet til Havforskningsinstituttets fasiliteter i Bergen der de ble holdt i to kar (400 L) frem til forsøkets oppstart. For å bekrefte at fisken var fri for spesifikke virusinfeksjoner, ble 30 parr screenet for SAV, infeksjøs pankreasnekrose virus (IPNV), piscint myokarditt virus (PMCV) og *Piscine orthoreovirus* (PRV1). Ved oppstart av forsøket (05.04.18) hadde parren en gjennomsnittsvekt på 14,6 ($\pm 3,59$) g (\pm Standardavvik) og en gjennomsnittlig gaffellengde på 10,5 ($\pm 1,2$) cm. Parren (videre omtalt som «shedderfisk») ble injisert med virus én uke før oppstart av forsøket (05.04). De ble brukt som smittespredere, og var ved shedding kilde til virus i vannet som kunne infisere yngelen gjennom «kohabitering» (se under), og til virusholdig vann brukt til badsmitte.

Både ørret- og lakseyngel ble flyttet til Bergen 21 dager før forsøkstart (22.03) og ble holdt i to separate 250 L kar. Prøver av begge artene (n=8 per art) ble screenet for SAV, IPNV, PMCV og PRV1 før forsøksstart, i tillegg ble et større antall testet for PRV1 og SAV3 gjennom forsøket som kontrollfisk. I forkant av forsøket ble noe av yngelen tapt grunnet predasjon. Det ble nødvendig å supplere med ørret som var klekket en uke før hovedgruppen av yngel, og disse var derfor noe større enn den originale yngelen. De to yngelgruppene ble blandet sammen og tilfeldig distribuert i forsøkskarene. Ved forsøkets start var gjennomsnittsvekten til lakseyngelen 0,38 ($\pm 0,07$) g og ørretyngelen 0,54 ($\pm 0,23$) g.

2.2 Fasiliteter

Fisken ble holdt i tre separate smittelaboratorier i Havforskningsinstituttets fasiliteter på Nordnes i Bergen gjennom hele forsøket. Shedderfisken og kohabitant-fisken ble holdt i våtlaboratorie 4, kontrollfisk på våtlaboratorie 5 og den badbehandlede fisken på våtlaboratorie 6. Hver smittegruppe var fordelt på to tanker, og kontrollfisk i individuelle tanker (figur 2).

Under forøket gikk kontrollfisken i to 400 L kar, og all annen fisk i 250 L kar. Gjennomstrømningen i bad- og kontrollkarene var 350 L/time. Fordi shedder-karene hver forsynte to kohabitant-kar med vann var vannstrømmen 700 L/time i shedder-karene, og 350 L/time i kohabitant-karene. Yngelen ble føret 8 ganger daglig og overflødig fôr ble regelmessig fjernet for å forhindre forringelse av karmiljøet. Temperaturen i vannet økte gradvis fra 10,2 °C i starten av forsøket til 12,7 °C ved forsøkets slutt.



Figur 2: Oppsett av kar i forsøket. Blå piler representerer vannoverføringer til grupper referert til som kohabitanter. (n; antall fisk)

2.3 Virus isolat

SAV 3 isolatet som ble brukt ble opprinnelig levert av Øystein Evensen, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Viruset ble dyrket i CHH-1 celler i L-15 medium tilsatt 2% fetal bovine serum (FCS) og gentamicin (500 µg/ml) ved 20°C. Virus ble titrert av Sonal Patel, Vaxxinoa. Supernatanten til CHH-1-cellene inneholdt 10^5 TCID₅₀/ml (50% Tissue Culture Infective Dose per ml) Hver shedderfisk fikk en intraperitoneal (IP) dose på 50 µL (10^3 TCID₅₀). Dette er ansett som en rikelig mengde virus til å starte en SAV infeksjon i shedderfisken (Jarungsriapisit et al., 2016a).

2.4 Forsøksoppsett

Shedderfisken (n=250) ble smittet en uke før forsøkstart. Etter at fisken var bedøvet med benzokain (60 mg/L) (Apotekproduksjon AS) ble den IP injisert med 50 µl supernatant 10^3 TCID₅₀ ved hjelp av en 1 ml insulinsprøyte. Ved forsøkstart ble to grupper med 100 shedderfisk overført til to oksygenerte

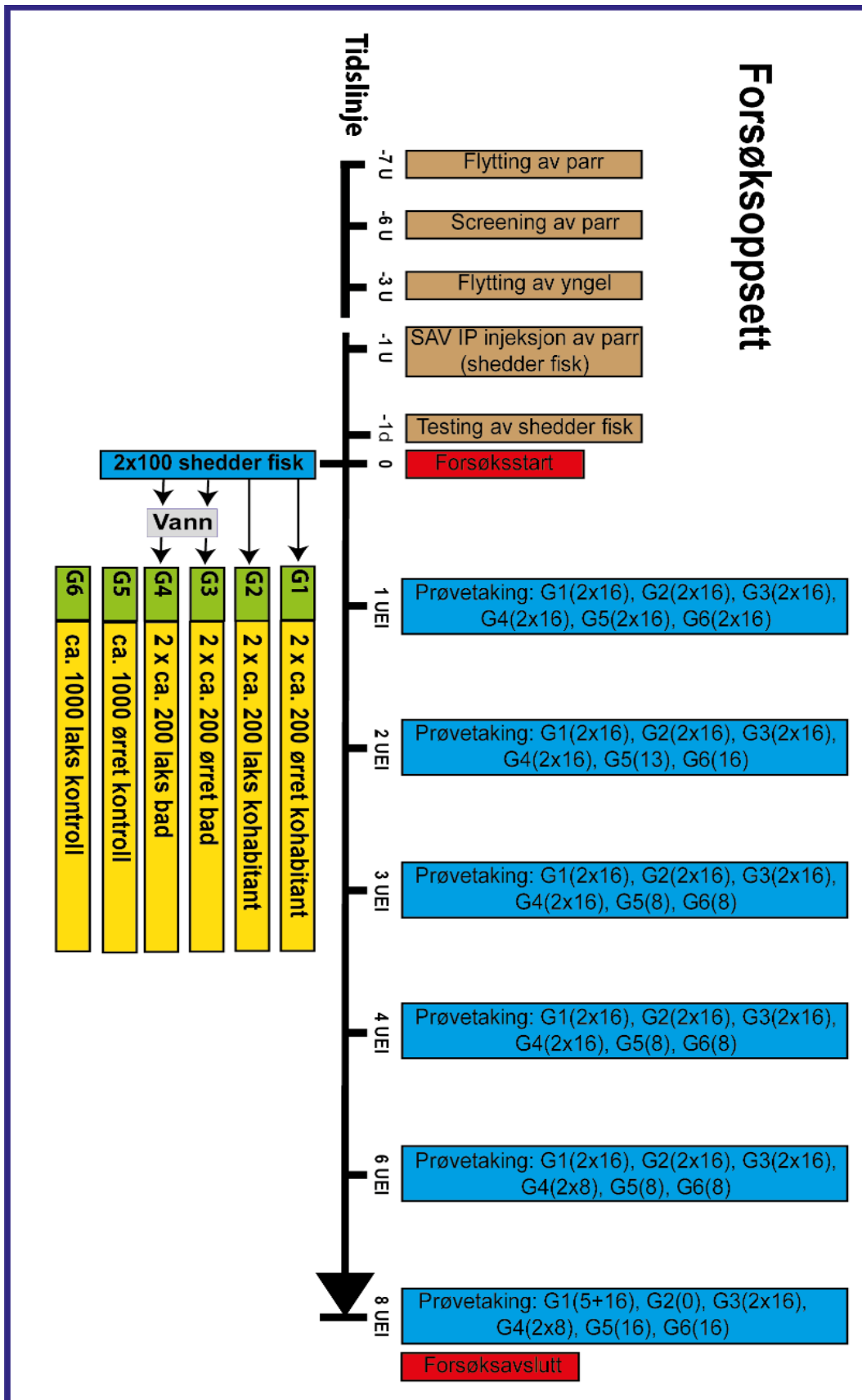
kar som hver inneholdt 30 L vann. Etter å ha frigjort virus i én time ble shedder-fiskene tatt ut av karene, og fordelt i to forsøkskar der de skulle fungere som smittekilde for «kohabitant»-fisken (figur 2). Yngelen av laks og ørret ble holdt separat gjennom hele forsøket fordi det ikke var mulig å skille dem på en sikker måte utfra utseende og fordi fisken var for liten til å bli merket. For at smittedosen skulle bli lik hos de to yngelgruppene ble det virusholdige vannet blandet og deretter fordelt i to tanker. Yngelen ble overført til det virusholdige vannet og badet i 6 timer med oksygenering. Shedder-karene var utstyrt med pumper som overførte virusholdig vann (350 L/time) til kohabitant-karene. Det er valgt å benevne denne smittemetoden som en kohabitant smittemodell fordi smitte kunne skje via vann, slim og avføring. Siden forsøksfisken og shedderfisken ikke hadde mulighet til fysisk kontakt var dette likevel ikke helt identisk med en tradisjonell shedder-kohabitant smittemodell. Det ble ikke ansett som forsvarlig å la forsøksfisken og shedderfisken gå sammen på grunn av fare for predasjon. Videre omtales forsøksfisk eksponert for smitte med denne metoden som «kohabitant»-fisk, for å skille den fra den badsmittede fisken.

Det ble satt opp fire smitte-grupper og to kontrollgrupper (tabell 1 og figur 2). Hver smittegruppe ble satt opp med to duplikater, totalt 8 kar. I tillegg ble det satt opp to kar med kontrollfisk, ett for hver art. Kontrollgruppene ble ikke duplisert på grunn av begrenset tilgang på kar i laboratoriet. Det ble telt opp omtrent 220 yngel til hvert forsøkskar og resterende fisk ble brukt som kontrollfisk, faktisk antall er gitt i tabell 1. Shedder-karene inneholdt som nevnt 100 fisk.

Forsøket var godkjent av Mattilsynet (FOTS-søknad 15111)

Tabell 1: Oversikt over gruppene i forsøket, fiskeart, smittemetode, og antall fisk i gruppene.

Art	Smittemetode	Antall fisk
Ørret	Kohabitant	391
Laks	Kohabitant	430
Ørret	Bad	438
Laks	Bad	438
Ørret	Ingen (kontroll)	178
Laks	Ingen (kontroll)	1045



Figur 3: Forsøksoppsett og tidslinje. Oversikt over plan med hendelser før og under forsøket. I tillegg ble det tatt ut 32 fisk til histologi fra hver gruppe hvert prøveuttak så lenge det var fisk igjen i karet. Det eneste vesentlige avviket var at ørret-kontrollgruppen ble bestående av 178 fisk.

2.5 Vannprøver

To én L prøver av det virusholdige vannet som ble brukt til badsmitte ble tatt ut før yngelen ble tilsatt, og to én L prøver av inntaksvannet ble tatt ut da badsmitten ble gjennomført og testet for SAV3 ved qPCR. Prøvene ble filtrert gjennom Zeta Plus filtre (3M) (ca. 50 ml/min). Etter filtrering ble hvert filter lagt i en liten petriskål som inneholdt 1,2 mL L15 + 10% FCS. De ble satt på en «orbit shaker» og kjørt med 500 runder per minutt i 15 minutter ved romtemperatur. Væsken i skålene ble så samlet ved hjelp av en sprøyte og overført til et 1,5 mL rør gjennom et 0,22 µm filter (Millex). Deretter ble 100 µL av væsken blandet ut i 350 µL lysesbuffer. RNA fra vannprøvene ble manuelt isolert ved bruk av et RNeasy Mini kit (Qiagen). Isoleringen ble gjort ifølge Qiagen Quick-Start Protocol. Videre ble virusmengden i vannprøvene undersøkt med qPCR sammen med vevsprøvene fra én uke etter infeksjonsstart (uei). Resterende elueringsløsning ble brukt i virus titrering utført ved Vaxxinova.

2.6 Prøveuttak

Prøver av fisken ble tatt ved 0-, 1-, 2-, 3-, 4-, 6- og 8 uei (figur 3). Alle uttak ble gjort på torsdager utenom fire uei uttaket som ble gjort på en fredag. I tillegg til disse prøvene ble prøver av 30 shedderfisk tatt én uke før forsøksstart, like før injeksjon av shedderfisk. Det ble også tatt prøver av 8 shedderfisk én dag før forsøksstart. Ved 0 uei ble det tatt prøver både fra shedderfisk og yngel. Det ble tatt prøver til qPCR av blod, hjerte og milt fra shedderfisk for å verifisere at det var en pågående infeksjon av SAV3 i fisken og viremi. Før all prøvetaking ble fisken avlivet med en overdose benzokain (160 mg/L). All fisk som ble prøvetatt til qPCR ble målt (gaffellengde) og veid.

Med noen få unntak på ble det tatt ut 16 fisk for qPCR fra hvert kar hvert uttak (tabell 2). Antall prøver av kontrollfisk ble redusert til 8 fra og med uke tre til og med uke 6. Dette ble gjort for å forsikre at det var nok fisk i karet for hele forsøket.

Det var høy dødelighet i laks-kohabitant gruppen. Denne gruppen ble følgelig avsluttet i uke 6 på grunn av mangel på fisk og for å sikre et humant endepunkt for den resterende forsøksfisken. Det var også høy dødelighet i laks-bad gruppen. For å ha nok fisk i denne gruppen til et uttak i uke 8 ble 6 uei

Figur 4: Uttak til RT-qPCR. Den merkede biten ble brukt til videre qPCR analyse og inneholder hjerte, milt, pankreas og hodenyre. Bilde tatt under to uei uttaket



uttaket halvert. Noe av fisken i ørret-kohabitant gruppen gikk tapt på grunn av en oversvømmelse i ett av karene som følge av at fôr-rester hadde tettet avløpet. Det var derfor for få fisk igjen i dette karet ved 8 uei uttaket.

Uttak til qPCR ble gjort på en måte som sikret at prøven inneholdt hjerte og indre organer med pankreas og hodenyre (figur 4). Dette ble gjort ved at buken ble snittet opp, og organpakken trukket frem. Deretter ble bakre del av fisken kuttet bort. Hodet ble også fjernet ved at det ble kuttet fremover fra under gjellelokket på begge sider.

Prøvene ble overført til 5 ml rør (Sarstedt) som inneholdt 4 ml RNA-stabiliseringsbuffer og inkubert i minst 24 timer ved 4 °C. De ble deretter lagret ved -20 °C frem til RNA ekstraksjon.

Det ble tatt ut 16 fisk til histologi fra hvert kar hver prøveuttaksdag utenom i gruppen med kohabitant laks ved 8 uei uttaket da det var tomt for fisk i denne gruppen. Haledelene ble kuttet vekk med et snitt som gikk fra fremre del av ryggfinnen til et par millimeter fremfor gattet, og den resterende delen fiksert i 10 % bufret formalin. Delingen ble gjort både for å sikre god inntrenging av fiksativ og for å redusere vevsbitens størrelse. Alle tegn på sykdom eller andre abnormiteter som ble observert under prøvetaking ble notert.

Tabell 2: Antall prøver tatt ut til qPCR per uttak per kar. *avvikende prøvetall på grunn av feiltelling. (uei; uker etter infeksjonsstart)

	1 uei	2 uei	3 uei	4 uei	6 uei	8 uei
Kontroll laks G6 FK2	16	16	8	8	8	16
Kontroll ørret G5 FK1	16	13*	8	8	8	16
Laks kohabitant A4 G2	16	16	16	16	8	0
Laks kohabitant A6 G2	16	16	16	16	8	0
Ørret kohabitant A1 G1	16	16	16	16	16	5
Ørret kohabitant A3 G1	16	16	16	16	16	16
Laks bad A3 G4	16	16	16	16	8	8
Laks bad A4 G4	16	16	16	16	8	8
Ørret bad A1 G3	16	16	16	16	16	16
Ørret bad A2 G3	16	16	16	16	16	16

2.7 RNA isolering

Alle vevsprøver for qPCR ble inkubert i en RNA stabiliseringsbuffer (3,6 M ammoniumsulfat, 18 mM natriumsitrat, 15 mM EDTA (etylendiamintetraacetat) (pH 5,2), ved 4 °C i minst 24 timer (Herath et al., 2017). De ble deretter lagret ved -20 °C frem til RNA ekstraksjon. Oppskrift og fremgangsmåte for tillaging av RNA stabiliseringsbuffer er oppgitt i vedlegg 6.1.

Homogenisering

Prøvene ble manuelt overført fra rørene med RNA stabiliseringsbuffer til homogeniseringsrør (PreMax™-Plate x 96, 96 tubes 1,4 ml stainless steel balls, Nerliens), og tilsatt 600 µL homogeniseringsløsning (Promega). Homogeniseringen ble gjort i et FastPrep 96 instrument (Nerliens) med en hastighet på 16000 svingninger per minutt i 3 minutter. Homogenatet ble deretter sentrifugert ved 1000 G i 5 minutter ved 4°C og deretter lagret på -80°C.

RNA isolering av vevsprøver

Total RNA fra vevsprøvene ble isolert fra 200 µL homogenat. Alle prøvene ble isolert ved hjelp av et Maxwell HT simplyRNA kit (AX2420, Promega) på en Biomek 4000 Laboratory Automated Workstation i en 96 brønners brett (2.2 mL, square-well deep well plate 96, VWR). Reagenser ble manuelt fylt i sterile modulære Biomek reservoar brønner (Nerliens) på enten 19 mL eller 40 mL. Etter at maskinen var klargjort, ble RNA isoleringen gjort i henhold til produsentens standard protokoll og eluert i 70 µL nukleasefritt vann i et 96 brønners PCR brett (Axygen Scientific). RNA i prøvene ble deretter kvantifisert ved hjelp av en NanoDrop™-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Prøvene ble normalisert til 50 ng/µL ved hjelp av Biomek 4000 Laboratory Automated Workstation. Noen få prøver hadde lavere konsentrasjon enn 50 ng/µL, og disse prøvene ble brukt uforynnnet og individuelt vurdert ut fra resultatene fra referansegenet Elongeringsfaktor 1 alfa om de kunne tas med som resultat. Normalisert RNA ble fryst ned og lagret ved -80°C i påvente av viruskvantifisering.

2.8 Viruskvantifisering med kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR)

Påvisning og semikvantifisering av SAV3 ble gjort ved hjelp av qPCR. Delen av viruset som ble brukt for å kvantifisere SAV3 var en sekvens i genet som koder for nsp1 proteinet i viruset.

Elongeringsfaktor 1 alfa (ELA) ble brukt som referansegen. Probe og primere benyttet i de respektive assay er listet i tabell 5 (TaqMan). qPCR reaksjonen ble kjørt ved hjelp av et AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagent (Life Technologies) i henhold til produsentens anvisning. En terskellinje på 0,2 ble benyttet for analyse av alle resultater. Syklus-terskelnivå (cycle threshold, Ct) verdiene ble brukt som et mål på virusmengde i prøvene (Løvoll et al., 2012).

qPCR-reaksjonsmiksen ble laget med et AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Life Technologies). Det ble brukt 6 µL reaksjonsmiks og 4 µL normalisert RNA per brønn i en total på 10 µL per prøve. Volum av reagenser per brønn og amplifiseringsbetingelser for qPCR reaksjonen er gitt i tabell 3 og 4.

Reaksjonsmiksen og RNA ble pipettert på et MicroAmp Optical 384-brønners brett (Life Technologies) ved hjelp av en Biomek 4000 Laboratory Automated Workstation. Brettet ble manuelt

forseglet med en MicroAmp Optikal adhesive film (Thermofisher), og kjørt i et QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermofisher) i henhold til produsentens anvisning.

Hver brett inneholdt 8 ikke-templat kontroller (NTC) for å kunne oppdage eventuell kontaminering av prøvene, og som positiv kontroll ble det benyttet et syntetisk fremstilt nsP1 RNA.

Tabell 3: Oppskrift for tillaging av 10 µL qPCR reaksjonsmiks (Life Tech).

Reagenser	Volum per prøve (µl)
qPCR buffer	5
Nuklease-fritt vann	0,28
Forward primer	0,08
Reverse primer	0,08
TaqMan probe	0,16
Enzym-mix	0,4
RNA	4
Total	10

Tabell 4: amplifiseringsbetingelser for qPCR program

	UNG* (cDNA syntese)	Aktivering	qPCR		
			Denaturering	Anneal/Extend	
Temp	45°C	95°C	95°C	60°C	RT
Tid	10 min	10 min	15 sek	45 sec	∞
sykler	1	1	40		1

*Uracil-N-Glycosylase

Tabell 5: Sekvenser for prober og primere i assays brukt til kvantifisering av SAV3, nsp1 og *Salmo spp.*, Elongeringsfaktor 1 alfa (TaqMan).

Navn	Sekvens (5'-3')	Referanse
nsP1 Forward	CCG GCC CTG AAC CAG TT	Hodneland and Endresen (2006)
nsP1 Reverse	GTA GCC AAG TGG GAG AAA GCT	
nsP1 Probe	6FAM-TCG AAG TGG TGG CCA G-MGBNFQ	Andersen et al. (2007)
ELA Forward	CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA	Olsvik et al. (2005)
ELA Reverse	CAC ACG GCC CAC AGG TAC A	
ELA Probe	6FAM-ATC GGT GGT ATT GGA AC -MGBNFQ	Moore et al. (2005)

2.9 Histologi

Histologisk sammenligning ble gjort på prøver fra 6 uei. Det ble opparbeidet snitt fra 16 kohabitant-ørret, 8 kohabitant-laks og 5 fisk fra hver av kontrollgruppene. Prøveantallet ble valgt ut fra prevalensen observert i qPCR gruppene.

Etter fiksering i formalin ble prøvene dehydrert og infiltrert med parafin med en Leika vevsprosessor (TP1020; histokinette). I denne prosessen ble det formalinfikserte vevet overført til kassetter (WLAS-1060), plassert i histokinetten, og prosessert automatisk ifølge en standard protokoll. Rekkefølge, innhold og funksjon av badene i histokinetten er gitt i vedlegg 6.2, tabell 7.

Etter parafininfiltrering ble prøvene manuelt støpt i parafinblokker. Snitting ble gjort med en Microm HM 3555 (Thermo Scientific) mikrotom. Parafinblokkene med vevsprøver ble først grovsnittet (20 μm) for å komme frem til de relevante delene av prøven. Da det var mulig å se hjertet og tarm i parafinblokken ble det gjort finere snitt (3 μm) som ble undersøkt i et mikroskop (DMRBE, Leica). Snitt som inneholdt gode seksjoner av ventrikkel, pankreas eller skjelettmuskulatur ble beholdt og brukt videre til farging og screening. Det ble tatt ut fire snitt av hvert organ i hver fisk for å kunne gi en mer nøyaktig scoring av patologien.

En standard protokoll ved Havforskningsinstituttet ble fulgt under farging. For å sikre at snittene satt godt fast på objektivglasset ble de varmet opp i et varmeskap (58 °C) i 30 minutter før farging. Fargingen ble gjort med standard Hematoxylin Erytrosin Saffran (HES).

Hematoxylin gir en blå farge og farger de basofile delene av cellene, slik som cellekjernen. Erytrosin gir en rød farge, og farger de eosinofile delene av cellene som for eksempel cytoplasma. Saffran gir en gul farge og har en høy affinitet til bindevev. Varighet og innhold av badene som ble brukt til farging er gitt i vedlegg 6.2, tabell 9.

Etter farging ble objektivglassene dekket med et dekkglass som ble forseglet med Histokitt lim (Assistent). Videre ble de tørket i et avtrekkskap ved romtemperatur i tre dager før de ble screenet i et mikroskop (DMRBE, Leica).

Histologiskåring ble gjort på ventrikkelen, pankreas og skjelettmuskulatur. Det ble gitt en skår til hvert av disse vevene i hver fisk ved mikroskopi. Skåren var et tall mellom 0 og 3 etter skåringskjema gitt i tabell 6 (McLoughlin et al., 2006). En skår på 0 indikerer ingen synlige patologiske forandringer, mens en skår på 3 indikerer alvorlig patologi. Skåren ble gitt ut fra en samlet vurdering av alle snittene med samme vev fra samme fisk.

Tabell 6: Skåringskjema brukt for kvantifisering av histopatologi i hjerte, eksokrin pankreas og skjelettmuskulatur. Basert på skjemaet til McLoughlin et al. (2006), men modifisert.

	Skår	Beskrivelse
Hjerte	0	Normal myokard
	1	Fokal degenerasjon i myokarden
	2	Multifokal degenerasjon i myokarden
	3	Utbredt diffus degenerasjon i myokarden
Pankreas	0	Normal eksokrin pankreas
	1	Fokale nekroser i eksokrin pankreas
	2	Multifokale nekroser eller atrofi av eksokrin pankreas, noen gjenværende normale celler
	3	Totalt fravær av normale eksokrine pankreasceller
Hvit skjelettmuskulatur	0	Normal hvit skjelettmuskulatur
	1	Fokal degenerasjon av muskelceller
	2	Multifokal degenerasjon av muskelceller
	3	Utbredt diffus degenerasjon av muskelceller

2.10 Statistiske analyser

Verdier for Ct og histologiskår er som regel ikke normalfordelt, og variansen her var høy og ulik. Det ble derfor brukt ikke-parametriske statistiske metoder. Binomiale data (prevalens) ble testet med kontingensanalyser (KA, multiple prøver) eller Fishers Exact test (FET, to prøver, og post-hoc testing i etterkant av KA). Hypotesen (H_0) var som regel «ingen forskjell i prevalens» og derfor toveis, men i noen tilfeller var hypotesen for eksempel en økning fra tid x til tid y og testene følgelig enveis.

Mengden virus i fiskene ble tilnærmet ved bruk av Ct-verdier som virustetthetsestimater. Rank-baserte ikke-parametriske statistiske tester ble brukt for å sammenligne virustettheter; Mann-Whitney U-test (MW) for sammenligning av to grupper, og Kruskal-Wallis test (KW) til tre eller flere. Test statistikkene var da U og $K_{\text{frihetsgrader}} (K_{df})$ respektivt.

Statistikk på vektdata ble gjort med KW test etterfulgt av Dunns post-hoc test. For 0 uei, og 8 uei for laks, ble det brukt en tosidig t-test. K-faktoren ble regnet ut med følgende formel: $100 \times \text{vekt(g)} / \text{gaffellengde(cm)}^3$.

Før analyse ble datasettet kvalitetssikret. Resultater fra qPCR ble vurdert ut fra kurver og forventet Ct-verdier på ELA. Individuer med ELA Ct > 30 ble ikke inkludert i videre analyser.

Noen få vekt og lengde punkter var svært avvikende, sannsynligvis som følge av skrivefeil under uttak. Mulige uteliggere ble identifisert ved hjelp av ROUT-metoden i GraphPad Prism (versjon 8.0), og tatt ut av datasettet. Totalt ble det tatt bort henholdsvis 2, 0 og 20 uteliggere for vekt, gaffellengde og Fultons Kondisjonsfaktor (K-faktor).

Statistikk og visualisering ble gjort i Excel (Microsoft), og i GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software).

3.0 Resultater

3.1 Uttak før forsøksstart

Prøvene som ble tatt av forsøksfisken og parren før forsøksstart var alle negative for SAV, IPN, PMCV og PRV. Alle prøver som ble tatt av shedderfisken ved forsøksstart var positive for SAV3 med Ct-verdier mellom 25,0 og 14,4 (tabell 7).

Tabell 7: Ct-verdier i shedderfisk én uke etter IP-injeksjon av 50 µl SAV3 (10^3 TCID₅₀)

Fisk #	Ct-verdi		
	Blod	Hjerte	Milt
1	15,4	18,8	19,4
2	16,0	18,8	18,1
3	21,6	25,0	22,4
4	21,4	20,9	21,9
5	16,5	20,0	18,6
6	16,9	20,1	20,1
7	14,4	17,3	16,6
8	20,5	21,7	23,1

3.2 Virus i vannprøver

Det kunne ikke detekteres SAV i noen av prøvene fra inntaksvannet. Begge prøvene av vann som ble brukt til badsmitte var positive for SAV3 (Ct; 36,6 og 37,6). Titrering på cellekultur ga et usikkert resultat, men indikerte 10 TCID₅₀ per liter vann.

3.3 Makroskopiske sykdomstegn

Alle lesjoner som ble observert under uttak ble notert. Ved to uei uttaket var det to laks- kohabitant fisk som hadde blødninger i buken, en av disse hadde også ascites. I laks-bad gruppen var det en fisk som hadde blødninger i buken. I ørret- bad gruppen var det en fisk med blødning i ett øye og en fisk med blek lever. Ved 6 uei uttaket var det én fisk fra laks- bad gruppen som hadde eksoftalmus og ascites. Utenom dette var all fisk uten synlige lyter.

3.4 Vekt, lengde og kondisjonsfaktor etter 6 og 8 uker

Kondisjonsfaktor

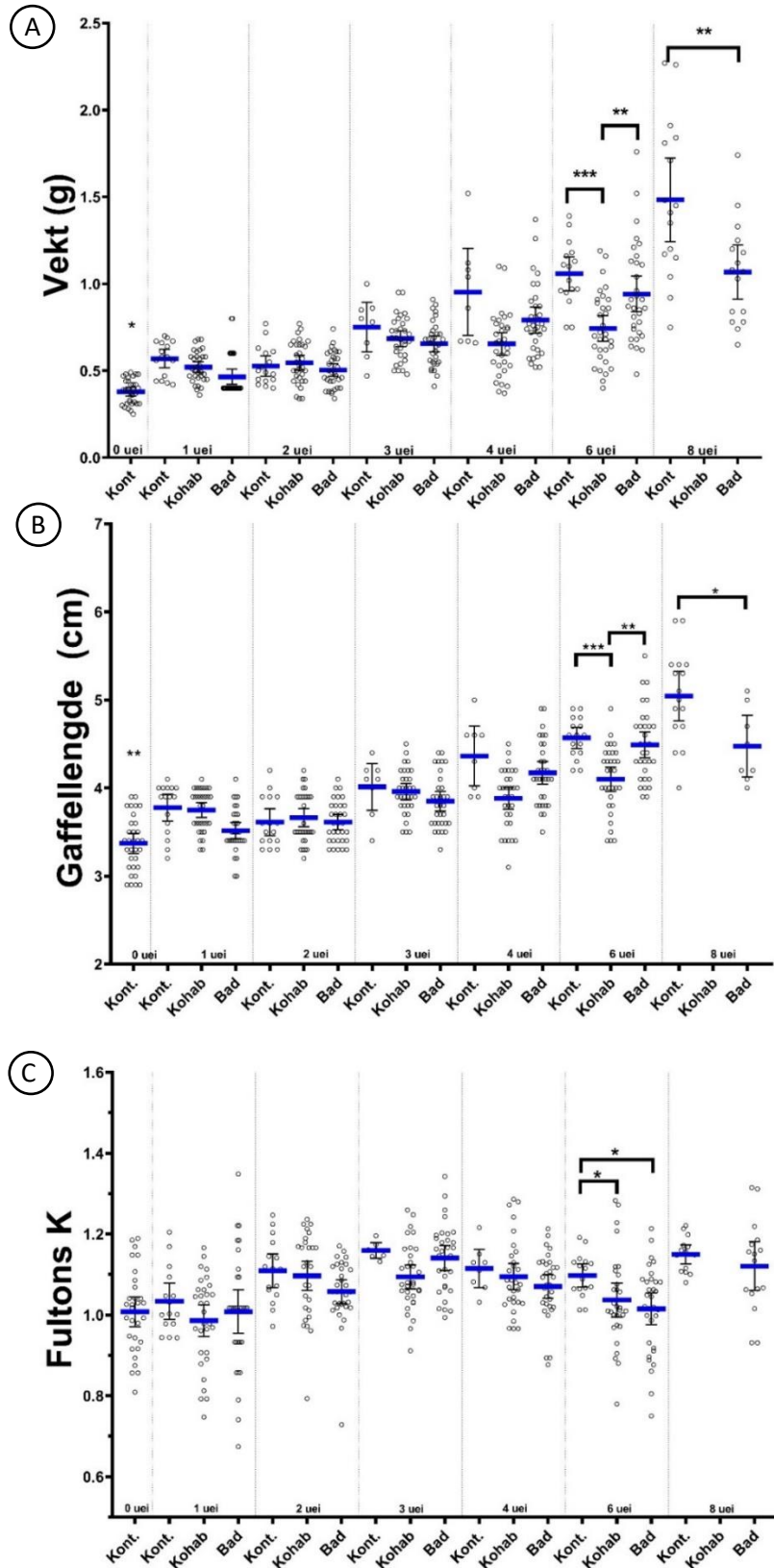
Kondisjonsfaktor for alle uttak er vist i figur 5C og 6C. Da det vil ta tid før en infeksjon kan ha påviselig effekt på vekst og kondisjon, ble dette testet for uke 6 og 8 etter infeksjon. Kondisjonsfaktoren til kontrollgruppen var signifikant høyere enn i smittegruppene ved 6 uei (KW; $p < 0,05$). Det var ikke en signifikant forskjell i kondisjonsfaktor mellom kontroll- og badgruppen ved 8 uei.

Vekt – laks

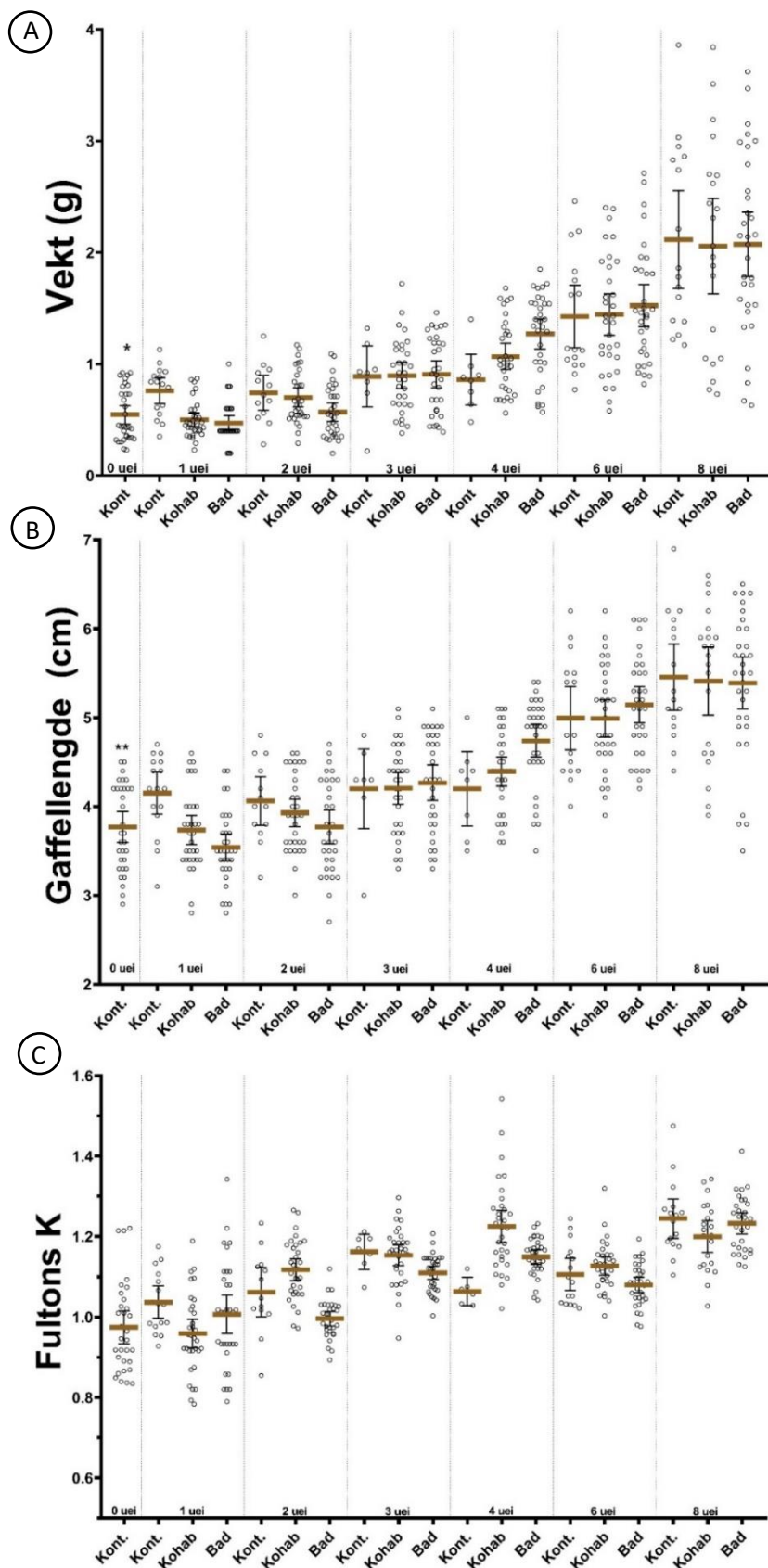
Vektutviklingen for laks er vist i figur 5A. Ved oppstart av forsøket var laksens gjennomsnittsvikt 0,38 ($\pm 0,08$) g som var signifikant lavere enn ørreten (0,54 ($\pm 0,23$) g) (KW; $p < 0,05$). Snittvekten økte i alle gruppene gjennom forsøket (figur 5A). Den badbehandlede gruppen hadde en snittvekt på 1,07 ($\pm 0,29$) g og kontrollfisken hadde snittvekt på 1,86 ($\pm 1,08$) g ved forsøkets slutt. Kohabitantgruppen ble avsluttet ved 6 uei, og da var snittvekten 0,82 ($\pm 0,18$) g. Vekten i badgruppen var noe lavere enn i kontrollgruppen mot slutten av forsøket. Vekten i kohabitantgruppen var tydelig lavere ved 6 uei uttaket.

Vekt – ørret

Vektutviklingen for ørret er vist i figur 6A. Ved oppstart av forsøket var gjennomsnittsvekten til ørret yngelen 0,54 ($\pm 0,23$) g. Den badbehandlede gruppen hadde en snittvekt på 2,50 ($\pm 0,69$) g, kohabitantgruppen hadde en snittvekt på 2,23 ($\pm 1,00$) g og kontrollgruppen hadde en snittvekt på 2,11 ($\pm 0,80$) ved forsøkets slutt. Alle de tre gruppene hadde en jevn vekst gjennom hele forsøket og det var ikke forskjell i vekt mellom gruppene 8 uker etter infeksjon (KW; $p < 0,05$).



Figur 5: Utvikling av vekt (A), lengde (B) og k-faktor (C) i laksegruppene gjennom 8 uker. «Kohabitant» gruppen ble avsluttet ved 6 uei og mangler derfor ved 8 uei. Gjennomsnitt med 95 % konfidensintervall (KI) er markert. Stjerner over 0 uei uttaket representerer forskjeller mellom laks og ørret. Stjerner over andre uttak representerer forskjeller mellom gruppene. (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$)



Figur 6: Utvikling av vekt (A), lengde (B) og k-faktor (C) i ørretgruppene gjennom 8 uker. Gjennomsnitt (\pm 95 % KI) er markert. Stjerner over 0 uei uttaket representerer forskjeller mellom laks og ørret. (*= $p < 0.05$)

3.5 qPCR

Både bad- og kohabitantsmitte førte til SAV3-infeksjon av laks- og ørretyngelen. Alle tester av kontrollfisk både før og under forsøket var negative for SAV3.

3.5.1 SAV3 smitte-dynamikk i den badeksponerte gruppen med laks

Prevalensen varierte signifikant gjennom forsøket ($\chi^2_{(5df)} = 38,7$, $p < 0,001$), med en gradvis økning i prøveprevalens fra 6 % ved én uei til 100 % ved 6 uei (FET, $p < 0,001$) (figur 7A). Prevalensen endret seg ikke signifikant fra 6 - til 8 uei.

I den badsmittede gruppen med laks var det en signifikant variasjon i Ct mellom uttakene (KW; $p < 0,001$). Virusmengde (målt som Ct-verdi) i prøvene fra én uei uttaket var signifikant lavere enn i prøvene fra fire uei (Post-Hoc; 1-4 uei, $p < 0,01$) og 6 uei (Post-Hoc; 1-6 uei, $p < 0,001$). Fisk fra to uei uttaket hadde en signifikant lavere virusmengde enn fisk fra 6 uei uttaket (Post-Hoc; 2-6 uei, $p < 0,01$). En tilsynelatende nedgang i virusmengde fra 6 - til 8 uei var ikke signifikant (figur 7B-C).

3.5.2 SAV3 smitte-dynamikk i kohabitantgruppen med laks

Prevalensen i kohabitantgruppen med laks varierte også signifikant gjennom forsøket ($\chi^2_{(4df)} = 35,6$, $p < 0,001$) og artet seg som en økning i prevalens fra 19 % i uke én til 81 % i uke 2 (FET; $p < 0,001$). Dette ble fulgt av en nedgang til 44 % i uke tre (FET; $p < 0,05$) og en ny økning til 100 % i uke fire (FET; $p < 0,001$). Det var en nedgang i prevalens i uke 6 (94 %), men denne var ikke signifikant forskjellig fra prevalensen i uke fire.

Det var en signifikant variasjon i virusmengde (målt som Ct) i prøvene mellom uttakene i kohabitantgruppen (KW; $p < 0,001$). Som prevalensen, viste variasjonen seg som en økning fra én uei til to uei ($P < 0,001$), fulgt av en nedgang til tre uei ($P = 0,02$) og en økning igjen i prøvene fra fire uei ($P < 0,01$) (figur 8A-B). Samme mønsteret kunne sees i Ct-verdier fra kun de infiserte fiskene (figur 8C)

3.5.3 SAV3 smitte-dynamikk i den badeksponerte gruppen med ørret

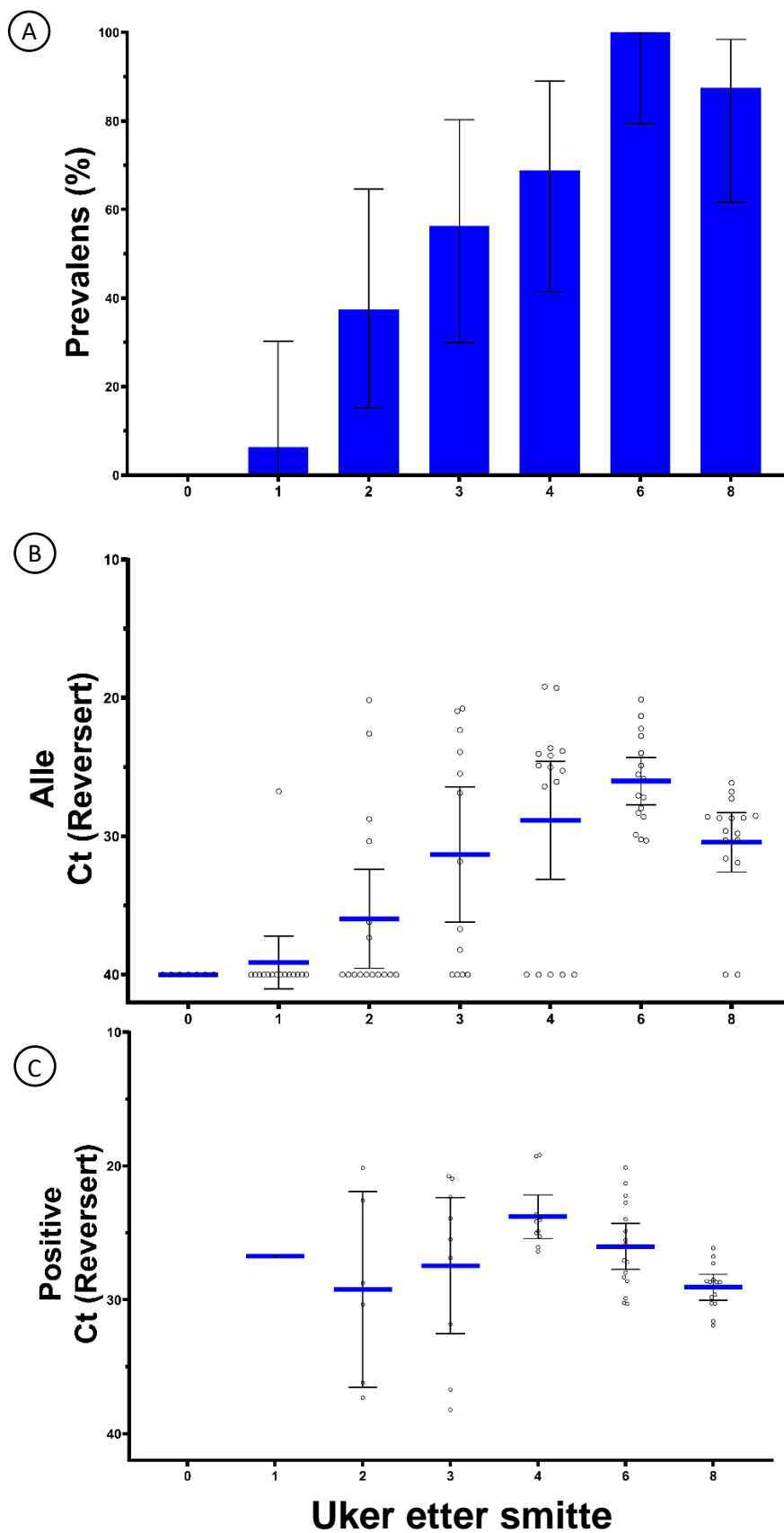
Det var ingen variasjon i prevalensen i den badsmittede ørretgruppen gjennom forsøket ($P > 0,05$). Det var heller ingen signifikant variasjon i virusmengde i denne gruppen gjennom forsøket. (KW; $p > 0,05$) (figur 9).

3.5.4 SAV3 smitte-dynamikk i kohabitantgruppen med ørret

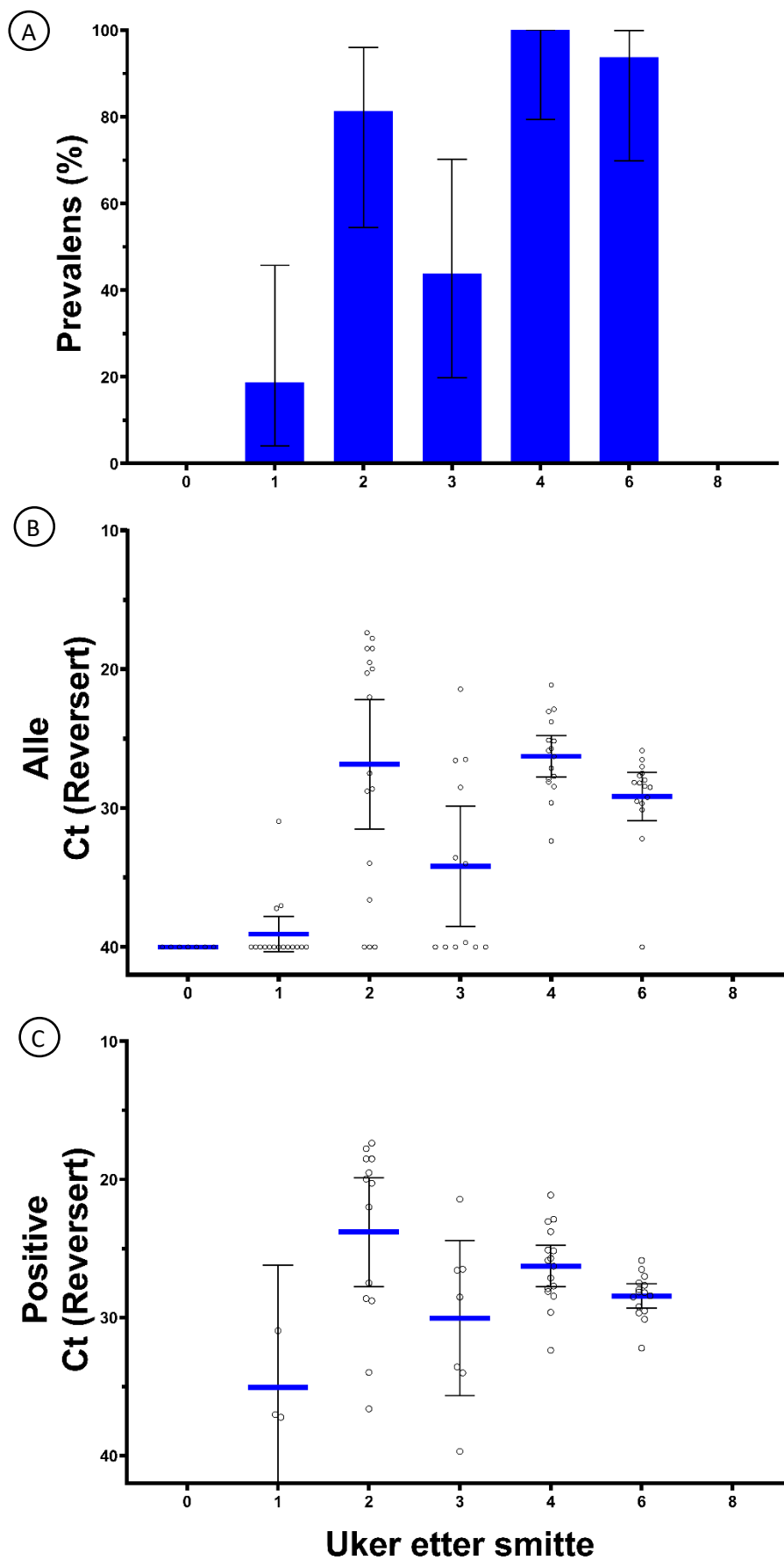
Prevalens varierte signifikant 1-6 uei ($\chi^2_{(5df)} = 11,8$ $p = 0,04$). Etter å ha økt fra 19 % i uke én til 50 % i uke 2 ble det observert en signifikant nedgang til 6 % i uke tre ($p < 0,05$). Deretter økte prevalensen, med signifikant økning til 50 % i uke 6 ($p < 0,05$) (figur 10A).

Anne Moberg Vossgård 2018

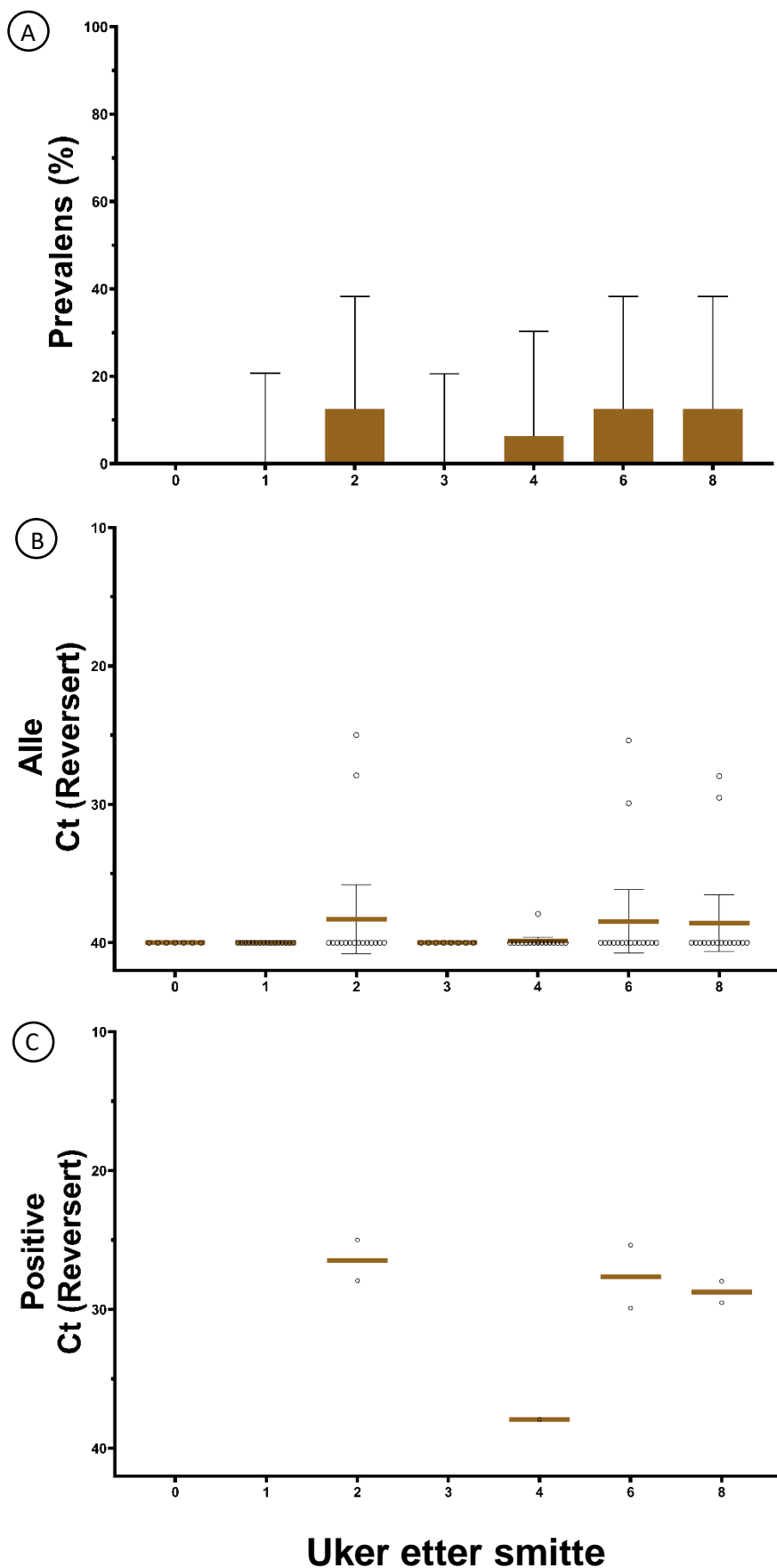
Virusmengde (målt som Ct) varierte også signifikant (KW, $p < 0,05$), med et lignende mønster som prevalensen. Igjen var det en nedgang fra uke to til tre ($p < 0,05$), før den økte igjen til uke 6 ($p < 0,05$)



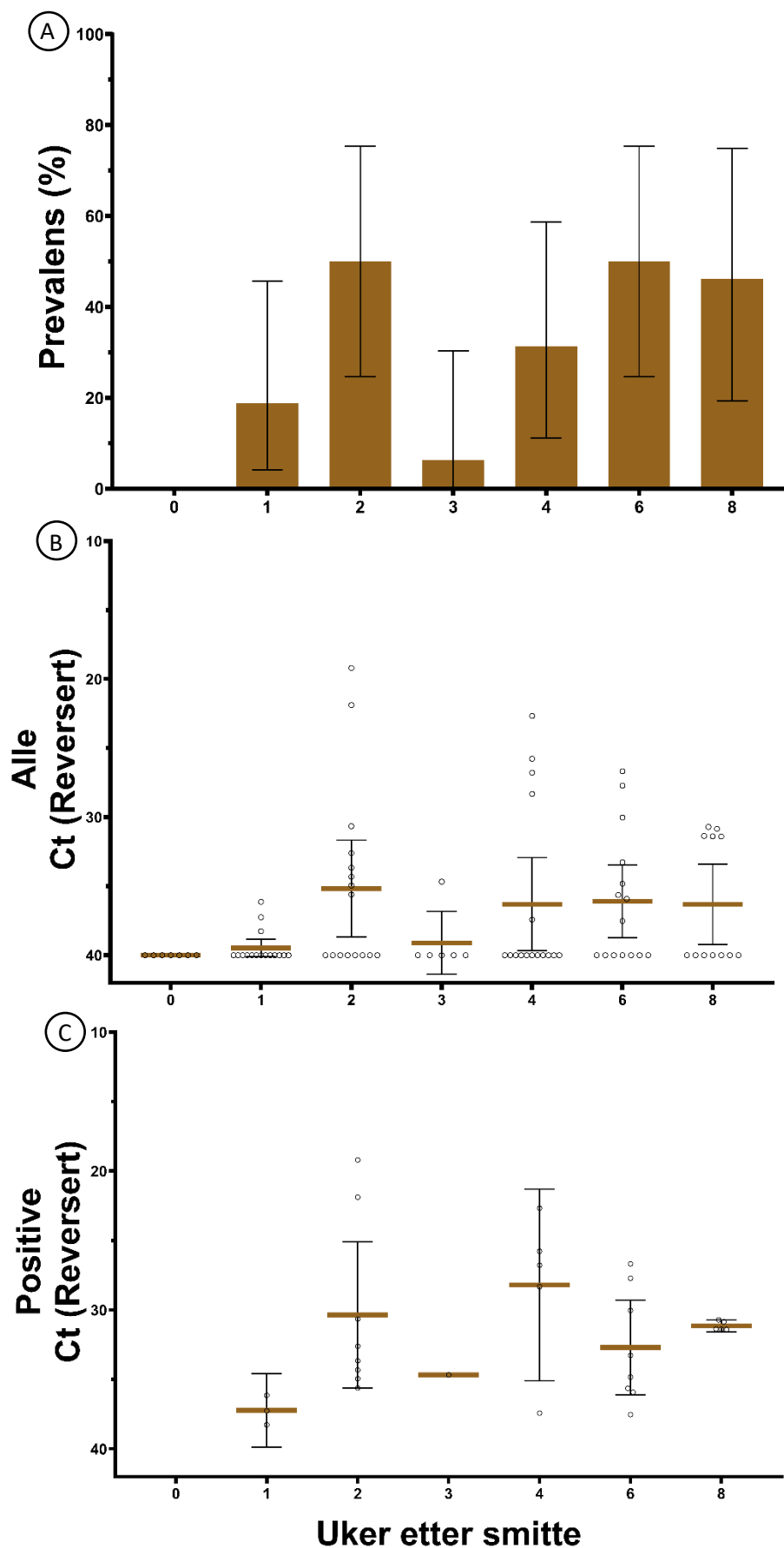
Figur 7: Prevalens (A) ($\pm 95\%$ KI) og Ct (B-C) hos den badesmittede laksen. B viser gjennomsnittlig Ct i all prøvetatt fisk ($\pm 95\%$ KI) og C viser gjennomsnittlig Ct i den positive fisken ($\pm 95\%$ KI).



Figur 8: Prevalens (A) ($\pm 95\%$ KI) og Ct (B-C) hos «kohabitant»-laksen. B viser gjennomsnittlig Ct i all prøvetatt fisk ($\pm 95\%$ KI) og C viser gjennomsnittlig Ct i den positive fisken ($\pm 95\%$ KI).



Figur 9: Prevalens (A) ($\pm 95\%$ KI) og Ct (B-C) hos badsmittet ørret. B viser gjennomsnittlig Ct i all prøvetatt fisk ($\pm 95\%$ KI) og C viser gjennomsnittlig Ct i den positive fisken ($\pm 95\%$ KI).



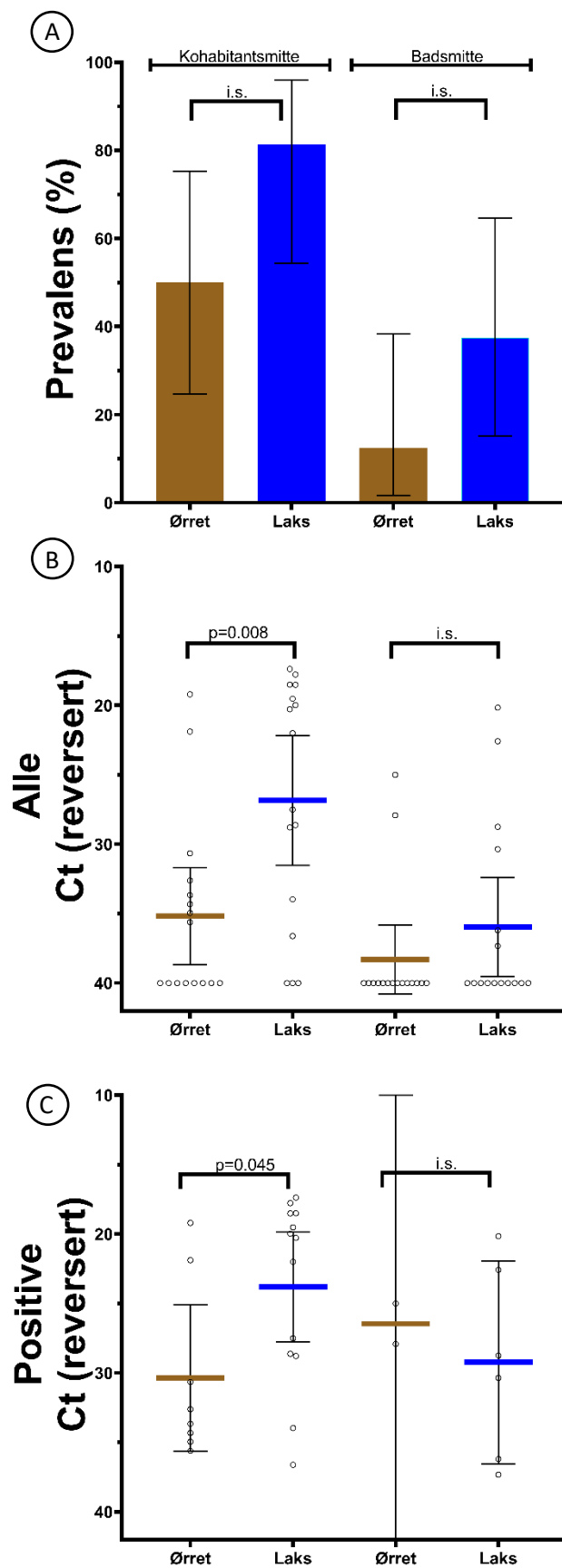
Figur 10: Prevalens (A) ($\pm 95\%$ KI) og Ct (B-C) hos «kohabitant»-ørret. B viser gjennomsnittlig Ct i all prøvetatt fisk ($\pm 95\%$ KI) og C viser gjennomsnittlig Ct i den positive fisken ($\pm 95\%$ KI).

3.6 Forskjeller i mottagelighet mellom laks og ørret

Uke én uttakene var uegnede for sammenligning fordi svært få fisk var infisert. Prevalens og virusmengde ble sammenlignet mellom artene to uer (figur 11).

I de kohabitantsmittede gruppene var det ingen signifikant forskjell i prevalens (50 % mot 81 %; FET=0,14), men virusmengden var klart høyere (Ct lavere) hos laks (MW, U =60, P<0,01). De laveste Ct-verdiene hos ørret totalt sett ble observert uke to i kohabitantgruppen, da to individer hadde Ct 17,4 og 20,2. I tilsvarende uttak på laks var Ct nede i 15,6.

I dette uttaket var det ikke signifikant forskjell i prevalens i de badesmittede gruppene (38 % og 13 % for laks og ørret respektivt; FET; p=0,22). Det var heller ikke signifikant forskjell i Ct mellom disse gruppene (MW, U =98, P=0,27).



Figur 11; Sammenligning av uttaksprevalens (A) ($\pm 95\%$ KI) og Ct i laks- og ørretgrupper to uker etter infeksjonsstart. B viser gjennomsnittlig Ct i all prøvetatt fisk ($\pm 95\%$ KI) og C viser gjennomsnittlig Ct i den positive fisken ($\pm 95\%$ KI).

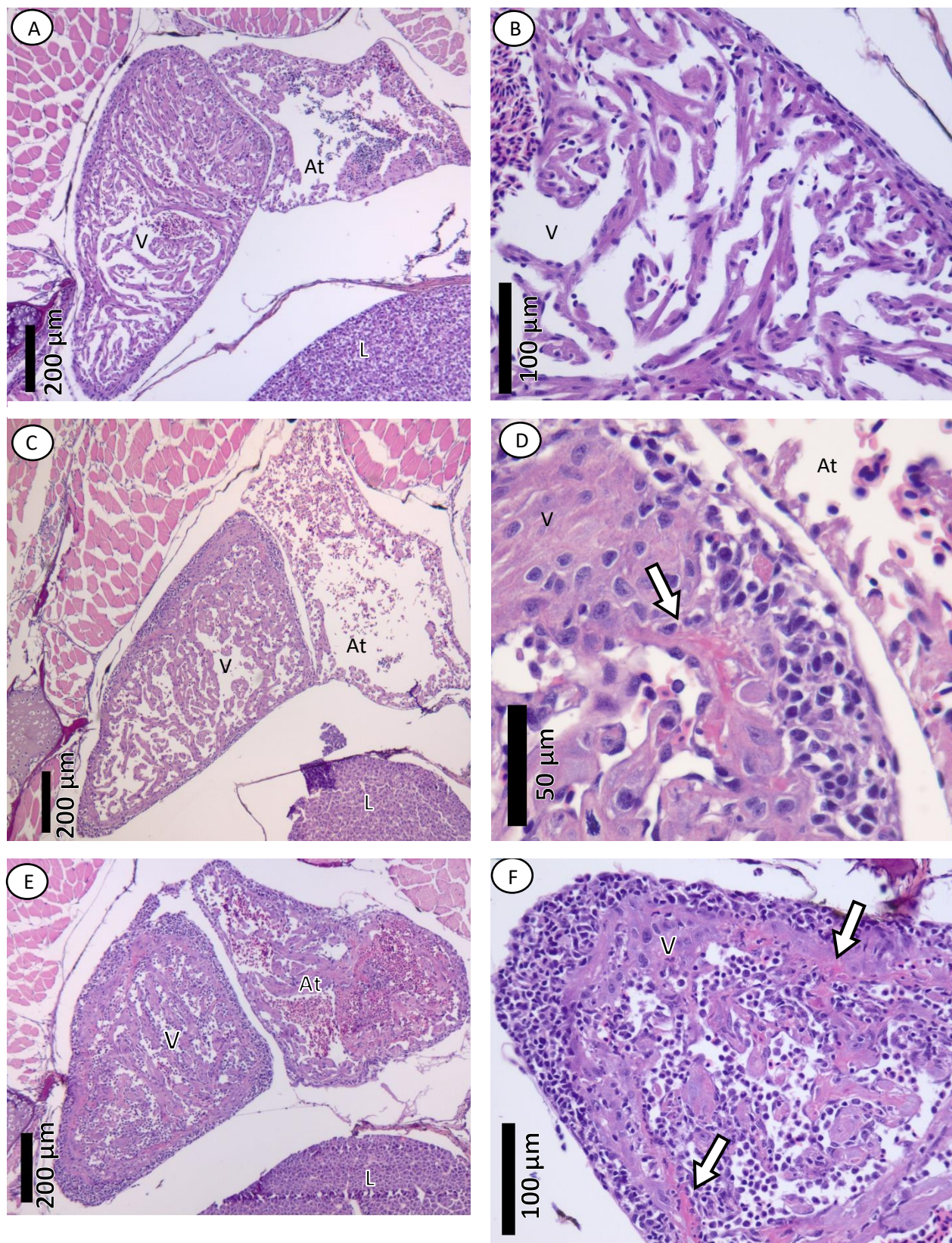
3.7 Histologi av kohabitanter og kontrollfisk 6 uei

Hver undersøkte fisk fikk én skår mellom 0 og 3 for patologiske forandringer i hver av vevene; ventrikkel, eksokrin pankreas og hvit skjelettmuskulatur. Alle skårene er oppgitt i figur 18 og vedlegg 6.2, tabell 10.

3.7.1 Histopatologiske funn i hjertet av kohabitant laks

Det ble ikke funnet patologi i noen av hjertene i kontrollfisken. Epikardlaget i ventrikkelen var tynt, og bestod kun av noen få cellelag. Hjertemuskulaturen i trabeklene var normale. (13A-B)

Det ble funnet patologi i ventriklene til alle undersøkte kohabitant-laks og den høyeste skåren som ble gitt var 3. Samtlige fisk hadde degenerasjon i trabeklene og det ble funnet en koagel i ett av atriene. Den samme fisken hadde infiltrasjon av betennelsesceller og hyperplasi i epikardet (figur 12D).

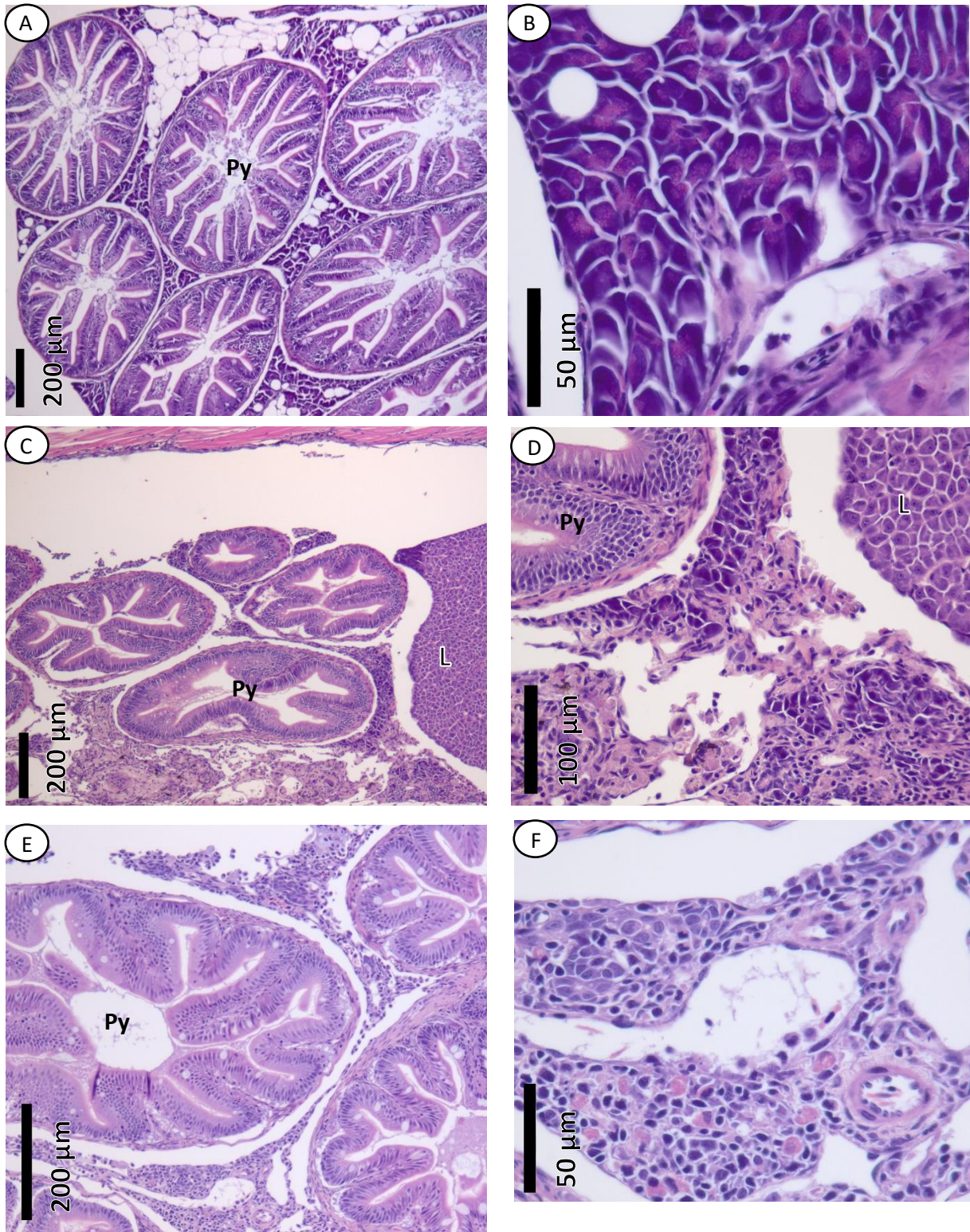


Figur 12: Histologi av hjerter hos kontroll-laks (A-B) og «kohabitant» laks (C-F) 6 uker etter forsøksstart. A og B viser normalt atrium (At) og ventrikkel (V) med et tynt epikard bestående av få cellelag og normal spongiosum. C og D viser normalt atrium men ventrikkel med multifokal eosinofil degenerasjon (pil) (skår 2). E og F viser et atrium med blodkoagel og en ventrikkel med fortykket epikard med epikarditt, og spongiosum med invasjon av lymfocytter og utbredt diffus eosinofil degenerasjon (piler). (L; lever)

3.7.2 Histopatologiske funn i pankreas av kohabitant laks

Det var varierende mengder fettceller mellom pylorusblindsekkene i kontrollfiskene. De eksokrine cellene hadde tydelige acinære korn og en distinkt avgrensning. Det ble ikke registrert forandringer i pankreas hos noen av kontrollfiskene (figur 13A-B).

Alle undersøkte kohabitant-laks hadde forandringer i pankreas og to av fiskene fikk skår 3. I disse prøvene var det få eller ingen normale acinære celler igjen (figur 134E-F). I fravær av normalt pankreasvev forekom nekrotiske celler og bindevevsnedslag. De Langerhanske øyer i kohabitant-fisken virket normale.

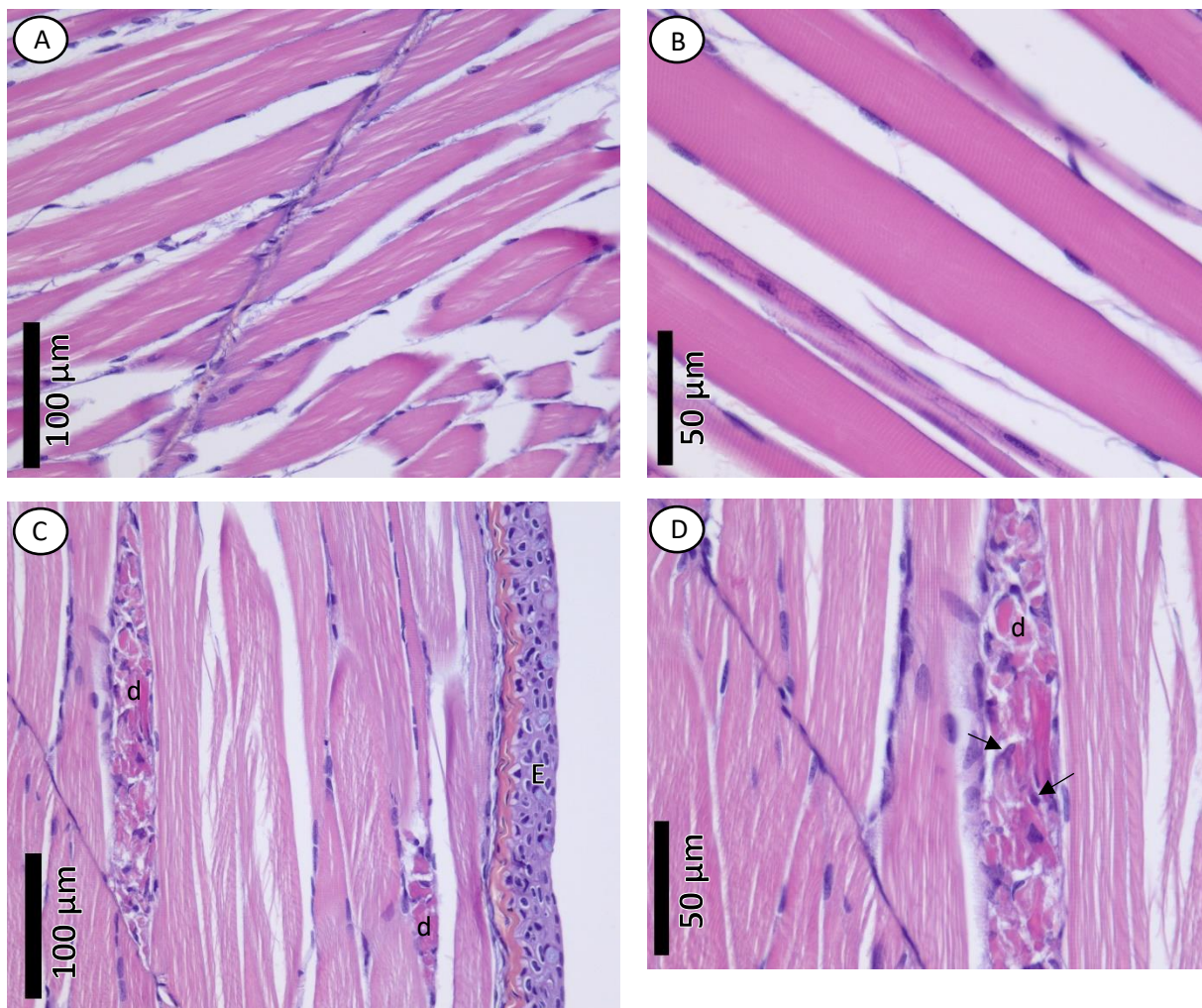


Figur 13: Pankreas hos kontrollfisk (A-B) og «kohabitant» av laks (C-F) 6 uker etter infeksjonsstart. A og B viser normale eksokrine pankreasceller og fettceller mellom pylorusblindsekkene (Py). C og D viser moderat diffus degenerasjon og nekrose av eksokrin pankreas med noen gjenværende tilsynelatende normale celler (skår 2). E-F viser atrofi av eksokrin pankreas (skår 3).

3.7.3 Histopatologiske funn i skjelettmuskulatur hos kohabitant laks

Kontrollfisken hadde normal skjelettmuskulatur, med tydelig tverrstriping av muskulaturen i alle prøvene (figur 14A-B).

Det ble funnet degenerasjon i skjelettmuskulaturen til kohabitant-laks hos alle utenom én fisk. Andelen muskelfibre med forandringer varierte mye i denne gruppen. Forandringene som ble funnet var degenererte hvite muskelfibre (figur 14C-D) med infiltrasjon av betennelsesceller omgitt av normal muskulatur. På grunn av måten prøvene ble snittet på var det ikke mulig å gjøre en grundig undersøkelse av rød skjelettmuskulatur i alle prøvene. Det ble ikke observert patologi i den røde muskulaturen i de prøvene hvor denne muskulaturen var synlig. Den gjennomsnittlige skåren i denne gruppen var 1.

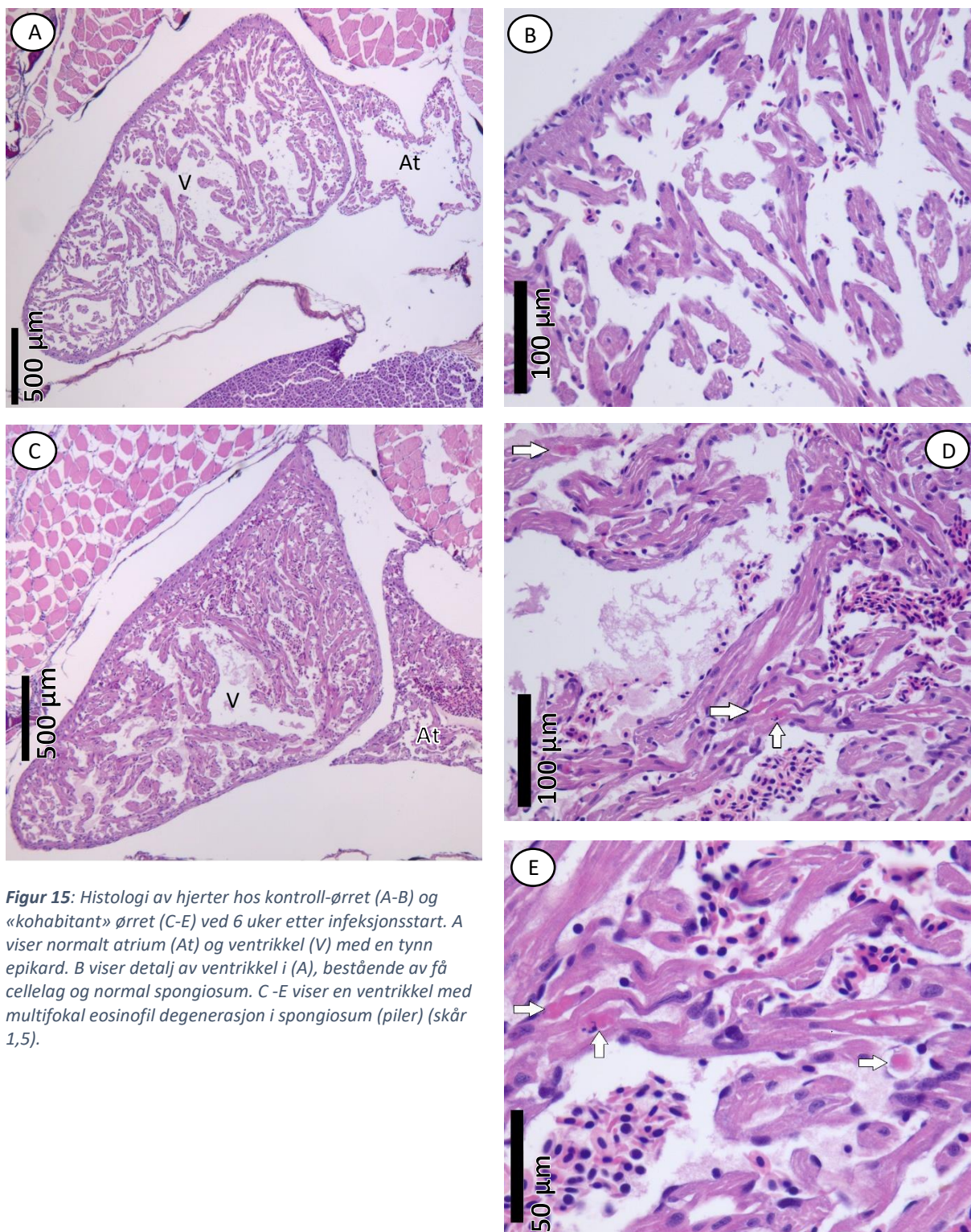


Figur 14: Hvit skjelettmuskulatur hos kontrollfisk (A-B) og «kohabitant» (C-D) laks ved 6 uker etter infeksjonsstart. A og B viser normale muskelfibre med perifer kjerner og synlig tverrstriping. C og D viser degenerering av to muskelfibre (d) med fragmentert og eosinofilt sarcoplasma og invasjon av betennelsesceller (piler). (E; epidermis)

3.7.4 Histopatologiske funn i hjertet hos kohabitant ørret

Det ble ikke observert patologi i hjertene til kontrollfisken. Ventrikkelen hadde naturlig et tynt epikardlag som kun bestod av noen få cellelag og hjertemuskulaturen i trabeklene var normale (figur 16A-B).

I noen av hjerteprøvene fra kohabitant-fisken ble det observert små lesjoner med eosinofil degenerasjon av hjertemuskulaturen i ventrikkelen (figur 15D). Det ble ikke funnet koageler eller unormale mengder betennelsesceller i noen av hjertene. Det ble observert patologi i ventrikkelen til fire av 16 kohabitant ørret og den høyeste skåren som ble gitt var 1,5.

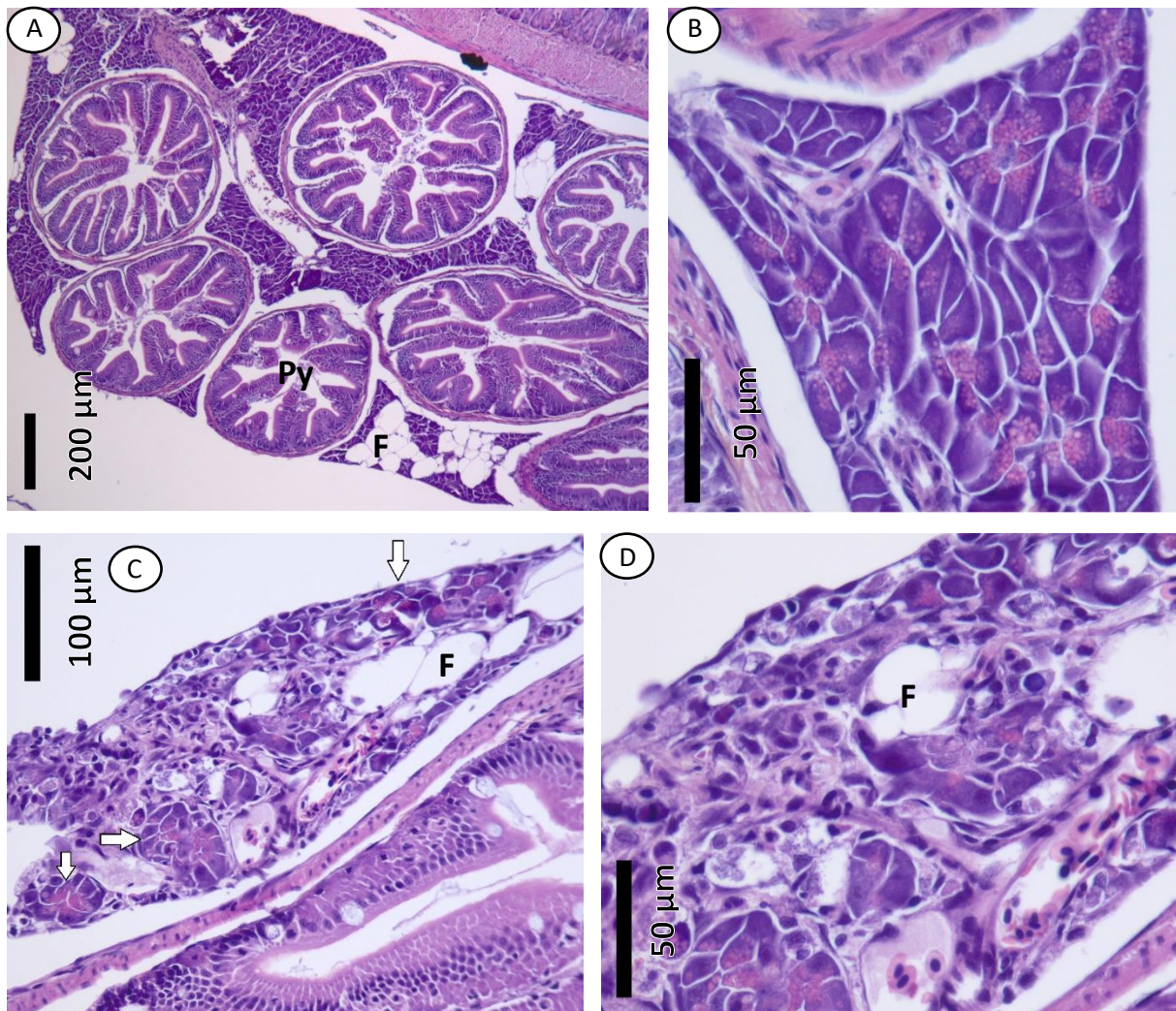


Figur 15: Histologi av hjerter hos kontroll-ørret (A-B) og «kohabitant» ørret (C-E) ved 6 uker etter infeksjonsstart. A viser normalt atrium (At) og ventrikkel (V) med en tynn epikard. B viser detalj av ventrikkel i (A), bestående av få celledag og normal spongiosum. C-E viser en ventrikkel med multifokal eosinofil degenerasjon i spongiosum (piler) (skår 1,5).

3.7.5 Histopatologiske funn i pankreas hos kohabitant ørret

Kontrollfisken hadde gjennomgående normalt pankreas-vev med varierende mengder fettceller. Cellene hadde tydelige acinære korn og en distinkt avgrensning (figur 16A-B).

Hos kohabitant-fisken var det tydelig tap av eksokrin pankreas med atrofi av acinære celler hos fire av 16 fisk og den høyeste skåren som ble gitt var 2. Hos fiskene med mest patologi var det få gjenværende acinære celler (figur 16C-D).

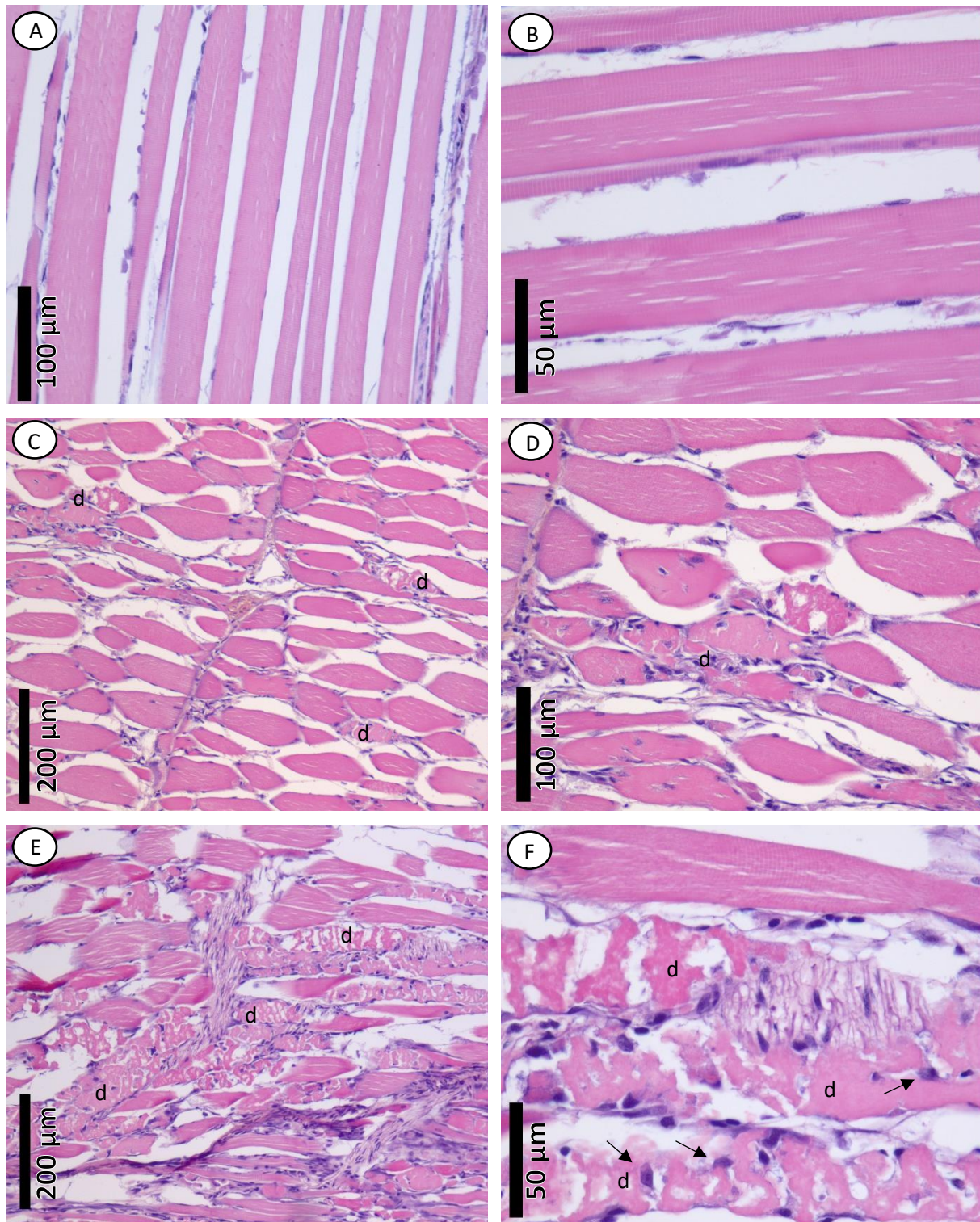


Figur 16: Pankreas hos kontrollfisk (A-B) og «kohabitant» av ørret (C-F) 6 uker etter infusjonsstart. A og B viser normale eksokrine pankreasceller samt fettceller (F) mellom pylorusblindsekkene (Py). C og D viser moderat diffus degenerasjon og atrofi av eksokrin pankreas med noen gjenværende tilsynelatende normale celler (pil) (skår 2).

3.7.6 Histopatologiske funn i skjelettmuskulatur hos kohabitant ørret

Kontrollfisken hadde normal skjelettmuskulatur, og tverrstriping av muskulaturen var tydelig i alle prøvene.

Av de undersøkte kohabitantene hadde fire av 16 fisk forandringer i skjelettmuskulaturen, og den høyeste skåren som ble gitt var 2,5. Utenom denne var det én fisk som fikk skår 2 og to fisk som fikk skår 1,5. Det ble observert multifokale lesjoner i den hvite skjelettmuskulaturen med degenererte og nekrotiske muskelfibre og infiltrasjon av betennelsesceller (figur 17C-D). Det ble ikke observert patologiske forandringer i den røde skjelettmuskulaturen i de snittene hvor denne var godt synlig.



Figur 17: Hvit skjelettmuskulatur hos kontrollfisk (A-B) og «kohabitant» (C-F) ørret 6 uker etter infeksjon. A og B viser normale muskelfibre med perifer kjerner og synlig tverrstriping. C og D viser fokal degenerasjon av muskelfibre (d) med fragmentert og eosinofilt sarcoplasma og invasjon av betennelsesceller (skår 1,5). E-F viser gjennomgående degenerasjon av hvit skjelettmuskulatur (d) som har ført til fragmenterte og eosinofile sarcoplasma og invasjon av betennelsesceller (piler) (skår 2,5).

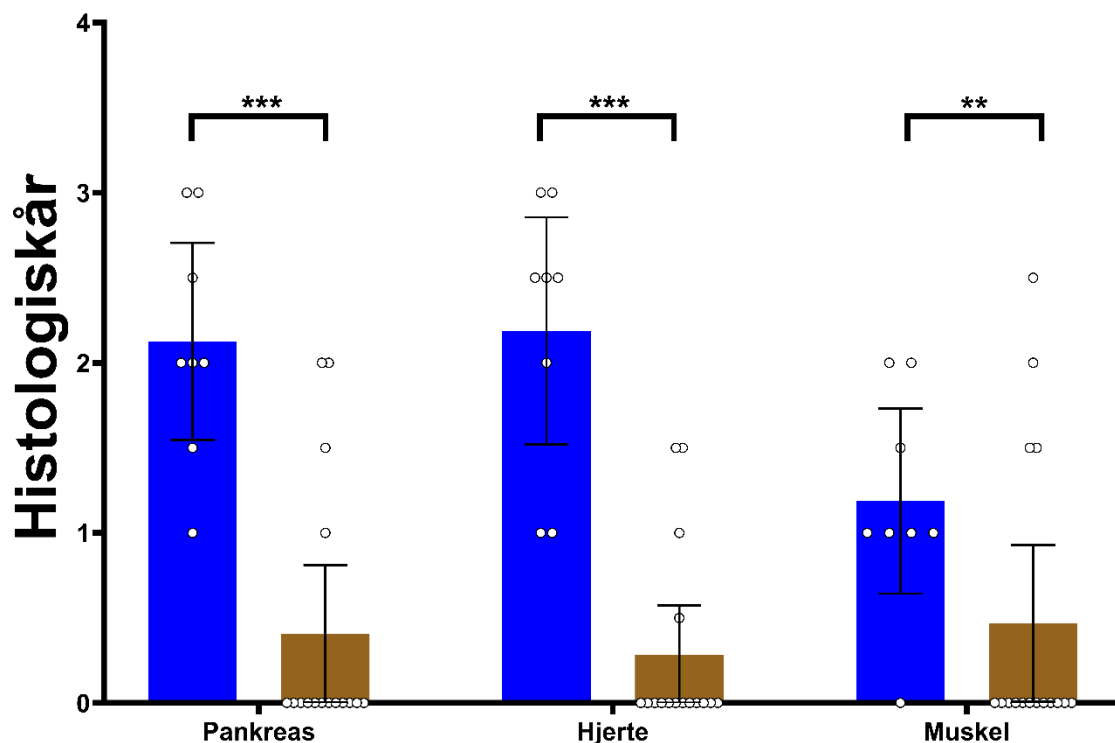
3.7.7 Histologiske bifunn

Det ble funnet trofozoitter av flagellaten *Ichthyobodo* sp. på epidermis av både laks og ørret, men dette ble ikke forbundet med forhøyet dødelighet. Det ble også sett noe hyperplasi av epidermis og en økning i antall slimceller hos noen individer.

3.7.8 Sammenligning av histologisk skår hos kohabitant laks og ørret 6 uer

Alle skåringer i kontrollgruppene var 0, og skåringer hos kohabitantgruppen med laks var derfor signifikant høyere i alle vev ($p < 0.001$). Hos ørreten var det derimot ingen vev som hadde signifikant høyere skåring enn kontrollgruppen.

Mellom laks og ørret var det en signifikant forskjell i skåring av patologi i alle vev (figur 18), og laksen hadde de mest alvorlige patologiske forandringene. Det ble observert størst forskjell i pankreas og hjerte. Laksen hadde der klart mer omfattende lesjoner enn ørreten, selv om enkelte ørretindivider hadde høy skår. Det var også signifikant høyere snittskår på skjelettmuskulatur hos laks, men hos de ørretene hvor det ble funnet forandringer var skåren like høy som hos laksen (ingen signifikant forskjell).

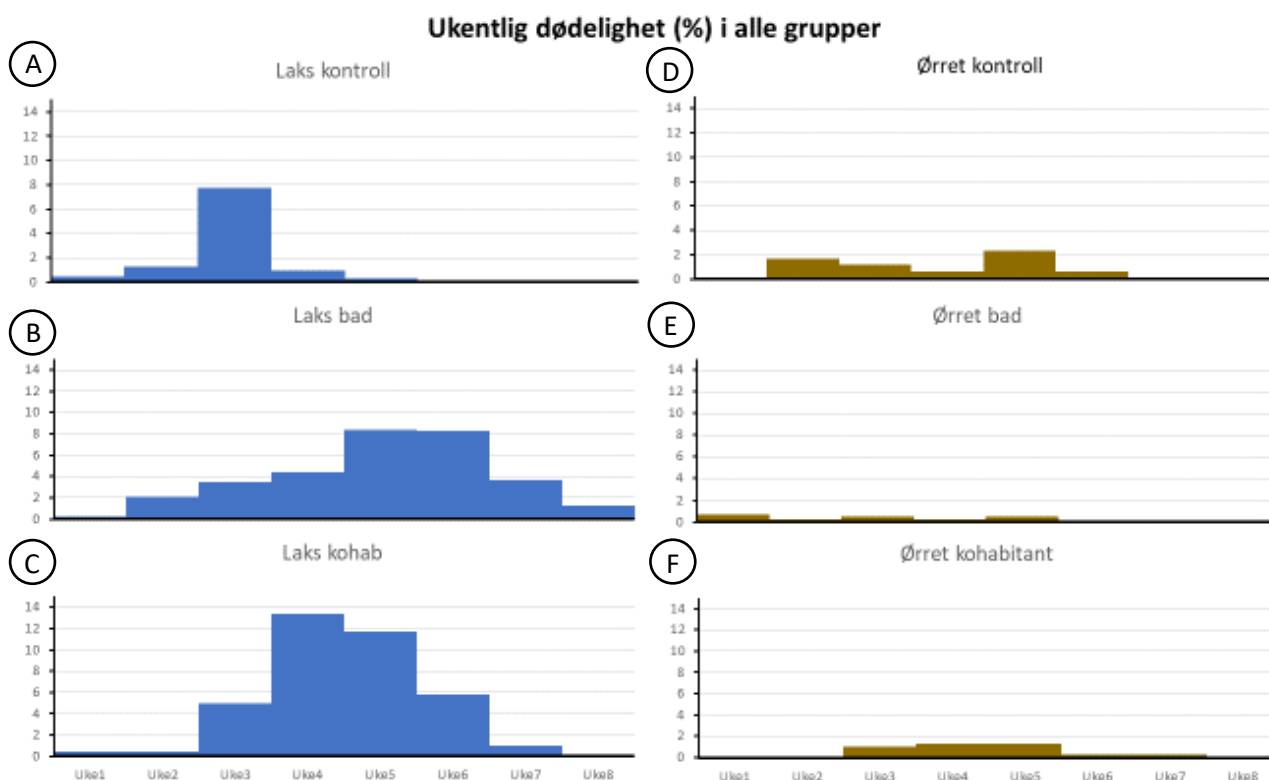


Figur 18: Sammenligning av histologiskår i «kohabitant» laks (blå søyler)- og ørret (brune søyler); Søylene viser gjennomsnittlig skår (\pm 95 % KI) i vevene **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$

3.8 Dødelighet

Det var noe forhøyet dødelighet i laks-kontroll gruppen i uke tre (figur 19A). Årsaken er ikke kjent. Det var høy dødelighet i begge smittegruppene med laks. I kohabitantgruppen var det ingen overlevende fisk etter 6 uer uttaket og i badgruppen var det bare to fisk igjen etter 8 uer uttaket. I badgruppen døde over 8 % av fiskene per uke i ukene 5-6, før dødeligheten avtok. I kohabitantgruppen kom dødeligheten noe senere (tre uer vs. to uer), men var høyere, med et maksimum i uke fire og fem (maksimum var 13.3 % i uke 4). Av de fiskene som ikke ble tatt ut til prøver, døde alle fiskene i kohabgruppen og nesten alle i badgruppen. (figur 19B-C)

I ørretgruppene var dødeligheten jevnt lav (maks 2,3 %) (figur 19D-F). Ukentlig dødelighet i alle gruppene er oppgitt i figur 19.



Figur 19: Dødelighet ble registrert daglig og er vist som prosentvis ukentlig dødelighet (mandag-søndag) alle uttak ble gjort på torsdager utenom uke fire uttaket som ble gjort på en fredag.

4.0 Diskusjon

I denne studien har det blitt gjennomført smitteforsøk med SAV3 på yngel av laks og brunørret. Forsøket ble satt opp med to smitte-grupper (bad og kohabitering) for hver av disse artene. For å vurdere konsekvensene av smitte ble det gjennom forsøket tatt ut prøver til både qPCR og histologi fra alle forsøksgruppene, og vekst og dødelighet ble registrert.

Målet med studien var å finne ut om yngel av ørret og laks er mottakelige for SAV3, hvordan en SAV3 infeksjon vil påvirke fisken, og om eventuell infeksjon vil føre til økt dødelighet.

Forsøksoppsett og utfordringer underveis i arbeidet

De viktigste utfordringene med forsøksoppsettet viste seg å være følgende:

- Forsøksfisken var ikke stor nok til å bli tatt prøve av til både histologi og qPCR. Det var heller ikke mulig å bruke yngelen som shedderfisk på grunn av størrelsen.
- Forsøksfisken vokste raskt, hvilket medførte endret vevsprøvetaking underveis
- Større sheddere medførte fare for predasjon i karene og begrenset muligheten for bruk av en normal kohabitant smittemodell.
- Forekomst av internsmitte i karene er sannsynlig, og smittetidspunkt var derfor trolig varierende i både bad og kohabitant-kar.

Fordi fisken var så liten var det ikke mulig å ta prøver til både histologi og qPCR av samme fisk. Virusmengde i fisken kunne dermed ikke direkte korreleres med grad av patologi. Dette var det tatt hensyn til ved å øke antall fisk fra hver smittegruppe til hver av disse analysene. Ved høy prevalens i smittegruppene kunne det med stor sikkerhet antas at fiskene som ble undersøkt histologisk også var SAV-positive. I gruppene med lavere prevalens var det mer problematisk å knytte patologien til infeksjon. Det er likevel lite trolig at dette har påvirket hovedkonklusjonene i studien.

Størrelsen på yngelen ved oppstart av forsøket gjorde også at det ikke var forsvarlig å injisere yngelen for bruk som shedderfisk. Selv om dette hadde vært mulig ville størrelsen gjort det vanskelig å merke shedderne slik at den kunne skilles fra kohabitantene. I et annet forsøk ble yngel på 1,8 g injisert med virus og brukt som shedderfisk og dette synes å være de minste fiskene som har blitt brukt som shedderfisk i SAV-smitteforsøk (Herath et al., 2017). Siden fisken i vårt forsøk var for liten til dette ble det besluttet å i stedet bruke større lakseparr, som var store nok til at de kunne håndteres og injiseres uten å forårsake indre skader. Bruk av laks som shedderfisk for SAV i ferskvann er godt dokumentert (Graham et al., 2011, Gonen et al., 2015, Herath et al., 2017). Kohabitant-smitten var i utgangspunktet satt opp som en tradisjonell shedder-kohabitant smittemodell med kohabitanter

(yngel) og sheddere (parr) i samme kar. Men, for å forhindre predasjon, sett i pilotoppsett, måtte de holdes separat. Smittemodellen brukt i dette forsøket ble med dette avvikende fra tradisjonelle kohabitant smittemodeller (Graham et al., 2011). Ved pumping av vann mellom karene hadde ikke fisken mulighet til å overføre smittestoff gjennom fysisk kontakt, men det er ingen studier som tyder på at denne smittemåten er viktig ved SAV smitte (OIE, 2018). Siden yngelen fikk en kontinuerlig tilstrømning av vann med smittestoff refereres det likevel her til denne smitten som «kohabitering», til forskjell fra den kortvarige eksponeringen ved badsmitte. Denne smittemetoden resulterte i SAV-positive fisk i alle karene og var således en vellykket tilnærming til kohabitantsmitte.

Fisken vokste raskt (Kontroll laks; 0,38 - 1,86 g. Kontroll ørret; 0,54 - 2,11 g), og det var derfor ikke mulig å følge en identisk prøveuttaksmetode for qPCR analyseprøver gjennom hele forsøket. I de første uttakene var fisken så liten at det var tilstrekkelig å kutte av haledelen før overføring til rør. Etter hvert som fisken vokste var det nødvendig å kutte bort mer av skjelettmuskulatur og hode for å få plass til prøven i homogeniseringsrørene. Vevstilfanget fra fisken som ble tatt med i qPCR-analysen endret seg derfor noe gjennom forsøket, selv om de indre organene med kjerneorganene hjerte, milt, pankreas og nyre alltid var med. Disse vevene inneholder sannsynligvis mest virus i infisert fisk (Andersen et al., 2010). Dette kan ha ført til at Ct har variert mer fra starten til slutten av forsøket enn den ville ha gjort dersom samplingen var mer konsekvent. Store vevsbiter mot slutten av forsøket ga også utfordringer under RNA isoleringen. Kvaliteten på RNA ble likevel akseptabel (vurdert fra nanodrop og ELA Ct) og det er lite sannsynlig at dette har påvirket konklusjonen i denne studien. Utfordringene med ulik prøvetaking gjorde også at vi brukte Ct-verdier som mål på virus tettheter, da forskjellig organ og vevstilfang ville måtte påvirke referansegen-signalet. ELA ekspresjonen ble derfor primært brukt som en kontroll på at RNA kvaliteten i prøvene var god.

Ved badsmitte ble fisken kun utsatt for smittestoff én gang, men det er sannsynlig at fisken som ble smittet ved badingen kan ha videreført smitte til usmittet fisk i karet, da de etter hvert skilte ut virus selv. I tidligere arbeid har det blitt vist at fisk starter å skille ut virus 4-13 dager etter IP-smitte (Andersen et al., 2010) og 2-6 uker etter eksponering for virus fra sheddere (Graham et al., 2012). Siden usmittet fisk forekom, og prevalensen økte, må det ha foregått kohabitant-smitte i karene. Denne smittekaskaden vanskeliggjør en god sammenligning av mottageligheten til laks og ørret, da en ikke har god kontroll på smittetidspunkt og smittepress i karene. På grunn av dette ble prevalens og virusmengde sammenlignet mellom artene i bad og kohabitant-gruppene to uer, da det sannsynligvis var lite internsmitte i karene.

Forskjell i mottakelighet av SAV3 mellom laks og ørret

Alle lakseyngel i karene syntes å bli infisert med SAV. Prevalensen i laks-badgruppen hadde en jevn økning frem til 6 uei mens laks-kohabitant gruppen hadde en rask økning i prevalens mot to uei etterfulgt av en nedgang ved tre uei og en ny oppgang ved 6 og 8 uei. Årsaken til nedgangen i uke 3 er vanskelig å forklare. En mulig årsak er at dødeligheten i denne gruppen økte i uke tre. Fisk som først utviklet PD har trolig også dødd først og kan ha ført til en nedgang i prevalens. Et annet aspekt som kan ha virket inn var at det var flere prøver med høy Ct for referansegenet i dette uttaket og det kan derfor ikke utelukkes at nedgangen i prevalens også kan ha med tekniske problemer knyttet til RNA isolering eller qPCR å gjøre.

Den badsmittede gruppen med laks hadde lavere dødelighet og denne kom senere enn i kohabitantgruppen. Dette kan ha sammenheng med at det var få fisk som ble smittet i begynnelsen av forsøket. Denne fisken har trolig videreført smitten i karet, og ført til en gradvis økende prevalens.

I et badforsøk med SAV3 på postsmolt fant Jarungsriapisit et al. (2016a) en positiv korrelasjon mellom smittedose, prevalens, Ct, utvikling av patologi og grad av shedding. I vårt forsøk var det stor variasjon i virustettheten (Ct) i begge laksegruppene frem til uke fire. Det er sannsynlig at fiskene som raskt utviklet kraftige infeksjoner også var de som døde først i forsøket. Det kan virke som om den resterende fisken ikke produserte like store mengder virus og at virustettheten i gruppene stabiliserte seg på en Ct mellom 30 og 25 i de fleste fiskene. Det er antatt at den totale eksponeringen for viruset ble lavere i de badbehandlede gruppene enn i kohabitantgruppene, men det var ikke forskjell i virustetthet i de to laksegruppene ved slutten av forsøket. Dette kan skyldes at det etter hvert som forsøket gikk ble gradvis mer kohabitantsmitte i karene. Resultatene fra qPCR analysene tyder på at selv lave initiale smittedoser kan føre til kraftige infeksjoner og videreføring av smitte hos lakseyngel i kar.

Ørretyngel ser ut til å være mer motstandsdyktig mot SAV3 infeksjon enn lakseyngel. Prevalensen i begge ørretgruppene var alltid lavere, og virustettheten (vurdert fra Ct-verdiene) i ørretene var for det meste lavere enn i laksen. Det er likevel vesentlig at enkelte ørretindivider i kohabitantgruppen viste Ct-verdier på linje med laks. Forskjeller i prevalens rett etter eksponering for smitte kan reflektere variasjon i opptak, men de begrensede prøvestørrelsene her var lite egnet til å avsløre prevalensforskjeller mellom ørret og laks. Tendensen var lavere prevalens blant ørreten enn laksen, men ingen signifikante forskjeller ble sett. Som hos laksen, viste ørret-kohabitant gruppen en økning i prevalens frem mot uke to, etterfulgt av en nedgang i uke tre og en økning igjen mot uke 6. Da det ikke var økt dødelighet i ørretgruppene kan ikke frafall av fisk forklare den tilsynelatende nedgangen. Det samme mønsteret ble sett i prevalens i uke tre for både laks og ørret, noe som kan tyde på at

tekniske utfordringer (som nevnt tidligere) var grunnen til nedgangen i dette uttaket. Hvis reelt, må det skyldes enten at det tilfeldig ble plukket ut færre positive fisk i dette uttaket, eller at noen av fiskene kvittet seg med viruset. I et tidligere tilsvarende forsøk med post-smolt ble det indikert at det kan forekomme en rask klarering av SAV3 hos infisert ørret (Kvamme et al., 2018). Dette tyder på at ørretyngel kan bli infisert med SAV3, men med lav prevalens, og at det i fiskegupper infisert med en lav smittedose ikke skilles ut nok virus til å starte et utbrudd.

Noen ørretyngel som blir infisert ser ut til å utvikle like høye virusmengder som lakseyngel, vurdert ut fra at Ct-verdiene er omtrent like som laksens. I ørret-kohabitantgruppen var det stor variasjon i virustetthet gjennom hele forsøket med unntak av uttaket i uke 8. Variasjonen kan tyde på at noen av fiskene var mer mottakelig for viruset og dermed fikk en kraftigere infeksjon enn andre.

Forskjellene i mottakelighet innad i ørretgruppene kan være en følge av genetisk variasjon eller forskjeller i størrelse og helsestatus. Dette kan som tidligere nevnt tyde på at ørret som art er mer motstandsdyktig, men at de ørretene som faktisk blir infisert utvikler like høy virustetthet som laks.

Resultatene to uker etter smitte indikerer at laks blir lettere smittet og at infeksjonen går hurtigere enn i ørret. Sammenligning av smittegruppene ved to uei viste at det ikke var en signifikant forskjell i prevalens i hverken bad- eller kohab-gruppene eller i virustetthet i badgruppene, men prøvestørrelsene er for små til å påvise forskjeller når prevalensen er lav. I kohabitantgruppene hadde laksen klart kraftigere infeksjoner, selv om enkeltindivider blant ørreten også hadde betydelige virusmengder.

Dette betyr at brunørret som art kan være mere resistent mot SAV3 enn laks, men at noen ørretindivider er mer mottakelig enn andre. Dette støtter (Madhun et al., 2016) som ikke fant SAV infeksjoner hos vill voksen sjøørret i PD områder og mente at ørreten er resistent.

Påvirkning av vekt og kondisjonsfaktor etter eksponering for SAV3

Laksens vekst ble hemmet som følge av eksponering for SAV3, mens ørretens vekst synes upåvirket. Fra starten av forsøket var ørreten noe større enn laksen. Grunnen til dette var mest sannsynlig en kombinasjon av at ørreten har en raskere vekst enn laksen og at en andel av ørretene ble klekket en uke tidligere enn resten. Dette hadde sannsynligvis ikke en stor påvirkning på mottakeligheten til de to artene. Både laks og ørret hadde nylig kommet i gang med startforing og det viste seg ved histologi at begge artene hadde rester av plommesekk i begynnelsen av forsøket. Da fisken ble utsatt for det samme miljøet fra klekking til forsøksstart kan eventuell eksponering for agens eller andre immunstimulanter regnes som å ha vært svært lik hos de to artene.

Flere forfattere har konstatert at vekttap og nedgang i kondisjonsfaktor kan være en direkte konsekvens av en SAV-infeksjon hos laks (Christie et al., 2007, Taksdal et al., 2015, Heidari et al., 2015, Jarungsriapisit et al., 2016a). I forsøket som er utført her var det en tydelig trend at den smittede laksen vokste dårligere enn kontrollfisken. Ved 6 uei hadde kohabitantgruppen lavest vekt av de tre laksegruppene. Kondisjonsfaktoren ble derimot ikke påviselig påvirket. Disse resultatene tyder på at særlig lengde vekst ble hemmet av infeksjonen. At kohabitantgruppen med laks vokste dårligere enn badgruppen skyldes trolig at den fikk en kontinuerlig tilstrømning av smittestoff og at flere fisk dermed ble infisert tidligere. Smittedosen i badgruppene var lav, men det forekom sannsynligvis kohabitant-smitte i karene med laks utover i forsøket som kan ha ført til økt smittepress. Siden det tar tid før veksten hemmes etter en infeksjon ville dette skje senere i badgruppen. Et senere forløp i denne gruppen støttes også av den senere dødeligheten som ble observert.

I de smittede ørretgruppene var hverken vekt eller kondisjonsfaktor avvikende fra kontrollen i de siste uttakene (uke 6 og 8), og det var heller ingen trend i vekstdata som indikerte at smitte påvirket ørretene. Siden det var få positive fisk i ørretgruppene vil et eventuelt avvik i vekst hos infisert fisk forekomme hos så få individer at dette ikke ville gjøre en forskjell på vekst-trenden i gruppene. Det ble heller ikke sett tendenser til hemming av vekst hos de få ørretene som ble infisert. Dette indikerer at SAV3- infeksjon har liten eller ingen effekter på vekst hos ørretyngel, men at lakseyngel blir negativt påvirket.

Histopatologiske forandringer i ørret- og lakseyngel

Det ble undersøkt histologiske snitt fra kohabitantgruppene for både laks og ørret fra 6 uei. Uke 6 ble valgt fordi det trolig var mest histopatologiske forandringer i de siste ukene i forsøket og fordi laks-kohabitantgruppen ble avsluttet like etter dette uttaket.

I laksen ble det observert vevsforandringer i pankreas og hjerte hos alle fiskene og i skjelettmuskulatur i alle utenom én. I ørretgruppen ble det kun påvist histopatologi i fem av 16 fisk og kun to av disse viste forandringer i alle de tre vevene. Hos laksen ble det sett mest alvorlige forandringer i hjertet og pankreas, mens det var skjelettmuskulaturen som virket mest påvirket hos ørreten. Den lave andelen av ørret med lesjoner synes å samsvare med andelen fisk som hadde høye virustettheter (lav Ct).

I tidligere forsøk med badsmittet lakseyngel med SAV1 ble det observert vevsforandringer i pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur fem uker etter smitte (Cano et al., 2015), disse forandringene var

mindre alvorlige og mindre utbredte enn det som er sett her. Disse forskjellene er trolig på grunn av bruk av forskjellige subtyper av viruset.

Graham et al. (2011) viste at SAV3 affiserte en større andel av den eksponerte populasjonen enn SAV1 i komparative smittestudier. De patologiske forandringene som ble påvist var også mer alvorlig hos SAV3 enn i SAV1 smittet fisk. Det er uvisst om forandringer i lever, rapportert av Herath et al. (2017) i SAV1 eksponert fisk, er knyttet til virusvariant, men leverforandringer ble ikke sett i de SAV3 eksponerte fiskene i vår studie.

Ved PD i sjø er det vanlig å finne forandringer i pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur (McLoughlin and Graham, 2007). Forandringene i skjelettmuskulaturen vil ofte hovedsakelig være i den røde muskulaturen. Dette står i kontrast med det som ble funnet her, hvor kun den hvite muskulaturen synes å være påvirket. Tilfeldigheter kan ha spilt inn her, da rød muskulatur ikke var godt representert i alle snitt. Likevel er det mulig at de patologiske forandringene i yngel med SAV3 kan avvike fra større fisk.

Prøvene som ble undersøkt histologisk i denne oppgaven er tatt ut sent i forløpet, og det er derfor en mulighet for at regenerering kan ha spilt en rolle i pankreas og hjertemuskulatur. Regenerering av ascinære pankreasceller hos laks kan observeres mellom 6 og 9 uker etter et PD utbrudd (McLoughlin et al., 2002). Det kan gjøres mere omfattende histologiske undersøkelser på flere uttak for både å avsløre eventuell regenerering og for å kartlegge utviklingen av patologi hos begge artene.

Forandringene som ble observert i ørreten lignet det som ble observert i laksen, men forandringene var gjennomgående mindre omfattende i ørreten.

Det har det blitt gjort få studier med SAV på ørret. I et eldre forsøk fra før selve viruset ble oppdaget ble parr av laks, regnbueørret og brunørret IP injisert med nyre-homogenat fra en PD-syk fisk (Boucher et al., 1995). Kun pankreas ble undersøkt histologisk. Resultatene viste at brunørreten utviklet minst patologiske forandringer av de tre artene.

Siden det ikke var mulig å gjøre histologi og qPCR på de samme individene i denne studien kan det ikke med sikkerhet konkluderes med at vevsforandringene som blir observert skyldes PD, selv om dette er høyst sannsynlig. I laksegruppene var prevalensen høy i uke 6, og usikkerheten knyttet til om individene som viste vevsforandringer også var infisert er derfor liten. I ørretgruppene var derimot prevalensen lavere og det kan derfor ikke med sikkerhet konkluderes med at alle individene med patologi også var positive for SAV3. Fravær av patologiske funn hos kontrollfisk styrker likevel sannsynligheten for at de karakteristiske PD lesjonene sett var en konsekvens av infeksjon med SAV.

Resultatene fra forsøket utført her kombinert med tidligere arbeid (Kvamme et al., 2018) viser at færre ørret enn laks utvikler vevsforandringer etter eksponering av SAV3. I tillegg synes ørreten å

utvikle mindre omfattende forandringer i hjerte og pankreas, og omtrent like alvorlige forandringer i skjelettmuskulatur i forhold til laksen.

Dødelighet hos yngel som følge av SAV3 eksponering

Det var stor forskjell i dødelighet mellom laks- og ørretyngelen i dette forsøket. Hos ørreten var det ingen økt dødelighet i forhold til kontrollgruppen hverken i kohabitant- eller badgruppen. I laksegruppene var det derimot høy dødelighet i begge gruppene. Dødeligheten i kohabitantgruppen var så høy at denne gruppen døde ut like etter 6 uei uttaket. I lignende forsøk på yngel har det vært svært varierende grad av dødelighet. Gonen et al. (2015) rapporterte om hele 60 % kumulativ dødelighet etter 8 uker (SAV 3), Herath et al. (2017) om omtrent 10 % dødelighet i kohabitant og badsmittet fisk (SAV 1), og Cano et al. (2015) om bare 1,2 % dødelighet (SAV1 og SAV5). Smitteforsøk med SAV3 på lakseparr har også vist store variasjoner i dødelighet, fra 16.7 % (Taksdal et al., 2015) til ingen (Christie et al., 2007). Dette gjenspeiler også observasjoner fra utbrudd i felt i sjø, med svært varierende tap (McLoughlin and Graham, 2007). I forsøket utført her var det i likhet med hos Gonen et al. (2015) og Taksdal et al. (2015) høyest dødelighet fra fire til 8 uei. Laks med PD dør antagelig som følge av en kombinasjon av tap av pankreas og hjertedegenerasjon (Taksdal et al., 2015). Her ble det også observert blodkoagel i hjertet, hvilket også er en mulig dødsårsak. Det er vanlig med høyere dødelighet hos laksefiskyngel enn hos større fisk blant annet fordi immunforsvaret til yngelen er umodent (Zapata et al., 2006). Like etter klekking er yngelen avhengig av det medfødte immunforsvaret for å beskytte seg mot patogener frem til det adaptive immunforsvaret er utviklet (Chettri et al., 2012, Ghosh et al., 2016, Herath et al., 2017). Fisk er derfor ekstra utsatt for infeksjoner de første ukene etter klekking. Størrelsen på yngelen har stor betydning for utviklingen av det adaptive immunforsvaret og større fisk har som regel et mer utviklet immunforsvar (Zapata et al., 2006, Magnadóttir, 2006, Johnson et al., 1982).

Det var en økning i dødelighet i kontrollgruppen med laks i uke tre. Det ble ikke sett en tilsvarende dødelighet denne uken i noen av smittegruppene, og siden kontrollfisken ble undersøkt med qPCR ved hvert uttak kan dødelighet som følge av SAV3 utelukkes. Det er ikke uvanlig med forhøyet dødelighet i ukene rundt startforting hos lakseyngel i klekkeri som følge av at fisken ikke er i stand til å ta til seg næring (Noble et al., 2018). Dersom dette var grunnen til dødeligheten ville det være forventet å se en samtidig dødelighet i smittegruppene. Dette ble ikke observert, men fisketettheten i disse var lavere, så det er mulig at dødeligheten i kontrollgruppen var tapere som ikke var i stand til å få tak i fôr på grunn av høyere konkurranse. Av andre agens ble kun *Ichthyobodo* sp. cf. *necator* påvist histologisk, men tettheten var lave, og kunne ikke kobles til dødeligheten. Årsaken til

dødeligheten i denne kontrollgruppen er derfor ukjent.

For laks viser resultatene at begge smittemodellene resulterte i infeksjon, sykdom og dødelighet. Ørreten ble infisert, men i vesentlig mindre grad enn laks, og få utviklet histopatologi som var forenelig med PD. Det ble heller ikke registrert vesentlig dødelighet hos ørret. Yngel av ørret synes derfor klart mer motstandsdyktige mot PD enn laks.

Hva betyr dette for laksefiskyngel i naturen?

Dette forsøket har blitt gjort for å få mer kunnskap om hvordan vill laks- og brunørret yngel ville taklet å bli utsatt for SAV3-smitte i elven. Det er kjent at viruset kan overleve og smitte i ferskvann og at det er høy prevalens av SAV i norsk lakseoppdrett med 176 PD tilfeller i 2017 (Veterinærinstituttet, 2018). Det er også kjent at rømt oppdrettslaks med virusinfeksjoner, inklusivt SAV, vandrer opp i elvene (Jensen et al., 2010, Skilbrei et al., 2015, Madhun et al., 2017). Det er derfor sannsynlig at yngel av laks og aure i mange norske elver blir eksponert for SAV i noen grad. Resultatene i dette forsøket tyder på at både laks og ørret kan bli smittet med SAV3 selv med lave smittedoser, men at det er færre ørret enn laks som blir infisert. Virustettheten de kan eksponeres for i elvevannet vil trolig være lavere enn i badsmitten i dette forsøket. I tillegg vil tettheten av fisk i naturen være mye lavere enn i karene på laboratoriet, ikke minst fordi yngel og parr av begge artene er territorielle (Sundström et al., 2003, Økland et al., 2004) Yngelen vil derfor ikke være like utsatt for shedder-smitte innad i populasjonen der en får smitte av enkeltfisk. Dette kan bety at ørreten er lite utsatt for SAV-smitte og at konsekvensene av SAV3 smittespredning fra oppdrett til ørret trolig er små. Lakseyngel virker derimot mer sårbar enn ørreten for SAV3 og det er mulig at selv lave viruskonsentrasjoner kan være nok til å starte en infeksjon. Resultatene i dette forsøket tyder også på at alle infiserte laks utvikler patologi og at dødeligheten i alle fall i kar kan bli svært høy. Dersom virusmengdene i elvene er høye nok til å smitte lakseyngelen og tetthetene tilstrekkelig, kan smitte med SAV3 kunne ha en innvirkning på laksebestanden. Miljøforhold vil ha stor betydning for spredning av viruset. Temperaturen i elvene varierer mye og det er kjent at temperatur betyr mye for virulensen til SAV (Houghton, 1994, McLoughlin and Graham, 2007). Rømt oppdrettslaks vandrer vanligvis opp i elvene sent på sommeren når temperaturen er relativt høy, så eventuelt smittede yngel kan tenkes å utvikle alvorlige infeksjoner (Skaala et al., 2018). Fordi forholdene i naturen vil være svært forskjellig fra eksperimentelle forhold vil de mest sannsynlige effektene likevel være subletale, som midlertidig nedsatt svømming og fødeopptak.

Det at enkelte ørretyngel av Matre-stammen viste høye virustettheter og PD lignende patologi reiser også spørsmålet om det er forskjell mellom ulike ørretstammer i forhold til mottakelighet for SAV3

og utvikling av sykdom. Resultatene her motiverer derfor fremtidige studier for å avklare forskjeller mellom arter og stammer, og betydningen av slike forskjeller

5.0 Konklusjon

Resultatene i dette forsøket tyder på at yngel er mer sårbar i møte med SAV3 enn større fisk, men at det er store forskjeller på hvordan infeksjoner arter seg i laks og ørret. Selv om begge artene er mottakelig for SAV3 og utvikler patologi som er forenelig med PD, er alvorlighetsgraden målt som prevalens, virustetthet, patologi og dødelighet langt lavere hos brunørret enn hos laks.

For laks kan resultatene indikere at SAV3 smitte kan påvirke ville bestander. For ørret ser det derimot ut til å være liten fare for at SAV3 skal ha påviselige effekter.

Referanser

- 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.). *Archives of Virology*, 152, 1871-1883.
- 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.). *Virology journal*, 7, 198.
- AUNSMO, A., VALLE, P. S., SANDBERG, M., MIDTLYNG, P. J. & BRUHEIM, T. 2010. Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 233-241.
- BANG JENSEN, B., GU, J. & TAKSDAL, T. 2018. Fiskehelse rapporten 2017. 4.1 Pankreassykdom (PD), 33-37.
- BOSCHER, S. K., MCLOUGHLIN, M., LE VEN, A., CABON, J., BAUD, M. & CASTRIC, J. 2006. Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *Journal of Fish Diseases*, 29, 263-273.
- BOUCHER, P., RAYNARD, R. S., HOUGHTON, G. & LAURENCIN, F. B. 1995. Comparative experimental transmission of pancreas disease in Atlantic salmon, rainbow trout and brown trout. *Dis Aquat Org*, 22, 19-24.
- BRATLAND, A. & NYLUND, A. 2009. Studies on the Possibility of Vertical Transmission of Norwegian Salmonid Alphavirus in Production of Atlantic Salmon in Norway. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21, 173-178.
- CANO, I., JOINER, C., BAYLEY, A., RIMMER, G., BATEMAN, K., FEIST, S. W., STONE, D. & PALEY, R. 2015. An experimental means of transmitting pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry in freshwater. *J Fish Dis*, 38, 271-81.
- CHETTRI, J. K., RAIDA, M. K., KANIA, P. W. & BUCHMANN, K. 2012. Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36, 463-474.
- CHRISTIE, K. E., GRAHAM, D. A., MCLOUGHLIN, M. F., 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75, 13-22.
- DEPERASIŃSKA, I., SCHULZ, P. & SIWICKI, A. K. 2018. Salmonid alphavirus (SAV). *Journal of Veterinary Research*, 62, 1-6.
- DESVIGNES, L., QUENTEL, C., LAMOUR, F. & LE VEN, A. 2002. Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally

- infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). *Fish Shellfish Immunol*, 12, 77-95.
- ERDAL, J. & REITAN, L. 1992. Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 2, 99-108.
- GHOSH, B., NGUYEN, T. D., CROSBIE, P. B., NOWAK, B. F. & BRIDLE, A. R. 2016. Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against yersiniosis than immersion vaccination. *Vaccine*, 34, 599-608.
- GONEN, S., BARANSKI, M., THORLAND, I., NORRIS, A., GROVE, H., ARNESEN, P., BAKKE, H., LIEN, S., BISHOP, S. C. & HOUSTON, R. D. 2015. Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, 115, 405-414.
- GRAHAM, D., BROWN, A., SAVAGE, P. & FROST, P. 2012. Detection of salmon pancreas disease virus in the faeces and mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge. *Journal of fish diseases*, 35, 949-951.
- GRAHAM, D. A., FROST, P., MCLAUGHLIN, K., ROWLEY, H. M., GABESTAD, I., GORDON, A. & MCLOUGHLIN, M. F. 2011. A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1-6 using an experimental cohabitation challenge model. *Journal of Fish Diseases*, 34, 273-286.
- GRAHAM, D. A., STAPLES, C., WILSON, C. J., JEWHRST, H., CHERRY, K., GORDON, A. & ROWLEY, H. M. 2007. Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influence of temperature and pH on virus survival. *Journal of Fish Diseases*, 30, 533-543.
- GREFSRUD, E. S., SVÅSAND, T. & TARANGER, G. L. 2018. Risikorapport norsk fiskeoppdrett-2018. *Fisken og havet, særnr. 1*.
- GUDDING, R. 2014. *Vaccination as a Preventive Measure*, Chichester, UK, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- HEIDARI, Z., TINSLEY, J., BICKERDIKE, R., MCLOUGHLIN, M. F., ZOU, J. & MARTIN, S. A. 2015. Antiviral and metabolic gene expression responses to viral infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & shellfish immunology*, 42, 297-305.
- HERATH, T. K., ASHBY, A. J., JAYASURIYA, N. S., BRON, J. E., TAYLOR, J. F., ADAMS, A., RICHARDS, R. H., WEIDMANN, M., FERGUSON, H. W., TAGGART, J. B., MIGAUD, H., FORDYCE, M. J. & THOMPSON, K. D. 2017. Impact of Salmonid alphavirus infection in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *PLoS One*, 12, e0179192.
- HERATH, T. K., FERGUSON, H. W., WEIDMANN, M. W., BRON, J. E., THOMPSON, K. D., ADAMS, A., MUIR, K. F. & RICHARDS, R. H. 2016. Pathogenesis of experimental

- salmonid alphavirus infection in vivo: an ultrastructural insight. *Veterinary research*, 47, 7.
- HJELTNES, B., BANG JENSEN, B., BORNØ, G. & HAUKAAS, A. 2018. Fiskehelserapporten 2017. *Veterinærinstituttet, NVI*.
- HJORTAAS, M. J., BANG JENSEN, B., TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., LILLEHAUG, A., TRETENES, E. & SINDRE, H. 2016. Genetic characterization of salmonid alphavirus in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 39, 249-257.
- HJORTAAS, M. J., SKJELSTAD, H. R., TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., JOHANSEN, R., BANG-JENSEN, B., ORPETVEIT, 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*, 36, 71-4.
- HODNELAND, K. & ENDRESEN, C. 2006. Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of virological methods*, 131, 184-192.
- HOUGHTON, G. 1994. Acquired protection in Atlantic salmon *Salmo salar* parr and post-smolts against pancreas disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 109-109.
- JANSEN, M. D., JENSEN, B. B., MCLOUGHLIN, M. F., RODGER, H. D., TAKSDAL, T., SINDRE, H., GRAHAM, D. A. & LILLEHAUG, A. 2017. The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 40, 141-155.
- JANSEN, M. D., TAKSDAL, T., WASMUTH, M. A., GJERSET, B., BRUN, E., OLSEN, A. B., BRECK, O. & SANDBERG, M. 2010. Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *Journal of Fish Diseases*, 33, 391-402.
- JARUNGSRIAPISIT, J., MOORE, L. J., MAEHLE, S., SKAR, C., EINEN, A. C., FIKSDAL, I. U., MORTON, H. C., STEFANSSON, S. O., TARANGER, G. L. & PATEL, S. 2016a. Relationship between viral dose and outcome of infection in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts bath-challenged with salmonid alphavirus subtype 3. *Veterinary Research*, 47, 13.
- JARUNGSRIAPISIT, J., MOORE, L. J., TARANGER, G. L., NILSEN, T. O., MORTON, H. C., FIKSDAL, I. U., STEFANSSON, S., FJELLDAL, P. G., EVENSEN, O. & PATEL, S. 2016b. 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). *Virology Journal*, 13, 14.
- JENSEN, Ø., DEMPSTER, T., THORSTAD, E. B., UGLEM, I. & FREDHEIM, A. 2010. Escapes of fishes from Norwegian sea-cage aquaculture: causes, consequences and prevention. *Aquaculture Environment Interactions*, 1, 71-83.

- JOHNSON, K., FLYNN, J. & AMEND, D. 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal of Fish Diseases*, 5, 197-205.
- JONSSON, B. 1985. Life history patterns of freshwater resident and sea-run migrant brown trout in Norway. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114, 182-194.
- KARLSEN, M., GJERSET, B., HANSEN, T. & RAMBAUT, A. 2014. Multiple introductions of salmonid alphavirus from a wild reservoir have caused independent and self-sustainable epizootics in aquaculture. *Journal of General Virology*, 95, 52-59.
- KARLSEN, M., HODNELAND, K., ENDRESEN, C. & NYLUND, A. 2006. Genetic stability within the Norwegian subtype of salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Archives of Virology*, 151, 861-874.
- KLEMETSEN, A., AMUNDSEN, P. A., DEMPSON, J., JONSSON, B., JONSSON, N., O'CONNELL, M. & MORTENSEN, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish*, 12, 1-59.
- KONGTORP, R. T., STENE, A., ANDREASSEN, P. A., ASPEHAUG, V., GRAHAM, D. A., LYGSTAD, T. M., OLSEN, A. B., OLSEN, R. S., SANDBERG, M., SANTI, N., WALLACE, C. & BRECK, O. 2010. Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *Journal of Fish Diseases*, 33, 879-888.
- KVAMME, B. O., VOSSGÅRD, A., KARLSBAKK, E., PATEL, S., FIKSDAL, I., DAHLE, M., BERG-ROELNESS, H., MÆHLE, S., NORDBØ, J. & MADHUN, A. 2018. *Susceptibility of sea trout (Salmo trutta) to important viral pathogens (SAV3 and PRV1)* [Online]. Available: <https://isaah2018.files.wordpress.com/2018/08/8-30-18-oral-presentations-searchable-pdf-final1.pdf> [Accessed 19.12.2018].
- LØVOLL, M., ALARCON, M., JENSEN, B. B., TAKSDAL, T., KRISTOFFERSEN, A. B. & TENGS, T. 2012. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99, 7-U5.
- MADHUN, A. S., ISACHSEN, C. H., OMDAL, L. M., EINEN, A. C. B., BJORN, P. A., NILSEN, R. & KARLSBAKK, E. 2016. Occurrence of salmonid alphavirus (SAV) and piscine orthoreovirus (PRV) infections in wild sea trout *Salmo trutta* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120, 109-113.
- MADHUN, A. S., KARLSBAKK, E., ISACHSEN, C. H., OMDAL, L. M., EIDE SORVIK, A. G., SKAALA, O., BARLAUP, B. T. & GLOVER, K. A. 2015. Potential disease interaction reinforced: double-virus-infected escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., recaptured in a nearby river. *J Fish Dis*, 38, 209-19.
- MADHUN, A. S., WENNEVIK, V., SKILBREI, O. T., KARLSBAKK, E., SKAALA, O., FIKSDAL, I. U., MEIER, S., TANG, Y. K. & GLOVER, K. A. 2017. The ecological profile of Atlantic salmon escapees entering a river throughout an entire season: diverse

- in escape history and genetic background, but frequently virus-infected. *Ices Journal of Marine Science*, 74, 1371-1381.
- MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20, 137-151.
- MCLOUGHLIN, M., NELSON, R., MCCORMICK, J. & ROWLEY, H. 1995. Pathology of experimental pancreas disease in freshwater Atlantic salmon parr. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7, 104-110.
- MCLOUGHLIN, M. F. & GRAHAM, D. A. 2007. Alphavirus infections in salmonids - a review. *Journal of Fish Diseases*, 30, 511-531.
- MCLOUGHLIN, M. F., GRAHAM, D. A., NORRIS, A., MATTHEWS, D., FOYLE, L., ROWLEY, H. M., JEWHRST, H., MACPHEE, J. & TODD, D. 2006. Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72, 125-133.
- MCLOUGHLIN, M. F., NELSON, R. N., MCCORMICK, J. I., ROWLEY, H. M. & BRYSON, D. B. 2002. Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25, 33-43.
- MCLOUGHLIN, M. F., NELSON, R. T., ROWLEY, H. M., COX, D. I. & GRANT, A. N. 1996. Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 117-124.
- MOORE, L. J., SOMAMOTO, T., LIE, K. K., DIJKSTRA, J. M. & HORDVIK, I. 2005. Characterisation of salmon and trout CD8 alpha and CD8 beta. *Molecular Immunology*, 42, 1225-1234.
- NOBLE, C., NILSSON, J., STIEN, L. H., IVERSEN, M. H., KOLAREVIC, J. & GISMERVIK, K. 2018. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. 2. utgave.
- OIE 2018. Infection With Salmonid Alphavirus. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*.
- OLSEN, A. B., SKJELSTAD, H. R. & TAKSDAL, T. 2017. 4.1 Pankreassykdom (PD). *Fiskehelsesrapporten 2016*. Oslo, Norway: Veterinærinstituttet.
- OLSVIK, P. A., LIE, K. K., JORDAL, A.-E. O., NILSEN, T. O. & HORDVIK, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology*, 6, 21.
- POPPE, T. & BRECK, O. 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 219-226.

- RODGER, H. D., MURPHY, T. M., DRINAN, E. M. & RICE, D. A. 1991. ACUTE SKELETAL MYOPATHY IN FARMED ATLANTIC SALMON SALMO-SALAR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 17-23.
- SKAALA, Ø., FJELDHEIM, P. T. & GLOVER, K. 2018. Rømt og vill fisk i Etneelva 2017. *Rapport fra havforskningen*.
- SKILBREI, O. T., HEINO, M. & SVÅSAND, T. 2015. Using simulated escape events to assess the annual numbers and destinies of escaped farmed Atlantic salmon of different life stages from farm sites in Norway. *ICES Journal of Marine Science*, 72, 670-685.
- SKILBREI, O. T. & WENNEVIK, V. 2006. The use of catch statistics to monitor the abundance of escaped farmed Atlantic salmon and rainbow trout in the sea. 63, 1190-1200.
- SKJOLD, P., SOMMERSET, I., FROST, P. & VILLOING, S. 2016. Vaccination against pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reduces shedding of salmonid alphavirus. *Vet Res*, 47, 78.
- STENE, A., HELLEBØ, A., VILJUGREIN, H., SOLEVÅG, S., DEVOLD, M. & ASPEHAUG, V. 2016. Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *Journal of fish diseases*, 39, 531-537.
- SUNDSTRÖM, L. F., LÖHMUS, M. & JOHNSON, J. I. 2003. Investment in territorial defence depends on rearing environment in brown trout (*Salmo trutta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54, 249-255.
- TAKSDAL, T., BANG JENSEN, B., BÖCKERMAN, I., MCLOUGHLIN, M., HJORTAAS, M., 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. *Journal of fish diseases*, 38, 1047-1061.
- TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., BJERKAS, I., HJORTAAS, M. J., DANNEVIG, B. H., GRAHAM, D. A. & MCLOUGHLIN, M. F. 2007. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 30, 545-558.
- TAKSDAL, T. & SINDRE, H. 2016. *Togaviruses of Fish. Aquaculture Virology*. Elsevier.
- VETERINÆRINSTITUTTET. 2018. *Pankreassykdom (PD)* [Online]. Veterinærinstituttet. Available: <https://www.vetinst.no/dyr/oppdrettsfisk/pankreassykdom-pd-utbrudd-og-statistikk> [Accessed 08.11 2018].
- WOBESER, G. A. 2013. *Essentials of disease in wild animals*, John Wiley & Sons.
- ZAPATA, A., DIEZ, B., CEJALVO, T., GUTIERREZ-DE FRIAS, C. & CORTES, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology*, 20, 126-136.

ØKLAND, F., THORSTAD, E. & NÆSJE, T. 2004. Is Atlantic salmon production limited by number of territories? *Journal of Fish Biology*, 65, 1047-1055.

Vedlegg 1: Oppskrift for RNA stabiliseringsløsning

Det ble brukt en RNA stabiliseringsløsning som ble laget i følge en oppskrift gitt av John Taggard fra Universitetet i Stirling. Stabiliseringsløsningen ble laget i sterile 5 L glassflasker (VWR) på en oppvarmet magnetrører. Den originale oppskriften var for tillaging av 100 mL stabiliseringsløsning og ble multiplisert med 30. På grunn av en feilregning ble det benyttet 4 ganger mer sodium citrat enn i den originale oppskriften. Følgende steg ble gjort under tillaging av omtrent 4 L stabiliseringsløsning:

1. 2880 mL destillert vann (Barnstead) ble varmet opp til nært kokepunkt.
2. 87 g Sodium citrat trisodium salt dihydrat (Sigma-Aldrich) ble løst opp i vannet.
3. 120 mL 0.5 M EDTA (Thermo fisher) ble tilsatt.
4. 1800 g Ammonium sulfat (Sigma-Aldrich) ble gradvis rørt inn til det var fullstendig oppløst.
5. pH ble justert til 5.2 ved bruk av konsentrert svovelsyre (H_2SO_4 95-97%) (VWR)

Før bruk i forsøket ble RNA stabiliseringsløsningens evne til å inaktivere RNase og redusere degenerering av RNA testet. Det ble tatt 7 gjelleprøver av en parr hvor 4 ble fiksert i «hjemmelaget» RNA stabiliseringsløsning og 3 ble fiksert i kommersiell RNAlater (Sigma-Aldrich). Hver prøve ble fiksert i et rør med 1 mL løsning. Prøvene ble lagret på 4°C i 7 dager før de ble isolert med et Promega Reliaprep simply RNA HT kit (Sigma-Aldrich) i en Biomek 4000. Mengde RNA i prøvene ble så målt ved hjelp av en nanodrop 1000 (Thermo Scientific) og kvaliteten av RNA ble testet med en Bolanalyzer. Resultatet av denne analysen viste at RNA stabiliseringsløsningen var like effektiv på å forhindre degenerasjon av RNA i prøvene som den kommersielle RNAlater løsningen.

Vedlegg 2: Tabeller histologi

Tabell 8: Havforskningsinstituttets standard protokoll for dehydrering og parafin infiltrering av prøver i histokinette (Leika) i kronologisk rekkefølge.

Infiltreringsvæske	Varighet
50 % etanol	1 time
70 % etanol	1 time
80 % etanol	1 time
96 % etanol	2 timer
96 % etanol	2 timer
100 % etanol	2 timer
100 % etanol	2 timer
Xylen, hist	2 timer
Xylen, hist	2 timer
Histo-voks 56-58° C	2 timer
Histo-voks 56-58° C	2 timer

Tabell 9: Varighet og innhold i badene som ble brukt under HES farging

Løsning	Varighet i minutter
Xylen – hist	10
100 % etanol	5
100 % etanol	5
96 % etanol	5
80 % etanol	5
50 % etanol	5
springvann	5
Haematoxylin	2,5
springvann	4
1 % Erythrosin, pH 6,5	1,5
springvann	1
96 % etanol	1
100 % etanol	1
Alkoholisk safron	20 sekunder
100 % etanol	1
100 % etanol	1
Xylen – hist	5
Xylen - hist	5

Vedlegg 3: Histologiskårer

Tabell 10: Oversikt over histologiskårer gitt til de forskjellige fiskegruppene i de forskjellige vevene.

Fisk #	Vev	Laks		Ørret	
		kontroll	kohabitant	kontroll	kohabitant
1	Pankreas	0	2	0	0
2	Pankreas	0	3	0	0
3	Pankreas	0	2	0	0
4	Pankreas	0	1	0	0
5	Pankreas	0	2,5	0	0
6	Pankreas	-	3	-	2
7	Pankreas	-	2	-	0
8	Pankreas	-	1,5	-	0
9	Pankreas	-	-	-	0
10	Pankreas	-	-	-	0
11	Pankreas	-	-	-	2
12	Pankreas	-	-	-	0
13	Pankreas	-	-	-	0
14	Pankreas	-	-	-	1,5
15	Pankreas	-	-	-	1
16	Pankreas	-	-	-	0
1	Ventrikkel	0	3	0	0
2	Ventrikkel	0	1	0	1,5
3	Ventrikkel	0	3	0	0
4	Ventrikkel	0	1	0	0
5	Ventrikkel	0	2	0	0
6	Ventrikkel	-	2,5	-	0,5
7	Ventrikkel	-	2,5	-	0
8	Ventrikkel	-	2,5	-	0
9	Ventrikkel	-	-	-	0
10	Ventrikkel	-	-	-	0
11	Ventrikkel	-	-	-	1,5
12	Ventrikkel	-	-	-	0
13	Ventrikkel	-	-	-	0
14	Ventrikkel	-	-	-	0
15	Ventrikkel	-	-	-	1
16	Ventrikkel	-	-	-	0
1	Skjelettmuskulatur	0	1	0	0
2	Skjelettmuskulatur	0	2	0	2,5
3	Skjelettmuskulatur	0	1	0	0
4	Skjelettmuskulatur	0	1,5	0	0

Anne Moberg Vossgård 2018

5	Skjelettmuskulatur	0	1	0	0
6	Skjelettmuskulatur	-	1	-	0
7	Skjelettmuskulatur	-	1	-	0
8	Skjelettmuskulatur	-	0	-	0
9	Skjelettmuskulatur	-	-	-	0
10	Skjelettmuskulatur	-	-	-	0
11	Skjelettmuskulatur	-	-	-	2
12	Skjelettmuskulatur	-	-	-	0
13	Skjelettmuskulatur	-	-	-	0
14	Skjelettmuskulatur	-	-	-	1,5
15	Skjelettmuskulatur	-	-	-	1,5
16	Skjelettmuskulatur	-	-	-	0