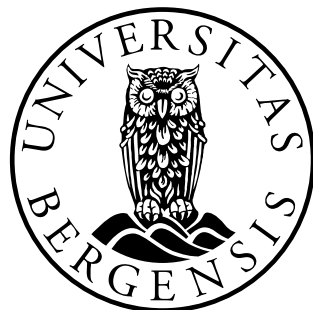


**Et longitudinelt studium av utvalgte gjellepatogener assosiert med
gjellesykdom hos oppdrettslaks i Vest-Norge.**

Master i Fiskehelse

Helene Katrine Kvam



Institutt for biologi

Universitetet i Bergen

Januar 2015

Forord

Jeg vil benytte anledningen til å takke min veileder, professor Are Nylund, for muligheten til å velge denne oppgaven. God oppfølging, engasjement og ærlige tilbakemeldinger settes stor pris på.

Takk til anlegget som materialet er hentet fra og som ga meg grunnlaget for hele oppgaven.

Jeg vil også rette en stor takk til Heidrun Nylund og Kuninori Watanabe som har gitt meg god opplæring på lab'en og vist meg hvordan materialet i oppgaven skulle bearbeides. Steffen Blindheim fortjener en stor takk for å ha startet studiet og gjort det lett for meg og videreføre.

Videre vil jeg takke mine medstudenter på fiskehelse for god støtte og motiverende samtaler underveis. Gode vennskap og et pust i bakken, ofte med altfor lange kaffepauser, settes stor pris på i en intens periode av studiet. En spesiell takk må rettes til Øyvind Tønnessen som har brukt tid på gjennomlesing og gode tilbakemeldinger av oppgaven. I tillegg fortjener Catrine Smørås og Sara Leksen en stor takk for gode vennskap.

Til slutt vil jeg takke min familie for stor tålmodighet og full tilgang på bil den siste tiden av studiet. Jeg vil også takke min beste venninne Amalie for god støtte og omtanke, og beklage at jeg ikke har vært så kjekk å bo med det siste halvåret.

Bergen, januar 2015

Helene Katrine Kvam

Sammendrag

Studien var en longitudinell undersøkelse av forekomst av gjellepatogener. En populasjon av høstutsatt Atlantisk laks på Vestlandet ble fulgt gjennom ett år i sjø (oktober 2013 – september 2014). Det ble utført månedlige uttak av fisk som ble undersøkt for utvalgte gjellepatogener. Hovedfokuset i studien var real-time RT-PCR undersøkelser av *P. theridion*, *Paramoeba* spp., *I. salmonis*, ‘*Ca. B. cysticola*’ og ‘*Ca. S. salmonis*’. I tillegg ble det gjennomført histopatologiske undersøkelser av gjellelev. Det ble registrert høy tilstedeværelse av *P. theridion*, ‘*Ca. B. cysticola*’ og *I. salmonis* gjennom hele studien og i mai nådde de en prevalens på nesten 100 % og stabiliserte seg på dette frem til september. *Paramoeba* spp. og ‘*Ca. S. salmonis*’ viste varierende forekomst med under 50 % prevalens gjennom hele studien. I sommermånedene ble det ikke registrert tilstedeværelse av amøben, og bakterien viste prevalens under 10 %. Ved økt dødelighet på anlegget i september ble det imidlertid registrert en kraftig økning i prevalens av *Paramoeba* spp. og ‘*Ca. S. salmonis*’. Densiteten av alle patogenene økte signifikant mot slutten av studien. For *P. theridion*, ‘*Ca. B. cysticola*’ og *I. salmonis* ble det registrert gradvis økt densitet fra mai. I tillegg til de nevnte patogenene, ble det undersøkt for Piscine reovirus (PRV) og salmonid alfavirus (SAV) på grunnlag av atferdsendringer som ble observert i løpet av studien. SAV ble først påvist i anlegget i juni, og prevalens økte gradvis frem til avslutning av studien. Densitet av viruset viste samme tendenser med høyest tetthet ved siste uttak i september. Tilstedeværelse av PRV ble først observert i desember 2013 og stabiliserte seg raskt med prevalens på 100 % den resterende tiden av studien. Densitetsmålinger av viruset viste seg også og være stabil med en begrenset topp i juli. PRV var dermed det eneste av de undersøkte patogenene som ikke økte i densitet når dødeligheten ved anlegget økte i september etter en lusebehandling i midten av august. Dødeligheten ser ut til å være forårsaket av en kombinasjon av stress, håndtering og forekomst av patogener ettersom økt densitet av *P. theridion*, *Paramoeba* spp., *I. salmonis*, ‘*Ca. B. cysticola*’, ‘*Ca. S. salmonis*’ og SAV ble registrert. I tillegg påvirker temperatur utvikling av gjelleinfeksjon da høy sjøtemperatur er forbundet med høyt smittepress fra patogener. Til tross for delvis manglende temperaturmålinger i løpet av studien, ble det funnet en indikasjon på at temperatur influerer prevalens og densitet av de undersøkte patogenene (bortsett fra PRV).

Histologiske undersøkelser viste sirkulasjonsforstyrrelser med infiltrering av betennelsesceller, og hypertrofi og hyperplasi av epitelceller lignende til beskrivelser gjort ved gjellesykdommen PGI. Histopatologiske undersøkelser sammen med real-time RT-PCR analyser tyder på at fisken i anlegget hadde gjellesykdom ved siste uttak i studiet (september).

Innholdsfortegnelse

Forord.....	3
Sammendrag.....	4
Introduksjon.....	7
Mål for studiet.....	12
Materiale og metode.....	13
Lokalitetsdata.....	14
Populasjonsdata.....	14
Produksjonsdata.....	15
Uttak av fisk og prøvetaking.....	15
Rensing av RNA.....	16
Real-time reverstranskripsjon PCR.....	16
Prevalens.....	18
Optimalisering, effektivisering og normalisering av real-time RT-PCR analyser.....	18
Sekvensering.....	21
Histologi.....	22
Resultat.....	24
Lokalitetsdata.....	24
Temperatur.....	24
Populasjonsdata.....	25
Dødelighet.....	25
Fiskepopulasjonsdata.....	27
Real time RT-PCR analyser.....	28
Optimalisering, effektivisering og normalisering.....	29
Prevalens av undersøkte patogener.....	30
Densitet av undersøkte patogener.....	36
Sekvensering.....	41
Patologi.....	42
Histologi.....	45
Gjelle.....	45
Andre organer.....	49
Diskusjon.....	50
Temperatur.....	50
Dødelighet i anlegget.....	51
Mulige fysiske årsaker til dødelighet på studielokaliteten.....	51

Prevalens og densitet av utvalgte patogener.....	53
Gjellesykdom på studielokaliteten	57
Andre sykdommer	59
Konklusjon	61
Referanser.....	63
Appendiks.....	76
Oppskrifter	76
Programmer	76
Sekvensering.....	78
Rådata.....	78

Introduksjon

Norge er en av verdens største produsenter av Atlantisk laks (*Salmo salar*). De siste årene har produksjonen økt med omtrent 200 000 tonn slaktet laks, henholdsvis fra 944 000 tonn i 2010 til 1 143 700 tonn i 2013 (Hjeltnes, 2011, 2014). De høye produksjonstallene viser at næringen produserer store verdier, og problemer som oppstår underveis i produksjonen kan derfor ha store økonomiske konsekvenser. Gjelleproblemer har lenge vært en utfordring for oppdrett. Årsakene til gjellesykdom er ofte sammensatt og kan være forårsaket av et samspill mellom ulike patogener, miljøforhold og fiskens helsesituasjon (Nylund et al., 2011; Mitchell et al., 2013). Omfanget og alvorlighetsgraden av gjellesykdom kan være vanskelig å fastslå siden problemet ikke er meldepliktig. Når laksen blir sjøsatt som smolt er den i en særlig sårbar fase hvor miljøforandringer, håndtering og patogener kan forårsake sykdom og store tap. Gjelleproblemer forekommer ofte påfølgende høst etter utsett ettersom faktorer som høy salinitet og vanntemperatur kan gjøre fisken svært mottakelig for gjellepatogener (Clark & Nowak, 1999; Ellis & Wootten, 1978; Nowak & LaPatra, 2006; Nylund et al., 2011; Roubal et al., 1989; Sveen et al., 2012).

Gjellene er et av de mest eksponerte områdene på en fisk og er kontinuerlig under påvirkning av miljøet rundt, fra både biotisk og abiotiske faktorer (Soares et al., 2013; Steinum et al., 2010; Sveen et al., 2012). Laks har fire par med gjellebuer som hver innehar en dobbel rekke med primærlameller og sekundærlameller. Gjellelamellenes ytre cellelag består av et tynt dobbellag av epitelceller (Bruno et al., 2013; Ling et al., 2001; Speare & Ferguson, 2006). De er beskyttet av et tynt slimlag som sammen med epitelcellene blir ansett som deler av førstelinjeforsvaret til fisk mot ulike patogener (Ellis, 2001; Fast et al., 2002; Ling et al., 2001). Slim, utskilt fra slimceller (mukocytter/gobletceller) inneholder ulike enzymer og antimikrobielle proteiner og gir både fysisk og kjemisk beskyttelse, og sammen med immunceller kan det redusere/hindre invasjon med patogener (Bruno et al., 2013; Fast et al., 2002; Haugarvoll et al., 2008; Norte dos Santos et al., 2014; Speare & Ferguson, 2006).

Gjellenes store overflate gjør dem godt tilpasset gassutveksling, syre-baseregulering, osmoseregulering og utskillelse av nitrogenrester. I tillegg er gjellene et svært blodrikt organ som dermed gjør de til en mulig inngangsport for patogener. Det er vist gjennom studier at

enkelte patogener kan infiltrere gjellene og transporteres via blodet til andre organer i fisken (Løvoll et al., 2009; Totland et al., 1996; Sveen et al., 2012).

Økt produksjon av slim og økt bevegelse av gjellelokket kan være et tegn på gjellesykdom. I tillegg kan svekket fisk ofte observeres som mørkere og svømme i vannoverflaten for å snappe luft (Speare & Ferguson, 2006). Gjelleforandringer kan være hypertrofi av epitelceller, ødem som forårsaker løfting av epitellaget («lifting») og aneurisme/blødning (Speare & Ferguson, 2006). Senere i infeksjonsløpet (kronisk) kan det observeres hyperplasi av klorid-, slim- og epitelceller. Hyperplasi kan forårsake total sammenvoksing av sekundærlamellene, noe som er svært alvorlig for fiskens helse, deriblant på grunn av dårlig gassutveksling. I tillegg vil det kunne observeres en tilstrømming av betennelsesceller (Speare & Ferguson, 2006).

Infeksjonsagens, mengde og lengde av eksponering er faktorer som påvirker hvordan gjellene responderer på skade. Ofte observeres diffuse skader som strekker seg på tvers av lamellene og påvirker ulike celler, men i andre tilfeller kan kun spesifikke celler eller soner av lamellene være infisert (Speare & Ferguson, 2006); ved sykdommen epiteliocystis kan det observeres hypertrofi av enkelte epitelceller (Draghi et al., 2004; Nylund et al., 1998; Nylund et al., 2008), mens det ved amøbeindusert sykdom kan observeres multifokal hyperplasi som involverer opptil femten sekundærlameller (Adams et al., 2004; Zilberg & Munday, 2005).

Det er hovedsakelig i Sør-Norge at næringen sliter med gjellesykdommer. Flere navn er benyttet i beskrivelsen av disse sykdommene; proliferativ gjelleinflammasjon, PGI (Kvellestad et al., 2005), proliferativ gjellesykdom, PGD (Nylund et al., 2008), amøbisk gjellesykdom, AGD (Munday, 1986), paranucleosporose (Nylund et al., 2011), ichthyobodose (Isaksen et al., 2011) og epiteliocystis (Hoffman et al., 1969). Gjellesykdommer er forbundet med respirasjonsproblemer og sirkulasjonsforstyrrelser som inkluderer blødning, betennelse og både proliferasjon og nekrose av epitelceller (Kvellestad et al., 2005; Nylund et al., 2008; Steinum et al., 2010). Det er mange patogener som kan forårsake gjelleskader, og sykdomsutbrudd ser ut til å ha en multifaktoriell etiologi (Kvellestad et al., 2005; Mitchell et al., 2013; Nylund et al., 2014).

Atlantisk lakseparamyxovirus (ASPV) (Kvellestad et al., 2003) og «salmonid gill poxvirus» (SGPV) (Nylund et al., 2008) er blant de viktigste gjelleviruspatogenene på laks i Norge. I 2005 beskrev Kvellestad et al. funn av ASPV i forbindelse med patologiske endringer i epitel- og endotelceller i laks, men viruset ble ikke detektert i all syk fisk og heller ikke i alle områder med patologiske endringer. Det er observert at SGPV infiserer epitelceller ytterst på

sekundær lammelse og medfører hyperplasi og hypertrofi med degenerasjon av cellekjerne, samt lamellærfusjon (Nylund et al., 2008). Infeksjonen kan medføre histopatologiske endringer der cellene er hypertrofisk og cytoplasma inneholder kondensert kromatin og stor kjerne (svullen før den degenereres). Per dags dato er den etiologiske rollen til ASPV og SGPV i utbrudd av gjellesykdom usikker, men de histologiske endringene assosiert med virusene indikerer at disse kan påvirke respirasjonsevnen til fisken, noe som videre kan medføre økt dødelighet (Kvellingstad et al., 2005; Nylund et al., 2008; Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010).

Amøbisk gjellesykdom ble første gang beskrevet på Atlantisk laks fra oppdrett i Tasmania (Munday, 1986). Få år senere ble *Paramoeba pemaquidensis* (Kent et al., 1988; Roubal et al., 1989) beskrevet som den etiologiske agens for AGD i Tasmania. Amøben er omtalt i litteraturen med to synonyme navn, henholdsvis *Paramoeba* og *Neoparamoeba* (Feehan et al., 2013). I 2005 ble også *Paramoeba branchiphila* (Dykova et al.) beskrevet fra AGD-infisert fisk, og en antok at begge artene kunne utgjøre en blandet etiologi. Flere forsøk på kunstig fremkalling av AGD ved bruk av kultiverte *P. pemaquidensis* viste seg å bli mislykket (Kent et al., 1988; Morrison et al., 2005; Howard et al., 1993; Findlay, 2001). I 2007 ble en ny art av *Paramoeba*, *P. perurans*, beskrevet for første gang av Young et al. (2007), og dette viste seg å være forklaringen på hvorfor de tidligere forsøkene mislyktes. *P. perurans* ble med en gang assosiert til AGD, og ble antatt å være det egentlige etiologiske agens til AGD i Tasmania. Året etter ble det publisert en ny artikkel som konkluderte med at *P. perurans* er den kosmopolitiske etiologiske agens for AGD (Young et al., 2008).

AGD, forårsaket av *P. perurans*, er nylig blitt et problem for den norske oppdrettsnæringen. Amøben ble første gang identifisert fra sykdomsutbrudd i Norge i 2006 (Nylund et al., 2007, Steinum et al., 2008), men ble deretter ikke assosiert med sykdom i Norge før 2012 (Hjeltnes, 2013). De to siste årene er det observert en økning av problemet, med størst utbredelse i Hordaland, Rogaland og Sogn og Fjordane (Hjeltnes, 2013). Sykdommen forekommer på høsthalvåret med begynnende sykdomstegn i september og gir økende problemer utover høsten. Det er i denne perioden vanntemperaturen og saliniteten ofte er høyest. Amøben trives best ved salinitet rundt 32-35 ‰, og en temperatur på mellom 10 og 20 °C (Clark & Nowak, 1999; Munday et al., 1990; Steinum et al., 2008). Kliniske symptomer kan ses som sløv fisk med utstående gjellelokk som følge av respirasjonsproblemer. Patologisk kan det observeres mye

slim på gjellene og mest karakteristisk for AGD er multifokale lyse områder som kalles «patches» (Adams et al. 2004; Butos et al., 2011; Crosbie et al., 2012; Steinum et al. 2008; Zilberg & Munday, 2005). Etter kronisk sykdom kan fisken dø av respirasjons- og sirkulasjonsproblemer (Kent et al., 1988; Nylund et al., 2008; Powell et al., 2008; Steinum et al., 2008). Histopatologisk karakteriseres AGD hos laks ved hyperplasi og hypertrofi av epitelceller, samt fusjon av sekundærlamellene med dannelse av kaviteter kombinert med tilstedeværelse av *P. perurans* (Adams et al., 2004; Butos et al., 2011; Crosbie et al., 2012; Kent et al., 1988; Roubal et al., 1989; Steinum et al., 2008; Young et al., 2008; Zilberg & Munday, 2005). De histologiske endringene er assosiert til områdene med de karakteristiske makroskopiske «patchene» (Adams et al., 2004).

Paranucleospora theridion (syn. *Desmoozon lepeophtherii*; Freeman & Sommerville, 2009) er en vanlig parasitt på laks i Sør-Norge og kan finnes på fisk uten klare sykdomstegn (Freeman & Sommerville, 2009; Nylund et al., 2010; Steinum et al., 2010; Sveen et al., 2012). Ved gjellesykdommer hos laks er det imidlertid observert betraktelig høyere mengde av parasitten, noe som tyder på at den har en rolle i sykdomsforløpet (Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). Det er uvisst om *P. theridion* er primærårsak til sykdom, men sammen med andre patogener er den observert i forbindelse med hyperplasi, hypertrofi, betennelse og nekrose på gjeller (Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). Microsporidien ble først observert som en hyperparasitt på lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og senere identifisert fra Atlantisk laks (Freeman et al., 2003; Nylund et al., 2010). Parasitten har de to første delene av livssyklusen i laksefisk og siste del av syklusen i lakselus (Freeman & Sommerville, 2009; Nylund et al., 2010; Sveen et al., 2012). Andre stadiet i livssyklusen til parasitten forekommer i laksens hud og det er trolig ved beiting på epidermis at lusen blir infisert (Sveen et al., 2012).

I tillegg til de nevnte patogener blir det ofte observert betydelige mengder av parasitten *Ichthyobodo salmonis* på laks med gjellesykdommer (Isaksen et al., 2011; Todal et al., 2004). *Ichthyobodo* spp., er viktige patogener på oppdrettet atlantisk laks i Norge. Tidligere ble det antatt at *I. necator* (Henneguy, 1883) var euryhalin og infiserte laks i både ferskvann og saltvann (Bruno, 1992; Ellis & Wootten, 1978). Etter observasjoner av flere morfologiske- og størrelsesvariasjoner (Bruno, 1992; Roubal & Bullock, 1987) av *Ichthyobodo* sp. funnet i ferskvann og saltvann, ble det i 2004 gjennomført molekulære undersøkelser som konkluderte med at det var to distinkte *Ichthyobodo*-spp. (Isaksen et al., 2011; Todal et al., 2004). *I. necator* infiserer både gjeller og hud på laksefisk og er trolig begrenset til ferskvann, mens *I. salmonis* er antatt å være den euryhaline arten og infiserer gjellene til Atlantisk laks i ferskvann og

saltvann (Isaksen et al, 2010; Isaksen et al., 2011). Kliniske tegn på infeksjon observeres som blinking («flashing») der fisken prøver å klø seg i kar/notveggen og ved at fisken får et grålig slør på dorsale overflater (Isaksen et al., 2010). Parasitten kan forårsake skade på gjelleepitelet med hyperplasi av epitelceller og lamellærfusjon, samt økt antall av slimceller på sekundærlamellene (Bruno, 1992; Ellis & Wootten, 1978). Det er vanlig å finne andre patogener på gjellene i tillegg til *Ichthyobodo* sp., og det kan dermed være vanskelig å konkludere med at skadene som observeres er grunnet *Ichthyobodo*-infeksjon. Videre er *Ichthyobodo*-lignende flagellater funnet å ha en sammenheng med AGD, da det er en korrelasjon mellom sykdommen og mengden av denne parasitten på gjellene til laks (Bermingham & Mulcahy, 2006).

Epiteliocystis (Hoffman et al., 1969) er en gjellesykdom hos laks som er assosiert med bakteriene '*Candidatus* (*Ca.*) *Piscichlamydia salmonis*' (Draghi et al., 2004), '*Ca. Clavichlamydia salmonicola*' (Karlsen et al., 2008), '*Ca. Branchiomonas cysticola*' (Toenshoff et al., 2012) og '*Ca. Synonymydia salmonis*' (Nylund et al., 2014). Sykdommen gir epitelial hypertrofi og i enkelte tilfeller gjellehyperplasi og gjellebetennelse (Draghi et al., 2004; Mitchell et al., 2013; Nylund et al., 1998; Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). Sykdommen kan karakteriseres ved cystedannelse i gjelleepitelceller observert som hypertrofe med vakuoler som inneholder store mengder bakterier og der nukleus er presset mot periferien (Draghi et al., 2004; Hoffman et al., 1969; Nylund et al., 1998; Nylund et al., 2008; Nylund et al., 2014). Det er foreslått at '*Ca. B. cysticola*' er primær patogen i cystene (Mitchell et al., 2013; Toenshoff et al., 2012). Rollen til '*Ca. P. salmonis*' i sykdomsutbrudd er usikker, men bakterien blir observert i større grad ved utbrudd og antas dermed å ha en sammenheng med epitheliocystis (Mitchell et al., 2013; Steinum et al., 2010; Toenshoff et al., 2012). Nylig ble en ny art av *Chlamydia* beskrevet, '*Ca. Synonymydia salmonis*', og assosiert med epitheliocystis hos laks, men med en ukjent betydning for gjellesykdommer (Nylund et al., 2014).

Mål for studiet

Målet med dette studiet var å følge forekomst av gjellepatogener i et høstutsett av Atlantisk laks gjennom deler av produksjonsperioden på Vestlandet. Anlegget er lokalisert i et område hvor gjellesykdommer er hyppig forekommende, og materialet inkluderte høst 2013 og hele 2014 frem til oktober måned. Videre ble dynamikken i sykdomsforløpet og forekomst av gjellepatogener kartlagt. Hovedfokus var på parasittene *Paranucleospora theridion*, *Ichthyobodo salmonis*, *Paramoeba spp.*, og bakteriene *Ca. Branchiomonas cysticola* og *Ca. Syngnamydia salmonis*. På grunn av funn gjort underveis i studiet ble det i tillegg undersøkt for virusene PRV og SAV.

Materiale og metode

Fisk, sykdomshistorie og miljødata ble samlet inn fra ett oppdrettsanlegg i Sogn og Fjordane. Fisken ble fulgt fra utsett i sjø (oktober 2013) med et referanseuttak av fisk rett før utsett (ferskvann), og til økende dødelighet i september 2014. Det ble tatt ut 20-30 fisk en gang i måneden (Tabell 1). Det ble lagt vekt på å sikre materiale fra både «svimere» og tilsynelatende frisk fisk ved uttak.

Tabell 1: Uttak av Atlantisk laks i sjø med et referanseuttak fra ferskvann i perioden oktober 2013 til september 2014. For hvert uttak er det notert antall fisk og registrert gjennomsnittsvekt og -lengde på fisken.

Dato for uttak:	Antall fisk:	Vekt (g)	Lengde (cm)
03.10.2013 (ferskvann)	20	80	19
15.10.2013 (10 dager i sjø)	12	87	20
21.10.2013	10	119	22
21.11.2013	20	202	26
16.12.2013	10	310	29
17.01.2014	10	344	32
18.02.2014	32	343	31
26.03.2014	30	203	27
04.04.2014	60	512	36
13.05.2014	30	506	36
18.06.2014	30	824	42
23.07.2014	30	1398	49
15.08.2014	30	1685	50
04.09.2014	6	1618	53
17.09.2014	27	1751	54

I perioden 03.10.13-17.09.14 ble totalt 357 atlantiske laks undersøkt, fordelt på 15 uttak. Fra oktober 2013 til januar 2014 var en stipendiat ved UiB (Steffen Blindheim) ansvarlig for uttakene, mens de resterende uttakene og følgelig disseksjon ble utført av Helene K. Kvam.

Lokalitetsdata

Det undersøkte anlegget er lokalisert i Sogn og Fjordane. Anlegget produserer matfisk av Atlantisk laks (*Salmo salar*), disponert på to 157-meters ringmerder med omtrent 35 meters dybde. Lokaliteten ligger kystnært og åpent med relativt høy salinitet, det vil si lite ferskvannstilrenning i området. Det er varierende bunntopografi med 60-120 meters dyp under anlegget. Strømforholdene ved lokaliteten er gode med middels sterk strøm som hovedsakelig veksler mellom nordvest og sørøst i følge en lokalitetsundersøkelse utført i 2013.

Det foreligger ingen diagnoser gitt i tidligere generasjoner ved anlegget.

Populasjonsdata

5. og 6. oktober 2013 ble det sjøsatt en populasjon av 0-årig smolt av stammen SalmoBreed ved anlegget. Smolten kom fra et settefiskanlegg i Hordaland fylke. Det er ikke kjent om det var sykdom og dødelighet under smoltproduksjonen. Vaksinerings av smolten ble gjort med Alphaject 6 (mot *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* serotype O1 og O2 α , *Vibrio salmonicida*, *Moritella viscosa* og infeksjøs pankreasnekrosevirus (IPNV)) og Norwax® Compact PD vet. (mot Pankreassykdom). Fisken ble holdt omkring 600 døgngader etter vaksinerings før utsett (personlig meddelelse lokalitetsansvarlig).

Smolten ble fordelt på to merder ved sjøsetting (tabell 1), der merd 1 fikk 253 396 fisk med gjennomsnittsvikt på 119 g og merd 2 fikk 143 004 fisk med gjennomsnittsvikt på 92,4 g. Det ble ikke differensiert mellom merdene ved uttak av fisk til studiet.

Tabell 2: Utsettinformasjon med merdfordeling av fisk, gjennomsnittlig vekt og biomasse ved sjøutsett.

Merd	Antall fisk	Snittvekt (g)	Biomasse (kg)
1	253 596	119	30 154
2	143 004	92,4	13 216

Produksjonsdata

Driftsteknikere på anlegget registrerte daglig dødelighet, så fremt det var forsvarlig. Utfra disse dataene og antall sjøsatte fisk, ble det regnet ut akkumulert dødelighet gjennom uttaksperioden. Daglig dødelighet ble samlet til total ukentlig dødelighet for å gjøre grafen mer oversiktlig. Sjøtemperaturen på lokaliteten ble målt på 5-meters dyp, og ukentlig gjennomsnitt registrert. I tillegg ble overflatetemperatur notert annenhver måned av ansvarlig veterinær.

Fiskenes gjennomsnittlige kondisjonsfaktor ble regnet ut for hvert uttak. Kondisjonsfaktor (K) er et mål på fiskens fysiske tilstand og beregnes ut fra forholdet mellom vekt ($V = g$) og lengde ($L = cm$). Fultons formel ble brukt til utregning:

$$K = \frac{V \times 100}{L^3}$$

Uttak av fisk og prøvetaking

Fisk brukt i studiet ble avlivet med slag i hodet for ikke å påvirke analysene i ettertid. I enkelte tilfeller ble strupen kuttet. Ved bruk av denne avlivningsmetoden er det fare for kontaminering av prøvemateriale fra gjelle og hjerte. Det er derfor notert hvilke fisk dette gjelder. Samme dag som avlivning ble fisken transportert med bil i omtrent 2,5 timer i isoporbokser med is til fiskesykdomslaboratoriet ved Universitetet i Bergen (UiB) der analyseprøvene ble tatt. Ved uttak av prøver til histologi, ble de aktuelle fiskene dissekert på anlegget rett etter avlivning for å sikre så ferske prøver som mulig uten begynnende degenerering av vevene. Analyseprøver av disse fiskene ble da tatt samtidig. Alle prøvene (histologi- og analyseprøver) ble umiddelbart plassert på is.

Fisken ble dissekert kort tid etter uttak, eller lagt på frys ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dersom det ikke var mulig å gjennomføre disseksjon samme dag. Vevsprøver av gjelle og nyre ble tatt ut og lagret på mikrotuber (1,5 mL, Axygen®) ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for senere ekstrahering av RNA. I tillegg ble det tatt ut større prøver av gjeller, nyre og hjerte som ble lagret på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ som «backup» prøver (Nunc, Thermo Scientific). Vevsprøvene ble hentet ut fra tilnærmet samme område på hver fisk, henholdsvis 2. gjellebue, hodenyre og ventrikkelspiss. Mellom hvert organuttak ble disseksjonsutstyret desinfisert (etanol og avbrenning) for å hindre kontaminering mellom de ulike vevene og fiskene. Før organuttak ble det målt lengde (gaffellengde) og vekt på fisken, med unntak av fisk brukt til histologi ettersom det ikke var tilgjengelige redskaper for dette på anlegget. I tillegg ble makroskopisk patologi notert.

Rensing av RNA

Til rensing av RNA ble det brukt en metode beskrevet av Devold et al. (2000) med enkelte modifikasjoner. Analyseprøvene ble homogenisert ved tilsetning av 1000 µL Iso-RNA Lysis Reagent (5 Prime) og kjørt i TissueLyser LT (Qiagen) i 5 min (50 oscilleringer). Deretter ble prøvene spunnet ned og inkubert i romtemperatur i 15 min. 200 µL kloroform (Sigma-Aldrich) ble tilsatt og etterfulgt av 15 sek vortex (IKA®), ny inkubering i 5 min og sentrifugering (Thermo Scientific) i 15 min (12 000 rpm, ~4°C). Under sentrifugering skilles vandig fase med RNA fra protein og DNA. RNA ble overført til en ny mikrotube og tilsatt 500 µL isopropanol (Kemetyl). Den nye blandingen ble deretter vortexet og inkubert i romtemperatur i minst 10 min, etterfulgt av sentrifugering i 15 min (12 000 rpm, ~4°C). Etter sentrifugeringen ble det dannet en RNA-pellet. Isopropanol ble fjernet og røret ble tilsatt 70 % etanol (1000 µL) (>99,8 %, Sigma-Aldrich) for vasking av pellet før det ble sentrifugert i 5 min (9500 rpm, ~4°C). Etanol (70 %) ble fjernet og vaskeprosedyren gjentatt med 99 % etanol (1000 µL), og etterfulgt av ~10 min tørking av pellet. Tilslutt ble det tilsatt 50-100 µl RNase fritt vann (70°C) (Sigma®), avhengig av størrelsen på pellet. RNA-analysene ble lagret på -20 °C.

Real-time reverstranskripsjon PCR

De rensede RNA prøvene ble undersøkt i en real-time reverstranskripsjon (RT)-PCR reaksjon for å gi en semikvantitativ fremstilling av måltemplat (RNA) i analyseprøvene. Detektering av oppformert mål-RNA/templat i reaksjonene genererer et fluoreserende signal som øker eksponentielt frem til kritiske komponenter tar slutt. Ct-verdi (threshold cycle, terskelverdi) er et mål på antall sykluser som må gjennomføres før det er oppformert nok måltemplat/RNA for å nå en gitt terskelverdi (Kubista et al., 2006). Terskelverdien i dette studiet ble satt til 0,1 på alle utførte analyser. Desto lavere Ct-verdien i en prøve er, desto høyere innhold av det gitte RNA-et er tilstede i prøven.

For real-time RT-PCR analyse ble det brukt buffer (2X RT-PCR) og enzym (25X RT-PCR) fra AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies). Primere og prober som ble brukt i studiet er listet opp i Tabell 3. Det ble for hver tiende reaksjon satt opp negativ rensek kontroll og negativ templatkontroll (NTC), for å undersøke for eventuell kontaminering av analyseprøvene.

Tabell 3: Oversikt over primer- og probesekvenser som er brukt i studiet.

Assay	Primere og prober	Referanse
Elongeringsfaktor for laks (ELA)	Forward – CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA Reverse – CAC ACG GCC CAC AGG TAC A Probe – ATC GGT GGT ATT GGA AC	Olsvik et al., 2005
<i>Paranucleospora theridion</i> (Nuc)	Forward – CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG Reverse – GGT CCA GGT TGG GTC TTG AG Probe – TTG GCG AAG AAT GAA A	Nylund et al., 2010
<i>Paramoeba perurans</i> (Neo)	Forward – GCT CGT AGT TGG ATT TTG AAG TTT ACA Reverse – GGA GAA GTA CAT ATC ACA ACA AAA CAC A Probe – TTA TGA CCC CCT TTG TAT TAG	Nylund et al., 2011
<i>Paramoeba</i> spp. (Neo-ny)	Forward – TTG TCA GAG GTG AAA TTC TTG GAT T Reverse – TGA AAA CAT CTT TGY CAA ATG C Probe – ATG AAA GAC GAA CTT CTG	Smørås, 2014
‘<i>Ca. Branchiomonas cysticola</i>’ (Epit)	Forward – GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA GTG Reverse – CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C Probe – ACT TAG CGA AAG TTA AGC	Tolås, 2012
<i>Ichthyobodo</i> spp. (Costia)	Forward – ACG AAC TTA TGC GAA GGC A Reverse – TGA GTA TTC ACT YCC GAT CCA T Probe – TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G	Isaksen et al., 2012
<i>Syngnamydia salmonis</i> (Sch)	Forward – GGG TAG CCC GAT ATC TTC AAA GT Reverse – CCC ATG AGC CGC TCT CTC T Probe – TCC TTC GGG ACC TTA C	Nylund et al., 2014
Piscine Reovirus (PRV-M2)	Forward – CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA Reverse – GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG Probe – CTG GCT CAA CTC TC	Repstad, 2011
Piscine myocarditt virus (PMCV-2)	Forward – AGG GAA CAG GAG GAA GCA GAA Reverse – CGT AAT CCG ACA TCA TTT TGT GA Probe – TGG TGG AGC GTT CAA	Dette studiet

Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV, seg. 7)	Forward – TGG GAT CAT GTG TTT CCT GCT A Reverse – GAA AAT CCA TGT TCT CAG ATG CAA Probe – CAC ATG ACC CCT CGT C-MGBNFQ	Plarre et al., 2005
Salmonid alfavirus (SAV-nsp1)	Forward – CCG GCC CTG AAC CAG TT Reverse – GTA GCC AAC TGG GAG AAA GCT Probe – TCG AAG TGG TGG CCA G	Hodneland & Endresen, 2006

Det ble laget en mastermix av 1,96 µL RNase fritt vann, 6,88 µL buffer, 1,10 µL forward og revers primer, 0,24 µL probe og 0,28 µL enzym. Til sammen rommet blandingen 10,5 µL og det ble senere tilsatt 2 µL templat (RNA), til et totalvolum på 12,5 µL. Prøvene ble kjørt i Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System og Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System. Reaksjonene fulgte et «Standard AgPath»-program i henhold til anbefalinger gitt av AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies)-bruksanvisningen. Programmet innebar revers transkripsjon i 10 min på 45°C, inaktivering av revers transkriptase og aktivering av DNA polymerase i 10 min på 95°C, og 45 sykluser med amplifikasjon med henholdsvis 15 sek på 95°C og 45 sek på 60°C.

Prevalens

Prevalens er antall positive analyseprøver delt på totalt antall undersøkte prøver og oppgis ofte i prosent (%). Prevalens ble regnet ut for utvalgte patogener på gjellene ved hjelp av formelen under:

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

Denne metoden for datafremstilling ble benyttet for å gi en oversikt over hvor vanlig forekomsten av ulike patogener var i studiet. Ved å fremstille dataene i grafer kan en enkelt få overblikk over økt, stabil og redusert tilstedeværelse av patogenene.

Optimalisering, effektivisering og normalisering av real-time RT-PCR analyser

Optimalisering utføres for å finne de primer- (forward og revers) og probekonsentrasjonene av et gitt assay som gir de beste/laveste Ct-verdiene og samtidig de høyeste grafene i real-time RT-PCR analyser. Assayene brukt i dette studiet er optimalisert i tidligere studier og forsøk

(Tabell 4). Av den grunn ble det kun gjennomført optimalisering for ‘*Ca. Branchiomonas cysticola*’ ettersom assayet hadde svært lave Ct-verdier ved siste uttak (Ct = 8,2).

Tabell 4: Oversikt over effektiviteten til ulike assay brukt i studiet.

Assay	Effektivitet	Referanse
Elongeringsfaktor (EFA1 α)	1,987	Sveen, 2010
<i>P. theridion</i> (Nuc)	1,9698	Repstad, 2011
<i>Paramoeba</i> spp. (Neo-ny)	2,2295	Smørås, 2014
<i>I. salmonis</i> (Costia)	1,92	Isaksen et al., 2012
Piscine reovirus (PRV-M2)	1,987	Repstad, 2011
Salmonide alfavirus (SAV-nsp1)	1,985	Skjold, 2014

Det ble benyttet Standard AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies)-konsentrasjoner for buffer, probe og enzym ble benyttet for å bestemme optimalkonsentrasjonene til primerne. Vannkonsentrasjonen (RNase fritt) varierte for å opprettholde et standardvolum på 10,5 μ L. De ulike konsentrasjonene som ble brukt for å teste forward/revers primer i dette studiet var henholdsvis 300/300 nM, 300/600 nM, 300/900 nM, 600/300 nM, 600/600 nM, 600/900 nM, 900/300 nM, 900/600 nM og 900/900 nM. Da den optimale forward/revers primerkonsentrasjonen var funnet, ble den brukt for å teste optimalkonsentrasjonen av probe, med konsentrasjoner på henholdsvis 50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM, 175 nM, 200 nM og 225 nM. Alle konsentrasjonene for både primere og prober ble testet i triplikater.

Ved å anvende en effektivitetstest kan en måle hvor godt et assay er til å detektere RNA. Denne metoden ble gjennomført ettersom det er enklere å sammenligne resultatene når en vet at effektiviteten til de ulike assayene er tilnærmet lik. Testen ble utført ved hjelp av en real-time RT-PCR analyse og det ble benyttet en fortynningsserie (10^0 - 10^{-8}) av templat/RNA. Deretter ble det fremstilt blandinger med de ulike konsentrasjonene fra fortynningsserien, optimalisert forward og revers primer og probe, i tillegg til standard AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies)-konsentrasjoner med buffer og enzym. Til slutt ble det tilsatt RNase fritt vann i varierende mengder for å justere totalvolumet i blandingen til 10,5 μ L. Blandingene ble kjørt i triplikater i real-time RT-PCR. Ct-verdi for hvert triplikat ble deretter plottet inn i en

standardkurve i Microsoft Excel der stignings- og regresjonstallet til assayet ble fastslått. Til utregning av assayeffektiviteten (E) ble formelen under benyttet (Pfaffl et al., 2004):

$$E = [10^{-1/\text{stigningstall}}]$$

Ved bruk av en kombinasjon av et bestemt assays effektivitet og assayets tilsvarende Ct-verdier, kan en regne ut densiteten av dette patogenet. Metoden regner ut normalisert uttrykk (NE) og setter det gitte assayets effektivitet og Ct-verdi opp mot korresponderende verdier fra referansegenet (elongeringsfaktor, EFA1_α). Normalisert genuttrykk (NE) bestemmes ved bruk av formelen under (Simon, 2003):

$$NE = \frac{(E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(E_{mål})^{Ct_{mål}}}$$

Det ble regnet ut NE for utvalgte assay, i tillegg til ‘*Ca. B. cysticola*, i studiet ved hjelp av tidligere publiserte effektivitetsverdier.

Densitet brukes for å klarlegge tettheten av et bestemt patogen på et gitt område. I dette studiet er ‘området’ definert til tuppene av primærlamellene dorsalt ved «knekken» på 2. gjellebue. Mens prevalens kun forteller hvor mange individer som er infisert av et gitt patogen, forteller densitet hvor mange av et bestemt patogen (RNA-templat) fisken er infisert med. Lave Ct-verdier av et gitt patogen tyder på at tettheten av patogenet er høy, og at infeksjonspresset til patogenet er tilsvarende høyt. Likevel trenger ikke et høyt infeksjonspress (lav Ct) nødvendigvis bety at individet som er infisert har utviklet sykdom.

Det normaliserte uttrykket til de ulike assayene ble regnet om til NE-fold. Utregning av NE-foldsøkning ble gjort ved å sette det normaliserte uttrykket (NE) til hver analyse opp mot minste NE-verdi gjennom studien ved hjelp av formelen:

$$NE_{fold} = \frac{NE}{NE_{min}}$$

Deretter ble verdiene fra NE-foldsøkning Log₂ transformert for å presentere resultatene på en oversiktlig måte.

Sekvensering

Sekvensering er en metode som utnyttes for stadfesting av enten en ukjent eller en bestemt genfrekvens. Ved bruk av primere for detektering av templat og fluoriserende markører, kan en etter endt sekvensering lese av en gitt genfrekvens/fragmenter.

Sekvenseringsprosessen utnytter cDNA. Det er derfor nødvendig å omgjøre RNA (brukt i real-time RT-PCR) til cDNA ved revers transkripsjon (RT). Metoden innebærer blanding av forward og revers primer (1 μL av hver), RNase fritt vann (4 μL) og templat (4 μL) som tilsettes i Eppendorf® PCR-rør (0,2 ml). Prøvene ble spunnet ned og plassert i Applied Biosystems GeneAmp® PCR Systems 2700 for behandling etter et standard «HP-RT» program (se appendiks). Programmet ble stoppet etter 5 minutter for tilsetning av RNase fritt vann (7 μL), M-MLV RT 5x Buffer (5 μL) (Promega), deoksyribonucleotid trifosfat (dNTP, Sigma, LifeScience) (4 μL) og M-MLV reverse transcriptase (0,5 μL) (Promega) og kjørt videre i en time i henhold til programmet. Etter gjennomført RT-prosess ble cDNAet overført til nye 0,2 mL Eppendorf® PCR-rør og tilsatt RNase fritt vann (16,85 μL), Taq DNA Polymerase 10x buffer (2,5 μL) (Promega), dNTP (1,5 μL), forward og revers primer (1 μL av hver) og Taq-enzym (0,15 μL) (BioLabs). Blandingen hadde totalkonsentrasjon på 25 μL . Prøvene ble deretter forflyttet til Applied Biosystems GeneAmp® PCR Systems 9700 og kjørt etter «HP50»-standardprogram for PCR (se appendiks).

Det ble gjennomført gelelektroforese for å kontrollere om det brukte templatet ble detektert av de valgte primerne. Dette ble undersøkt ved først å lage en agarose gel (25 μL) (oppskrift i appendiks) tilsatt 2,5 μL GelRed Nucleic Acid stain (Biotium). Gelen brukte 15 min for å stivne og ble etterfulgt av tilsetning av TAE-buffer som dekket hele gelen. Deretter ble PCR-produkt (5 μL) blandet med 6X loading buffer (BigDye®) (1 μL) før det ble tilsatt i en brønn i gelen. I tillegg ble det tilsatt SmartLadder (2,5 μL) i den første brønnen som et referansepunkt for antall basepar (bp) PCR-produktet uttrykte. Følgelig ble gelen tilkoblet 90 V strøm i omtrent 30 min. Til slutt ble gelen analysert under UV-lys ved bruk av programmet Carestream MI GelLogic 212PRO for syning av bp-bånd som viste hvor lang sekvensen var (antall bp).

Ved påvist produkt fra PCR-reaksjonen, ble det laget en blanding av PCR-produktet (2,5 μL) og ExoSAP-IT® (1 μL) (Affymetrix®) som ble kjørt i Eppendorf® Mastercycler Gradient etter standardprogrammet «Exosap» (se appendiks). Etter endt program ble prøvene brukt som templat i den følgende sekvenseringsreaksjonen med bruk av BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Templatet (1 μL) ble tilsatt i to Eppendorf® PCR-rør

med blandinger av BigDye® (1 µL), BigDye® 5X buffer (1 µL) og RNase fritt vann (6 µL). Deretter ble det tilsatt forward primer (1 µL) i ett av Eppendorf® PCR-rørene og revers primer (1 µL) i det andre Eppendorf® PCR-røret. Blandingene ble dernest behandlet i Eppendorf® Mastercycler Gradient i henhold til standardprogrammet «Big» (se appendiks). Da programmet var ferdig ble prøvene levert til Sekvenseringslaboratoriet ved UiB for prosessering av gensekvenser.

Det ble gjennomført sekvensering for *P. theridion*, *P. perurans*, ‘*Ca. B. cysticola*’, *I. salmonis*, ‘*Ca. S. salmonis*’, PRV og SAV (Tabell 5).

Tabell 5: Oversikt over primere som ble brukt til sekvensering. Det er i tillegg oppgitt informasjon om antall basepar i primersekvensene brukt. Tabell med primersekvensene er vedlagt i appendiks. Nuc = *P. theridion*, Neo = *P. perurans*, Epit = ‘*Ca. B. cysticola*’, Costia = *I. salmonis*, Sch = ‘*Ca. S. salmonis*’, PRV = piscine reovirus, SAV = salmonid alfhavirus

Assay	Primerkombinasjoner		Antall basepar (bp)
	Forward (F)	Revers (R)	
Nuc	Nuc F1	Nuc R1	Ca. 500
Neo	Y08-NeoPeru F NP-F12	Y08-NeoPeru R NP-R11	Ca. 1000
Epit	BProto-F1	806 R	Ca. 675
	BProto-F2	Pic-R1	
Costia	Cos F1	Cos R6	Ca. 1800
	Cos F1	Cos R4	Ca. 1000
	Cos F3	Cos R6	Ca. 250
Sch	Pic F1	16sB1	Ca. 662
	16sig F	806 R	
	ChI-ITS-F1	ChI-ITS-R1	
PRV	S2-F1	S2-R2	Ca. 1180
	S2-F2	S2-R3	
SAV	F1600	R2357	Ca. 750
	F2234	SAV 20R	

Histologi

Det ble foretatt anleggsbesøk for å ta ut gjellevev fra tilfeldig utvalgte friske og syke fisk til histologi. Gjellevevet ble lagret på modifisert Karnovsky fiksativ (4 °C) (Nylund et al., 1995,

oppskrift i appendiks) for senere histopatologiske undersøkelser. I tillegg ble histologiprøver fra hjerte og nyre, samt milt og lever fra enkelte uttak, lagt på modifisert Karnovsky fiksativ (4 °C). Metoden brukes for å observere og registrere endringer i celle- og vevsstrukturer, samt å identifisere tilstedeværelse av patogener. Videre ble prøvene prosessert i henhold til rettledning av Techovit® 7100 The Sliceable. Metoden innebærer fire steg med henholdsvis fiksering og dehydrering, pre-infiltrering, infiltrering og polymerisering.

Etter filtrering i modifisert Karnovsky fiksativ, ble vevene (maks 3 mm) vasket tre ganger med grunnmedium (oppskrift i appendiks). Deretter fulgte dehydrering med 70 % etanol og to runder med 96 % etanol, henholdsvis 30 min per runde. Etter dehydreringen, ble det tilsatt en 50/50 blanding av 96 % etanol og Technovit® 7100 The Sliceable for pre-infiltrering. Blandingen skal stå i omtrent fire timer, og ble etterfulgt av infiltreringsstadiet som ble stående i omtrent 12 timer, avhengig av størrelse og hvilket organ prøven er av. Infiltreringsblandingen bestod av 100 mL Technovit® 7100 The Sliceable og ett gram Technovit® 7100 The Sliceable hardner 1. Til innstøping av organene ble det brukt en blanding av Technovit® 7100 The Sliceable hardner 1 (15 mL) og hardner 2 (1 mL), som måtte stå i to timer for å bli polymerisert.

Snittene til histologi ble kuttet ved hjelp av Reichert-Jung 2050 supercut. For best mulig kvalitet ble stiftet trimmet til en fikk en god snittoverflaten av vevet. 8-10 snitt ble laget fra hver stift og lagt på objektglass, tørket og farget med toluidin-blå. Etter omtrent ett minutt i farge, ble objektglasset vasket i lunket vann til kun snittene bar farge. Når de er tørket, limes dekkglass på og snittene var klar til å bli mikroskopert.

For undersøkelse av vevene ble Zeiss® Axio Scope.A1 med AxioCam 105 color-kamera benyttet.

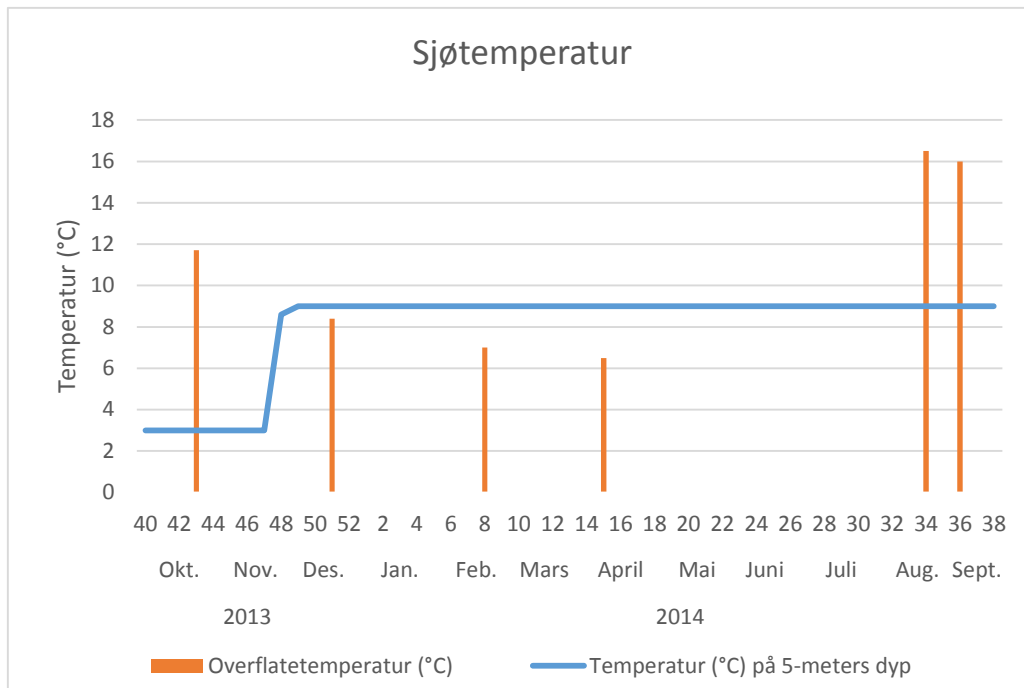
Det ble lagt mye vekt på forståelse og grundig gjennomgang av histologisnittene for å kunne utlede en konklusjon om mulig sykdom og tilstedeværelse av patogener. Identifisering/karakterisering av ulike patogener er derimot ikke mulig ved kun bruk av histologi, men sammen med real-time RT-PCR kan en få en oppfatning av hvilke patogener som er tilstede.

Resultat

Lokalitetsdata

Temperatur

Temperaturene ble målt på 5-meters dyp, og store variasjoner mellom månedene kommer dermed ikke til uttrykk. I tillegg ble overflatetemperaturer notert da den ansvarlige lokalitetsveterinæren var på rutinekontroll på anlegget. Veterinæren hadde rutinekontroll omtrent annenhver måned, og temperatur ble dermed registrert for oktober (uke 43, 2013), desember (uke 51, 2013), februar (uke 8, 2014), april (uke 15, 2014) og august (uke 34, 2014). Temperaturen i juni ble ikke notert. Det ble derimot notert en ekstra temperaturmåling i begynnelsen av september (uke 36, 2014) på grunn av et ekstra anleggsbesøk av veterinæren. Til tross for få målinger fra veterinærrapportene, ble det likevel valgt å bruke målingene både fra 5-meters dyp og fra veterinæren, siden det ga et mer helhetlig bilde av temperaturforholdene ved anlegget. Figur 1 viser stabil temperatur gjennom stort sett hele uttaksperioden ved 5-meters dyp (blå linje) ettersom temperaturen holdt seg på 9 °C fra begynnelsen av desember 2013 (uke 49) og til midten av september 2014 (uke 38). Ved starten av studiet ble havtemperaturen målt til 3 °C som økte til 8,6 °C i slutten av november. Samtidig viser grafen at det var betydelige forskjeller i overflatetemperaturene (oransje stolper) med en gradvis redusering fra oktober 2013 og til april 2014. I august og september 2014 ble det målt høye temperaturer tilsvarende temperaturen i oktober året før.



Figur 1: Oversikt over målte sjøtemperaturer gjennom studiet. Temperaturmålinger på 5-meters dyp ble notert hver uke, men overflatetemperaturen ble registrert omtrent annenhver måned.

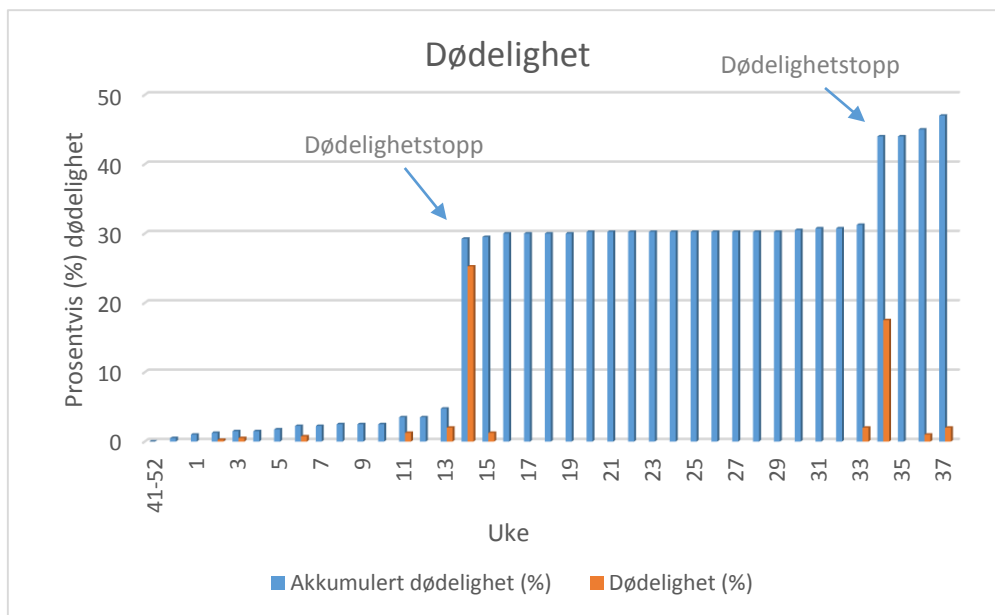
Populasjonsdata

Dødelighet

Gjennom hele studiet var det generelt lite dødelighet på lokaliteten (Figur 2). Fra oktober til desember 2013 lå akkumulert dødelighet på 0,5 % ved endt år. Utover vårhalvåret var det normalt lav dødelighet og appetitten til fisken var normal (lokalitetveterinærens rutinerapport). Det ble registrert enkeltfisk med sår uten særlig påvirkning på dødeligheten. I løpet av perioden januar til mars (til og med uke 13) ble det kun registrert 5 % akkumulert dødelighet. Første uken i april (uke 14) registrerte anlegget høy «dødelighet» (ca. 50 %) i den ene merden. Dette var grunnet et haveri, og var ikke sykdomsrelatert. Den gjenværende fisken på anlegget ble da fordelt på de to merdene.

Det ble observert unormal atferd hos fisken i midten av juni. Fisken var kvikk og oppmerksom, men ble observert svømmende mot strømmen. I august registrerte lokaliteten økt dødelighet som antas skyldes avlusning (Figur 2). Dødeligheten vedvarte imidlertid og økte i ettertid av behandlingen. Ifølge veterinærens rutinerapport for oktober (etter avsluttet studie) var hovedårsaken til dødelighet i perioden trolig gjelleproblemer. Det ble også registrert redusert

appetitt i denne perioden og obdusert dødfisk manglet fôr i mage og tarm (lokalitetveterinærens rutinerapport).



Figur 2: Oversikt over prosentvis dødelighet (orange) og akkumulert dødelighet (blå) ved lokaliteten gjennom studiet. Dødelighet i perioden oktober-desember 2013 (uke 41-52) var veldig lav og stabil (<0,5 %). For å få grafen mer oversiktlig, ble disse ukene derfor slått sammen. Det var to dødelighetstopper gjennom studiet, henholdsvis i uke 14 og 34. Registrert dødelighet i uke 14 var ikke relatert til sykdom, mens dødelighet registrert i uke 34 trolig var forårsaket av gjelleproblemer.

Det ble ikke blitt stilt noen diagnoser av den ansvarlige veterinæren ved anlegget i løpet av uttaksperioden (pers. med. lokalitetsansvarlig og lokalitetveterinærens rutinerapporter). Det har derimot vært en del lus på anlegget og behandlinger er blitt iverksatt for å redusere lusetallene (Tabell 6). I tillegg hadde anlegget en behandling mot bendelorm i mai måned.

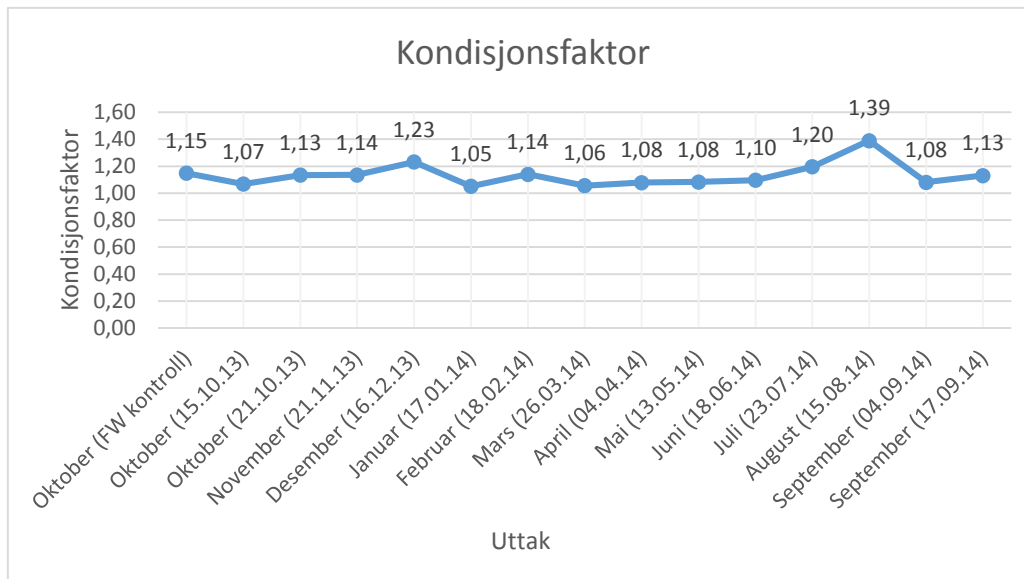
Tabell 6: Oversikt over behandlinger gjort ved anlegget i løpet av studiet; behandlingstype, medikament og dato for avsluttet behandling.

Behandling	Medikament	Sluttdato for behandling
Lusebehandling	Releeze vet.	15.11.13 (uke 46)
Lusebehandling	SLICE vet.	11.12.13 (uke 50)
Lusebehandling	Alpha Max	24.03.14 (uke 13)
Bendelorm	Praziquantel	08.05.14 (uke 19)
Lusebehandling	H ₂ O ₂	19.05.14 (uke 21)
Lusebehandling	Releeze vet.	03.06.14 (uke 23)
Lusebehandling	Kombinasjon: Alpha Max & Trident	18.08.14 (uke 34)
Lusebehandling	Releeze vet.	13.09.14 (uke 37)

Som det kommer frem i dødelighetsgrafene, var det økt dødelighet i uke 13, 34 og 37, henholdsvis 2 %, 17,5 % og 1,5 %. Disse ukene samsvarer med noen av ukene det var lusebehandling på lokaliteten. Det kan dermed tenkes at den økte dødeligheten kan være påvirket av mekaniske eller kjemiske belastninger på fisken ved behandling. I uke 34 er det mulig at fisken ble spesielt påvirket av badebehandling da fisken i denne perioden trolig var svak på grunn av dårlig gjellehelse.

Fiskepopulasjonsdata

Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor ble regnet ut for fisken ved hvert uttak. For laksefisk er en kondisjonsfaktor større enn 1,0 tilsvarende til god kondisjon/fysisk tilstand. Som vist i Figur 3 hadde de undersøkte fiskene generelt god kondisjon og var ikke betegnet typiske «svimere» (kondisjon <1). Utrekning av kondisjonsfaktor ble gjort med gjennomsnittlig vekt og lengde på alle fiskene ved hvert uttak noe som betyr at enkelte fisk kan ha vært «svimere» uten at det kommer til uttrykk i utregningen (oversikt over vekt og lengde på all fisken i studiet finnes i appendiks). Samtidig ser en at kondisjonsfaktoren mellom hvert uttak er jevn da den stort sett holder seg mellom 1,05 og 1,15 med kun tre unntak i henholdsvis desember (1,23), juni (1,20) og august (1,39). Dette tyder på god og jevn utvelgelse av fisk til uttakene. Videre kan dette bety at analyseresultatene (prevalens og densitet) ikke påvirkes av betydelig tilstedeværelse av «svimere» i uttakene, da «tapere» ofte har dårligere helse og lett kan bli infisert av patogener.



Figur 3: Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor hos eksaminert fisk.

Real time RT-PCR analyser

Det ble i utgangspunktet undersøkt for patogener som primært infiserer gjeller hos laks (*Paramoeba* spp., *B. cysticola*, *S. salmonis* og *I. salmonis*) og *P. theridion* i alle uttakene. Ved uttakene i mars og april ble det observert blødning og koagel i de fleste fiskenes hjertehule, og det ble derfor undersøkt for Piscine myocardittvirus (PMCV) og Piscine reovirus (PRV). Det viste seg at analyseprøvene var positive for PRV, og dette patogenet ble dermed videre undersøkt for ved hvert uttak. Analyseprøvene var negative for PMCV.

Utover sommeren ble det observert uvanlig atferd på fiskene i merdene (pers. med. lokalitetsansvarlig), der fisken stod mot strømmen. Atferden var vanskelig å relatere kun til de undersøkte gjellepatogene til tross for lave Ct-verdier, og det ble av den grunn undersøkt for flere patogener. Det ble da fokusert på salmonid alfavirus (SAV), infeksiøs lakseanemi virus (ILAV) og PMCV.

I september økte dødeligheten ved anlegget. Etter histopatologiske analyser og observasjoner av amøbelignende strukturer ble det undersøkt for flere typer amøber (*Tetramitus* sp. og *Plathyamoeba*). Det ble observert store mengder epiteliocyster på gjellene og på bakgrunn av uviss etiologi av 'Ca. *P. salmonis*', ble det i tillegg gjort real-time RT-PCR analyser av denne bakterien.

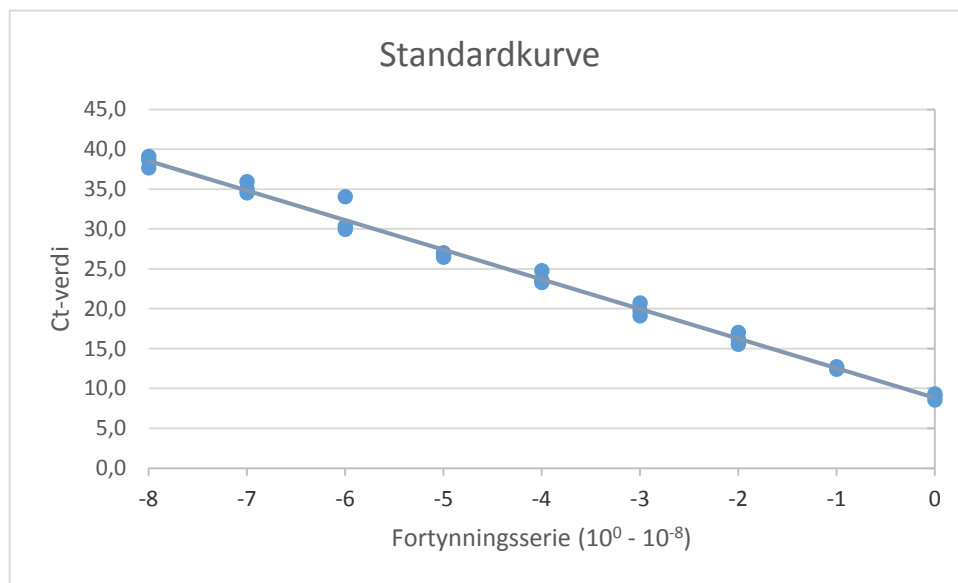
Optimalisering, effektivisering og normalisering

Det ble utført en optimaliseringstest for assayet «Epi» som detekterer 'Ca. Branchiomonas cysticola'. De optimale primer- og probekonsentrasjonene er listet opp i Tabell 7.

Tabell 7: Optimaliserte primer- og probekonsentrasjoner for 'Ca. B. cysticola'-assayet. Volumene er notert både som μL og nM for hver optimalisering.

Assay	Forward primer	Revers primer	Probe
'Ca. B. cysticola'	1,13 μL	2,25 μL	0,75 μL
	300 nM	600 nM	200 nM

Da de optimaliserte konsentrasjonene var fastslått, ble det gjennomført en fortyningsserie ($10^0 - 10^{-8}$) av det brukte templatet som ble kjørt i triplikat i real-time RT-PCR analyser. Ct-verdiene ble brukt til å lage en standardkurve for 'Ca. B. cysticola' assayet (Figur 4). Effektivitetsverdien, stigningstallet og regresjonsverdien til figuren er vist i Tabell 8.



Figur 4: Standardkurve for 'Ca. B. cysticola' -assayet. Verdiene brukt for utregning av standardkurven ble hentet fra en 10-gangers fortyningsserie fra templat positiv for 'Ca. B. cysticola' utført i triplikater.

Tabell 8: Stigningstall, regresjonsverdi og effektivitet for 'Ca. B. cysticola' assayet. Effektiviteten er regnet ut ved bruk av formelen på side 20.

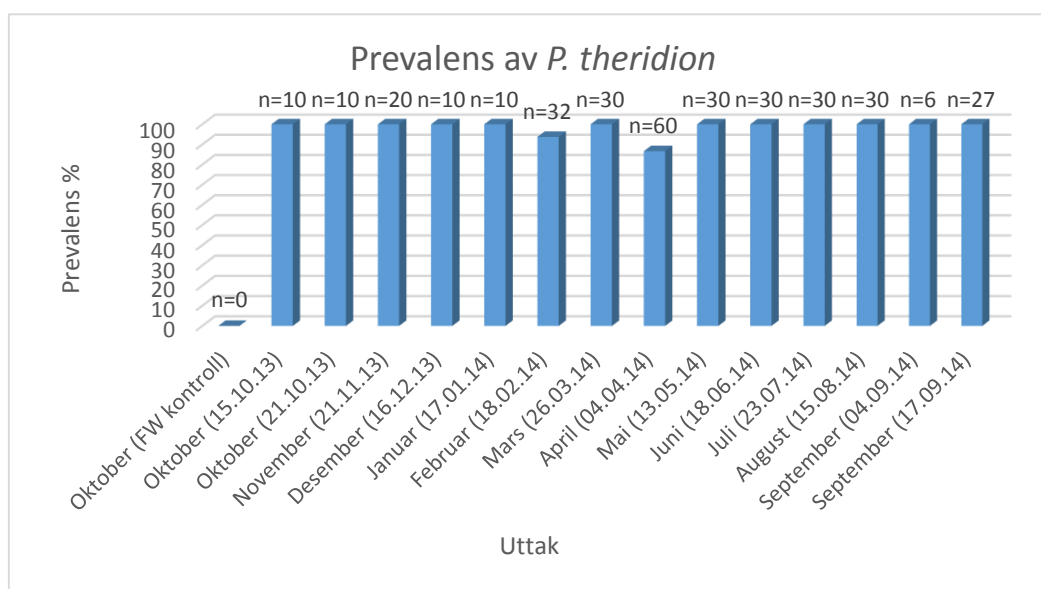
Assay	Stigningstall (y)	Regresjonsverdi (R ²)	Effektivitet (E)
'Ca. B. cysticola	-3,6652	0,9986	1,8743

Etter effektivitetstesten ble verdiene til E sammen med assayets Ct-verdi brukt for å bestemme det normaliserte uttrykket til assayet mot referansegenet (EFA1_α) (se formel side 20). Normalisering ble også gjennomført for assayene til *P. theridion*, *Paramoeba* spp., *I. salmonis*, PRV og SAV.

Prevalens av undersøkte patogener

Paranucleospora theridion

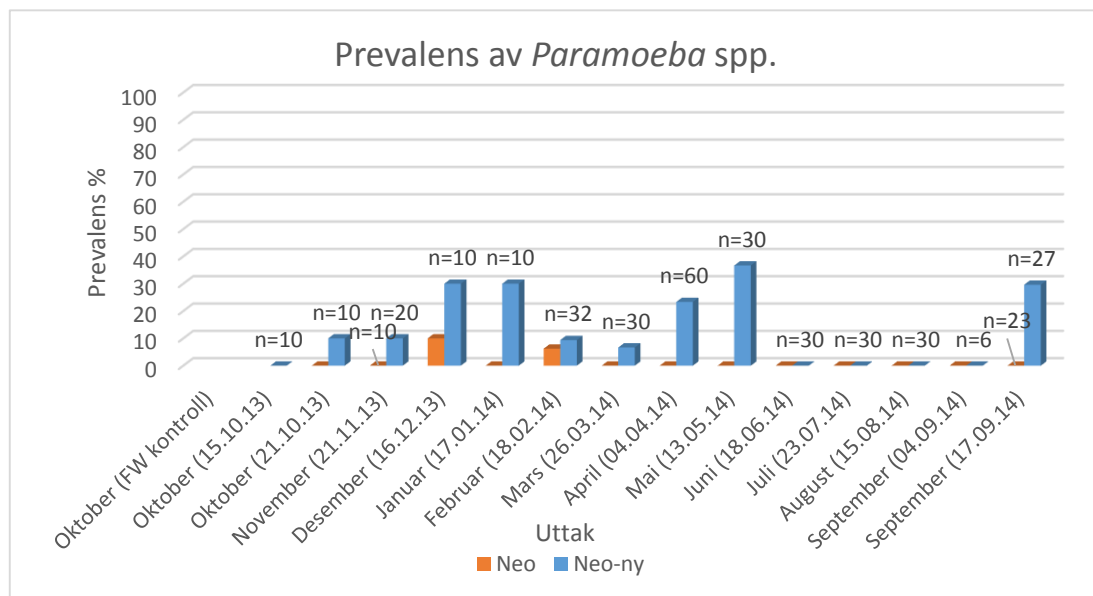
P. theridion ble registrert allerede ved første sjøuttak den 15. oktober 2013. Fisken hadde da kun gått ti dager i sjø, men til tross for det var alle fiskene infisert med parasitten (100 % prevalens). Prevalensen holdt seg stabil gjennom hele studiet, med små avvik i februar og april med prevalens på henholdsvis 94 % og 87 %.



Figur 5: Prevalens av *P. theridion* gjennom studiet. Det ble undersøkt for patogenet ved alle uttakene, bortsett fra kontrolluttaket i oktober da parasitten ikke er kjent å forekomme i ferskvann. n = antall undersøkte fisk.

Paramoeba spp.

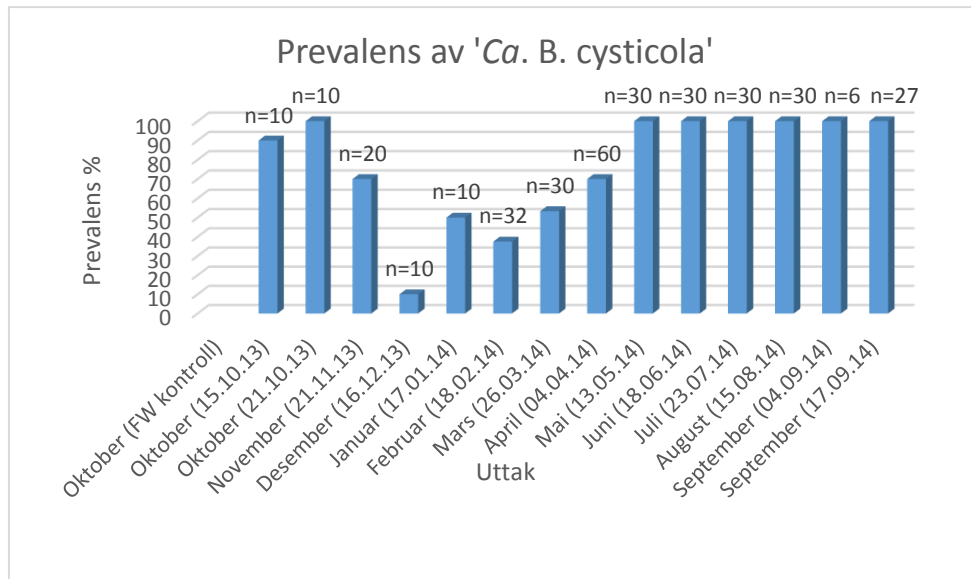
Analyseprøver ble testet både for *Paramoeba* spp. og spesifikt for *P. perurans*. Undersøkelser av *P. perurans* viste lav, henholdsvis 10 og 6 %, eller ingen tilstedeværelse av amøben gjennom hele studiet. *Paramoeba* spp. var derimot svakt til moderat positiv i ni av de femten uttakene, med høyest prevalens i mai måned (37 %). Til tross for høy prevalens i mai viste analyser av de fire neste uttakene ingen tilstedeværelse av *Paramoeba* spp. Under siste uttak i september ble det igjen registrert moderat prevalens av parasitten (29,6 %).



Figur 6: Prevalens av *P. perurans* (oransje) og *Paramoeba* spp. (blå) gjennom studieperioden. Det ble ikke undersøkt for amøbene ved kontrolluttaket i oktober da de kun er kjent fra marint miljø. Analysene for *P. perurans* var stort sett negative gjennom studiet, og det ble derfor ikke undersøkt for parasitten ved andre uttak i oktober heller. n = antall undersøkte fisk

'Ca. Branchiomonas cysticola'

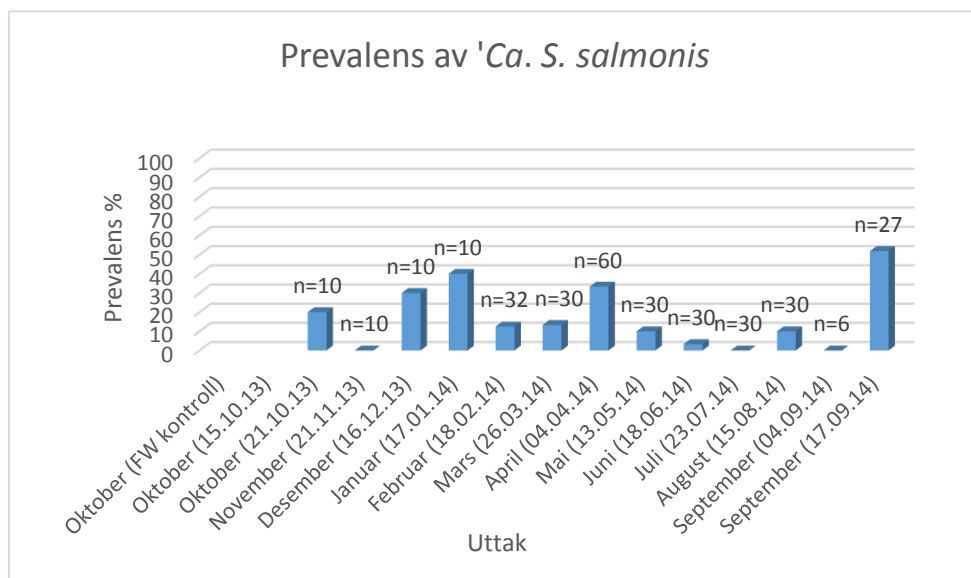
Allerede under første uttak fra sjø i oktober var det høy prevalens av 'Ca. B. cysticola' på gjellene til de undersøkte fiskene. Etter oktober ble det observert en redusert prevalens frem til januar/februar, og deretter en økning som nådde 100 % prevalens av bakterien i mai. Prevalensen holdt seg stabil ut resten av studiet.



Figur 7: Prevalens av 'Ca. B. cysticola' gjennom studiet. Det ble undersøkt for patogenet ved alle uttakene, bort sett fra kontroll uttaket i oktober da bakterien ikke er kjent å forekomme i ferskvann. n = antall undersøkte fisk.

'Ca. Syngnamydia salmonis'

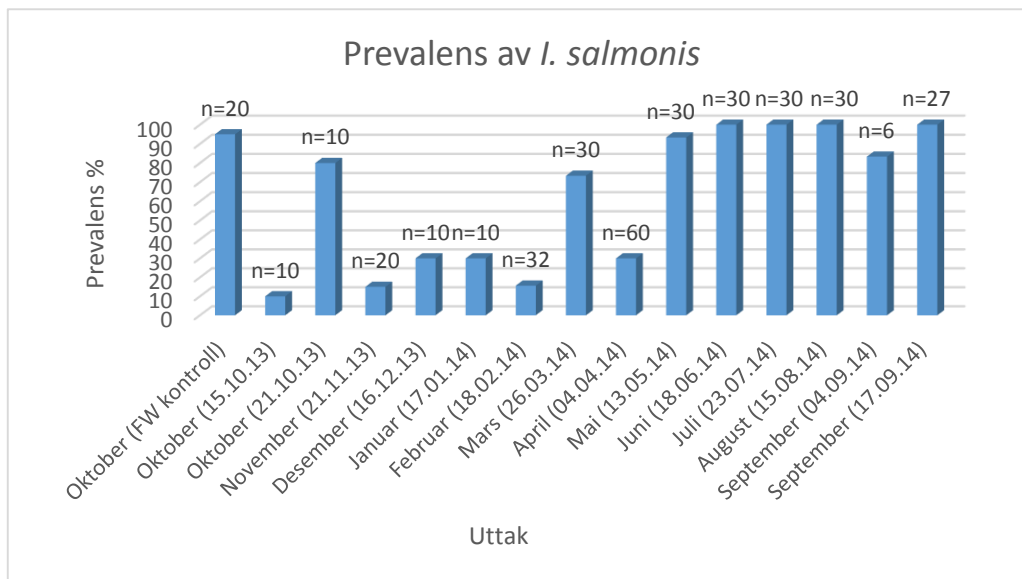
Tilstedeværelse av 'Ca. S. salmonis' ble stort sett funnet gjennom hele studiet med overveiende lav eller ingen tilstedeværelse av bakterien. I de positive uttakene varierte prevalensen fra lav (3,3 %) til moderat (40 %), mens den ved siste uttak var på 52 %.



Figur 8: Prevalens av 'Ca. S. salmonis' gjennom studiet. Det ble undersøkt for patogenet ved alle uttakene, bort sett fra kontroll uttaket i oktober da bakterien ikke er kjent å forekomme i ferskvann. n = antall undersøkte fisk.

Ichthyobodo salmonis.

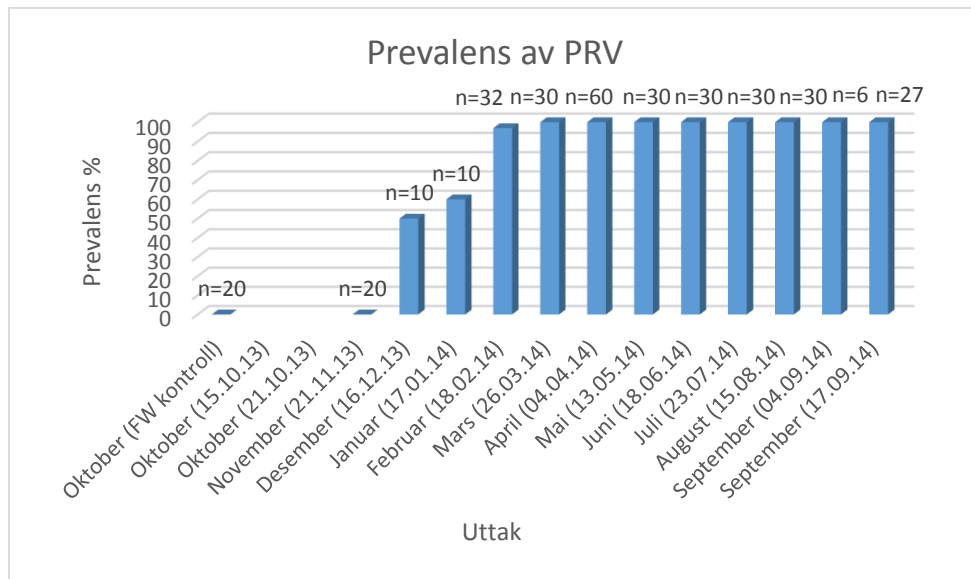
Ichthyobodo-assayet som er benyttet i studiet fanger opp både ferskvanns- og saltvannsarter av slekten. Som nevnt i introduksjonen er *I. salmonis* en euryhalin parasitt. I kontrolluttaket fra ferskvann ble parasitten registrert med en prevalens på 95 %. Den høye prevalensen i ferskvann og med tanke på redusert prevalens til 10 % ved første uttak fra saltvann, kan skyldes at assayet registrerte store mengder av en ferskvannsart av *I. necator*. Videre i studiet var forekomsten av parasitten i varierende grad ettersom prevalensen viste seg å 'svinge' mellom 15-80 %. Ved de siste uttakene var prevalensen nærmere 100 %.



Figur 9: Prevalens av *I. salmonis* gjennom studiet. Det ble undersøkt for parasitten ved alle uttakene i studieperioden. n = antall undersøkte fisk.

Piscine reovirus (PRV)

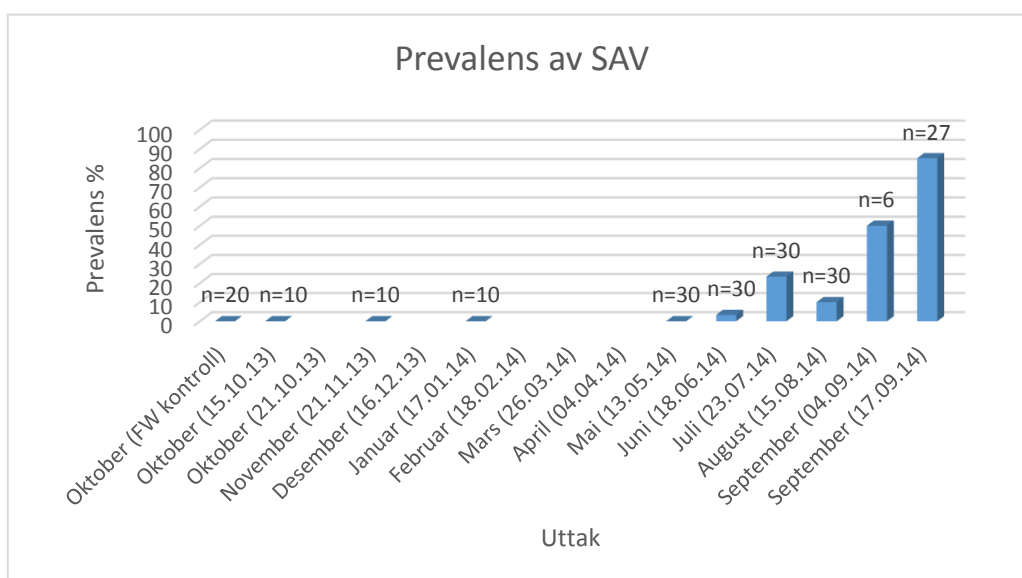
I mars ble det observert blødning og koagel i hjertehulen hos tilnærmet alle de eksaminerte fiskene, og det ble derfor undersøkt for PRV. Analysene viste en prevalens av viruset på 100 %. Etter funnene i april ble det gjort videre undersøkelser av PRV gjennom studiet, både før og etter april måned. Analyser fra tidligere måneder viste at PRV først forekom/opptrådte i desember med 50 % prevalens og deretter økte til 100 % prevalens i mars. I de resterende månedene holdt prevalensen av PRV seg stabil på 100 % til september da studiet ble avsluttet.



Figur 10: Prevalens av Piscine reovirus (PRV) gjennom studieperioden. Viruset ble undersøkt ved alle uttakene bortsett fra to, da disse uttakene var mellom to analyser som viste ingen tilstedeværelse av patogenet. n = antall undersøkte fisk.

Salmonid alfavirus (SAV)

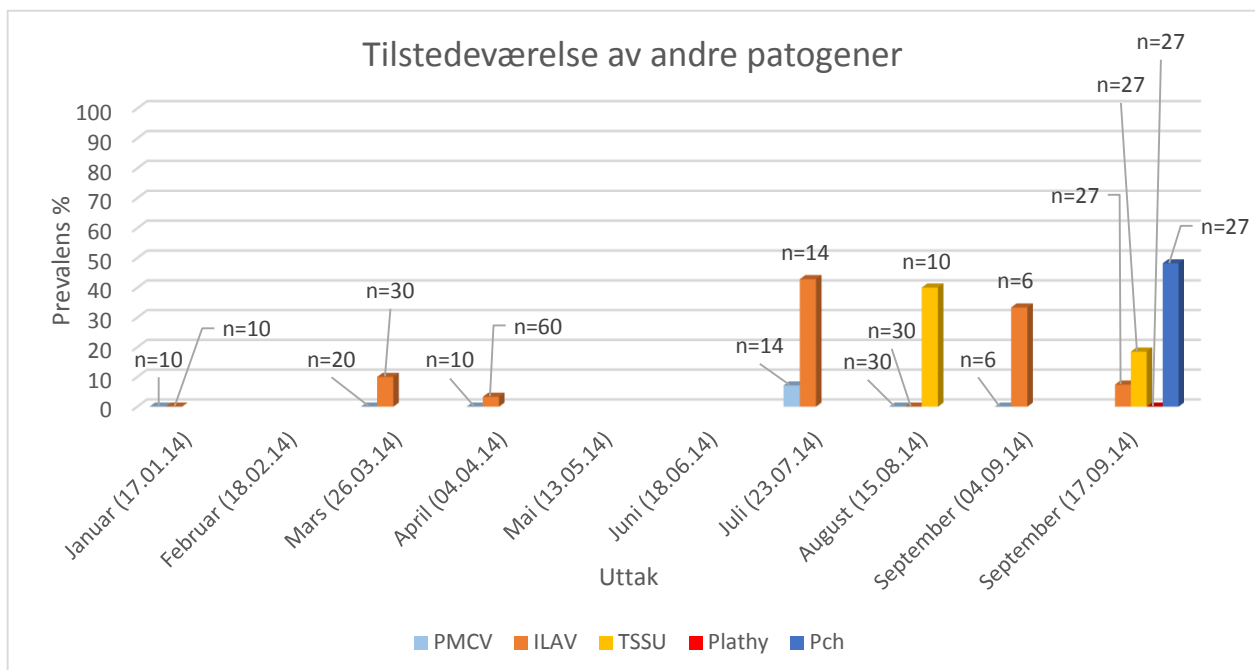
Det ble gjort sporadiske undersøkelser for tilstedeværelse av SAV tidlig i studiet uten påvisning av viruset. I august ble det gjort en ny undersøkelse for viruset på grunn av økt dødelighet ved anlegget. Analysene viste en prevalens på 10 %, og det ble besluttet å undersøke for SAV videre. I tillegg ble det gjort undersøkelser for SAV i tidligere uttak for å finne ut når tilstedeværelse av viruset først forekom. Første forekomst ble registrert i juni. Ved siste uttak i studiet hadde SAV-prevalens nådd 85,2 %.



Figur 11: Prevalens av salmonid alfavirus (SAV) gjennom studiet. Dette patogenet ble undersøkt ved utvalgte uttak, da forekomst av viruset først opptrådte i juni. n = antall undersøkte fisk.

Andre patogener

Det ble gjennomført sporadiske undersøkelser for Piscine myocardittvirus (PMCV), Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV), 'Ca. Piscichlamydia salmonis' (Pch) og amøber som *Tetramitus* sp. (TSSU) og *Plathyamoeba* sp. (Plathy). Som nevnt ble det undersøkt for PMCV etter uttaket i mars på grunn av blod og koagel observert i hjertehulen til de eksaminerte fiskene. Analysene viste at ingen av fiskene var positive for dette patogenet. Det ble i tillegg undersøkt for viruset i uttakene fra januar, april, juli, august og september. Viruset ble kun påvist i juli med en svært lav prevalens (7 %). Det ble undersøkt for ILAV i ni av uttakene. Tilstedeværelse av viruset ble først registrert i mars. Videre ble det registrert svært 'svingende' prevalens med en topp på 43 % prevalens i juli, for dermed å ha 0 % prevalens i august og opp igjen til 33 % prevalens ved første uttak i september.



Figur 12: Prevalens av Piscine myocardittvirus (PMCV), infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), *Tetramitus* sp. (TSSU), *Plathyamoeba* (Plathy) og 'Ca. P. salmonis' (Pch) ved enkelte uttak. Det ble ikke gjort undersøkelser av patogenene i 2013 og det ble derfor valgt å unnlate disse månedene i grafen. PMCV og ILAV ble sporadisk undersøkt gjennom studiet (januar, mars, april, juli, august & september). Tssu ble undersøkt ved to uttak, henholdsvis i august og ved siste uttak i september. Det ble undersøkt for Plathy og Pch kun i siste uttak i september. n = antall undersøkte fisk.

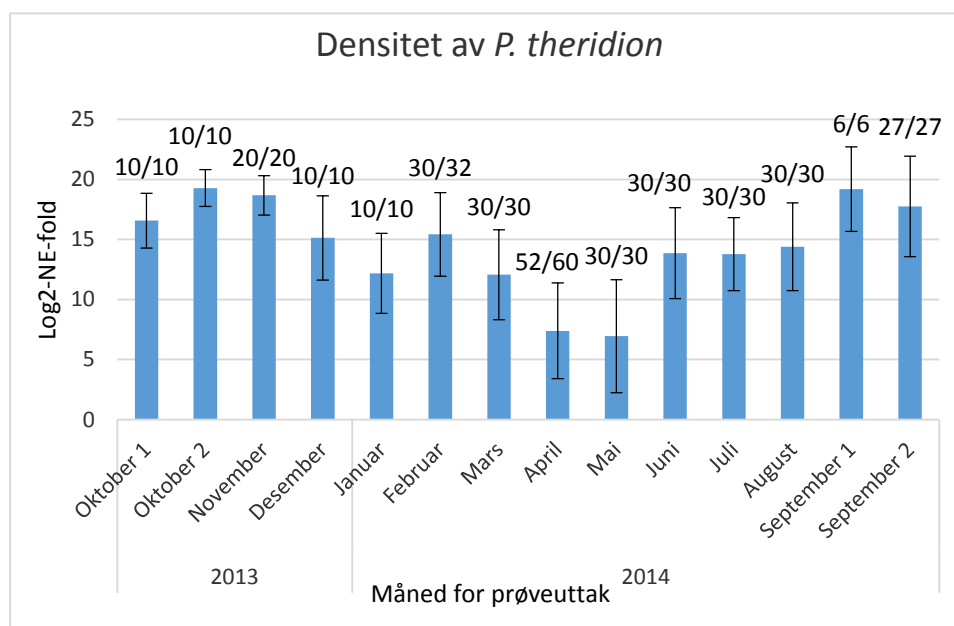
Etter histopatologiske observasjoner av amøbe-lignende strukturer fra siste uttak i september, ble det besluttet å kjøre analyser for TSSU og Plathy. Real-time RT-PCR analysene viste henholdsvis 18,5 % og 0 % prevalens av amøbene. I august ble ti fisk undersøkt for tilstedeværelse av TSSU. Analysene registrerte fire positive individer.

Ettersom real-time RT-PCR analyser ikke viste tilstedeværelse av PMCV, bortsett fra ved et uttak, blir ikke dette patogenet undersøkt videre eller diskutert. Den ene positive prøven hadde i tillegg Ct-verdi på 36,8 som blir betraktet som verdier hos fisk som er bærere for patogenet. ILAV ble registrert fra fem uttak i studieperioden. Ct-verdiene fra hvert av de positive uttakene var over 32, og infisert fisk blir betraktet som patogenbærere. Dette viruset blir heller ikke diskutert videre da det med liten sannsynlighet har påvirket dødelighet i fiskebestanden.

Densitet av undersøkte patogener

Paranucleospora theridion

Densiteten av parasitten gjennom studiet viste seg å være mer varierende enn prevalensen. Fra utsett i oktober og til november var det betydelige mengder av parasitten i infisert fisk, etterfulgt av en nedgang frem til mai. Fra mai til september var det en ny gradvis økning med en topp i det nest siste uttaket. Ct-verdiene til parasitten var i siste uttak 20,1.

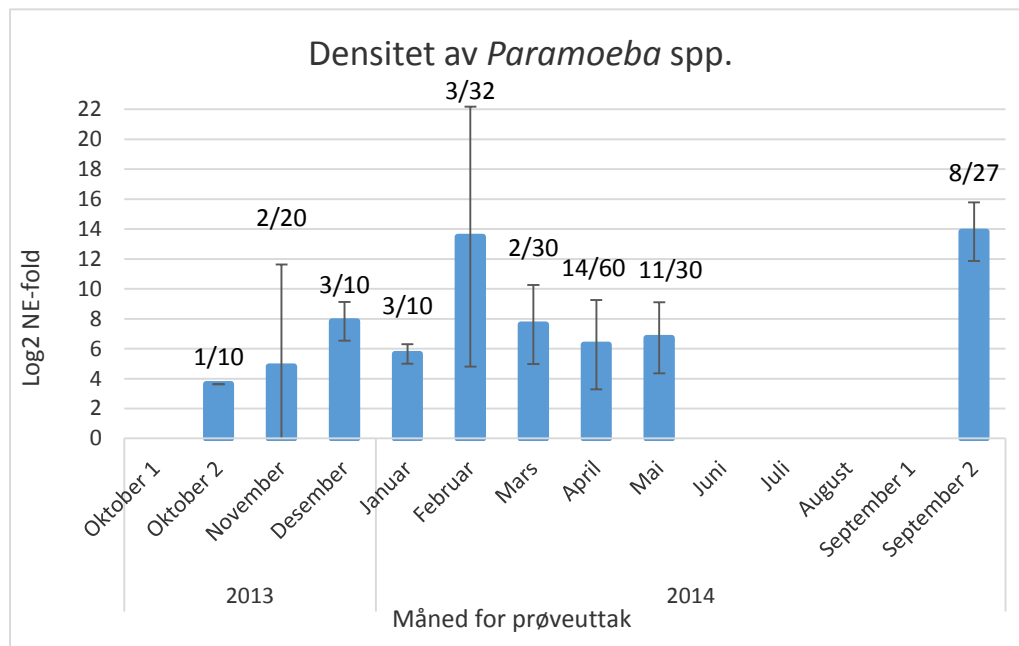


Figur 13: Densitet av *P. theridion* gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylene inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

Paramoeba spp. og P. perurans

Det ble ikke regnet ut densitet for *P. perurans* ettersom parasitten kun ble funnet i to av uttakene. Gjennomsnittlig Ct-verdi var da 34,1 i desember og 22,5 i februar.

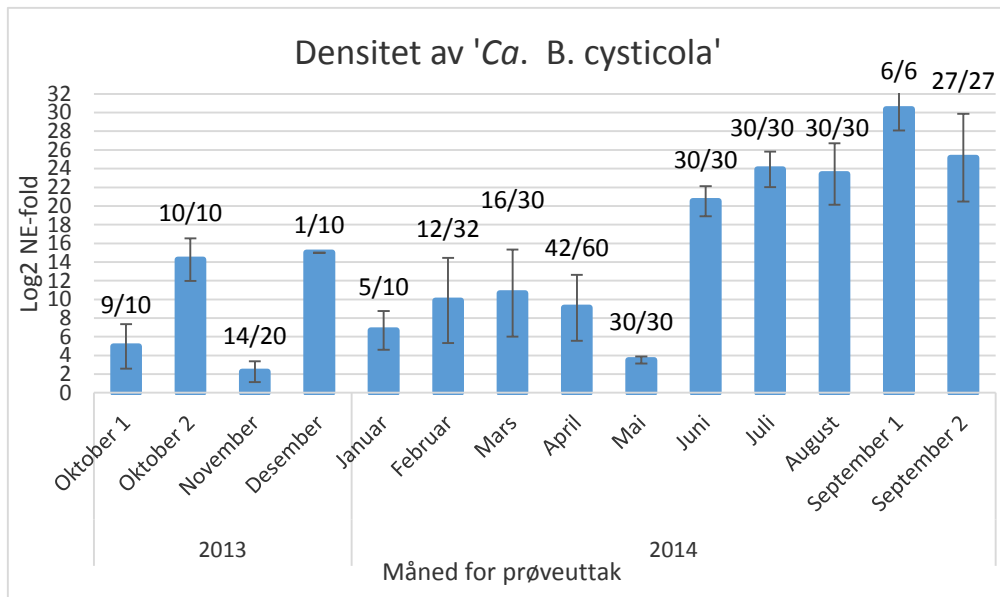
Paramoeba spp. viste varierende densitet gjennom studieperioden. Høyest densitet ble målt i februar og siste uttak i september. Tetthetstendensen viste gradvis økning fra oktober til februar, etterfulgt av en lignende nedgang frem til juni. Fra juni ble det ikke registrert tilstedeværelse av amøben før ved siste uttak i september (Ct 18,3), da den høyeste gjennomsnittsdensiteten av amøben gjennom studien ble målt.



Figur 14: Densitet av *Paramoeba* spp. gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylene inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

'Ca. Branchiomonas cysticola'

Undersøkelser viste svært varierende densitet av '*Ca. Branchiomonas cysticola*' de ni første månedene (oktober 1 – mai), med de laveste forekomstene i første sjøuttak i oktober, november og mai. Etter mai økte densiteten av bakterien betraktelig og flere av fiskene i de siste uttakene var svært infiserte (Ct < 10). Sammenlignet med de andre undersøkte patogenene, var fisken sterkest infisert med '*Ca. Branchiomonas cysticola*' fra juni og til siste uttak.



Figur 15: Densitet av 'Ca. B. cysticola' gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylen inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

'Ca. Syngnamydia salmonis'

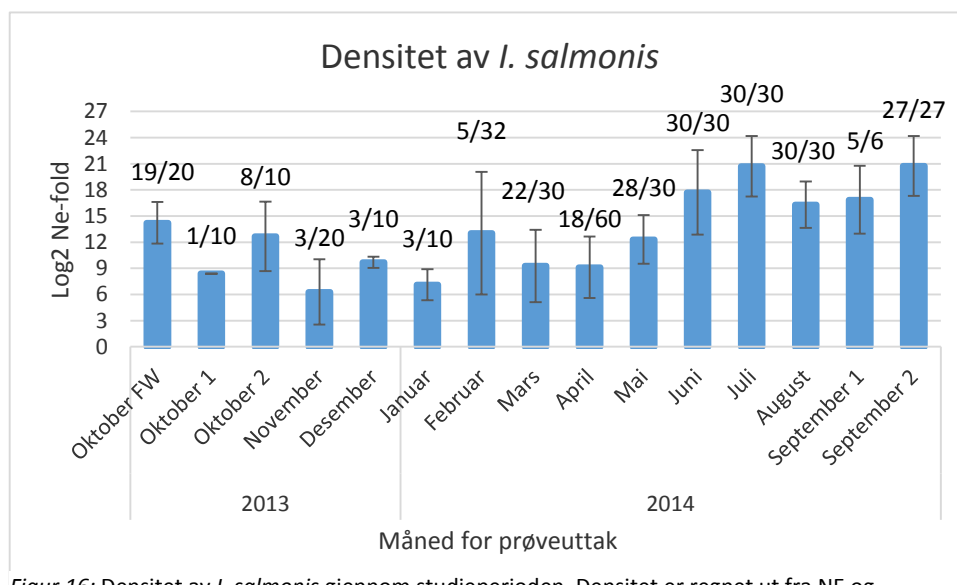
Det ble ikke regnet ut NE-foldsøkning av 'Ca. Syngnamydia salmonis'. Effektiviteten til assayet brukt for å detektere bakterien har ikke blitt beskrevet i tidligere studier, og på grunn av manglende tid ble det heller ikke gjort i denne studien. I stedet er gjennomsnittlig Ct-verdi plottet i Tabell 9. Tabellen må ikke sammenlignes direkte med densitetgrafene for de andre patogenene, da de oppgitte verdiene er fremstilt ulikt. Ct-verdiene for bakterien er svært høye ($Ct > 30$) og viser antagelig en bærertilstand hos de infiserte individene. I desember og februar ble de laveste gjennomsnittsverdiene for bakterien målt, med Ct-verdi på henholdsvis 28,4 og 26,1.

Tabell 9: Densitet av 'Ca. S. salmonis' gjennom studieperioden. Gjennomsnittlig Ct-verdi og prevalens for alle uttakene.

'Ca. S. salmonis'	Ct-verdi	Antall positive/antall undersøkt
Oktober 2	33,9	2/10
November	Neg	0/10
Desember	28,4	3/10
Januar	35,1	4/10
Februar	26,1	4/32
Mars	31,8	4/30
April	33,9	20/60
Mai	35,2	3/30
Juni	37,1	1/30
Juli	Neg	0/30
August	35,4	3/30
September 1	Neg	0/6
September 2	30,9	14/27

Ichthyobodo salmonis

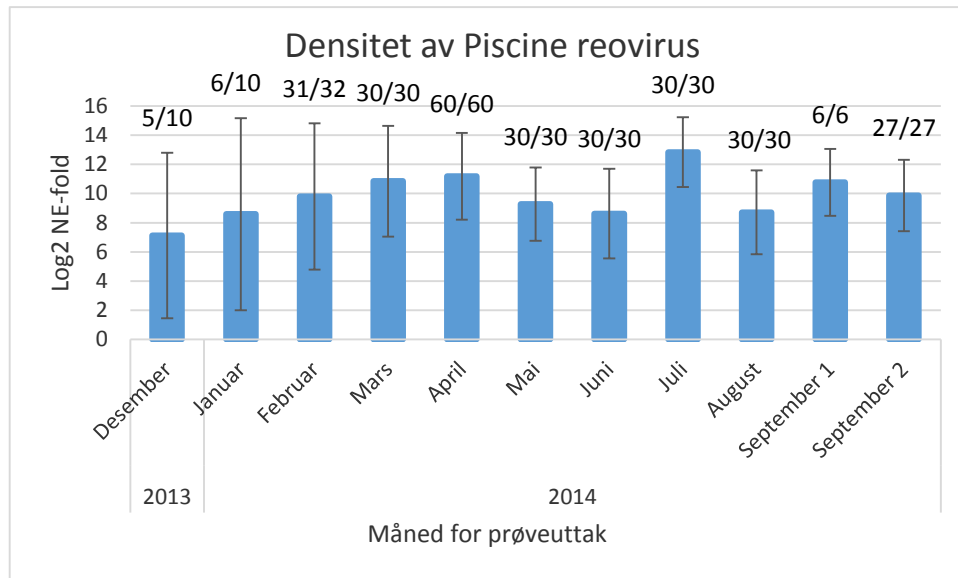
I. salmonis ble detektert med varierende densitet i alle uttakene gjennom studieperioden. De laveste tetthetene av parasitten ble målt i november og januar (Ct > 30). Etter mai måned økte densiteten frem til september, med et svakt fall i august og ved siste uttak i september. Generelt holdt gjennomsnittlige Ct-verdier for mai til september seg under 24. Enkelte individer viste seg å være svært infiserte (Ct < 10), mens flertallet av fiskene hadde Ct-verdier mellom 10 og 20 fra juni og ut studieperioden. De lave Ct-verdiene forteller at fisken var betydelig infisert av *I. salmonis*.



Figur 16: Densitet av *I. salmonis* gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylene inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

Piscine reovirus

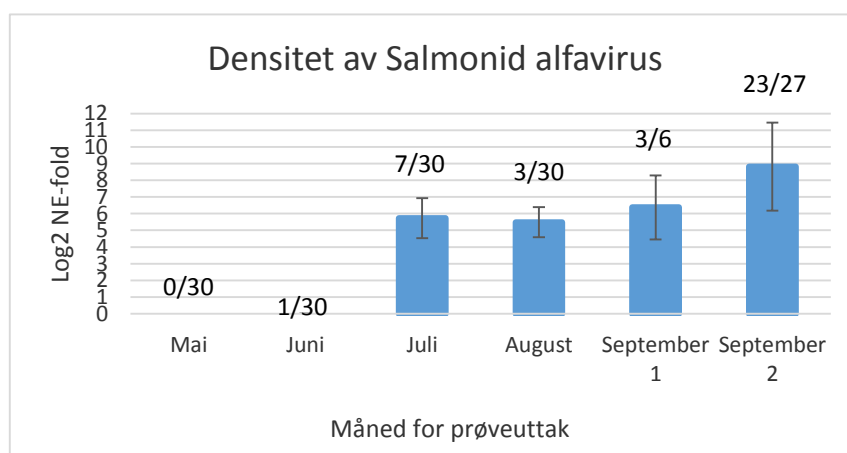
Densitet av PRV økte gradvis fra desember til april, etterfulgt av en reduksjon i mai og juni. Juli viste høyest tetthet av viruset gjennom studieperioden (20,2), men variasjonen i Ct-verdier fra positive uttak var ikke signifikant ettersom verdiene lå mellom 20,2 og 25,1. Med andre ord, fisken var moderat infisert av PRV fra desember (2013) til september (2014).



Figur 17: Densitet av PRV gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylen inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

Salmonid alfavirus

SAV-densitet økte kraftig fra første positive uttak i juni og til uttaket i juli (Ct 33,0 – 28,9) etterfulgt av ytterligere gradvis økning frem til siste uttak i september.



Figur 18: Densitet av SAV gjennom studieperioden. Densitet er regnet ut fra NE og presentert som Log2-transformerte verdier. Søylen inkluderer standardavvik. Tallverdiene over søylene er prevalens av patogenet.

Andre patogener

Undersøkelser av ILAV, PMCV, *Tetramitus* spp. og ‘*Ca. P. salmonis*’ viste lav densitet av alle patogenene. Densitet av ILAV lå mellom 32,1 og 36,5 i de positive uttakene (mars, april, juli, september), med høyeste tetthet i juli. PMCV ble kun detektert i ett uttak (juli) og viste Ct-verdi på 36,8. Densitet av *Tetramitus* spp. viste Ct-verdier på 34,9 og 35,6 i henholdsvis august og september. Lavest Ct-verdi ble målt for ‘*Ca. P. salmonis*’ i siste uttak (Ct 27,0).

Sekvensering

Det ble gjennomført sekvensering for patogenene som viste høy tilstedeværelse (prevalens) og lave Ct-verdier. De aktuelle patogenene var *P. theridion*, *Paramoeba* spp., ‘*Ca. B. cysticola*’, ‘*Ca. S. salmonis*’, *I. salmonis*, PRV og SAV. Resultatene fra sekvensering viste gensekvenser av ‘*Ca. B. cysticola*’, ‘*Ca. S. salmonis*’, *I. salmonis* og PRV fra de utnyttede templatene (Tabell 10). Patogenene var tilnærmet 100 % lik til publiserte gensekvenser, samt at noen av sekvensene viste likhet til flere gensekvenser.

Tabell 10: Sekvenseringsresultat. Viser oversikt over målpatogen, accession nummer, antall nukleotider sekvensen innehar og likheten til tidligere identifiserte sekvenser (ac. no.).

Målpatogen	Accession nummer (ac. no.)	Nukleotider (nt)	Segmentlikhet
‘ <i>Ca. B. cysticola</i> ’	JN807444	675	100 %
‘ <i>Ca. S. salmonis</i> ’	EU326493 KF768762 KF768763	662	99 %
<i>I. salmonis</i>	JQ613341 AY229973 AY224686 JQ613342	898	100 %
PRV (segment 2)	HG329937 HG329921	1180	100 %

De resterende undersøkte patogenene ga av ulike grunner ikke PCR-produkt. En av grunnene til uteblitt gensekvens kan være at densiteten til patogenet ikke var høy nok i det undersøkte

templatet. En annen grunn kan være at det ble benyttet primere som ikke var spesifikke for de aktuelle patogenene som var tilstede i templatet.

Patologi

Observert patologi, både utvendig og innvendig, ble notert ved disseksjon av den eksaminerte fisken i perioden februar til september. Generelt virket fisken frisk uten særlig ytre patologi. Det ble observert enkelte fisk med skjelltap og sår i tillegg til noen med erosjon på dorsal- og caudalfinner (Figur 19). Ved uttakene i februar, mars og mai var det noen få «pinner» og typiske «taper-fisk». Dette er fisk som av ulike grunner ikke har klart å ta til seg næring og dermed ikke har vokst normalt. De observeres derfor ofte som veldig slanke og avlange. I flere av disse fiskene ble det også observert bendelorm.



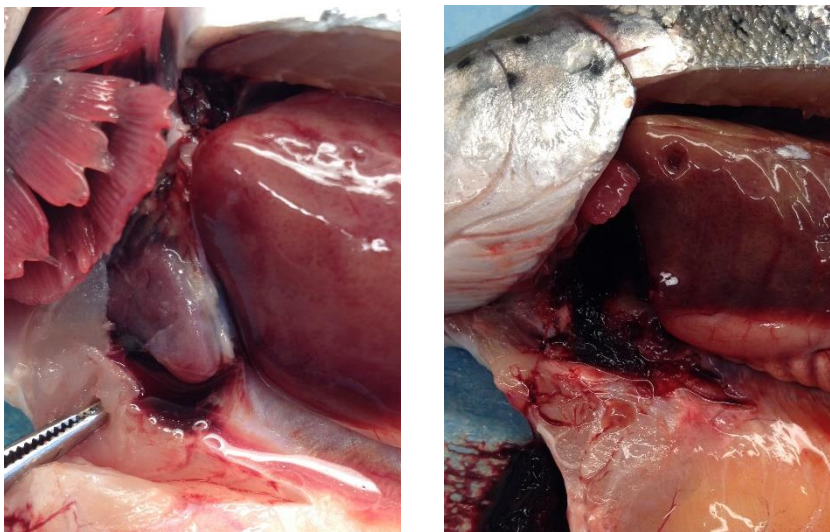
Figur 19: Skjelltap og sår hos en «taperfisk» fra uttaket i juni (S180614)

I løpet av studiet ble det generelt observert lite patologi på gjellene. Ved disseksjon fra uttakene i april og mai, ble det registrert store mengder blod og koagel på gjellene til flere av fiskene. Dette skyldtes trolig avlivningsmetoden (slag mot hodet). Ellers ble det kun registrert noen fisk med slimete gjeller, og enkelte med nekroser og sprikende primærlameller frem til september. Ved uttakene i september ble det i tillegg observert punktblødninger og bleke gjeller med blødning hos enkelte av fiskene.



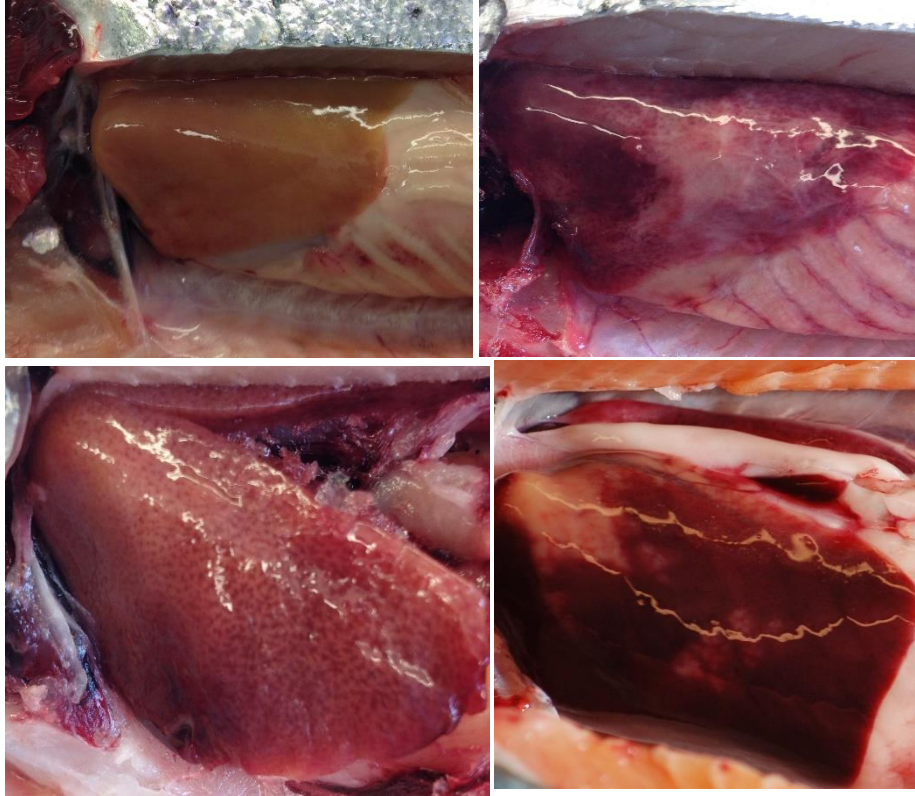
Figur 20: Patologi observert på gjellene fra uttakene i september. Bildene viser punktblødning, nekrose, blødning og misfarging av gjellene.

Blod, koagel og væske i hjertehulen var det patologiske funnet som oftest ble observert ved eksaminering av fisken. Denne patologien ble først registrert i mars og vedvarte ut studieperioden og var tilstede i tilnærmet alle undersøkte fisk. I løpet av sommeren ble det i tillegg notert bløt muskulatur i fiskene. Muskulaturpatologi kan være lett påvirkelig av frysing etterfulgt av opptining. Det var derfor vanskelig å vite om dette var artefakter.



Figur 21: Blod og koagel observert i hjertehulen til fisk fra uttaket i april (S040414).

Ved eksaminering ble leveren ofte observert som misfarget enten gulig, rødlig eller brunlig, eller med en kombinasjon av disse fargene. I tillegg ble det i noen tilfeller observert prikker på leveren som kunne ligne på punktblødninger, og i enkelte tilfeller observert «fiberdrag»/krystallisering. Som oftest var det vanskelig å stadfeste om den observerte patologien skyldtes sykdom, eller om det var post-morterelle forandringer.



Figur 22: Leverpatologi observert hos fisk fra uttak i april (S040414) og september (S170914). Gulig misfarging, «fiberdrag», prikker og misfarging kunne observeres.

I enkelte uttak ble det i tillegg til den nevnte patologien observert betente organer i de undersøkte fiskene. Hovedsakelig gjaldt dette baktarmen, men i noen tilfeller ble pylorus observert som rød og uten særlig fettvev rundt, samt forstørret milt. Hos enkelte fisk ble det også observert blødninger i og rundt tarm og pylorus.



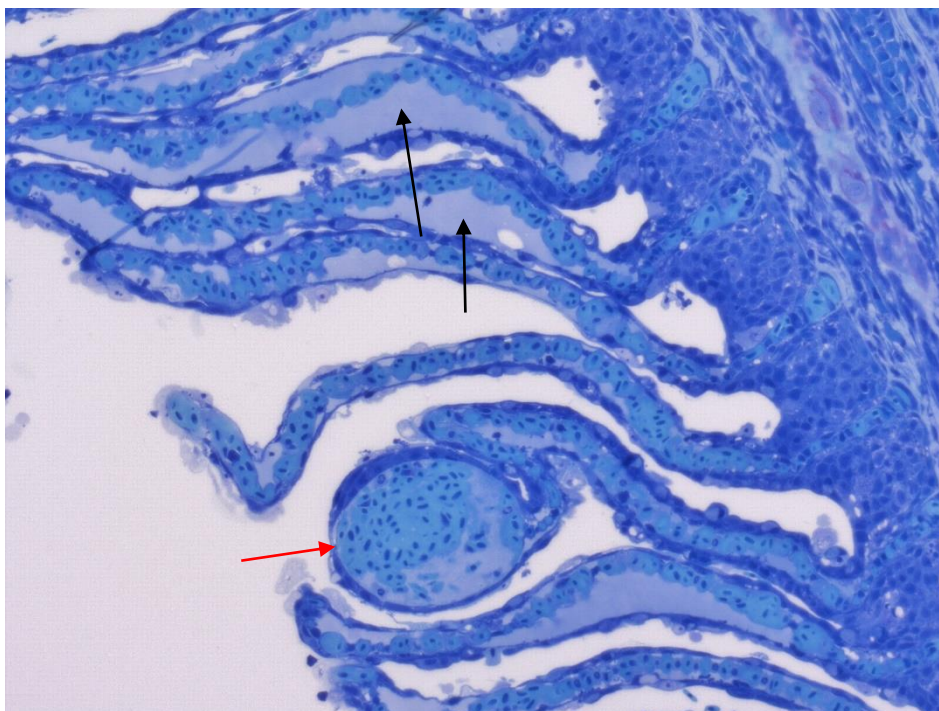
Figur 23: Betente organer hos fisk fra uttak i juni (S180614) og september (S170914). Betennelse i baktarm og blødning og betennelse i bukhulen.

Histologi

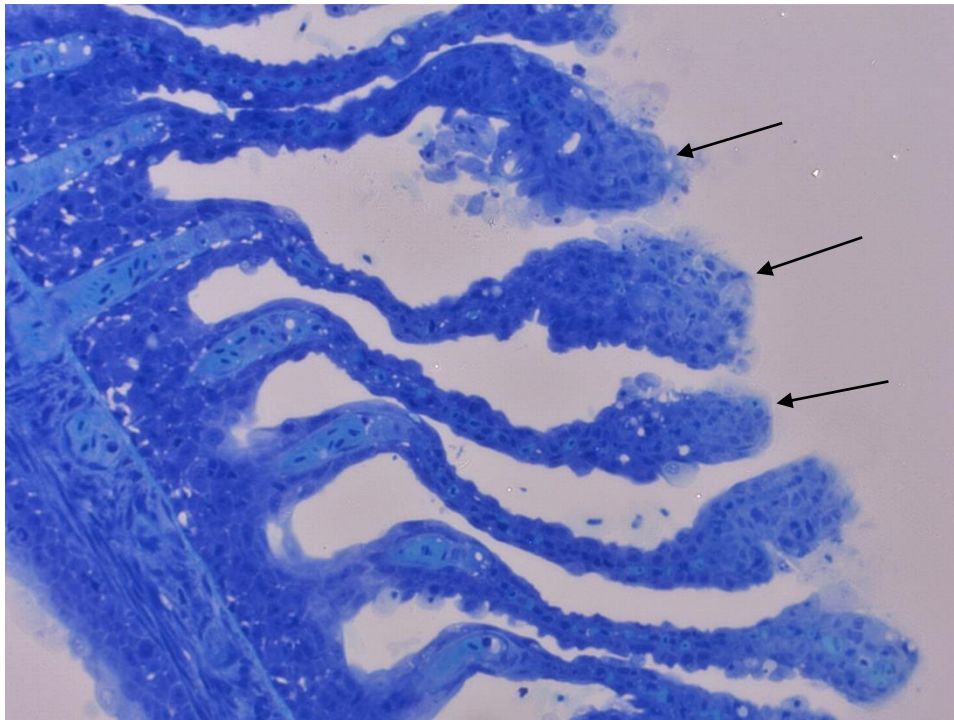
Prøver til histologi ble tatt ut fire ganger i løpet av studiet, henholdsvis i januar, juli, august og september. Grunnet økende dødelighet i september, ble det fokusert på histologi av gjellene fra det siste uttaket. Det ble i tillegg tatt ut hjerte, nyre, milt og lever til histopatologiske undersøkelser fra fem fisk ved siste uttak (S170914 1-5). Innstøping og farging av disse vevene ble ikke tilfredsstillende for histologiske undersøkelser, og det ble dermed valgt ikke å gjøre videre analyser.

Gjelle

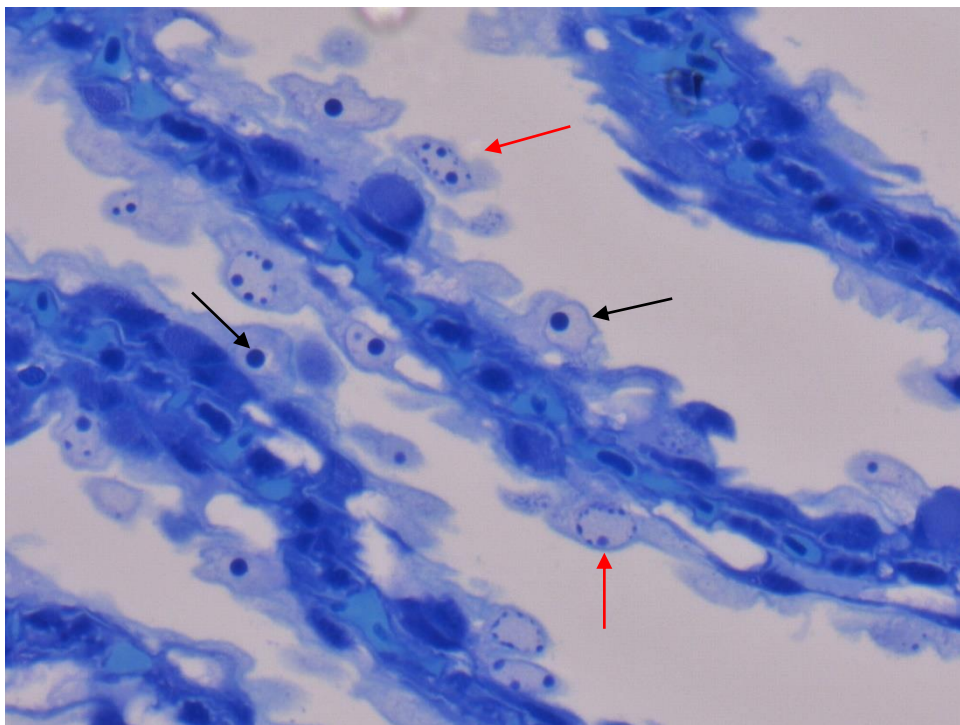
De fleste fiskene hadde «lifting» av epitelcellene, «klubbing» av sekundærlamellene og blødninger blant annet i uttrykk av «ballonger». Generelt var gjellehelsen svært dårlig (Figur 29-31) og det ble observert mye hypertrofi, hyperplasi og nekroser av cellekjerner. Cellekjernene var ofte avrundet og pyknotisk, mens den i andre tilfeller var oppløst (degenerert) og ble observert som mange små kjerner enten samlet sentralt i cellen eller helt perifert. Hypertrofi og -plasi ble stort sett registrert av epitelcellene. I noen tilfeller ble dette også observert i slimceller ofte med migrering ut mot gjelletuppene.



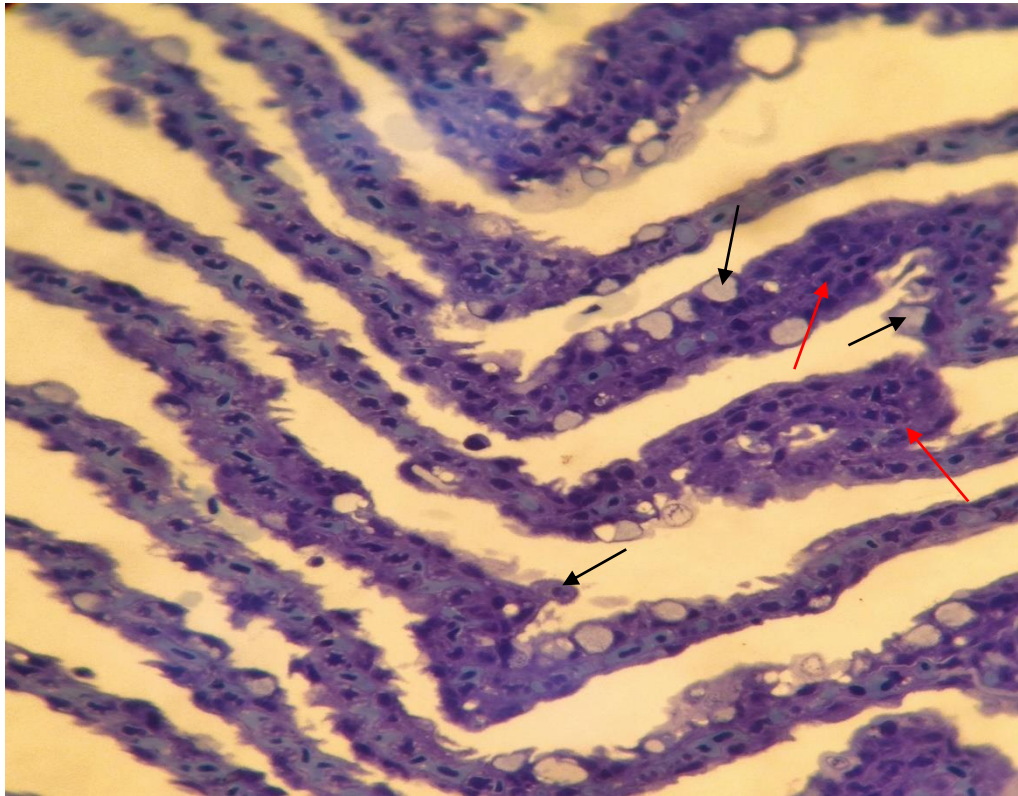
Figur 24: Sekundærlameller med «ballong» (rød pil) og «lifting» (svart pil). Fisk nr. 2 fra septemberuttaket (S170914). Objektivet har 20x forstørrelse.



Figur 25: Sekundærlameller med «klubbing» apikalt (svart pil). Fisk nr. 4 fra septemberuttaket (S170914). Objektivet har 20x forstørrelse.



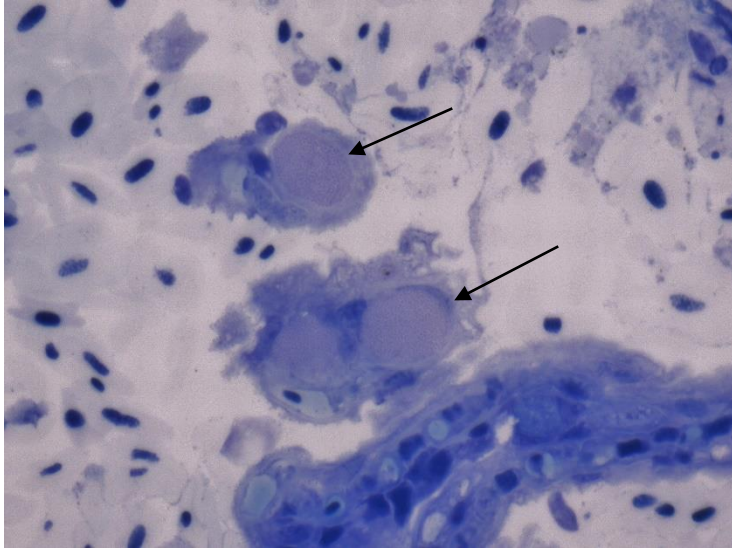
Figur 26: Epitelceller med degenerasjon. Cellene viser ulike stadier av degenerasjon der noen er pyknotisk (svart pil) og andre har oppløst cellekjerne (rød pil). Fisk nr. 1 fra septemberuttaket (S170914). Objektivet har 40x forstørrelse.



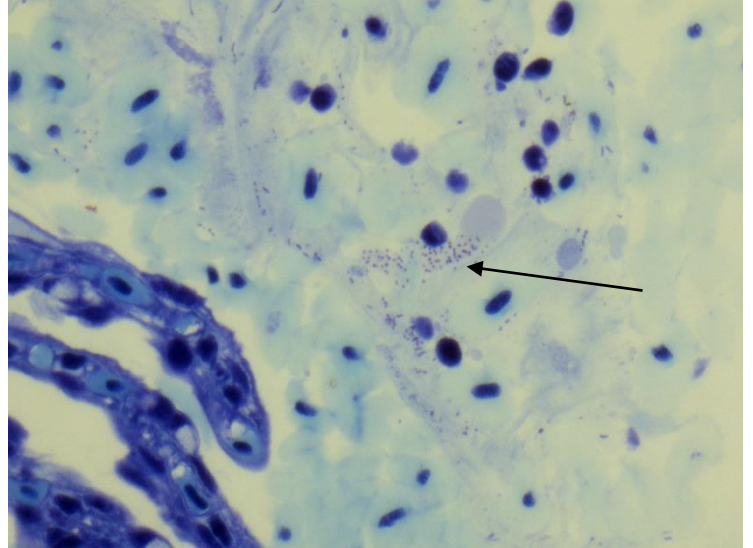
Figur 27: Sekundærlameller med hypertrofi (svart pil) og hyperplasi (rød pil). Fisk nr 5 fra septemberuttaket (S170914). Objektivt har 40x forstørrelse.

I tillegg til histopatologiske endringer, ble det i enkelte snitt observert tilstedeværelse av patogener. Det er ikke mulig å identifisere patogener kun ved histologiske observasjoner, men ved å sammenligne observasjonene med real-time RT-PCR analysene er det mulig å resonnerer seg frem til hvilket patogen det trolig kan være. Observasjoner gjort ved histologi tydet på stor tilstedeværelse av epiteliocystis-lignende celler med hypertrofiske celler der kjernen var dislokalisert til periferien (Figur 28). I tillegg var det i flere av cellene mulig å skimte tilstedeværelse av bakterielignende strukturer. Ved sammenligning med real-time RT-PCR analysene som viser enkelte fisk med svært lav Ct-verdi (Tabell 11), kan det tyde på at observasjonene gjort faktisk var av epiteliocyster. Det ble også gjort observasjoner av bakterielignende strukturer i blod like utenfor sekundærlamellene (Figur 29). Det ble ikke gjort videre undersøkelser av hva dette kunne være. Tilstedeværelse av amøber ved real-time RT-PCR viste seg å være lav. Det var kun 4 av 20 amøbeundersøkte (neo-ny, neo, Tssu og plathy) prøver som var positive, og av disse hadde 3 av 4 veldig høye Ct-verdier (lav tilstedeværelse). Til tross for høye Ct-verdier og manglene forekomst i real-time RT-PCR resultatene, ble det i enkelte histologisnitt observert amøbelignende strukturer (Figur 30-31). Dette kan tyde på at strukturene observert enten ikke var amøber eller at real-time RT-PCR assayene ikke detekterte

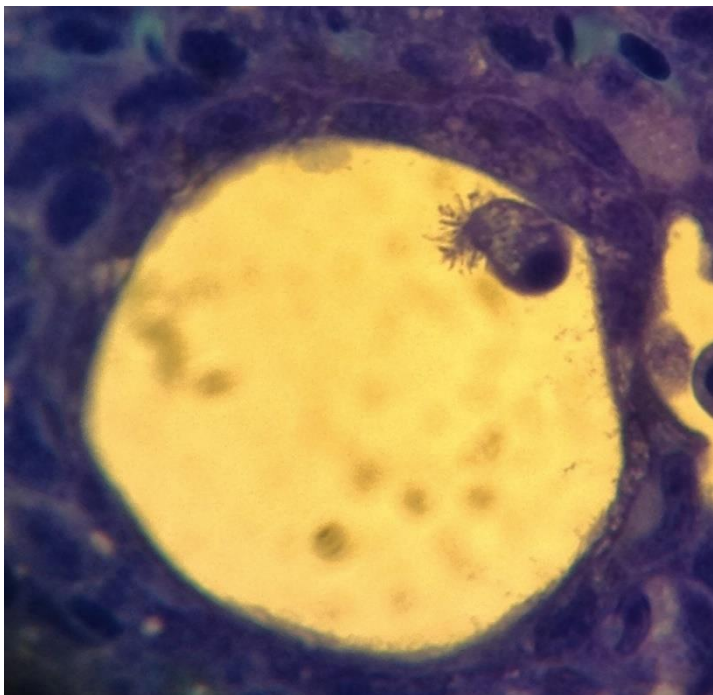
lav tilstedeværelse av amøbene. Lave Ct-verdier av både *P. theridion* og *I. salmonis* tilsier at det burde vært mulig å observere disse parasittene i histologiske gjellesnitt. Likevel ble verken *P. theridion* eller *I. salmonis* observert i undersøkelser av de fem fiskene.



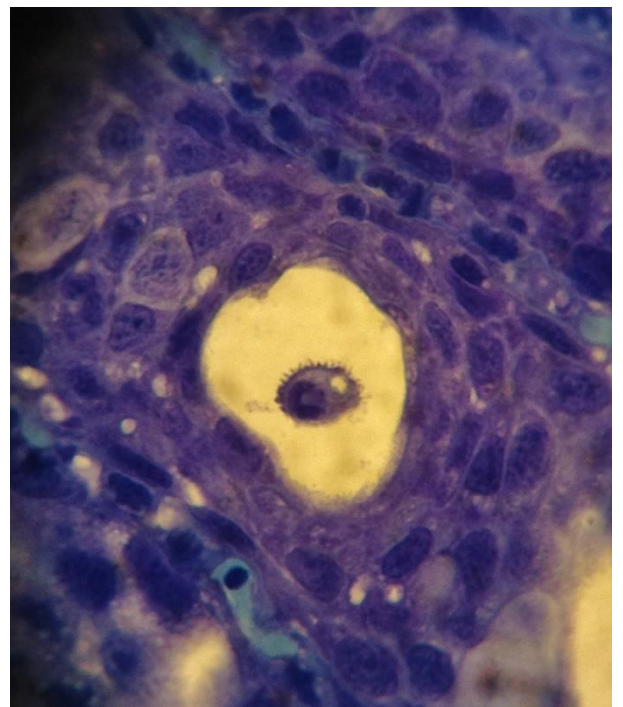
Figur 28: Epiteliocystis-lignende celler (svart pil). Cellene viser hypertrofi med dislokalisert kerne. Fisk nr 1 fra septemberuttaket (S170914). Objektivt har 40x forstørrelse.



Figur 29: Bakterie-lignende sturkruer (svart pil). Fisk nr 3 fra septemberuttaket (S170914). Objektivt har 40x forstørrelse.



Figur 30: Kavitet med amøbelignende struktur i gjellevevet til fisk nr 2 fra septemberuttaket (S170914). Objektivt har 40x forstørrelse.



Figur 31: Kavitet med amøbelignende struktur i gjellevevet til fisk nr 2 fra septemberuttaket (S170914). Objektivt har 40x forstørrelse.

Tabell 11: Oversikt over Ct-verdiene til undersøkte patogener ved siste uttak (S170914). Den samme fisken ble prøvetatt til histologi. Rutene er gitt fargekoder for å skille Ct-verdiene – mørk lilla = lav Ct (0-9,9), rosa = middels lav Ct (10-19,9), lys lilla = middels høy Ct (20-29,9), gul = høy Ct (30-->). Nuc = *P. theridion*, Neo-ny = *Paramoeba* spp., Neo = *P. perurans*, Epit = '*Ca. B. cysticola*', Costia = *I. salmonis*, Sch = '*Ca. S. salmonis*', PRV = piscine reovirus, SAV = salmonid alfavirus, Pch = '*Ca. P. salmonis*', TSSU = *Tetramitus* sp., Plathy = *Plathyamoeba* sp.

Fisk nr.	Nuc	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	PRV	SAV	Pch	Tssu	Plathy
1	17,0	Neg	Neg	8,2	12,4	Neg	21,9	27,5	Neg	36,0	Neg
2	17,0	Neg	Neg	6,9	13,5	29,8	22,1	29,6	Neg	Neg	Neg
3	22,5	20,2	Neg	17,2	16,9	28,0	23,4	30,1	Neg	35,2	Neg
4	20,8	Neg	Neg	14,0	15,2	35,6	24,4	23,6	Neg	36,6	Neg
5	26,8	Neg	Neg	19,8	28,2	Neg	21,4	26,4	Neg	Neg	Neg

Andre organer

Det ble ikke utført histopatologiske undersøkelser av hjerte, nyre, milt og lever på grunn av manglende tid og delvis ujevn infiltrering og farging av snittene.

Diskusjon

Dette arbeidet er et longitudinelt studium av tilstedeværelse av utvalgte gjellepatogener i en produksjonssyklus av høstutsatt smolt. Studien er konsentrert om følgende patogener: *Paranucleospora theridion*, *Ichthyobodo salmonis*, *Paramoeba* spp., ‘*Ca. Branchiomonas cysticola*’ og ‘*Ca. Sygnamydia salmonis*’, og hensikten er å beskrive hvordan disse varierer i prevalens og densitet gjennom den marine produksjonssyklusen for Atlantisk laks på Vestlandet. Tidligere studier har vist at temperatur er viktig for variasjon i *P. theridion*, og studier fra andre land indikerer at temperatur også kan være viktig for variasjon i *Paramoeba* spp. (Adams & Nowak, 2003; Clark & Nowak, 1999; Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2008; Sveen et al., 2012). Temperaturutviklingen gjennom studieperioden er derfor grundig diskutert. I tillegg ble det undersøkt for enkelte andre patogener, deriblant piscine reovirus (PRV) og salmonid alfavirus (SAV), i utvalgte uttak basert på utviklingen i anlegget, som vil si klinikk hos utvalgte fisk som kunne indikere tilstedeværelse av virus.

Temperatur

Sommeren 2014 var en uvanlig varm periode i hele landet med gjennomsnittlige månedstemperaturer på 0,3 – 4,3 °C over normaltemperatur (Meteorologisk institutt, 2014). Varmest var det i juli da månedstemperaturen var 4,3 °C over normalen for tidligere år, og det ble satt ny rekord med en hel grad (1 °C). Normalt vil de høye lufttemperaturene gjenspeiles i havtemperaturene, spesielt i overflatevannet. I dette studiet ble det kun gitt informasjon om temperatur på 5-meters dyp på studielokaliteten. Temperaturen fra 5-meters dyp viste 9 °C gjennom nesten hele studiet, desember 2013 til oktober 2014. Det kan mistenkes at disse målingene ikke er helt korrekte, ettersom det ble meldt om svært høy lufttemperatur i sommermånedene 2014.

Optimal temperaturen for Atlantisk laks kan variere med alder og størrelse, samt med tanke på hvilke parametere som måles. Det er vist at optimal temperatur for vekst hos oppdrettslaks er på rundt 13 °C, mens fôrutnyttelse er best på rundt 9-10,5 °C (Hadeland et al., 2003; Thodesen et al., 1999). Det kan derfor tenkes at laksen i anlegget ville holdt seg over 5-meters dyp ettersom temperaturmålingene i disse vannmassene var i det nedre sjiktet av fiskens optimaltemperatur.

Det ble også brukt overflatetemperaturer notert av ansvarlig veterinær på lokaliteten i studien. Disse temperaturene ble notert annenhver måned og gir dermed ikke et helhetlig bilde av temperaturvariasjonene. Det ble heller ikke notert temperaturer i sommermånedene (mai-august) når sjøtemperaturene mest sannsynlig var høyest. Utfra målingene brukt i studiet er det derfor ikke mulig å vite når temperaturene begynte å øke. Men ifølge en lokalitetsundersøkelse utført for lokaliteten i 2013, ble det konkludert med at laveste sjøtemperatur for området rundt anlegget normalt forekommer i mars-april. Det er derfor naturlig å anta at temperaturene begynte å øke fra mai-juni. Infeksjon og sykdomsutbrudd forekommer ofte ved økte sjøtemperaturer (Kvellestad et al., 2005; Nylund et al., 2011; Steinum et al. 2008; Steinum et al., 2010).

Dødelighet i anlegget

Det ble generelt registrert lav dødelighet i anlegget gjennom hele studiet. Prosentvis lå dødeligheten hovedsakelig mellom 1-2 (%). I april og august måned, henholdsvis uke 14 og 34, forekom det derimot avvik da det ble registrert tap og dødelighet av fisk på 25,5 % og 17,5 %. Tap av fisk i april skyldes hovedsakelig et havari ved anlegget.

Beregnet kondisjonsfaktor ved hvert uttak viste god og jevn kondisjon på fisken gjennom hele studieperioden. Kondisjonsfaktor baseres på antagelser om at vekt og lengde er i direkte korrelasjon og dermed at tyngre fisk med en gitt lengde har bedre kondisjon enn en lettere fisk av samme lengde (Datta et al., 2013; Refstie et al., 1998; Sutton et al. 2000). Kondisjon kan dermed reflektere fiskens spisevaner og fôrutnyttelse. Ved enkelte sykdommer kan det observeres redusert appetitt og mangel på fôr i mage og tarm (McLoughlin et al., 2002; McVicar, 1987). Da det ble registrert økt dødelighet ved anlegget i august-september, ble det målt en signifikant reduksjon i kondisjonsfaktor hos fisken (fra 1,39 til 1,08). Veterinæren meldte i tillegg om observasjoner av dårlig appetitt, som dermed kan tyde på mulig sykdom ved anlegget. Likevel forble kondisjonsfaktoren med en verdi over 1, som ifølge studier utført på «spotted snakehead» og Atlantisk laks er god kondisjon (Datta et al., 2013; Todd et al., 2008).

Mulige fysiske årsaker til dødelighet på studielokaliteten

Først og fremst er god smoltkvalitet viktig og en forutsetning ved sjøutsett av fisk. Dårlig smoltkvalitet, manglende smoltifisering og lav terskel for håndtering, kan føre til stor

dødelighet umiddelbart etter overføring til marint miljø (Strandmeyer, 1994). Med tanke på lav registrert dødelighet ($\leq 0,5$ %) ved anlegget i løpet av de første månedene i sjø, har smoltkvaliteten antageligvis vært generelt god.

I løpet av produksjonssyklusen ble det registrert flere tilfeller med lakselus, og behandling ble iverksatt etter lovverket (Forskrift om lakselusbekjempelse, § 8, 2013). I etterkant av behandlinger er det vanlig å observere noe økt dødelighet (personlig observasjon). Det var også tilfellet ved det undersøkte anlegget. Dødeligheten var som oftest ikke særlig markant og lå mellom 1-2 % i etterkant av behandling. Ved avlusning i august ble det derimot observert 17,5 % dødelighet. Behandlingen brukt var en kombinasjonsbehandling med Alpha Max og Trident. Kjemiske lusebehandlinger kan medføre store belastninger og økt stress hos fisken noe som igjen kan påvirke immunforsvaret til salmonider. Laks og regnbueørret som blir utsatt for stress over lengre perioder er vist å få redusert immunrespons, med mulig påfølgende økt mottakelighet for enkelte patogener (Fast et al., 2008; Maule et al., 1989; Roubal & Lester, 1989; Wiik et al., 1989). Årsaken til forøkt dødelighet ved den siste behandlingen var trolig en kombinasjon av stress påført fisken under behandling og tilstedeværelse av flere av de undersøkte patogenene.

I begynnelsen av år 2014 ble det registrert enkelte dødfisk med sårskader. Noen av sårtillfellene ble mistenkt å være forårsaket av bakterieinfeksjoner. Muligens kan bakteriene ha fått en inngangsport på fisken grunnet nedsatt immunforsvar etter stressende situasjoner under lusebehandling i desember. Sårforekomst kan også skyldes mekaniske skader etter store mengder parasitter på fisken og etter badebehandling mot lus. Økt dødelighet kan da være forårsaket av osmoregulatorisk sammenbrudd (Urawa, 1993; White, 1940; Wooten et al., 1982). Ved kjemisk behandling av fisk blir volumet i merdene redusert og biomassen av fisk per enhet blir dermed større og kan virke stressende for fisken. Følgelig kan det observeres (midlertidige) atferdsendringer som hurtig og ukontrollert svømming (Roth et al., 1993; pers. obs.). Ved behandlingen i desember ble det brukt lusemedikamentet «SLICE vet.» som er et medisinfôr. Sår forårsaket av mekanisk skade under behandling var dermed ikke tilfellet ved denne behandlingen.

Prevalens og densitet av utvalgte patogener

I september 2014 ble det påvist økt dødelighet i det undersøkte anlegget. I forbindelse med dødeligheten ble det registrert forhøyet densitet av følgende patogener; *P. theridion*, *Paramoeba* spp., ‘*Ca. B. cysticola*’, *I. salmonis*, ‘*Ca. S. salmonis*’ og SAV.

Paranucleospora theridion

Prevalens av *P. theridion* var høy, tilnærmet 100 %, gjennom hele studieperioden i sjø. I april ble det imidlertid registrert en svak nedgang i prevalens (87 %), det vil si i etterkant av en periode med lav temperatur. Denne nedgangen er mest sannsynlig relatert til den naturlige temperaturvariasjonen på kysten av Vestlandet med minimumstemperaturer i perioden februar til april (Aure & Strand, 2001; Havforskningsinstituttet, 2014). Et havari i anlegget med tap av mye fisk i ene merden rett før april-uttaket, kan muligens også vært av betydning. Densiteten av *P. theridion* varierte gjennom produksjonsperioden med høyest densitet i begge høstperiodene (september – november) noe som støtter tidligere observasjoner og hypotesen om at utviklingen til denne parasitten er temperaturavhengig. Parasittens utvikling i Atlantisk laks er avhengig av temperaturer over 10 °C (Nylund et al. 2011; Sveen et al. 2012). Det er også slik at forekomsten av lakselus, *Lepeophtheirus salmonis*, er høyere i sommer-høst perioden slik at sporer produsert i lusen vil utgjøre et høyere smittepress om høsten enn i andre sesonger (Heuch et al., 2000; Rikardsen, 2004). Tidligere studier har dessuten vist at gjellene er en viktig innfallspurt for smitte med *P. theridion*, og ved temperaturer under 10 °C kan en ha høye densiteter på gjellene uten at smitten spres systemisk i fisken (Sveen et al. 2012).

En antar at *P. theridion* spres passivt i sjø via sporer frigitt fra lakselus (Sveen et al., 2012). Levetiden til disse sporene er ikke kjent, men smittestudier tyder på at evnen til å infisere opprettholdes over lang tid (A. Nylund, pers. kom.). Lang overlevelse av sporer er også kjent for andre mikrosporidier (Amigó et al., 1996; Fayer, 2004; Olsen, 1981). Antall lakselus registrert på anlegget i oktober (2013) er ukjent, men med tanke på at første lusebehandling var to måneder etter sjøutsett av fisken, hadde antageligvis anlegget lav prevalens av lakselus i denne perioden. Til tross for lite lakselus, opplevde anlegget høy prevalens av *P. theridion* umiddelbart etter sjøutsett. Det er derfor rimelig å anta at de sporene som har smittet fisken i anlegget ikke er produsert av lakselus i det aktuelle anlegget. Avhengig av strømforholdene i området, kan muligens smittepress av *P. theridion* komme fra andre lakseanlegg som kan ligge

i betydelig avstand fra studie-lokaliteten. Basert på målinger av overflatetemperatur fremgår det at densiteten av *P. theridion* i gjellene til laks korrelerer med temperatur.

Paramoeba spp.

Gjennom studieperioden ble det undersøkt for både *Paramoeba perurans* og *Paramoeba* spp. Det ble kun registrert tilstedeværelse av *P. perurans* i to tilfeller (desember 2013 og februar 2014) med lav prevalens. Tilfellene sammenfalt med positive uttak for *Paramoeba* spp. og det ble derfor ikke gjort videre undersøkelser. *Paramoeba* spp. ble registrert i ni av femten uttak. Tilstedeværelse og densitet av *Paramoeba* spp. var generelt lav ved alle undersøkelser, men med topper i februar og september. Den høye densiteten av amøber registrert i februar skyldes ett individ som var tungt infisert (Ct 11,3). Dette var et enkelt tilfelle i et uttak med kun tre positive individer og kunne ikke knyttes til sykdom og dødelighet i anlegget. Med andre ord ble det kun registrert høy densitet av *Paramoeba* spp. ved siste uttak i studieperioden i september. I de fire foregående uttakene ble det ikke registrert tilstedeværelse av amøber. Økningen i densitet av *Paramoeba* spp. i september sammenfaller med økt dødelighet i anlegget og det kan ikke utelukkes at amøber kan ha bidratt til dødeligheten, men histologiske undersøkelser av gjellene synes ikke å støtte en slik hypotese. Typiske histologiske endringer ved amøbesykdom er hyperplasi og hypertrofi av epitelceller, og sammenvoksing av sekundærlamellene (Adams et al., 2004; Butos et al., 2011; Crosbie et al., 2012; Kent et al., 1988; Roubal et al., 1989; Steinum et al., 2008; Young et al., 2008; Zilberg & Munday, 2005). Lignende observasjoner ble gjort av gjellene fra siste uttak i studieperioden, men karakteristiske kaviteter med amøbe-lignende strukturer ble ikke observert.

Forekomst og densitet av *Paramoeba* spp. påvirkes av miljøfaktorer, spesielt vanntemperatur og salinitet, og begrenses ved temperaturer under 10 °C og salinitet lavere enn 30 ‰ (Adams & Nowak, 2003; Clark & Nowak, 1999; Steinum et al., 2008). Ved siste uttak i september ble overflatetemperaturene målt til omtrent 16 °C og det er tenkelig at dette kan ha medvirket til forekomsten av amøben denne måneden. I tidligere studier er det ofte observert en økning av amøben i perioder med høye sjøtemperaturer (Adams & Nowak, 2003; Bermingham & Mulchay, 2006; Clark & Nowak, 1999; Steinum et al., 2008). I følge Steinum et al. (2008) ble det imidlertid i en studie observert redusert temperatur i forkant av dødelighet assosiert med *Paramoeba* spp. Temperaturene for mai-juli er ikke registrert (målt) i denne studien, og det er derfor vanskelig å vite om den økte dødeligheten i dette anlegget kom ved fallende

temperaturer. Men med tanke på at det var en svært varm sommerperiode i hele landet (Meteorologisk institutt, 2014), og det ble registrert sjøtemperaturer oppimot 20 °C på kysten av Hordaland (pers. obs.), er det mulig at det kan ha vært en reduksjon i temperaturen før september.

'Ca. Branchiomonas cysticola'

Tilstedeværelse av bakterien '*Ca. B. cysticola*' ble registrert tidlig i studieperioden og forekomsten økte til 100 % i mai og dette vedvarte ut studieperioden. Densiteten av bakterien økte kraftig ved uttaket i juni sammenlignet med de tidligere månedene. Videre ble det registrert gradvis økning frem til september. I de tre siste uttakene ble det målt gjennomsnittlige Ct-verdier mellom 7,1-13,9. Tilstedeværelse av '*Ca. B. cysticola*' er funnet i nyrevev hos ulike fiskearter og tyder på en mulig systemisk infeksjon (Lai et al., 2013; Tolås, 2012). Tolås (2012) mente også at det muligens fantes en alternativ innfallspport til gjellene ettersom bakterien kun ble funnet i nyrevev ved første uttak (i ferskvann). I dette studiet ble det registrert høy densitet av bakterien i gjellevev allerede ved første uttak etter sjøsetting av fisken. Nyrevev ble ikke analysert og det er derfor ikke kjent om bakterien ga systemisk infeksjon.

'*Ca. B. cysticola*' er funnet å tilhøre den «normale» gjellefloraen hos Atlantisk laks (Mitchell et al., 2013; Toenshoff et al., 2012; Tolås, 2012). Tilsynelatende «frisk» fisk er blitt registrert med Ct-verdier mellom 17,8-37,9 (Mitchell et al., 2013; Tolås, 2012). Funn fra denne studien støtter tidligere observasjoner med tanke på at økt dødelighet først forekom i september til tross for tilstedeværelse av bakterien gjennom hele studiet. Likevel ble det ikke registrert lave Ct-verdier (< 20) hos den undersøkte fisken før i juni, noe som indikerer at fisken mest sannsynlig var bærer av bakterien de første ni månedene av studieperioden.

Bakterien er assosiert med gjellesykdom, da store mengder epiteliocyster ofte observeres ved sykdom (Mitchell et al., 2013; Nowak & LaPatra, 2006; Nylund et al., 1998; Steinum et al., 2010; Toenshoff et al., 2012). Epiteliocystis er forbundet med flere etiologiske agens, deriblant '*Ca. B. cysticola*' og '*Ca. P. salmonis*'. Sykdomsutbrudd med epiteliocystis opptrer ofte ved økende vanntemperaturer i løpet av sommer- og høstmånedene (Mitchell et al., 2013; Nowak & LaPatra, 2006; Nylund et al., 1998; Steinum et al., 2010; Toenshoff et al., 2012), og lave temperaturer er vist å redusere mengden '*Ca. B. cysticola*' i utbrudd (Tolås, 2012). Temperatur

ser ut til å påvirke densiteten av '*Ca. B. cysticola*' i denne studien og samsvarer dermed med resultater fra tidligere studier.

'*Ca. P. salmonis*' ble kun undersøkt ved siste uttak, og viste moderat prevalens og densitet. Det hadde vært interessant å undersøke når tilstedeværelse av patogenet forekom første gang, men på grunn av denne oppgavens begrensede omfang er det ikke funnet tid å gjøre dette. I noen tidligere studier er det funnet at tilstedeværelse av '*Ca. P. salmonis*' ikke er direkte korrelert med forekomst av epiteliocystis, da prevalens av epiteliocyster var langt større/høyere enn prevalens av bakterien i enkelte analyser (Mitchell et al., 2013; Steinum et al., 2010; Toenshoff et al., 2012). I en annen studie er det likevel vist en korrelasjon mellom bakterien og utvikling av gjellesykdom (Steinum et al., 2010).

'*Ca. Sygnamydia salmonis*'

'*Ca. S. salmonis*' er nylig karakterisert (Nylund et al., 2014) og det er dermed svært begrenset med informasjon om denne bakterien. Tilstedeværelse av '*Ca. S. salmonis*' ble registrert med lav til moderat prevalens i ti av uttakene i studieperioden. I siste uttak hadde prevalensen økt til 52 %. Densitet av bakterien var lav gjennom hele studiet der Ct-verdiene stort sett var over 30 ($26 < Ct < 39,1$). I februar ble det registrert ett individ med moderat infeksjon og ett individ som var betydelig infisert av bakterien, med Ct-verdier på henholdsvis 24,6 og 16,5.

Til tross for lite variasjon mellom uttakene, viser resultatene i dette studiet at bakterien hadde lavest prevalens og densitet i sommermånedene. Dette er interessant med tanke på at flere patogener har tendenser til å øke i prevalens og densitet i varme perioder (eksempelvis *P. theridion*, *I. salmonis* og '*Ca. B. cysticola*). Likevel viser '*Ca. S. salmonis*' like tendenser som *Paramoeba* spp. I humanmedisin er det blitt observert en mulig sammenheng mellom amøber og arter av *Chlamydia*, der *Chlamydia* spp. er vist å være endosymbionter i amøbene med evnen til å overleve og vokse i verten (Amann et al., 1997; Essing et al., 1997; Fritsche et al., 1993; Kahane et al., 2001; Thomas et al., 2006). I studieperioden ble det registrert fisk som var positiv for både *Paramoeba* spp. og '*Ca. S. salmonis*' i syv av uttakene. Det var tilfellet i fisken med Ct-verdi på 16,5 for '*Ca. S. salmonis*' da den i tillegg var infisert med *Paramoeba* spp. (Ct-verdi 11,3). Signifikansen og korrelasjonen av disse tilfellene ble ikke undersøkt, men med tanke på lik tendenser i observert densitet er det mulig at det er en sammenheng mellom patogener.

Ichthyobodo salmonis

Forekomst av *I. salmonis* ble registrert i alle uttakene gjennom studieforløpet, men stabiliserte seg på rundt 100 % fra mai og utover. Det ble registrert en signifikant økning i densitet av parasitten fra mai og til september, med gjennomsnittlige Ct-verdier på 14 og 17 i september uttakene.

Beskrivelse av dødelighet og histopatologi direkte forbundet til *I. salmonis* er begrenset ettersom parasitten nylig har blitt beskrevet som egen art og ofte er blitt observert i forbindelse med gjellesykdom og infeksjoner med flere patogener (Isaksen et al., 2011; Isaksen et al., 2012; Nylund et al., 2011). Likevel er det rapportert om høye dødeligheter av Atlantisk laks i sjø, trolig grunnet denne parasitten (Bruno, 1992; Ellis & Wootten, 1978; Poppe & Håstein, 1982). Dødelighet forekom i løpet av sommer og høst kort tid etter sjøsetting av smolt. Laks i dette studiet var allerede infisert av parasitten i ferskvann og infeksjonen ble antageligvis overført til sjøvannsfasen med fisken der det etter hvert forkom et økt infeksjonspress ved høyere temperaturer som observert i tidligere studier (Bruno, 1992; Ellis & Wootten, 1978; Todal et al., 2004). Redusert salinitet og økte temperaturer påvirker trolig proliferasjon av parasitten (Ellis & Wootten, 1978). Tilstedeværelse av *I. salmonis* kan ha bidratt til den økte dødeligheten observert i september ettersom det ble registrert proliferasjon av parasitten fra august og til siste uttak i september.

Gjellesykdom på studielokaliteten

Gjelleproblem er blant de viktigste dødsårsakene hos oppdrettet Atlantisk laks på Vestlandet. Det har vært rapportert om dødelighet på >10-50 % og store økonomiske tap i oppdrettsnæringen, trolig forårsaket av PGI (Flesjø et al., 2004; Hjeltnes, 2011; Kvellestad et al., 2004; Nylund et al., 2008; Nylund et al., 2011). Stor dødelighet og tap er også rapportert fra Irland (Rodgers, 2007).

PGI og PGD er gjellesykdom som ikke har en klar etiologi, men det er registrert tilstedeværelse av flere ulike patogener ved slike sykdomsutbrudd (Karlsen et al., 2004; Nylund et al., 2008; Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). Årsakene til gjellesykdommer har blitt forklart som multifaktoriell og assosiert med tilstedeværelse av ASPV (Kvellestad et al., 2003), SGPV (Nylund et al., 2008), *Paranucleospora theridion* (Nylund et al., 2010), *Ichthyobodo* sp.

(Kvellestad et al., 2005), Chlamydia-lignende bakterier (Draghi et al., 2004; Nylund et al., 1998) og 'Ca. Branchiomonas cysticola' (Toenshoff et al., 2012). Analysene for september 2014 avslørte tilsvarende observasjoner av patogener ved det undersøkte anlegget. Real-time RT-PCR viste høy tilstedeværelse av *P. theridion*, *I. salmonis* og 'Ca. B. cysticola', samt moderate mengder av 'Ca. P. salmonis'. I tillegg ble det registrert moderate mengder av *Paramoeba* spp. og *Tetramitus* sp. som i senere år er assosiert med gjellesykdom i Norge (Nylund et al., 2008; Steinum et al., 2008, A. Nylund pers. kom.). Det ble ikke undersøkt for virusene ASPV eller SGPV, da betydning og tilstedeværelsen av disse patogener ved sykdomsutbrudd har vist seg å være variabel (Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010).

PGI har blitt definert histopatologisk med sirkulasjonsforstyrrelser, betennelsesreaksjon, hyperplasi, -trofi og nekrose av epitelceller (Kvellestad et al., 2005; Nylund et al., 2008; Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). Gjellehistopatologien på det undersøkte anlegget tilsvarte til en viss grad den som er observert ved PGI. Store mengder hypertrofiske celler ble observert hos alle de undersøkte fiskene. Alle fiskene hadde i tillegg massiv nekrose av epitelceller, og viste betydelig hyperplasi og blødning. Betennelsesreaksjonene var relativt begrenset, men tilstedeværelse av en del leukocytter ble notert. Flere av de hypertrofiske cellene inneholdt bakteriellignende strukturer og cellekjernene var lokalisert i periferien ved celleveggen, lignende til tidligere observasjoner gjort av epiteliocyster (Mitchell et al., 2013; Nylund et al., 1998; Toenshoff et al., 2012).

Gjellesykdomsutbrudd kan være omfattende og vare i flere måneder (Kvellestad et al., 2004; Kvellestad et al., 2005; Steinum et al., 2010). Sykdommen er vanligst forekommende i sørvest Norge og ses første høst etter sjøutsett som vanligvis vil si etter at fisken har vært 3-5 måneder i sjø (Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). I og med at fisken i anlegget ble sjøutsatt i oktober, følger den ikke nødvendigvis det samme sykdomsforløpet som beskrevet over. Førstkommende høst etter utsett blir for den aktuelle fisken omtrent ett år etter utsett, noe som tilsier at fisken ikke lenger er svak og like lett påvirkelig av ytre faktorer som blant annet temperatur og salinitet. Likevel ble det høsten 2014 observert økt dødelighet ved anlegget som trolig var forårsaket av gjellesykdom eventuelt i kombinasjon med SAV (og mulig utvikling av pankreassykdom). Det ble ikke foretatt histopatologiske undersøkelser som kunne klarlegge om fisken også hadde pankreassykdom.

Andre sykdommer

Ikke-dødelige infeksjoner med parasitter som *Eubothrium* spp. vil kunne medføre veksttap, redusert reproduktivitet og økt mottakelighet for andre patogene agens eller dårligere fôrutnyttelse (Bristow & Berland, 1991; Saksvik et al., 2001). I mai ble det gjennomført en behandling mot bendelorm. Kondisjonsfaktorene utregnet for april og mai reflekterte ikke dårlig appetitt og opptak av næringsstoffer som typisk observeres hos fisk med bendelorminfeksjoner. Det ble ikke notert spesielle funn av bendelorm ved prøveuttak, kun enkelt funn av parasitten ble notert. Sannsynligvis var prøvetatt fisk lite påvirket av infeksjonen og dermed ble det ikke registrert betydelige endringer i kondisjonsfaktoren.

På grunn av tilfeller med atferdsendringer og patologi som ikke kunne knyttes til de undersøkte gjellepatogenene, ble det i løpet av studiet undersøkt for virusene PRV og SAV (Weston et al., 2002). Virusene blir assosiert til alvorlige sykdommer i oppdrett av Atlantisk laks på Vestlandet, henholdsvis hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (Kongtorp et al., 2004a) og pankreassykdom (PD) (Munro et al., 1984).

Det er rapportert om sykdomsutbrudd med HSMB i oppdrett av Atlantisk laks spredt over hele norskekysten ofte 5-9 måneder etter sjøutsett. Utbrudd kan også inntreffe kun få uker etter utsett (Kongtorp et al., 2004a; Kongtorp et al., 2004b; Nylund et al., 2011; Watanabe et al., 2006). Det er også vist at risikoen for HSMB-utbrudd er dobbelt så høy for høstsmolt sammenlignet med vårutsatt smolt (Aldrin et al., 2010). Sykdommen er assosiert med relativt lav dødelighet (10-20 %), men viruset kan ligge latent i fisken og gi sykdom i kombinasjon med tilstedeværelse av andre patogener (Kongtorp et al., 2004a; Nylund et al., 2011; Watanabe et al., 2006). I dette studiet ble det registrert tilstedeværelse av PRV allerede i desember 2013. Siden densiteten av patogenet var forholdsvis jevn i siste del av studieperioden, kan det tenkes at en sammenheng med andre patogener kan ha forårsaket dødeligheten i september. Store mengder av blant annet parasitten *P. theridion* ble registrert i løpet av studieperioden og er ved flere tidligere anledninger funnet i anlegg med diagnosen HSMB (Nylund et al., 2010; Nylund et al., 2011).

I mars måned ble det observert blødninger i hjertehulen hos dissekert fisk ved anlegget, tilsvarende observasjoner gjort tidligere hos HSMB-infisert fisk (Kongtorp et al., 2004b; Watanabe et al., 2006). Leverpatologien var vanskelig å definere, men observasjoner av misfarging ble hyppig notert. Blek eller misfarget lever kan også være et sykdomstegn ved HSMB infeksjon (Kongtorp et al., 2004b; Watanabe et al., 2006).

Vanlige histopatologiske funn ved HSMB er nekroser og betennelse i hjertet (panmyocarditt) med infiltrering av leukocytter. I tillegg kan det observeres hyperplasi (hypercellularitet) og manglende strukturer i rød muskulatur. Leverpatologi kan vise nekrotiske områder med vakuoliserte og pyknotiske celler (Kongtorp et al., 2004a; Kongtorp et al., 2004b; Watanabe et al., 2006). Det ble ikke gjort undersøkelser av histologisnitt fra hjerte eller lever ettersom resultatet av vevsinnstøpingen ikke ble tilfredsstillende. Det er derfor vanskelig å diskutere histologiske observasjoner i henhold til HSMB ved anlegget.

I en ny studie utført av Finstad et al. (2014) ble det vist at røde blodceller er hovedmålcellen til PRV. Undersøkt blod viste større mengder virus enn hjerte- og skjelettmuskulatur som vanligvis blir brukt i diagnostisering av sykdommen HSMB. I dette studiet ble tilstedeværelse av PRV kun undersøkt i gjellevev, men siden dette er et blodrikt organ skal det i stor grad kunne reflektere forekomsten av PRV i fisken. Densitet av viruset holdt seg mellom 20,2 (juli) og 25,1 (februar) i gjennomsnittlig Ct-verdi for uttakene gjennom studieperioden. Siden virusmengde knapt varierte gjennom studiet, er det lite trolig at PRV i seg selv var med på å forårsake dødelighet i anlegget. Likevel var mengden såpass høy at det kan ha vært en medvirkende årsak sammen med de andre patogener som ble undersøkt.

PD-utbrudd forårsaker store økonomiske tap for norsk oppdrettsnæring (Aunsmo et al., 2010). Sykdommen PD er assosiert med salmonid alphavirus, SAV. Det er per dags dato identifisert 6 subtyper av SAV (1-6) som infiserer salmonider i ferskvann og saltvann (Fringuelli et al., 2008; Graham et al., 2011). Frem til 2011 var SAV 3 (NSAV; Hodneland et al., 2005) den eneste subtypen identifisert i Norge (Jansen et al., 2010). I 2011 ble imidlertid SAV 2 isolert fra regnbueørret i ferskvannsoppdrett (Hjortaas et al., 2013).

Sykdomsutbrudd i saltvann forekommer vanligvis i løpet av det første året, ofte 5-7 måneder etter sjøutsett (Hodneland et al., 2005; Hodneland & Endresen, 2006), men det er også observert utbrudd allerede 2,5 måneder etter utsett og helt frem til slakting (Jansen et al., 2010; Munro et al., 1984). Det vist at høstutsatt smolt er mer mottakelig for PD-sykdom siden smolten sjøsettes i en periode med lave temperaturer og høyt infeksjonspress (Kristoffersen et al., 2009). Til tross for dette ble det ikke påvist SAV i anlegget før i juni, ni måneder etter utsett. Dødelighet varierer fra utbrudd til utbrudd, men det er registrert dødelighet opptil 27 % (Jansen et al., 2007). Densiteten av viruset på studielokaliteten økte gradvis fra juni til første uttak i september, etterfulgt av en kraftig økning i siste uttak. Dødelighet ble ikke relatert til viruset i løpet av studiet, men potensielt kan SAV forekomme latent i fisk og utløse sykdom dersom

miljømessige forhold eller andre patogener svekker fisken (Hodneland et al., 2005; Kristoffersen et al., 2009).

Histologiske endringer som alltid vil kunne observeres ved sykdomsutbrudd assosiert med PD, innebærer myopati av hjerte- og skjelettmuskulatur, samt lesjoner i eksokrin pankreas (Hjortaaas et al., 2013; Hodneland & Endresen, 2006; Munro et al., 1984). Det ble ikke tatt histologiske prøver fra verken pankreas eller muskulatur ved siste uttak i september. Ettersom undersøkelse av disse vevene er viktig for å diagnostisere PD, er det vanskelig å uttale seg om mulighet for påvirkning av SAV-viruset i fisken.

Konklusjon

I denne studien ble prevalens og densitet av utvalgte patogener fulgt hyppig med månedlige prøveuttak i ett år. Prevalens og densitet av *P. theridion*, '*Ca. B. cysticola*' og *I. salmonis* viste tidlig tilstedeværelse og fra mai ble det registrert signifikant økning i densitet av patogenene frem til økt dødelighet i anlegget i september. *Paramoeba* spp og '*Ca. S. salmonis*' viste varierende prevalens og densitet gjennom studiet. Forekomst og tetthet av patogenene økte betraktelig ved siste uttak i september sammenlignet med de tidligere uttakene da prevalens var under 10 %. SAV ble først detektert i juni og både prevalens og densitet økte betydelig frem til siste uttak i studieperioden. PRV skilte seg ut i og med at dette var det eneste undersøkte patogenet som ikke økte i densitet i september. Viruset holdt seg stabilt på moderate megder gjennom hele studieperioden.

Studien viser en klar etablering av gjellepatogenene *P. theridion*, '*Ca. B. cysticola*' og *I. salmonis* i fiskepopulasjonen før gradvis forekomst av de andre undersøkte patogenene kunne identifiseres. I og med at det ikke ble registrert økt dødelighet før i september, indikerer resultatene at de tre nevnte patogenene antageligvis er vanlig forekommende hos oppdrett av Atlantisk laks på Vestlandet, men at økt densitet kan føre til svekket fisk (mer mottakelig for andre patogener) og dødelighet. Det har ikke vært mulig å identifisere et spesifikt patogen som årsak til sykdomsutvikling i denne studien. Det kan spekuleres i om høy sjøtemperatur kan ha påvirket dynamikken i sykdomsforløpet og ført til høy proliferasjon av enkelte patogener. Det er knyttet en del usikkerhet til temperaturmålingene gjort i studien, og det er derfor vanskelig å trekke noen klar konklusjon om betydningen av temperatur og patogenenes dynamikk. Likevel kan studien peke mot at prevalens og densitet av *P. theridion*, *Paramoeba* spp., '*Ca. B. cysticola*', '*Ca. S. salmonis*', *I. salmonis* og SAV kan påvirkes av temperatur ettersom densitet

av alle patogenene økte i september. Ved senere studier bør temperatur måles hyppigere enn det som ble gjort i denne studien.

Histologiske undersøkelser viste sirkulasjonsforstyrrelser med infiltrering av betennelsesceller, og hypertrofi og hyperplasi av epitelceller lignende til beskrivelser gjort ved gjellesykdommen PGI. Histopatologiske undersøkelser sammen med real-time RT-PCR analyser tyder på at fisken i anlegget hadde gjellesykdom ved siste uttak i september.

Referanser

Adams, M.B & Nowak, B.F. (2003) Amoebic gill disease: sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 26, s. 601-614.

Adams, M.B., Ellard, K. & Nowak, B.F. (2004) Gross pathology and its relationship with histopathology of amoebic gill disease (AGD) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 27, s. 151-161.

Aldrin, M., Storvik, B., Grigessi, A., Viljugrein, H. & Jansen, P.A. (2010) A stochastic model for the assessment of the transmission pathway of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon, anaemia in marine fish farms in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, september, s. 51-61.

Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Müller, K-D. & Michel, R. (1997) Obligate Intracellular Bacterial Parasites of Acanthamoebae Related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1), januar, s. 115-121.

Amigó, J.M., Gracia, M.P., Rius, M., Salvadó, H., Maillo, P.A. & Vivarés, C.P. (1996) Longevity and effects of temperature on the viability and polar-tube extrusion of spores of *Glugea stephani*, a microsporidian parasite of commercial flatfish. *Parasitology Research*, 82, august, s. 211-214.

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, oktober, s. 233-241.

Aure, J. & Strand, Ø. (2001) Hydrografiske normaler og langtidsvariasjoner i norske kystfarvann mellom 1936 og 2000. *Fisken og Havet*, 13, november.

Bermingham, M.L. & Mulcahy, M.F. (2006) Microfauna associated with amoebic gill disease in sea-farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts. *Journal of Fish Diseases*, 29, s. 455-465.

Bristow, G.A. & Berland, B. (1991) The effect of long term, low level *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) infection on growth in farmed salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 98, mars, s. 325-330.

Bruno, D.W. (1992) *Ichthyobodo* sp. on farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the marine environment. *Journal of Fish Diseases*, 15, s. 349-351.

Bruno, D.W., Noguera, P.A. & Poppe, T.T. (2013) *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. 2. utg., Springer.

Butos, P.A., Young, N.D., Rozas, M.A., Bohle, H.M., Ildefonso, R.S., Morrison, R.N. & Nowak, B.F. (2011) Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile. *Aquaculture*, 310 november, s. 281-288.

Clark, A. & Nowak, B.F. (1999) Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases*, 22, s. 433-443.

Crosbie, P.B.B., Bridle, A.R., Cadoret, K. & Nowak, B.F. (2012) In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in Atlantic salmon and fulfils Koch's postulates. *International Journal for Parasitology*, 42, april, s. 511-515.

Datta, S.N., Kaur, V.I., Dhawan, A. & Jassal, G. (2013) Estimation of length-weight relationship and condition factor of spotted snakehead *Channa punctata* (Bloch) under different feeding regimes. *SpringerPlus*, 2 (436).

Devold, M., Krossøy, B., Aspehaug, V. & Nylund, A. (2000) Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40 februar, s. 9-18.

Draghi II, A., Popov, V.L., Kahl, M.M., Stanton, J.B., Brown, C.C., Tsongalis, G.J., West, A.B. & Frasca Jr., S. (2004) Characterization of «*Candidatus Piscichlamydia salmonis*» (Order *Chlamydiales*), a Chlamydia-like bacterium associated with Epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (11) november, s. 5286-5297.

Dyková, I., Nowak, B.F., Crosbie, P.B.B., Fiala, I., Pecková, H., Adams, M.B., Macháčková, B. & Dvořáková, H. (2005) *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains. *Journal of Fish Diseases*, 28, s. 49-64.

Ellis, A.E. & Wootten, R. (1978) Costiasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. smolts in seawater. *Journal of Fish Diseases*, 1, s. 389-393.

Ellis, A.E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, s. 827-839.

Essing, A., Heinemann, M., Simnacher, U. & Marre, R. (1997) Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4), april, s. 1396-1399.

Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A. & Ross, N.W. (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132, mars, s. 645-657.

Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C. & Afonso, L.O.B. (2008) Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 24, oktober, s. 194-204.

Fayer, R. (2004) Infectivity of Microsporidia Apores Stored in Seawater at Environmental Temperatures. *Journal of Parasitology*, 90 (3), s. 654-657.

Feehan, C.J., Johnson-Mackinnon, J., Scheibling, R.E., Lauzon-Guay, J-S. & Simpson, A.G.B. (2013) Validating the identity of *Paramoeba invadens* the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103 april, s. 209-227.

Findlay, V.I. (2001) *Demonstration and manipulation of acquired resistance to amoebic gill disease in Atlantic salmon, Salmo salar L.* Akademisk avhandling, Universitetet i Tasmania.

Finstad, Ø.W., Dahle, M.K., Lindholm, T.H., Nyman, I.B., Løvoll, M., Wallace, C., Olsen, C.M., Storset, C.M. & Rimstad, E. (2014) Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Veterinary Research*, 45 (35).

Flesjå, K.I., Hjeltnes, B., Johansen, R., Norheim, K., Olsen, A.B. & Skjeldstad, H.R. (2004) Helsesituasjonen hos laksefisk. *Havbruksrapporten*, s. 25-29.

Forskrift om lakselusbekjempelse. (2012) *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140?q=lakselus> [Lest: 21. desember 2014].

Freeman, M.A., Bell, A.S. & Sommerville, C. (2003) A hyperparasitic microsporidian infecting the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*: an rDNA-based molecular phylogenetic study. *Journal of Fish Diseases*, 26, s. 667-676.

Freeman, M.A. & Sommerville, C. (2009) *Desmozoon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasites & Vectors*, 2 (58) november.

Fringuelli, E., Gordon, A.W., Rodger, H., Welsh, M.D. & Graham, D.A. (2012) Detection of *Neoparamoeba perurans* by duplex quantitative Taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded Atlantic salmonid gill tissues. *Journal of Fish Diseases*, 35, s. 711-724.

Fritsche, T.R., Gautam, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.I. & Lindquist (1993) Occurrence of Bacterial Endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. Isolated from Corneal and Environmental Specimens and Contact Lenses. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (5), mai, s. 1122-1126.

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, s. 273-286.

Hadeland, S.O., Björnsson, B.T., Arnesen, A.M. & Stefansson, S.O. (2003) Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture*, 220, s. 367-384.

Haugarvoll, E., Bjerkås, I., Nowak, B.F., Hordvik, I. & Koppang, E.O. (2008) Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy*, 213, mars, s. 202-209.

Havforskningsinstituttet (29. april 2014) *Kystklima* [Internett], Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig fra: <http://www.imr.no/temasider/klima/klimastatus/kystklima/kystklima/nb-no> [Lest 29. desember 2014].

Henneguy, L.F. (1883) Sur un infusoire flagellé, ectoparasite des poissons. *C R Hebd Séances Acad Sci*, 96, s. 658-660.

Heuch, P.A., Nordhagen, J.R. & Schram, T.A. (2000) Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research*, 31, s. 805-814.

Hjeltnes, B. (red) *Fiskehelse rapporten 2010*. Oslo, Veterinærinstituttet, 2011.

Hjeltnes, B. (red) *Fiskehelse rapporten 2012*. Oslo, Veterinærinstituttet, 2013.

- Hjeltnes, B. (red) *Fiskehelse rapporten 2013*. Oslo, Veterinærinstituttet, 2014.
- Hjortaas, M.J., Skjelstad, H.R., Taksdal, T., Olsen, A.B., Johansen, R., Bang-Jensen, B., Ørpetveit, I. & Sindre, H. (2013) The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 36, s. 71-74.
- Hodneland, K., Bratland, A., Christie, K.E., Endresen, C. & Nylund, A. (2005) New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66, september, s. 113-120.
- Hodneland, K. & Endresen, C. (2006) Sensitive and specific detection of *Salmonid alphavirus* using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 131, august, s. 184-192.
- Hoffman, G.L., Dunbar, C.E., Wolf, K. & Zwillenberg, L.O. (1969) Epitheliocystis, a new infectious disease of the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 35, s. 146-158.
- Howard T.S., Carson J. & Lewis T. (1993) Development of a model of infection for amoebic gill disease. I: P. Valentine (red.) *Proceedings of the Saltas Research and Development Review Seminar*, Saltas, Hobart, Tasmania, s. 103-111.
- Isaksen, T.E., Karlsbakk, E., Sundnes, G.A. & Nylund, A. (2010) Patterns of *Ichthyobodo necator* sensu stricto infections on hatchery-reared Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88, februar, s. 207-214.
- Isaksen, T.E., Karlsbakk, E., Watanabe, K. & Nylund, A. (2011) *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Ichthyobodo Infections on Salmon*, mai, s. 1164-1175.
- Isaksen, T.E., Karlsbakk, E., Repstad, O., Nylund, A. (2012) Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites. *Parasitology International*, 61, juli, s. 675-683.
- 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, s. 391-402.

Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M. & Friedman, M.G. (2001) Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* Survival within Amoebal Cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), oktober, s. 4789-4795.

Karlsen, M., Nylund, A., Watanabe, K., Helvik, J.V., Nylund, S. & Plarre, H. (2008) Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environmental Microbiology*, 10 (1), s. 206-218.

Kent, M.L., Sawyer, T.K. & Hendrick, R.P. (1988) *Paramoeba pemaquidensis* (Sarcomastigophora: Paramoebidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 5 desember, s. 163-169.

Kongtorp, R.T., Kjerstad, A., Taksdal, T., Guttvik, A. & Falk, K. (2004a) Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: a new disease. *Journal of Fish Diseases*, 27, s. 351-358.

Kongtorp, E., Taksdal, T. & Lyngøy, A. (2004b) Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59, juni, s. 217-224.

Kristoffersen, A.B., Viljugrein, H., Kongtorp, R.T., Brun, E. & Jansen, P.A. (2009) Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003-2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 90, april, s. 127-136.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, s. 95-125.

Kvellestad, A., Dannevig, B.H. & Falk, K. (2003) Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of General Virology*, 84 april, s. 2179-2189.

Kvellestad, A., Aarflot, L., Tørud, B. & Holm, J.A. (2004) Proliferative gjellebetennelse hjå laks: eit indervurdert problem?. *Norsk Veterinærtidsskrift*, 116, s. 552-553.

Kvellestad, A., Falk, K., Nygaard, S.M.R., Flesjå, K. & Holm, J.A. (2005) Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in seawater-reared *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67 november, s. 47-54.

Lai, C.C., Crosbie, P.B.B., Battaglene, S.C. & Nowak, B.F. (2013) Effects of epitheliocystis on serum lysozyme activity and osmoregulation in cultured juvenile striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *Aquaculture*, 388-391, januar, s. 99-104.

Ling, S.H.M., Wang, X.H., Lim, T.M. & Leung, K.Y. (2001) Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiology Letters*, 194, oktober, s. 239-243.

Meteorologisk institutt. (2014) *Været i Norge - klimatologisk månedsoversikt* [Internett], Oslo, Meteorologisk Institutt. Tilgjengelig fra: http://met.no/Klima/Klimastatistikk/Varet_i_Norge/2014/september_2014/ [Lest 08. november 2014].

Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C.R., Tunsjø, H.S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H. & Grove, S. (2009) Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* – Pathogen invasion and host response. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, mars, s. 877-884.

Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L. & Schreck, C.B. (1989) Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, 120, s. 135-142.

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, s. 33-43.

McVicar, A.H. (1987) Pancreas Disease of Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and Early Pathology. *Aquaculture*, 67, februar, s. 71-78.

Mitchell, S.O., Steinum, T.M., Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Falk, K., Horn, M. & Colquhoun, D.J. (2013) ‘*Candidatus* Branchiomonas cysticola’ is a common agent of epitheliocystis in seawater-farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway and Ireland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103 mars, s. 35-43.

Morrison, R.N., Crosbie, P.B.B., Cook, M.T., Adams, M.B. & Nowak, B.F. (2005) Cultured gill-derived *Noeparamoeba pemaquidensis* fails to elicit amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66, september, s. 135-144.

Munday, B.L., 1986. Diseases of salmonids. I: Humphrey, J.D. & Langdon, J.S. (red.), *Workshop on Diseases of Australian Fish and Shellfish*. Department of Agriculture and Rural Affairs, Benalla, Victoria, s. 127–141.

Munday, B.L., Foster, C.K., Roubal, F.R. & Lester, R.J.G. (1990) Paramoebic gill infection and associated pathology of Atlantic salmon, *Salmo salar*, and Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in Tasmania. I: Perkins, F.O. & Cheng, T.C. red. *Pathology in Marine Science*. San Diego, Academic Press. Inc., s. 215-222.

Munro, A.L.S., Ellis, A.E., McVicar, A.H., McLay, H.A. & Needham, E.A. (1984) An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37, s. 571-586.

Norte dos Santos, C.C., Adams, M.B., Leef, M.J. & Nowak, B.F. (2014) Changes in the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by amoebic gill disease. *Fish and Shellfish Immunology*, 41, oktober, s. 600-607.

Nowak, B.F. & LaPatra, S.E. (2006) Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases*, 29, s. 573-588.

Nylund, A., Hovland, T., Watanabe, K. & Endresen, C. (1995) Presence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., collected during three separate outbreaks of the disease. *Journal of Fish Diseases*, 18, s. 135-145.

Nylund, A., Kvenseth, A.M., & Isdal, E. (1998) A Morphological Study of the Epitheliocystis Agent in Farmed Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10, s. 43-55.

Nylund, A., Karlsen, M., Watanabe, K., Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. & Arnesen, C.E. (2007). Gjennombrudd i kampen mot PGI (proliferativ gjellebetennelse). *Norsk Fiskeoppdrett*, s. 50 – 53.

Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S., Karlsen, M., Sæther, P.A., Arnesen, C.E. & Karlsbakk, E. (2008) Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill

disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives Virology*, 153 juni, s. 1299-1309.

Nylund, S., Nylund, A., Watanabe, K., Arnesen, C.E. & Karlsbakk, E. (2010) *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57 (2) mars-april, s. 95-114.

Nylund, S., Andersen, L., Sævareid, I., Plarre, H., Watanabe, K., Arnesen, C.E., Karlsbakk, E. & Nylund, A. (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94 mars, s. 41-57.

Nylund, S., Steigen, A., Karlsbakk, E., Plarre, H., Andersen, L., Karlsen, M., Watanabe, K. & Nylund, A. (2014). Characterization of ‘*Candidatus* *Syngnamydia salmonis*’ (*Chlamydiales*, *Simkaniaceae*), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives Microbiology*, september.

Olsen, R.E. (1981) Effects of low temperature on the development of the microsporidian *Glugea stephani* in English sole (*Parophrys vetulus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 17 (4), oktober, s. 559-562.

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), november.

Plarre, H., Devold, M., Snow, M. & Nylund, A. (2005) Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66, august, s. 71-79.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, januar, s. 509-515.

Poppe, T. & Håstein, T. (1982) Costiasis på laksesmolt (*Salmo salar* L.) I sjøoppdrett. *Norsk Veterinærtidsskrift*, 94 (4), s. 259-262.

Powell, M.D., Leef, M.J., Roberts, S.D. & Jones, M.A. (2008) Neoparamoebic gill infections: host response and physiology on salmonids. *Journal of Fish Biology*, 73, s. 2161-2183.

Refstie, S., Storebakken, T. & Roem, A.J. (1998) Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture*, 162, januar, s. 301-312.

Repstad, O. (2011) *Kartlegging av patogendynamikken hos oppdrettslaks (Salmo salar L.) med diagnosen pankreassykdom (PD)*. Akademisk avhandling, Universitetet i Bergen.

Rikardsen, A.H. (2004) Seasonal occurrence of sea lice *Lepeophtheirus salmonis* on sea trout in two north Norwegian fjords. *Journal of Fish Biology*, 65, mai, s. 711-722.

Rodgers, H.D. (2007) Gill disorders: an emerging problem for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the marine environment? *Fish Veterinary Journal*, 9, s. 38-48.

Roth, M., Richards, R.H. & Sommerville, C. (1993) Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review. *Journal of Fish Diseases*, 16, s. 1-26.

Roubal, F.R. & Bullock, A.M. (1987) Differences between the host-parasite interface of *Ichthyobodo necator* (Henneguy, 1883) on the skin and gills of salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 10, s. 237-240.

Roubal, F.R., Lester, R.J.G. & Forster, C.K. (1989) Studies on cultured and gill-attached *Paramoeba* sp. (Gymnamoebae: Paramoebidae) and the cytopathology of paramoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from Tasmania. *Journal of Fish Diseases*, 12, s. 481-492.

Saksvik, M., Nilsen, F., Nylund, A. & Berland, B. (2001) Effect of marine *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 24, s. 111-119.

Simon, P. (2003) Q-gene: processing quantitativ real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19 (11), s. 1439-1440.

Skjold, P. (2014) *Survival of Salmonid alphavirus in seawater under different physical conditions*. Akademisk avhandling, Universitetet i Bergen.

Smørås, C. (2014) *Betydning av Paranucleospora theridion og Salmonid Alfavirus (SAV) for utvikling av sykdom hos Atlantisk laks (Salmo salar L.) – Dobbelsmitte av laks med P. theridion og SAV, og betydning av temperature for densitet av P. theridion i laks*. Akademisk avhandling, Universitetet i Bergen.

Speare, D.J. & Ferguson, H.W. (2006) Gills and Pseudobranchs.. I: Ferguson, H.W. red *Systemic Pathology of Fish: a Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and Their Responses in Disease*. London, Scotian Press, s. 24-63.

Soares, S., Murray, A.G., Crumlish, M., Turnbull, J. F. & Green, D.M. (2012) Evaluating abnormal mortality as an indicator of disease presence in the Atlantic salmon industry using the receiver operating characteristic (ROC). *Aquaculture*, 370-371, oktober, s. 136-143.

Steinum, T., Kvellestad, A., Rønneberg, L.B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., Nygård, S.M.R., Olsen, A.B. & Dale, O.B. (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of Fish Diseases*, 31, s. 205-214.

Steinum, T.M. (2010) *Microbial studies related to proliferative gill diseases in Atlantic salmon*. Akademisk avhandling, Norges Veterinærhøyskole.

Steinum, T., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J., Heum, M., Mohammad, S., Grøntvedt, R.N. & Falk, K. (2010) Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91 september, s. 201-211.

Strandmeyer, L. (1994) Survival, growth and feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts after transfer to sea water in relation to the failed smolt syndrome. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, s. 103-112.

Sutton, S.G., Bult, T.P. & Haedrich, R.L. (2000) Relationships among Fat Weight, Body Weight, Water Weight, and Condition Factors in Wild Atlantic Salmon Parr. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129, s. 527-538.

Sveen, S., Øverland, H., Karlsbakk, E. & Nylund, A. (2012) *Paranucleospora theridion* (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101, oktober, s. 43-49.

Thodesen, J., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J. & Gjerde, B. (1999) Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 180, april, s. 237-246.

Thomas, V., Casson, N. & Greub, G. (2006) *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environmental Microbiology*, 8 (12), s. 2125-2135.

Todal, J.A., Karlsbakk, E., Isaksen, T.E., Plarre, H., Urawa, S., Mouton, A., Hoel, E., Koren, C.W.R. & Nylund, A. (2004) *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida) – a complex of sibling species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, januar, s. 9-16.

Todd, C.D., Hughes, S.L., Marshall, C.T., MacLean, J.C., Lonergan, M.E. & Biuw, E.M. (2008) Detrimental effects of recent ocean surface warming on growth condition of Atlantic salmon. *Global Change Biology*, 14, november.

Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Mitchell, S.O., Steinum, T., Falk, K., Colquhoun, D.J. & Horn, M. (2012) A novel Betaproteobacterial agent of gill Epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE*, 7 (3) mars.

Tolås, I.V. (2012) *Lukket merdsystem – AquaDomen: Effekt på smittedynamikk*. Akademisk avhandling, Universitetet i Bergen.

Totland, G.K., Hjeltnes, B.K. & Flood, P.R. (1996) Transmission of infectious salmon anaemia (ISA) through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon *Salmo salar* during their presymptomatic phase. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, juli, s. 25-31.

Urawa, S. (1993) Effects of *Ichthyobodo necator* infections on seawater survival of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture*, 110, juli, s. 101-110.

Watanabe, K., Karlsen, M., Devold, M., Isdal, E., Litlabø & Nylund, A. (2006) Virus-like particles associated with heart and skeleton muscle inflammation (HSMI). *Diseases of Aquatic Organisms*, 70, juni, s. 183-192.

Weston, J., Villoing, S., Brémont, M., Castric, J., Pfeffer, M., Jewhurst, V., McLoughlin, M., Rødseth, O., Christie, K.E., Koumans, J. & Todd, D. (2002) Comparison of Two Aquatic Alphaviruses, Salmon Pancreas Disease Virus and Sleeping Disease Virus, by

Using Genome Sequence Analysis, Monoclonal Reactivity, and Cross-Infection. *Journal of Virology*, 76 (12), juni, s. 6155-6163.

White, H.C. (1940) «Sea Lice» (*Lepeophtheirus*) and Death of Salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 5 (2), april.

Wiik, R., Andersen, K., Uglenes, I. & Egidius, E. (1989) Cortisol-Induced Increase in Susceptibility of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, Together with Effects on the Blood Cell Pattern. *Aquaculture*, 83, s. 201-215.

Wootten, R., Smith, J.W. & Needham, E.A. (1982) Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, 81 (3), januar, s. 185-197.

Young, N.D, Crosbie, P.B.B., Adams, M.B., Nowak, B.F. & Morrison, R.N. (2007) *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal for Parasitology*, 37, april, s. 1469-1481.

Young, N.D, Dykova, I., Snekvik, K., Nowak, B.F. & Morrison, R.N. (2008) *Neoparamoeba peruans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease. *Disease of Aquatic Organisms*, 78 januar, s. 217-223.

Zilberg, D. & Munday, B.L. (2005) Pathology of experimental amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the effect of pre-maintenance of fish in sea water on the infection. *Journal of Fish Diseases*, 23, s. 401-407.

Appendiks

Oppskrifter

1 % agarose gel

- SeaKem® LA Agarose (Cambrex) oppløst i 400 mL 1x TAE-buffer
- Kokes og oppbevares ved 60 °C

10x TAE-buffer

- 48,4 g Tris base
- 11,4 mL iseddik (glacial acetic acid)
- 3,7 g EDTA
- 800 mL vann

Modifisert Karnovsky fiksativ

- 80 mL grunnmedium
- 10 mL 25% glutaraldehyde
- 10 % paraformaldehyde
- 4 g sukrose

Grunnmedium

- 1,65 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$
- 6,76 g $\text{Na}_2\text{HPO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 6,75 g NaCl
- 0,12 g KCl
- 0,15 g NaHCO_3
- 1,65 g glukose
- 1000 mL H_2O

Programmer

Program for revers transkripsjon («HP-RT»)

1. 5 min – 70 °C
2. 60 min – 37 °C
3. ~ 4 °C

Program for PCR («HP50»)

1. 94 °C i 2 min
2. 94 °C i 30 sek
3. 50 °C i 1 min
4. 72 °C i 1,50 min
5. 72 °C i 10 min
6. punkt 2-5 gjentas i 35 sykluser
7. ~ 4 °C

Program for «Exosap»

1. 37 °C i 15 min
2. 80 °C i 15 min

Program for pre-sekvensering («BigDye»)

1. 95 °C i 5 min
2. 96 °C i 10 sek
3. 50 °C i 5 sek
4. 60 °C i 4 min
5. Punkt 2-4 gjentas i 35 sykluser
6. ~ 4 °C

Sekvensering

Templat og primere benyttet til sekvensering

Navn på assay	Assay og Ct-verdi	Navn på primer
Nuc	S040914 4, Ct = 11,2	Nuc F1 / Nuc R1
Neo/Neo-ny	S180214 15, Ct = 11,3	Y08-NeoPeru F / Y08-NeoPeru R
Neo/Neo-ny	S180214 15, Ct = 11,3	NP-F12 / NP-R11
Epit	S040914 5, Ct = 5,0	BProto-F1 / 806 R
Epit	S040914 5, Ct = 5,0	BProto-F2 / Pic-R1
Costia	S040914 4, Ct = 9,6	Cos F1 / Cos R6
Costia	S040914 4, Ct = 9,6	Cos F1 / Cos R4
Costia	S040914 4, Ct = 9,6	Cos F3 / Cos R6
Sch	S180214 31, Ct = 24,6	Pic F1 / 16sB1
Sch	S180214 31, Ct = 24,6	16sig F / 806 R
Sch	S180214 31, Ct = 24,6	Chl-ITS-F1 / Chl-ITS-R1
PRV	S260314 5, Ct = 15,8	S2-F1 / S2-R2
PRV	S260314 5, Ct = 15,8	S2-F2 / S2-R3
SAV	S170914 15, Ct = 22,8	F1600 / R2357
SAV	S170914 15, Ct = 22,8	F2234 / SAV 20R

Rådata

Ubehandlet data fra studiet som er brukt til diverse utregninger.

Tabell med verdier brukt til utregning av kondisjonsfaktor

Uttak	Vekt	Lengde	L ³ av lengde verdiene:	Kondisjonsfaktor
Oktober (FW kontroll)	80	19,1	6967,9	1,15
Oktober (15.10.13)	86,7	20,1	8120,6	1,07
Oktober (21.10.13)	119,2	21,9	10503,5	1,13
November (21.11.13)	201,9	26,1	17779,6	1,14
Desember (16.12.13)	309,8	29,3	25153,8	1,23
Januar (17.01.14)	344,4	32	32768,0	1,05
Februar (18.02.14)	343,1	31,1	30080,2	1,14
Mars (26.03.14)	203,2	26,8	19248,8	1,06

April (04.04.14)	511,6	36,2	47437,9	1,08
Mai (13.05.14)	505,7	36	46656,0	1,08
Juni (18.06.14)	824,1	42,2	75151,4	1,10
Juli (23.07.14)	1398	48,9	116930,2	1,20
August (15.08.14)	1685	49,5	121287,4	1,39
September (04.09.14)	1618,3	53,1	149721,3	1,08
September (17.09.14)	1750,9	53,7	154854,2	1,13

Skjematisk oversikt av utregnet prevalensen til undersøkte patogener gjennom studiet

Tabell 1: Oversikt over utregning av prevalens for de ulike patogenene. Blanke ruter = det er ikke undersøkt for patogenet ved dette uttaket.

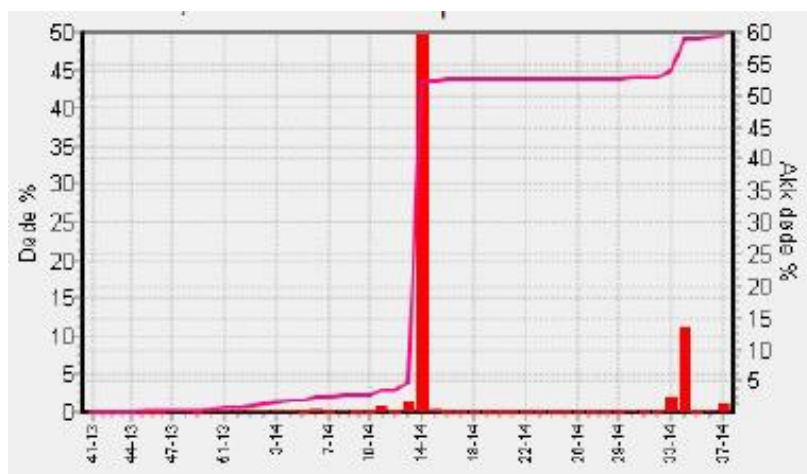
Uttak	Nuc	Neo	Neo-ny	Epit	Costia	Sch
Oktober (FW kontroll)					$=(19/20)*100$	
Oktober (15.10.13)	$=(10/10)*100$		$=(0/10)*100$	$=(9/10)*100$	$=(1/10)*100$	
Oktober (21.10.13)	$=(10/10)*100$	$=(0/10)*100$	$=(1/10)*100$	$=(10/10)*100$	$=(8/10)*100$	$=(2/10)*100$
November (21.11.13)	$=(12/12)*100$	$=(0/10)*100$	$=(2/20)*100$	$=(14/20)*100$	$=(3/20)*100$	$=(0/10)*100$
Desember (16.12.13)	$=(10/10)*100$	$=(1/10)*100$	$=(3/10)*100$	$=(1/10)*100$	$=(3/10)*100$	$=(3/10)*100$
Januar (17.01.14)	$=(10/10)*100$	$=(0/10)*100$	$=(3/10)*100$	$=(5/10)*100$	$=(3/10)*100$	$=(4/10)*100$
Februar (18.02.14)	$=(30/32)*100$	$=(2/32)*100$	$=(3/32)*100$	$=(12/32)*100$	$=(5/32)*100$	$=(4/32)*100$
Mars (26.03.14)	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(2/30)*100$	$=(16/30)*100$	$=(22/30)*100$	$=(4/30)*100$
April (04.04.14)	$=(52/60)*100$	$=(0/60)*100$	$=(14/60)*100$	$=(42/60)*100$	$=(18/60)*100$	$=(20/60)*100$
Mai (13.05.14)	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(11/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(28/30)*100$	$=(3/30)*100$
Juni (18.06.14)	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(1/30)*100$
Juli (23.07.14)	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$
August (15.08.14)	$=(30/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(0/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(30/30)*100$	$=(3/30)*100$
September (04.09.14)	$=(6/6)*100$	$=(0/6)*100$	$=(0/6)*100$	$=(6/6)*100$	$=(5/6)*100$	$=(0/6)*100$
September (17.09.14)	$=(27/27)*100$	$=(0/23)*100$	$=(8/27)*100$	$=(27/27)*100$	$=(27/27)*100$	$=(14/27)*100$

Tabell 2: Oversikt over utregning av prevalens for de ulike patogenene. Blanke ruter = det er ikke undersøkt for patogenet ved dette uttaket.

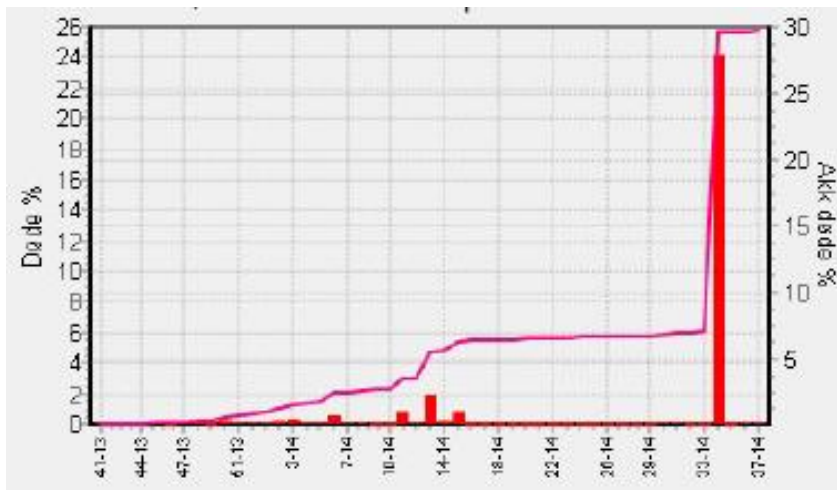
Uttak	PRV	SAV	Pch	PMCV	ILAV	TSSU	Plathy
Oktober (FW kontroll)	= $(0/20)*100$	= $(0/20)*100$			= $(0/10)*100$		
Oktober (15.10.13)		= $(0/10)*100$	= $(0/10)*100$				
Oktober (21.10.13)							
November (21.11.13)	= $(0/20)*100$				= $(0/10)*100$		
Desember (16.12.13)	= $(5/10)*100$						
januar (17.01.14)	= $(6/10)*100$	= $(0/10)*100$		= $(0/10)*100$	= $(0/10)*100$		
februar (18.02.14)	= $(31/32)*100$						
mars (26.03.14)	= $(30/30)*100$			= $(0/20)*100$	= $(3/30)*100$		
april (04.04.14)	= $(60/60)*100$			= $(0/10)*100$	= $(2/60)*100$		
mai (13.05.14)	= $(30/30)*100$	= $(0/30)*100$					
juni (18.06.14)	= $(30/30)*100$	= $(1/30)*100$					
juli (23.07.14)	= $(30/30)*100$	= $(7/30)*100$		= $(1/14)*100$	= $(6/14)*100$		
august (15.08.14)	= $(30/30)*100$	= $(3/30)*100$		= $(0/30)*100$	= $(0/30)*100$	= $(4/10)*100$	
september (04.09.14)	= $(6/6)*100$	= $(3/6)*100$		= $(0/6)*100$	= $(2/6)*100$		
september (17.09.14)	= $(27/27)*100$	= $(23/27)*100$	= $(13/27)*100$		= $(2/27)*100$	= $(5/27)*100$	= $(0/27)*100$

Dødelighetsgrafer

Dødelighetsgrafene under er utarbeidet av anlegget. Det er disse grafene som er utgangspunkt for grafene i studiet.



Figur 20: Prosentvis dødelighet og akkumulert dødelighet i merd 1



Oversikt over månedlige prøveuttak med uttakskode, vekt og lengde på fisken, Ct-verdi for hvert assay som er testet.

Oktober (FW)	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	ASPV	ILAV	Pch	IPNV	PRV
F031013-1	76	19	18,8					29,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-2	85	19,5	18,6					Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-3	69	19	19,0					26,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-4	84	19,5	18,2					24,0	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-5	114	22	18,7					22,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-6	73	18,5	19,8					29,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-7	85	19,5	18,8					25,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-8	68	18	18,6					26,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-9	83	19	20,4					27,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-10	84	19	18,2					31,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-11	84	19	16,4	Neg				20,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-12	63	18	17,4	Neg				24,7	Neg	Neg	Neg	27,1	Neg	Neg
F031013-13	76	18,5	14,6	Neg				26,0	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-14	60	18	16,9	Neg				24,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-15	91	19,5	15,4	Neg				22,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-16	75	18,5	15,9	Neg				26,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-17	76	18,5	16,3	Neg				27,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-18	99	20,5	15,9	Neg				26,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-19	74	18,5	15,0	Neg				26,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F031013-20	80	19	15,9	Neg				25,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Gj.snitt	80,0	19,1						26,0				27,1		

10dager i sjø	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	ASPV	ILAV	Pch	IPNV	Sch
FV151013-G1	87	20	15,0	22,2	Neg		32,2	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G2	95	21,5	15,2	22,3	Neg		37,0	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G3	89	20	14,9	21,1	Neg		35,0	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G4	99	21,5	15,4	22,5	Neg		36,7	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G5	82	20	15,9	22,7	Neg		37,2	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G6	83	20	15,3	21,0	Neg		Neg	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G7	80	19	15,5	20,9	Neg		37,5	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G8	101	21,5	15,1	20,8	Neg		38,0	29,8	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G9	52	17	15,9	23,0	Neg		38,0	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G10	95	20,5	21,0	20,5	Neg		36,5	Neg	Neg			Neg	Neg	
FV151013-G11	103	21												
FV151013-G12	74	19												
Gj.snitt	86,7	20,1		21,7			36,5	29,8						

Oktober 2	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	PRV	ILAV	Pch	IPNV	Sch
S211013-1	138	23	17,2	19,3	Neg	Neg	27,1	Neg						Neg
S211013-2	132	23	17,0	20,2	Neg	Neg	29,6	Neg						Neg
S211013-3	126	22	17,0	22,4	Neg	Neg	26,6	32,3						Neg
S211013-4	154	24	16,8	19,8	27,6	Neg	27,3	32,8						Neg
S211013-5	78	21	16,9	16,9	Neg	Neg	28,1	24,9						Neg
S211013-6	140	23	17,0	20,1	Neg	Neg	25,0	24,9						Neg
S211013-7	118	21	14,7	20,0	Neg	Neg	26,8	27,4						Neg
S211013-8	110	20	17,2	19,8	Neg	Neg	21,7	20,7						33,8
S211013-9	98	21	14,6	17,1	Neg	Neg	26,7	23,2						Neg
S211013-10	98	21	14,9	18,1	Neg	Neg	26,8	24,9						33,9
Gj.snitt	119,2	21,9		19,4	27,6		26,6	26,4						33,9

November	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	PRV	ILAV	Pch	IPNV	Sch
F211113-1	186	25	13,9	16,4	Neg		30,4	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-2	234	28	14,6	16,4	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-3	222	28	13,7	18,3	19,8		31,9	26,0	Neg	Neg	Neg			
F211113-4	146	23	13,8	17,3	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-5	124	22,5	14,2	20,2	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-6	126	23,5	13,0	16,6	27,5	Neg	35,7	Neg		Neg				Neg
F211113-7	166	24,5	14,4	17,8	Neg	Neg	34,2	Neg		Neg				Neg
F211113-8	152	23,5	13,5	20,3	Neg	Neg	33,3	Neg		Neg				Neg
F211113-9	224	27	13,0	16,6	Neg	Neg	32,4	Neg		Neg				Neg
F211113-10	114	22	13,2	14,8	Neg	Neg	27,1	Neg		Neg				Neg
F211113-11	280	30	13,4	14,8	Neg	Neg	35,0	Neg		Neg				Neg
F211113-12	180	25	13,4	17,3	Neg	Neg	33,3	Neg		Neg				Neg
F211113-13	294	30,5	13,0	16,1	Neg	Neg	38,7	Neg		Neg				Neg
F211113-14	198	26	12,9	16,7	Neg	Neg	38,1	Neg		Neg				Neg
F211113-15	230	27	13,1	14,2	Neg	Neg	34,0	Neg		Neg				Neg
F211113-16	209	26	14,5	17,3	Neg		Neg	33,9	Neg	Neg	Neg			
F211113-17	236	28	13,9	18,5	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-18	268	29	13,8	17,7	Neg		32,2	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-19	234	27,5	13,8	19,1	Neg		29,3	Neg	Neg	Neg	Neg			
F211113-20	214	26	13,6	18,7	Neg		Neg	32,6	Neg	Neg	Neg			
Gj.snitt	201,9	26,1		17,3	23,7		33,2	30,9						

Desember	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	PRV	ILAV	Pch	IPNV	Sch	
S161213-1	360	31	12,8	23,3	Neg	Neg	Neg	Neg	SAV	31,3				Neg	
S161213-2	310	29,5	14,3	25,2	Neg	Neg	23,6	Neg		Neg					Neg
S161213-3	186	25,5	14,6	18,9	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	24,9				Neg
S161213-4	418	33	14,8	20,6	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg				Neg
S161213-5	302	29	13,1	21,5	22,0	Neg	Neg	27,0		Neg	Neg				27,7
S161213-6	290	29	13,3	18,0	21,0	Neg	Neg	26,6		Neg	Neg				29,4
S161213-7	312	29	13,9	17,5	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg				Neg
S161213-8	330	30	13,0	21,8	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	16,5				Neg
S161213-9	282	27,5	14,2	16,7	20,7	34,1	Neg	26,8		Neg	23,5				28,0
S161213-10	308	29	13,6	26,7	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	28,6				Neg
Gj.snitt	309,8	29,3		21,0	21,2	34,1	23,6	26,8		24,9				28,4	

Januar	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	SAV	PRV	ILAV	Tss	IPNV	Sch	Tenacib	PMCV
FS170114-1	378	31,5	18,9	28,5	27,1	Neg	36,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	36,1	25,5	Neg
FS170114-2	322	30	16,1	29,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	19,3	Neg	Neg	Neg	Neg	23,8	Neg
FS170114-3	380	33	18,5	28,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	24,1	Neg	22,8	Neg
FS170114-4	410	34	13,9	23,0	Neg	Neg	Neg	32,1	Neg	30,6	Neg	36,4	25,4	Neg	26,8	Neg
FS170114-5	370	31,5	15,1	26,5	24,9	Neg	Neg	29,8	Neg	30,5	Neg	30,7	Neg	30,8	17,6	Neg
FS170114-6	358	31	18,7	22,1	Neg	Neg	37,2	34,2	Neg	20,2	Neg	Neg	Neg	36,8	32,1	Neg
FS170114-7	284	30,5	14,7	22,0	Neg	Neg	36,0	Neg	Neg	29,4	Neg	Neg	30,1	Neg	22,3	Neg
FS170114-8	308	37	16,1	26,6	Neg	Neg	31,6	Neg	Neg	Neg	Neg	35,8	32,2	36,8	24,2	Neg
FS170114-9	266	29	15,1	30,9	24,5	Neg	34,9	Neg	Neg	Neg	Neg	35,8	34,0	Neg	24,0	Neg
FS170114-10	368	32	12,9	24,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	20,2	Neg	Neg	Neg	Neg	22,7	Neg
Gj.snitt	344,4	32,0		26,3	25,5		35,3	32,0		25,0		34,7	29,2	35,1	24,2	

Februar	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	PRV	SAV
S180214 1		37	14,5	25,8	Neg	Neg	35,1	Neg	Neg	21,9	
S180214 2		27,5	15,5	25,0	Neg	Neg	33,7	Neg	Neg	16,8	
S180214 3		34,5	16,5	24,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	29,0	
S180214 4		35	17,5	24,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	29,8	
S180214 5	538	37,8	18,5	23,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	24,9	
S180214 6	476	35,1	19,5	23,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	21,4	
S180214 7	506	36,5	20,5	23,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	19,0	
S180214 8	412	35	21,5	26,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,3	
S180214 9	434	34,5	22,5	25,8	Neg	Neg	35,0	Neg	Neg	24,7	
S180214 10	446	34	23,5	21,9	Neg	Neg	35,9	Neg	Neg	26,5	
S180214 11	292	30,5	15,1	23,5	Neg	Neg	34,3	Neg	Neg	21,3	
S180214 12	294	29,5	14,8	26,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	22,5	
S180214 13	510	32,5	17,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	19,9	
S180214 14	402	33,5	15,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	26,5	
S180214 15	70	20	17,8	19,1	11,3	26,7	32,6	15,4	16,5	22,6	
S180214 16	440	34	14,6	22,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	21,3	
S180214 17	420	33	14,3	20,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
S180214 18	294	33	13,9	25,1	Neg	Neg	35,3	Neg	Neg	29,6	
S180214 19	148	25	15,2	27,0	22,8	Neg	Neg	Neg	33,4	18,2	
S180214 20	126	22,5	14,7	24,1	20,9	Neg	19,3	Neg	29,9	28,9	
S180214 21	444	34	14,7	24,0	Neg	Neg	Neg	24,5	Neg	26,6	
S180214 22	412	33,5	14,0	25,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	29,4	
S180214 23	406	32,5	14,5	22,5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	25,6	
S180214 24	470	35	13,9	22,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	18,6	
S180214 25	320	30	16,4	19,6	Neg	Neg	35,6	Neg	Neg	28,7	
S180214 26	296	30	15,4	23,2	Neg	Neg	25,3	29,6	Neg	23,4	
S180214 27	336	32	15,2	25,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	30,3	
S180214 28	436	35	13,9	22,7	Neg	Neg	Neg	30,9	Neg	28,2	
S180214 29	512	36	14,4	23,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,3	
S180214 30	60	19	17,4	20,2	Neg	Neg	30,6	Neg	Neg	29,2	
S180214 31	66	19	17,7	20,8	Neg	18,3	Neg	28,1	24,6	28,5	
S180214 32	42	20	15,7	18,9	Neg	Neg	31,2	Neg	Neg	31,6	
Gj.snitt	343,1	31,1		23,4	18,3	22,5	32,0	25,7	26,1	25,1	

Mars	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV
S260314 1	344	31	14,0	20,8	Neg	Neg	Neg	25,5	Neg	Neg	Neg	19,6	
S260314 2	526	36	14,2	20,2	Neg	Neg	Neg	30,0	37,6	Neg	Neg	27,3	
S260314 3	156	25	17,2	23,4	Neg	Neg	Neg	32,6	Neg	Neg	Neg	21,0	
S260314 4	492	36	14,2	28,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	21,3	
S260314 5	354	31	15,1	23,6	Neg	Neg	Neg	32,3	Neg	Neg	Neg	15,8	
S260314 6	130	24,5	17,6	23,1	Neg	Neg	22,7	30,7	Neg	36,8	Neg	19,7	
S260314 7	462	36,5	12,8	30,4	Neg	Neg	Neg	30,1	Neg	Neg	Neg	28,3	
S260314 8	210	28,5	13,8	27,5	Neg	Neg	33,8	Neg	Neg	Neg	Neg	22,0	
S260314 9	94	24,5	18,6	32,9	Neg	Neg	32,9	34,2	Neg	Neg	Neg	22,3	
S260314 10	132	24	14,8	21,8	Neg	Neg	33,9	31,7	Neg	Neg	Neg	23,5	
S260314 11	128	25	14,1	22,0	Neg	Neg	31,0	32,0	Neg	Neg	Neg	21,6	
S260314 12	84	25	16,7	27,0	22,4	Neg	Neg	28,2	27,6	Neg	Neg	19,4	
S260314 13	264	31	12,4	26,5	Neg	Neg	Neg	28,1	Neg	Neg	Neg	20,3	
S260314 14	78	20	16,6	20,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	24,9	
S260314 15	236	29	12,6	22,4	Neg	Neg	Neg	30,3	Neg	Neg	Neg	26,9	
S260314 16	76	21	13,6	25,5	Neg	Neg	31,9	25,0	Neg	Neg	Neg	22,3	
S260314 17	104	22,5	12,8	27,5	Neg	Neg	32,2	36,4	Neg	Neg	Neg	22,4	
S260314 18	288	30	13,3	25,6	Neg	Neg	30,5	Neg	Neg	Neg	Neg	22,0	
S260314 19	262	28	17,1	21,3	Neg	Neg	28,2	30,2	Neg	Neg	Neg	25,5	
S260314 20	152	24	14,5	24,9	Neg	Neg	26,9	24,5	32,7	Neg	Neg	21,6	
S260314 21	129	25	15,2	31,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	22,0	
S260314 22	88	22	17,9	31,1	Neg	Neg	22,5	Neg	Neg	Neg	Neg	20,5	
S260314 23	262	30	13,8	21,0	Neg	Neg	25,2	Neg	Neg	Neg	Neg	25,2	
S260314 24	155	24,5	14,3	23,1	Neg	Neg	32,3	26,5	Neg	Neg	Neg	22,0	
S260314 25	115	25,5	15,4	24,6	Neg	Neg	Neg	17,6	Neg	Neg	Neg	19,0	
S260314 26	95	22	15,5	24,8	Neg	Neg	23,0	27,9	Neg	36,4	Neg	21,4	
S260314 27			15,4	23,9	Neg	Neg	29,4	Neg	Neg	Neg	Neg	29,7	
S260314 28			13,8	31,6	Neg	Neg	Neg	28,4	Neg	Neg	Neg	18,7	
S260314 29			14,2	27,3	23,5	Neg	30,5	20,8	29,5	Neg	Neg	18,9	
S260314 30	70	22	13,0	22,1	Neg	Neg	Neg	23,8	Neg	33,8	Neg	25,4	
Gj.snitt	203,2	26,8		25,2	23,0		29,2	28,5	31,8	35,7		22,3	

April	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV
S040414 1	522	36	14,4	28,1	23,4	Neg	29,4	30,4	34,2	Neg	Neg	20,7
S040414 2	540	36	17,2	31,4	Neg	Neg	29,8	29,9	Neg	Neg	Neg	19,5
S040414 3	646	38	16,3	34,8	23,7	Neg	Neg	Neg	30,9	Neg	Neg	20,0
S040414 4	524	36	13,5	27,8	23,9	Neg	Neg	23,2	Neg	Neg	Neg	21,2
S040414 5	532	36	15,1	35,7	25,9	Neg	26,4	23,6	Neg	Neg	Neg	20,9
S040414 6	452	35	16,6	36,7	Neg	Neg	33,1	26,7	Neg	Neg	Neg	16,7
S040414 7	668	39	15,9	33,3	Neg	Neg	33,5	Neg	Neg	Neg	Neg	23,6
S040414 8	626	38	14,9	26,7	Neg	Neg	29,2	29,9	Neg	Neg	Neg	24,5
S040414 9	422	33,5	16,1	30,5	21,4	Neg	30,0	24,4	33,9	Neg	Neg	22,8
S040414 10	516	35	16,2	33,6	Neg	Neg	30,5	Neg	Neg	Neg	Neg	23,8
S040414 11	528	37	14,7	Neg	Neg	Neg	31,5	31,8	Neg	Neg		21,4
S040414 12	548	38	13,6	29,8	Neg	Neg	Neg	23,7	Neg	Neg		19,7
S040414 13	462	36	14,2	26,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	37,0		27,4
S040414 14	266	30	13,8	26,4	Neg	Neg	27,7	Neg	37,0	Neg		24,4
S040414 15	630	39	14,3	32,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		20,6
S040414 16	418	33	13,4	Neg	Neg	Neg	Neg	28,2	Neg	Neg		20,2
S040414 17	458	37	13,7	31,1	Neg	Neg	32,8	Neg	33,5	Neg		23,5
S040414 18	506	37	13,4	35,5	Neg	Neg	29,8	Neg	Neg	Neg		24,7
S040414 19	564	37	15,8	25,8	Neg	Neg	28,7	Neg	34,3	Neg		18,8
S040414 20	530	38,5	16,1	25,4	23,7	Neg	37,2	35,0	35,8	Neg		23,4
S040414 21	410	33	15,4	27,2	24,0	Neg	21,8	Neg	33,3	35,9		22,4
S040414 22	460	35	15,7	36,5	27,3	Neg	28,2	Neg	Neg	Neg		22,8
S040414 23	472	36	16,1	28,9	Neg	Neg	Neg	Neg	36,9	Neg		22,7
S040414 24	438	35	16,6	Neg	27,8	Neg	31,8	Neg	Neg	Neg		29,8
S040414 25	576	38	14,6	26,4	Neg	Neg	29,0	Neg	Neg	Neg		19,6
S040414 26			14,6	32,3	Neg	Neg	23,9	Neg	Neg	Neg		21,7
S040414 27	480	36	14,4	33,7	Neg	Neg	27,2	Neg	Neg	Neg		19,9
S040414 28	560	37	14,7	24,7	Neg	Neg	27,6	Neg	Neg	Neg		20,0
S040414 29	362	32	15,3	Neg	Neg	Neg	36,5	Neg	Neg	Neg		19,2
S040414 30	562	38,5	14,3	33,9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		21,6

S040414 31	556	37	13,9	35,1	Neg	Neg	35,1	Neg	Neg	Neg	24,0
S040414 32	690	39	14,3	30,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	19,6
S040414 33	374	33	15,3	31,4	Neg	Neg	30,6	Neg	Neg	Neg	19,6
S040414 34	572	40	15,3	36,3	Neg	Neg	32,1	Neg	Neg	Neg	20,9
S040414 35	564	37	16,6	38,0	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	17,9
S040414 36	363	33	16,8	36,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	23,2
S040414 37	346	31	15,2	32,4	Neg	Neg	37,7	Neg	Neg	Neg	22,7
S040414 38	390	34	16,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	24,5
S040414 39	338	31	16,2	33,0	Neg	Neg	36,9	Neg	36,2	Neg	28,6
S040414 40	404	34	16,6	33,3	Neg	Neg	36,8	Neg	Neg	Neg	29,1
S040414 41	536	36	14,4	35,7	Neg	Neg	29,1	Neg	29,1	Neg	25,5
S040414 42	520	37	15,6	25,8	Neg	Neg	34,5	Neg	34,5	Neg	23,0
S040414 43	402	34	14,2	32,9	Neg	Neg	37,5	Neg	37,5	Neg	21,6
S040414 44	502	36	15,2	25,8	Neg	Neg	Neg	37,2	Neg	Neg	24,1
S040414 45	494	35,5	15,5	27,6	Neg	Neg	34,0	Neg	34,0	Neg	21,6
S040414 46	454	34,5	18,0	31,0	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	28,9
S040414 47	648	39	16,8	30,2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	20,7
S040414 48	602	38	15,5	33,6	Neg	Neg	34,0	Neg	34,0	Neg	22,7
S040414 49	542	38	15,3	22,5	Neg	Neg	39,1	Neg	39,1	Neg	25,0
S040414 50	580	37,5	13,6	32,4	Neg	Neg	26,0	Neg	26,0	Neg	24,8
S040414 51	422	35	15,0	Neg	24,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	23,2
S040414 52	494	35	14,9	27,9	Neg	Neg	31,5	Neg	Neg	Neg	23,7
S040414 53	652	40	16,1	24,8	Neg	Neg	31,7	29,4	Neg	Neg	20,7
S040414 54	622	39	16,0	26,7	23,4	Neg	Neg	32,1	Neg	Neg	22,3
S040414 55	546	36	16,5	26,6	18,6	Neg	27,9	27,9	Neg	Neg	20,6
S040414 56	750	41	15,2	Neg	25,4	Neg	25,9	Neg	33,3	Neg	29,2
S040414 57	470	36	16,3	28,8	Neg	Neg	32,6	32,4	31,4	Neg	22,9
S040414 58	538	38	14,9	25,2	25,9	Neg	Neg	31,4	Neg	Neg	22,8
S040414 59	614	39	16,4	Neg	Neg	Neg	31,5	31,5	Neg	Neg	20,5
S040414 60	522	37	17,7	28,3	Neg	Neg	30,2	Neg	33,0	Neg	19,8
Gj.snitt	511,6	36,2		30,5	24,2		31,2	29,4	33,9	36,5	22,5

Mai	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV
S130514 Gj 1	466	36	14,6	28,5	Neg	Neg	21,5	24,8	Neg			21,8	Neg
S130514 Gj 2	582	39	13,3	30,3	Neg	Neg	28,1	31,3	Neg			27,9	Neg
S130514 Gj 3	612	39,5	13,1	33,7	22,1	Neg	29,3	21,2	Neg			20,9	Neg
S130514 Gj 4	548	38	13,6	27,2	21,5	Neg	31,5	31,2	Neg			20,3	Neg
S130514 Gj 5	554	37	15,0	34,9	25,8	Neg	31,3	24,9	Neg			22,4	Neg
S130514 Gj 6	468	36	12,4	35,1	Neg	Neg	27,4	23,1	Neg			24,0	Neg
S130514 Gj 7	118	21	12,6	26,4	23,2	Neg	24,8	23,2	Neg			24,9	Neg
S130514 Gj 8	160	25	12,6	23,0	Neg	Neg	23,9	19,9	Neg			23,0	Neg
S130514 Gj 9	550	38	14,6	24,1	23,1	Neg	28,4	22,3	Neg			23,4	Neg
S130514 Gj 10	476	35	11,5	20,0	Neg	Neg	27,9	21,8	33,2			18,6	Neg
S130514 Gj 11	508	38,5	12,1	33,7	Neg	Neg	21,4	23,3	Neg			23,4	Neg
S130514 Gj 12	586	39	13,0	35,6	Neg	Neg	21,5	24,5	Neg			21,6	Neg
S130514 Gj 13	682	39	13,5	33,9	Neg	Neg	29,2	22,9	Neg			22,4	Neg
S130514 Gj 14	340	31	13,6	33,5	Neg	Neg	31,0	23,4	Neg			16,7	Neg
S130514 Gj 15	62	20	13,9	29,3	Neg	Neg	22,0	21,9	Neg			24,2	Neg
S130514 Gj 16	538	38	12,7	26,4	23,2	Neg	26,8	20,1	Neg			16,7	Neg
S130514 Gj 17	525	38	14,0	25,4	Neg	Neg	26,5	21,8	Neg			19,6	Neg
S130514 Gj 18	726	41	12,9	33,5	21,7	Neg	28,6	25,4	Neg			21,7	Neg
S130514 Gj 19	328	31,5	12,3	21,5	Neg	Neg	24,0	23,7	Neg			23,5	Neg
S130514 Gj 20	676	41	14,3	22,4	23,3	Neg	31,5	24,8	Neg			22,5	Neg
S130514 Gj 21	382	34	12,5	35,0	16,0	Neg	26,0	29,3	Neg			24,7	Neg
S130514 Gj 22	522	35	13,9	28,4	Neg	Neg	26,2	19,3	Neg			24,0	Neg
S130514 Gj 23	623	38	12,8	23,9	20,3	Neg	28,6	Neg	36,7			24,8	Neg
S130514 Gj 24	474	35	12,6	30,4	Neg	Neg	21,3	Neg	Neg			23,5	Neg
S130514 Gj 25	592	39	12,7	30,4	Neg	Neg	23,6	21,6	Neg			21,3	Neg
S130514 Gj 26	642	40	12,4	32,1	Neg	Neg	22,8	24,6	Neg			22,8	Neg
S130514 Gj 27	558	38	13,0	22,0	21,9	Neg	21,0	21,5	35,8			21,4	Neg
S130514 Gj 28	724	40	12,7	31,8	Neg	Neg	20,8	22,9	Neg			21,7	Neg
S130514 Gj 29	464	38	12,4	23,2	Neg	Neg	21,1	23,1	Neg			24,0	Neg
S130514 Gj 30	686	41	13,1	26,6	Neg	Neg	27,2	23,2	Neg			20,0	Neg
Gj.snitt	505,7	36,0		28,7	22,0		25,8	23,6	35,2			22,3	

Juni	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV
S180614 Gj 1	780	43	14,6	27,1	Neg	Neg	16,5	14,5	Neg			20,1	Neg
S180614 Gj 2	590	41	13,4	15,6	Neg	Neg	14,4	20,3	Neg			28,7	Neg
S180614 Gj 3	806	42,5	13,6	25,2	Neg	Neg	17,8	15,6	Neg			22,3	Neg
S180614 Gj 4	710	40,5	13,9	23,3	Neg	Neg	14,7	19,9	Neg			23,6	Neg
S180614 Gj 5	1364	50	13,4	22,6	Neg	Neg	15,0	17,9	Neg			20,2	Neg
S180614 Gj 6	1130	45	14,9	26,8	Neg	Neg	17,6	16,2	Neg			27,3	Neg
S180614 Gj 7	806	43	14,5	23,8	Neg	Neg	18,6	17,2	Neg			16,3	Neg
S180614 Gj 8	1010	43	14,0	16,5	Neg	Neg	18,6	19,1	Neg			21,2	Neg
S180614 Gj 9	596	42	15,3	25,3	Neg	Neg	14,6	19,3	Neg			26,4	Neg
S180614 Gj 10	140	28	15,6	25,4	Neg	Neg	15,8	10,8	Neg			21,5	Neg
S180614 Gj 11	1020	47	12,7	18,6	Neg	Neg	17,5	27,7	Neg			26,2	Neg
S180614 Gj 12	950	43	13,8	21,4	Neg	Neg	18,2	19,5	Neg			24,4	Neg
S180614 Gj 13	998	45	13,6	28,7	Neg	Neg	17,9	14,5	Neg			25,5	Neg
S180614 Gj 14	568	38,5	13,8	29,3	Neg	Neg	18,4	18,7	Neg			27,2	Neg
S180614 Gj 15	1160	46	13,7	19,9	Neg	Neg	20,3	34,7	37,1			24,8	Neg
S180614 Gj 16	834	45	13,4	25,6	Neg	Neg	17,3	17,5	Neg			25,4	Neg
S180614 Gj 17	838	43	13,0	26,1	Neg	Neg	17,6	14,9	Neg			25,5	Neg
S180614 Gj 18	748	42	14,5	22,9	Neg	Neg	15,6	16,0	Neg			22,6	Neg
S180614 Gj 19	602	42,5	12,9	21,4	Neg	Neg	15,8	17,7	Neg			20,8	Neg
S180614 Gj 20	1296	49	12,9	23,7	Neg	Neg	15,9	18,3	Neg			22,7	Neg
S180614 Gj 21	436	38	14,7	22,4	Neg	Neg	16,6	17,6	Neg			21,4	Neg
S180614 Gj 22	1596	55	13,7	24,8	Neg	Neg	18,8	21,8	Neg			21,9	Neg
S180614 Gj 23	1282	47	13,1	24,0	Neg	Neg	16,5	20,5	Neg			24,6	Neg
S180614 Gj 24	970	44,5	12,9	23,6	Neg	Neg	17,3	19,7	Neg			21,7	33,0
S180614 Gj 25	756	41	13,1	15,6	Neg	Neg	16,4	20,7	Neg			24,4	Neg
S180614 Gj 26	130	25	15,2	16,0	Neg	Neg	16,7	13,5	Neg			19,3	Neg
S180614 Gj 27	1140	47	13,5	20,0	Neg	Neg	18,6	26,4	Neg			24,2	Neg
S180614 Gj 28	138	28	14,9	22,2	Neg	Neg	16,2	11,3	Neg			28,6	Neg
S180614 Gj 29	588	40	13,3	15,4	Neg	Neg	17,7	17,9	Neg			25,5	Neg
S180614 Gj 30	740	40	13,3	18,6	Neg	Neg	15,7	18,1	Neg			24,6	Neg
Gj.snitt	824,1	42,2		22,4			17,0	18,6	37,1			23,6	33,0

Juli	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV	ISAV-HPR0
S230714 Gj 1			14,2	17,8	Neg	Neg	13,7	17,8	Neg	25,7	Neg	19,7	Neg	28,2
S230714 Gj 2			14,8	22,4	Neg	Neg	12,9	13,5	Neg	Neg	Neg	18,7	27,8	
S230714 Gj 3			15,5	23,8	Neg	Neg	13,7	18,9	Neg	Neg	Neg	19,7	Neg	
S230714 Gj 4			13,8	20,6	Neg	Neg	11,2	10,1	Neg	Neg	Neg	21,7	27,5	
S230714 Gj 5			14,9	26,1	Neg	Neg	16,3	19,5	Neg	28,5	Neg	25,3	Neg	30,4
S230714 Gj 6		46	14,5	23,9	Neg	Neg	11,2	7,5	Neg	Neg	Neg	20,0	29,2	
S230714 Gj 7		48	14,9	22,5	Neg	Neg	13,0	16,5	Neg	Neg	Neg	18,8	29,2	
S230714 Gj 8		53	14,4	21,0	Neg	Neg	12,8	21,6	Neg	34,2	Neg	19,0	Neg	Neg
S230714 Gj 9		51	14,4	17,4	Neg	Neg	16,5	17,7	Neg	32,5	Neg	17,9	Neg	34,7
S230714 Gj 10		41	14,1	21,5	Neg	Neg	13,7	17,7	Neg	Neg	Neg	19,2	Neg	
S230714 Gj 11		48	13,9	27,0	Neg	Neg	14,6	18,3	Neg	Neg	Neg	18,6	Neg	
S230714 Gj 12		50	13,3	24,0	Neg	Neg	15,6	15,5	Neg	35,8	36,8	21,2	Neg	Neg
S230714 Gj 13		51	14,1	21,1	Neg	Neg	12,7	13,1	Neg	36,0	Neg	17,8	Neg	Neg
S230714 Gj 14		40	13,9	18,6	Neg	Neg	17,3	18,9	Neg	Neg	Neg	20,4	Neg	
S230714 Gj 15		39	16,7	23,4	Neg	Neg	12,5	11,6	Neg			18,4	Neg	
S230714 Gj 16		53	15,3	25,5	Neg	Neg	15,5	15,8	Neg			19,2	Neg	
S230714 Gj 17		52	14,8	28,0	Neg	Neg	16,8	20,4	Neg			19,2	Neg	
S230714 Gj 18		53	13,9	24,2	Neg	Neg	14,3	20,2	Neg			20,3	Neg	
S230714 Gj 19		46	15,8	24,0	Neg	Neg	14,5	19,8	Neg			18,6	Neg	
S230714 Gj 20		47,5	14,4	23,7	Neg	Neg	9,6	9,6	Neg			24,5	27,1	
S230714 Gj 21		48	14,4	28,7	Neg	Neg	15,7	18,7	Neg			20,4	Neg	
S230714 Gj 22		53	14,9	25,7	Neg	Neg	14,9	14,9	Neg			19,0	Neg	
S230714 Gj 23		51	14,4	24,1	Neg	Neg	11,6	11,8	Neg			21,7	29,9	
S230714 Gj 24		53,5	13,1	27,2	Neg	Neg	15,7	14,6	Neg			21,7	Neg	
S230714 Gj 25		55	14,6	21,9	Neg	Neg	14,2	15,9	Neg			22,8	Neg	
S230714 Gj 26		53	16,5	20,4	Neg	Neg	14,8	17,9	Neg			18,3	Neg	
S230714 Gj 27		46	15,1	21,3	Neg	Neg	15,6	21,5	Neg			24,3	Neg	
S230714 Gj 28		49	15,7	21,5	Neg	Neg	13,2	14,1	Neg			23,7	31,7	
S230714 Gj 29		49	14,3	23,9	Neg	Neg	15,2	19,2	Neg			18,9	Neg	
S230714 Gj 30		47	16,2	29,7	Neg	Neg	14,8	16,5	Neg			18,1	Neg	
Gj.snitt	1,398	48,9		23,4			14,1	16,3		32,1	36,8	20,2	28,9	31,1

August	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV	TSSU
S150814 Gj 1			13,9	25,9	Neg	Neg	19,4	12,2	Neg	Neg	Neg	23,4	28,9	
S150814 Gj 2			13,2	15,7	Neg	Neg	10,8	17,3	Neg	Neg	Neg	24,8	Neg	
S150814 Gj 3			14,1	25,5	Neg	Neg	15,7	17,9	Neg	Neg	Neg	20,8	Neg	
S150814 Gj 4			14,0	24,7	Neg	Neg	14,7	19,3	Neg	Neg	Neg	20,9	Neg	
S150814 Gj 5			13,6	23,7	Neg	Neg	15,5	17,5	Neg	Neg	Neg	29,3	Neg	
S150814 Gj 6		53	12,8	15,8	Neg	Neg	6,4	21,2	34,6	Neg	Neg	21,7	27,8	
S150814 Gj 7		48,5	14,4	19,4	Neg	Neg	23,4	22,3	Neg	Neg	Neg	23,6	Neg	
S150814 Gj 8		50	14,1	15,7	Neg	Neg	6,3	18,2	34,4	Neg	Neg	22,9	27,6	
S150814 Gj 9		41	14,4	16,3	Neg	Neg	15,8	22,3	Neg	Neg	Neg	18,5	Neg	
S150814 Gj 10		47	13,3	17,0	Neg	Neg	9,2	19,5	Neg	Neg	Neg	20,6	Neg	
S150814 Gj 11		50	13,4	26,9	Neg	Neg	11,1	19,9	Neg	Neg	Neg	21,9	Neg	
S150814 Gj 12		50	14,4	23,3	Neg	Neg	19,7	24,8	Neg	Neg	Neg	23,9	Neg	
S150814 Gj 13		51	15,0	24,9	Neg	Neg	17,1	21,7	Neg	Neg	Neg	22,0	Neg	
S150814 Gj 14		47	13,8	20,8	Neg	Neg	14,2	21,8	Neg	Neg	Neg	22,0	Neg	
S150814 Gj 15		53	14,2	25,3	Neg	Neg	19,6	25,9	Neg	Neg	Neg	27,7	Neg	
S150814 Gj 16		55	14,5	24,2	Neg	Neg	10,9	16,8	Neg	Neg	Neg	21,5	Neg	
S150814 Gj 17		53,5	14,0	23,5	Neg	Neg	14,0	18,7	37,1	Neg	Neg	22,2	Neg	
S150814 Gj 18		52	13,9	21,5	Neg	Neg	17,9	26,0	Neg	Neg	Neg	22,9	Neg	
S150814 Gj 19		53	15,2	23,8	Neg	Neg	14,4	20,9	Neg	Neg	Neg	22,9	Neg	
S150814 Gj 20		52	14,7	24,8	Neg	Neg	14,9	18,7	Neg	Neg	Neg	25,4	Neg	
S150814 Gj 21		51	13,5	22,6	Neg	Neg	14,6	20,8	Neg	Neg	Neg	27,0	Neg	36,2
S150814 Gj 22		51	13,8	26,7	Neg	Neg	14,7	20,6	Neg	Neg	Neg	22,7	Neg	Neg
S150814 Gj 23		48	14,2	22,0	Neg	Neg	12,6	19,4	Neg	Neg	Neg	21,8	Neg	Neg
S150814 Gj 24		48	13,9	26,1	Neg	Neg	10,9	20,0	Neg	Neg	Neg	25,8	Neg	Neg
S150814 Gj 25		38	12,8	13,6	Neg	Neg	11,3	23,7	Neg	Neg	Neg	27,0	Neg	Neg
S150814 Gj 26		42,5	14,4	20,4	Neg	Neg	14,3	22,4	Neg	Neg	Neg	19,6	Neg	34,3
S150814 Gj 27		49	13,7	17,5	Neg	Neg	9,8	18,9	Neg	Neg	Neg	25,6	Neg	36,0
S150814 Gj 28		53	13,1	19,9	Neg	Neg	11,5	18,2	Neg	Neg	Neg	27,8	Neg	33,2
S150814 Gj 29		50	14,5	27,5	Neg	Neg	14,0	20,0	Neg	Neg	Neg	26,9	Neg	Neg
S150814 Gj 30		51	14,2	24,0	Neg	Neg	11,6	19,8	Neg	Neg	Neg	26,5	Neg	Neg
Gj.snitt	1,7	49,5		22,0			13,9	20,2	35,4			23,7	28,1	34,9

September 1	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PMCV	PRV	SAV	ILAV-HPR0	Tb-TUF
S040914 Gj 1	2250	57	15,5	22,2	Neg	Neg	12,5	21,2	Neg	Neg	Neg	24,5	Neg		22,9
S040914 Gj 2	1540	53	15,0	20,5	Neg	Neg	6,2	13,2	Neg	Neg	Neg	26,3	Neg		26,6
S040914 Gj 3	2270	59	13,8	18,1	Neg	Neg	5,6	14,9	Neg	36,2	Neg	19,9	29,6		26,9
S040914 Gj 4	450	44	14,7	11,2	Neg	Neg	7,7	9,6	Neg	Neg	Neg	21,7	27,6		Neg
S040914 Gj 5	1710	54,5	15,3	18,6	Neg	Neg	5,0	Neg	Neg	36,4	Neg	19,9	Neg		27,5
S040914 Gj 6	1490	51	14,1	16,5	Neg	Neg	5,6	11,7	Neg	Neg	Neg	21,9	26,2		26,0
Gj.snitt	1618,3	53,1		17,8			7,1	14,1		36,3		22,4	27,8		26,0

September 2	Vekt	Lengde	Elf	PT	Neo-ny	Neo	Epit	Costia	Sch	ILAV	PRV	SAV	Pch	TSSU	Plathy
S170914 Gj 1			16,0	17,0	Neg	Neg	8,2	12,4	Neg	Neg	21,9	27,5	Neg	36,0	Neg
S170914 Gj 2			15,0	17,0	Neg	Neg	6,9	13,5	29,8	Neg	22,1	29,6	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 3			16,0	22,5	20,2	Neg	17,2	16,9	28,0	Neg	23,4	30,1	Neg	35,2	Neg
S170914 Gj 4			14,6	20,8	Neg	Neg	14,0	15,2	Neg	Neg	24,4	23,6	Neg	36,6	Neg
S170914 Gj 5			16,4	26,8	Neg	Neg	19,8	28,2	35,6	Neg	21,4	26,4	26,5	Neg	Neg
S170914 Gj 6	1893	53	16,0	24,4	Neg	Neg	19,0	20,8	Neg	Neg	19,2	25,3	26,6	36,3	Neg
S170914 Gj 7	1568	52	15,0	24,4	Neg	Neg	20,9	19,2	31,8	Neg	26,6	24,5	21,9	Neg	Neg
S170914 Gj 8	2754	56	15,7	21,5	Neg	Neg	15,6	17,9	Neg	36,3	27,6	Neg	31,7	Neg	Neg
S170914 Gj 9	1470	53	15,3	17,9	Neg	Neg	10,7	9,8	30,4	Neg	27,7	25,9	31,4	Neg	Neg
S170914 Gj 10	2440	58	15,7	23,9	18,7	Neg	13,3	17,5	28,7	Neg	26,8	27,2	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 11	1650	55	16,5	24,0	Neg	Neg	18,8	21,6	Neg	Neg	25,2	32,5	27,3	Neg	Neg
S170914 Gj 12	3548	64	14,9	19,6	Neg	Neg	19,9	18,2	Neg	Neg	24,0	Neg	27,3	Neg	Neg
S170914 Gj 13	1778	53	17,7	25,9	20,9	Neg	12,9	20,9	29,4	Neg	26,9	32,9	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 14	2380	58	16,0	23,8	22,4	Neg	19,8	18,4	28,2	Neg	21,9	24,1	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 15	1510	53	16,5	23,9	Neg	Neg	17,0	17,7	32,9	Neg	21,6	22,8	23,7	Neg	Neg
S170914 Gj 16	1745	54	15,7	20,2	Neg	Neg	18,1	18,9	34,9	Neg	26,5	27,3	29,7	Neg	Neg
S170914 Gj 17	1740	55,5	14,4	22,9	18,7	Neg	19,3	18,8	27,2	Neg	24,1	24,3	23,2	Neg	Neg
S170914 Gj 18	1258	47,5	16,0	24,5	23,9	Neg	17,5	23,2	Neg	Neg	22,6	23,8	23,5	Neg	Neg
S170914 Gj 19	1885	56	15,7	23,2	Neg	Neg	19,2	19,8	Neg	Neg	23,5	24,0	28,4	Neg	Neg
S170914 Gj 20	1030	50	14,5	14,8	Neg	Neg	6,6	12,5	Neg	Neg	23,6	26,4	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 21	1185	46	12,9	18,4	19,8	Neg	8,9	10,3	29,4	Neg	23,9	Neg	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 22	960	46	15,2	12,1	Neg	Neg	6,8	14,3	Neg	Neg	27,8	25,8	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 23	1660	59	14,6	20,2	22,2	Neg	10,4	17,8	29,6	Neg	22,3	28,7	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 24	1640	55	16,1	14,5	Neg		7,0	16,7	Neg	Neg	24,5	Neg	Neg	33,8	Neg
S170914 Gj 25	1202	50	15,2	13,6	Neg		6,7	15,3	Neg	Neg	24,2	27,0	29,6	Neg	Neg
S170914 Gj 26	1530	53	14,9	11,4	Neg		6,7	12,6	36,2	32,9	23,4	30,2	Neg	Neg	Neg
S170914 Gj 27	1694	55	16,5	13,4	Neg		7,4	14,3	Neg	Neg	21,9	25,8	Neg	Neg	Neg
Gj.snitt	1750,9	53,7		20,1	20,8		13,7	17,1	30,9	34,6	24,0	26,8	27,0	35,6	