



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

MB301612 Bacheloroppgave

**Kan laks med kronisk pankreassykdom være
smittebærer av Salmonid alfavirus i rød muskulatur?**

1306

Totalt antall sider inkludert forsiden: 43

Innlevert Ålesund, 03.06.2016

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å betrakte som fusk og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5.

Veileder: Ann-Kristin Tveten og Anne Stene.

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato: 02.06.2016

Forord

Norsk akvakultur er en svært viktig næring med en tett tilknytning til moderne bioteknologi. Mye tid og ressurser har blitt brukt på forskning og utvikling for å optimalisere produksjonen med tanke på omsetning og fiskevelferd. Likevel er det mye som gjenstår, spesielt innen bekjempelse av sykdommer. Det har derfor både vært spennende og lærerikt å få planlegge og gjennomføre denne studien fra start til slutt. Dette arbeidet hadde ikke vært mulig uten god hjelp fra mine veiledere, Anne Stene og Ann-Kristin Tveten. De har gjennom hele prosjektet stilt opp for at jeg skulle få et best mulig resultat. Jeg vil også takke høgskolelærer Gro Audveig Hagen Bjørnøy, som har bidratt med praktisk veiledning gjennom deler av prosjektet. Til slutt må jeg takke PatoGen Analyse AS, som har bidratt med materiell og prosedyrer som var nødvendig for å utføre et så omfattende analysearbeid.

Sammendrag

Pankreassykdom (PD) har siden 2003 vært den virussykdommen som har ført til mest problemer i norsk akvakultur, og skyldes viruset Salmonid alfavirus (SAV). Viruset gir skader i flere organer og vev, noe som gir økt dødelighet og dårligere slaktekvalitet. Ved mistanke om PD blir diagnosen stilt ved histopatologiske undersøkelser og viruspåvisning, først og fremst ved qPCR-analyse av hjertevev på grunn av stor nøyaktighet og lav deteksjonsgrense. Det viktigste arbeidet for å hindre spredning av sykdommen er å avdekke og forebygge alle smitteveiene. Vannbåren smitte har vist seg å være den beste forklaringen, men flere smitteveier må likevel avdekkes. Oppdrettsanlegg med pågående utbrudd av PD er det største virusreservoaret og den viktigste smitekilden, men forsøk har vist at SAV3 kan isoleres i cellekultur opp til 6 måneder etter utbrudd. Formålet med denne studien var først og fremst å undersøke om laks i den kroniske fasen av PD kan være smittebærer av SAV2 i den røde muskulaturen. Ulike vevsprøver ble tatt fra laks med akutt PD og fra laks med kronisk PD, og analysene antydte at andelen positive hjerteprøver gikk ned over tid sammenlignet med andre vevsprøver. Vevsekstrakt fra to av anleggene ble inkubert i cellekultur, og fra akutt syk laks ble det funnet gode indikasjoner på replikerende virus. Fra kronisk syk fisk ble det bare funnet indikasjoner på minimal replikasjon i prøver fra rød muskulatur hos et enkelt individ. Dette gir likevel mistanker om at laks med negative hjerteprøver kan være bærere av intakt og aktivt SAV2. Det kan derfor være aktuelt å studere dette nærmere.

Abstract

Pancreas disease (PD), caused by Salmonid alphavirus (SAV), has been the most prevailing viral disease in Norwegian aquaculture since 2003. The virus causes damage to organs and tissues, which leads to a higher mortality rate and lower quality at slaughter. When PD is suspected, the diagnosis is confirmed by histopathological examination and virus identification, preferably by qPCR in heart tissues because of its high accuracy and low detection limit. The most important way to limit the spreading of the disease is to find and prevent all the transmission pathways. Farms with an active disease outbreak has been found to be the most important viral reservoir, but studies have shown that SAV3 can be isolated from infected fish up to 6 months after diagnosis. The goal of this study was mainly to investigate if salmon with chronic PD can act as a viral carrier of SAV2 in its red muscle tissue. Multiple tissue samples were taken from salmon with acute and chronic PD, and analysis suggests that the proportion of positive heart samples declines over time relative to other tissues. Tissue extracts from two of the sampled farms were incubated in cell culture. There was good indication of replicating virus from fish with acute PD, but only minor indications of replication from a single individual with chronic PD. This still causes suspicions related to salmon with negative heart samples as possible SAV2 carriers, and should be investigated further.

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 Formål og problemstilling	1
1.2 Pankreassykdom	2
1.2.1 Pankreassykdom i Norge	2
1.2.2 Diagnostikk	4
1.2.3 Smittespredning	5
1.3 Salmonid alfavirus	6
1.3.1 Struktur	6
1.3.2 Replikasjon	7
1.3.3 Kultivering in vitro	7
2. Materialer og metoder	9
2.1 Prøveuttak	9
2.2 Cellekultur	10
2.3 SAV2-kultivering i cellekultur	11
2.4 Test av virusstabilitet in vitro	12
2.5 qPCR-analyse	12
3. Resultat	14
3.1 Ct-verdier i vevsprøver	14
3.1.1 Anlegg A	14
3.1.2 Anlegg B	14
3.1.3 Anlegg C	15
3.2 Ct-verdier i cellekultur	16
3.2.1 Anlegg A	16
3.2.2 Anlegg B	17
3.3 Virusstabilitet in vitro	18
4. Diskusjon	19
4.1 Vevsprøver	19
4.2 Virusstabilitet in vitro	21
4.3 SAV2 i cellekultur	22
5. Konklusjon	26
6. Referanser	27
7. Vedlegg	29
Vedlegg 1: qPCR-resultat for vevsprøver fra anlegg A	29
Vedlegg 2: qPCR-resultat for vevsprøver fra anlegg B	30
Vedlegg 3: Plott fra qPCR for anlegg A	31
Vedlegg 4: Plott for qPCR fra anlegg B	32

Figurer og tabeller

Figur 1. Lokalteter med pankreassykdom (PD) i Norge i 2015.....	3
Figur 2. Normalt bukspyttkjertellev hos laks	4
Figur 3. Tydelige lesjoner i bukspyttkjertellev hos laks.	4
Figur 4. Friske CHSE-celler og CHSE-celler med tegn til CPE.....	8
Figur 5. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg A.....	14
Figur 6. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg B.....	15
Figur 7. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg C.....	16
Tabell 1: Oversikt over oppdrettsanlegg for prøveuttak	10
Tabell 2: Oversikt over prøveresultat fra vevsprøver	10
Tabell 3: Oversikt over SAV2-positive vevsprøver.....	11
Tabell 4: Oversikt over prøver som ble brukt for test av virusstabilitet	12
Tabell 5: Positive prøveresultater fra cellekultur for anlegg A	17
Tabell 6: Positive prøveresultater fra cellekultur for anlegg B.....	18
Tabell 7: Resultat fra inkubering under to ulike forhold for å teste virusstabilitet.	18

Begreper

- Ct-verdi: Den syklusen der qPCR-signalet er over terskelverdien for bakgrunnsstøy (threshold cycle).
- Cytopatisk effekt (CPE): Strukturelle celleforandringer grunnet virusinfeksjon.
- Histopatologi: Læren om forandringer i vev ved sykdom og skade.
- Immunhistokjemi: Teknikker som brukes på vevssnitt for å påvise spesifikke stoffer som proteiner osv.
- In vitro: På laboratoriet, utenfor organismen.
- In vivo: I den levende organismen.
- IPNV: Infeksiøst pankreas nekrose virus.
- ISA: Infeksiøs lakseanemi.
- Konfluent vekst: Et mål på hvor stor del av arealet som er dekt av en cellekultur i f.eks. en celleflaske. Med «konfluente celler» mener en her >80% konfluent vekst.
- Nekrose: Lokal celle- og vevsdød.
- Primært inokulat: Den første prøven fra et gitt vev som inkuberes i cellekultur.
- PD: Pankreassykdom.
- Plakkformende enheter (PFU): Et mål på antallet partikler i et gitt volum som er i stand til å danne plakk (lokal CPE) i en cellekultur. Disse partiklene er ofte virus.
- RT-qPCR: 1-steps qPCR-analyse av RNA vha. revers transkriptase. Betegnelsene real time RT-PCR og Rt RT-PCR brukes ofte i litteraturen. Her brukes RT-qPCR som senere forkortes qPCR.
- SAV: Salmonid alfavirus. Det finnes 6 subtyper, navngitt SAV1 til og med SAV6.
- Trypsinering: Bruk av enzymet trypsin for å bryte bindeproteinene som holder cellene fast til underlaget.

1. Introduksjon

Lakseoppdrett er en viktig del av akvakulturen i Europeiske land som Norge, England og Skottland. Biomasseproduksjonen er enorm, og med flere hundre tusen fisk per merd og en konstant tilgang til fôr kan store mengder laks produseres årlig. Bare i 2015 ble det fra Norge eksportert over 1 million tonn laks til en verdi på 47,7 milliarder kroner [1]. Med en så stor biomasse på relativt små områder har ulike sykdommer blitt et utbredt problem. På slutten av 1980-tallet var bakterielle sykdommer og høy bruk av antibiotika det største problemet, men etter en vellykket vaksinerings har disse sykdommene i stor grad blitt erstattet av virussykdommer som IPNV, ISA og PD. Siden 2003 har PD vært den virussykdommen som har ført til mest problemer i norsk akvakultur [2].

1.1 Formål og problemstilling

På grunn av at forekomsten av PD i Norge øker i takt med den voksende oppdrettsnæringen, er det viktig å finne og kartlegge alle potensielle smitteveier. Det er naturligvis mye fokus på å hindre smitte mellom ulike oppdrettsanlegg i den akutte fasen av sykdommen, på grunn av at det er i denne fasen dødeligheten og smittepresset er høyest. Det kan likevel være verdt å sette fokus på smittespredning i den kroniske fasen av sykdommen. Det er spesielt interessant å undersøke om vev som ligger rett under skinnet på fisken kan inneholde virus, da det er dette vevet som raskest kommer i kontakt med miljøet rundt dersom fisken dør og skinnet brytes ned eller slites av. Dersom dette skjer kan virus frigjøres til vannmassene og fraktes via havstrømmer til andre områder der det kan infisere nye individer. Formålet og problemstillingen er derfor å se på mulighetene for at laks i den kroniske fasen av PD kan være smittebærer av SAV2 i rød muskulatur ved å påvise replikerende virus i cellekultur, og videre vurdere hva dette kan bety for kronisk syk fisk som en mulig smittekilde.

På grunn av prosjektets begrensninger med tanke på tid og ressurser er prøveuttaket begrenset til to uttak for isolering av virus, og analysemetoden begrenset til qPCR for påvisning av virus. Dette kan gi utfordringer dersom det skal trekkes noen endelige konklusjoner basert på denne studien.

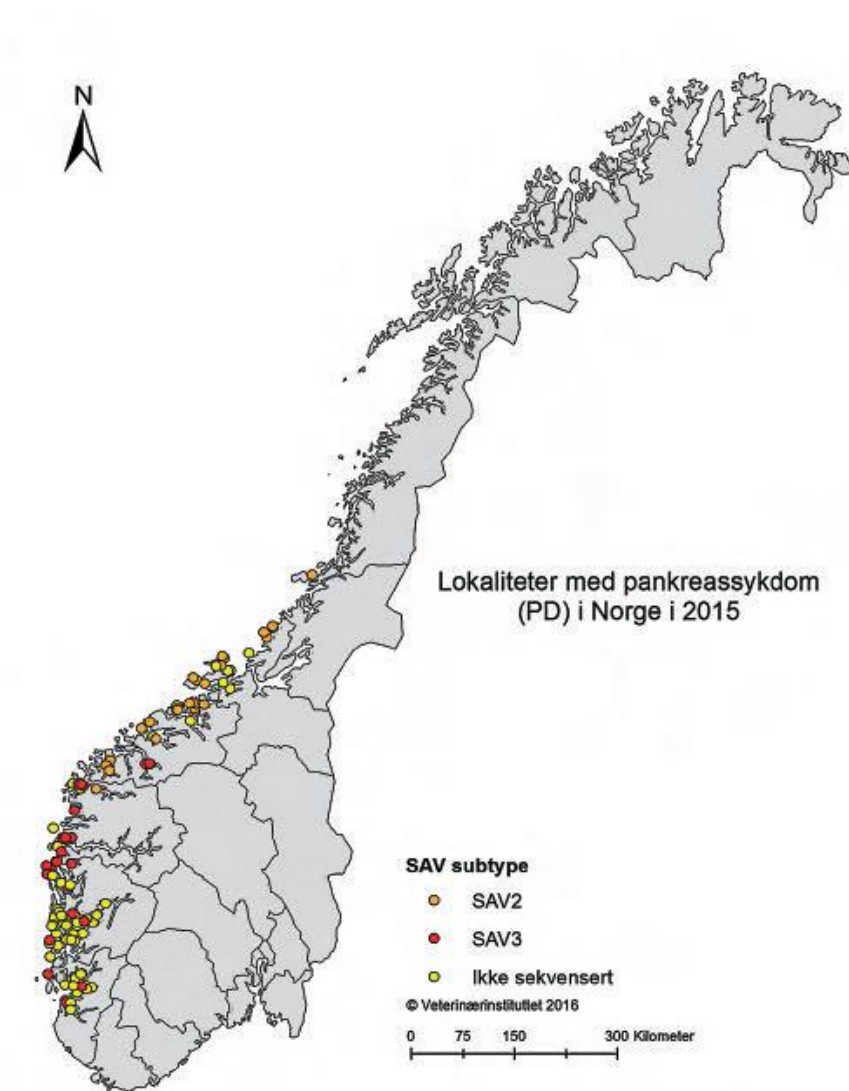
1.2 Pankreassykdom

Pankreassykdom (PD) er en sykdom hos laks og regnbueørret som skyldes infeksjon av Salmonid alfavirus (SAV). Sykdommen har vært kjent siden 1976 da den først ble beskrevet i Skottland, og siden den gang har sykdommen ført til store økonomiske tap for oppdrettsnæringen i Norge, Irland og Skottland. Noen forekomster av sykdommen har også blitt rapportert i Canada, USA, Frankrike og Spania [3]. PD er mest utbredt og kostnadskrevene hos laks i sjøfasen, men har også vært observert hos ørret og regnbueørret i ferskvann og sjøvann [4, 5]. Viruset fører til vevsskader pga. nekrose i bukspyttkjertelen, hjertet og skjelettmuskulatur, og fører i mange tilfeller til død. Dødeligheten er varierende, og 1-48% for SAV1 og fra ubetydelig og opp til 22% for SAV2 har vært rapportert [3]. De tidlige symptomene på sykdommen er fraværende appetitt og trådlignende avføring, og fisken blir ofte observert liggende i ro på bunnen av merden eller høyt i vannet mot strømmen, og kalles da gjerne for svimere. Senere symptomer er tap av muskel- og fettvev pga. dårlig inntak og fordøyelse av mat [3]. Selv etter at fisken har blitt frisk kan skadene i vevet vedvare, og fisken får lav vekt og dårligere slaktekvalitet. Ved mistanke om PD blir diagnosen stilt ved histopatologiske undersøkelser og viruspåvisning i vevsprøver. Ved mistanke og påvisning av PD er man pliktig til å melde det inn til mattilsynet, og nedslakting blir ofte gjennomført ved påvisning [1, 6, 7].

1.2.1 Pankreassykdom i Norge

PD er i dag mest utbredt fra Rogaland til Trøndelag (figur 1), samt enkelte tilfeller i Nord-Norge [8]. Det første kjente utbruddet av PD i Norge var i Hordaland i 1989, og frem til 2010 var SAV3 den eneste påviste subtypen i Norge. Etter at sykdommen først ble påvist økte antallet registrerte utbrudd årlig fra 5 i 1995 til 109 i 2008, med en liten nedgang til 75 i 2009 [9]. I samme periode økte også størrelsen på det rammede området langs kysten. I 2010 ble SAV2 påvist ved to anlegg i Nord-Trøndelag, og begge isolatene viste et nært slektskap til en skotsk SAV2-stamme, men det ble ikke funnet noen sammenheng mellom fisken i de to anleggene [6]. I årene som fulgte spredde SAV2 seg nordover i Trøndelag, og siden den gang har det vært to ulike PD-epidemier i Norge. En kontrollsoner fra Hustadvika til Nord-Trøndelag og en observasjonssone mot grensen til Nordland ble opprettet i 2012, og slike soner har vist seg effektive for å hindre spredning [7, 10]. Områdene sør for Hustadvika har hovedsakelig vært rammet av SAV3, mens Midt-Norge nord for Hustadvika har vært rammet av SAV2. Påvisning av SAV2 i Sogn og Fjordane i

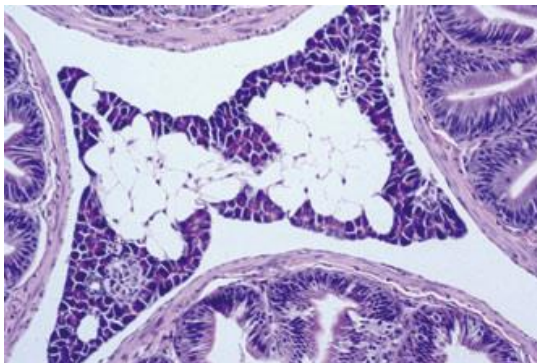
2014 og 2015 har senere vist at SAV2 nå sprer seg sørover [8]. I 2015 ble ikke PD registrert nord for Nord-Trøndelag. Det ble totalt registrert 137 PD-tilfeller i 2015, og 44 av disse skyldtes SAV2. For SAV2 er dette en liten nedgang fra 2014, da det ble registrert 54 tilfeller [8]. Det blir likevel stadig rapportert om nye utbrudd, og tiltak for å hindre videre spredning er svært viktig.



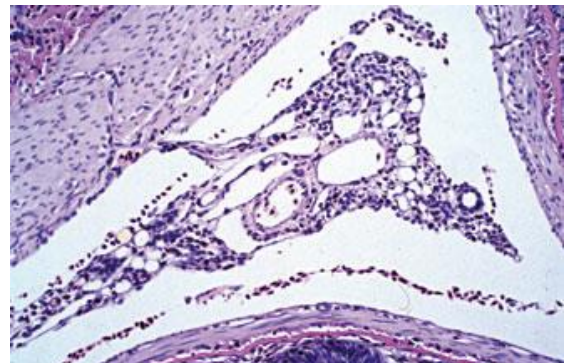
Figur 1. Lokaliteter med pankreassykdom (PD) i Norge i 2015 [10].

1.2.2 Diagnostikk

Det er en rekke teknikker som kan bli brukt for å stille diagnosen ved mistanke om PD. Man skiller mellom histopatologiske undersøkelser og viruspåvisning. Ved de histopatologiske undersøkelsene ser en etter celle- og vevsforandringer som er typiske for PD. Dette omfatter først og fremst vev i bukspyttkjertelen, hjerte- og skjelettmuskulatur. Ved den akutte fasen i et PD-utbrudd kan en observere at bukspyttkjertelvevet rundt blindsekkene blir ødelagt pga. nekrose (figur 2 og 3), ofte etterfulgt av betennelse og dannelse av bindevev. Hos noen fisk kan denne skaden bli reparert etter den akutte fasen, mens fisk med kroniske skader ofte blir lange og tynne og klassifiseres som «pinner». Denne skaden på bukspyttkjertelen har visse likheter med de som ses ved IPNV. Sammen med skadene på bukspyttkjertelen kan en ofte observere lesjoner i hjertemuskulaturen, også dette pga. nekrose. Disse skadene har visse likheter med de som observeres ved kardiomyopatisyndrom (CMS). Rundt 3-4 uker etter lesjoner i bukspyttkjertel og hjerte kan en observere tilsvarende lesjoner i skjelettmuskulaturen. Ved SAV2 er ofte skadene i skjelettmuskulaturen svært omfattende, noe som er grunnen til at fisken ofte blir observert liggende på siden i bunnen av merden [3].



Figur 2. Normalt bukspyttkjertelvev hos laks, *Salmo salar* [3]



Figur 3. Tydelige lesjoner i bukspyttkjertelvev hos laks, *Salmo salar*, 31 dager etter eksperimentell smitte med SAV1 [3].

Siden skadene som ses ved histopatologiske undersøkelser ikke er helt entydige er det også nødvendig å påvise selve viruset. Dette kan gjøres vha. isolering i cellekultur, immunhistokjemi, RT-qPCR (qPCR) og ved påvisning av antistoffer mot viruset i plasma [7]. Ved isolering og kultivering av SAV in vitro kreves det ofte mange passeringer før cytopatisk effekt (CPE) blir observert, noe som gir falske negativer dersom CPE blir brukt som kriterium for en positiv prøve. Derfor brukes ofte immunfarging av cellene for å påvise viruset selv om cellene ikke viser tegn til CPE. Immunhistokjemi kan i tillegg brukes direkte på skadet vev. Påvisning av antistoffer i serum fungerer bra på populasjonsnivå,

der antistoffer ofte kan påvises i plasma i løpet av 10 dager etter infeksjon. Likevel har qPCR blitt standarden for påvisning av SAV. Analysen utføres ofte på vevsprøver fra hjertet, siden det er lett tilgjengelig og samtidig et av de første vevene som rammes.

Ved bruk av denne PCR-teknikken kan en ved hjelp av primere og prober som er spesifikke for de ulike SAV-subtypene, påvise ulike subtyper raskt og effektivt. Ved hjelp av enzymet revers transkriptase blir SAV-RNA brukt som templat for å lage komplementert cDNA, som de spesifikke primerene deretter kan binde seg til. Ved hjelp av en standard PCR-syklus og luminiserende prober, som registreres av en detektor i eller mellom hver syklus, kan mengden SAV-RNA i en prøve kvantifiseres i sanntid. Dersom et signal som er over bakgrunnsstøyen blir registrert etter et gitt antall sykluser settes en Ct-verdi. På grunn av faktorer som spiller inn etter et stort antall sykluser blir prøver med en Ct-verdi over 38 regnet som negative (cutoff). Positive prøver for både qPCR og for påvisning av antistoffer har blitt rapportert opp til 19 måneder etter påvisning av PD [9]. qPCR har likevel en stor fordel ved at metoden kan detektere og kvantifisere veldig små mengder RNA, noe som gjør den godt egnet til analyser veldig tidlig og veldig sent i et utbrudd. Metoden har i flere tilfeller vist seg å oppdage SAV3-smitte opp til 2 måneder før kliniske tegn til PD [9]. For å si noe om virusets evne til å infisere celler og vev må en likevel isolere viruset i cellekultur, på grunn av at metoden ikke skiller mellom intakt virus og virus-RNA.

1.2.3 Smittespredning

De viktigste smittebegrensede tiltakene for PD er helseovervåkning, strenge rutiner rundt transport av smolt og slaktefisk, samt å sette ut smolt i brakklagte områder [10]. For å hindre videre spredning av PD er det likevel viktig å avdekke alle smitteveiene slik at disse kan forebygges. Vannbåren smitte er det mest åpenbare, og viruset har vist seg å ha en lang levetid i kaldt sjøvann. En studie av SAV3 i 2007 viste at viruset har en halveringstid i sjøvann på mellom 7 og 20 dager ved 10°C, avhengig av mengden biologisk materiale i vannet [11]. Dette åpner opp for en rekke horisontale smitteveier, for eksempel i sammenheng med flytting av fisk og utstyr, men også direkte ved hjelp av vær og vind. Dårlig rengjøring og desinfeksjon av brønnbåter og utstyr har vært foreslått som en mulig smittekilde [2, 3]. Død infisert fisk kan potensielt være en smittespreder dersom den ikke blir fjernet før nedbrytningen starter. En nylig studie har vist at viruset kan overleve i fett som lekker ut av død fisk, og når dette fettene legger seg på vannoverflaten

kan det raskt spre smitte i og mellom anlegg [12]. Modeller for vanntransport i de norske fjordene har i tillegg vist at havstrømmer er den beste forklaringen på smitte mellom ulike oppdrettsanlegg [13]. Siden viruset ser ut til å overleve over lang tid i sjøen er dette en mulig forklaring på smitte mellom anlegg som tilsynelatende ikke har noe til felles. En omfattende studie i 2010 viste at SAV3 kan isoleres i cellekultur opp til 6 måneder etter utbrudd [9], noe som åpner muligheten for at kronisk syk fisk kan være smittebærere. Forsøk med andre alfavirus har også vist at viruset selv i den kroniske fasen av sykdommen kan føre til en langvarig infeksjon in vitro [14]. Omfattende forsøk med egg og melke fra SAV3-positiv laks har derimot ikke vist noen tegn til vertikal smittespredning [15].

1.3 Salmonid alfavirus

Når PD først ble beskrevet i 1976 var det på grunnlag av histopatologiske undersøkelser av bukspyttkjertelvevet hos laks, der det ble observert nekrose og dannelse av bindevev. Et virus ble raskt mistenkt for å stå bak sykdommen, men også vitamin E- eller selenmangel ble foreslått som en mulig forklaring [16]. I 1995 ble viruset for første gang isolert på laboratoriet, og forsøk viste at det var mulig å infisere fisk slik at de utviklet sykdommen, noe som samtidig avkreftet mistankene om en næringsrelatert årsak. Undersøkelser viste at det var likt et typisk virus i Togavirus-familien, noe som ble bekreftet i 1999 da en delvis sekvensering av SAV1-arvestoffet viste nært slektskap med alfavirus, som er en art i Togavirus-familien. Sekvensering av SAV2-arvestoffet viste at også det var et alfavirus, og Salmonid alfavirus ble foreslått som et navn for denne arten [3]. Salmonid alfavirus er det eneste kjente alfaviruset hos fisk, og siden viruset ble oppdaget har det blitt identifisert 6 subtyper, navngitt SAV1 til og med SAV6 [9].

1.3.1 Struktur

Alfavirus er membrankledde virus med en diameter på 45-70nm. På utsiden ligger en dobbel membran bestående av fosfolipider og glykoproteiner. Selve membranen er et derivat fra vertscellens cellemembran, mens glykoproteinene er av viral opprinnelse. Disse glykoproteinene går gjennom membranen og er bundet til kapsidet. Kapsidet består av 240 kapsidproteiner arrangert som pentamerer og heksamerer, og sammen med glykoproteinene gir dette viruset en symmetrisk form. Inne i selve kapsidet finner man et enkelttrådet RNA-molekyl bestående av rundt 11800 nukleotider, avhengig av subtypen.

Dette koder for ulike strukturelle og ikke-strukturelle proteiner som er essensielle for replikasjon, transkripsjon og innkapsling av det virale RNAet [16].

1.3.2 Replikasjon

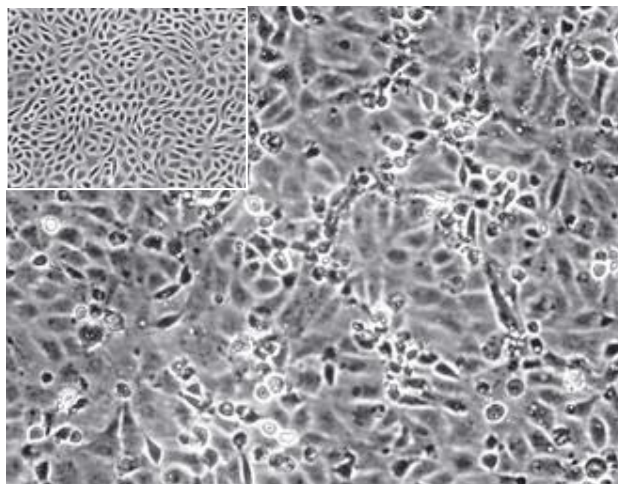
Som alle andre virus er alfavirus avhengig av en vertscelle for replikasjon. Viruset infiserer vertscellen ved hjelp av reseptoravhengig endocytose. Blant annet har lamininreseptoren blitt identifisert som en reseptor brukt av alfavirus, og selve bindingen skjer ved hjelp av et av glykoproteinene på overflaten av viruset. Etter reseptorbindingen blir viruset fraktet inn i cellen, der virusmembranen smelter sammen med den endosome membranen slik at det virale RNAet tømmer ut i cytoplasma. Der bindes RNAet til ribosom og fungerer direkte som templat for syntese av polypeptider. RNAet blir videre replisert gjennom en rekke trinn og komplekser mellom RNA og RNA-polymerase. Etter hvert som polypeptidene blir organisert og foldet via endoplasmatisk retikulum og golgiapparatet, danner de kapsidproteinene som bindes sammen og innkapsler viralt RNA. Til slutt blir virus transportert ut av cellen via eksocytose, og på den måten tar med seg en del av vertscellens cellemembran. Sammen med glykoproteinene omgir denne det ferdige viruset [16].

1.3.3 Kultivering in vitro

For kultivering av SAV på laboratoriet er det vanlig å bruke Chinook salmon embryo (CHSE) celler. Disse blir gjerne dyrket i celleflasker eller cellebrønner i et celledyrkningsmedium tilsatt føtalt kalveserum, L-glutamin og antibiotika ved 20°C. Forsøk har også vist at andre cellelinjer som TO, salmon head kidney (SHK) og blue fin-2 (BF-2) kan brukes til kultivering av viruset, men med varierende resultat [17].

Vevsprøvene som en vil isolere viruset fra blir ofte tilsatt en i konfluent cellekultur og inkubert ved 15°C i to uker eller til man observerer CPE (figur 4). Det blir ofte foretatt flere passeringer fra det primære inokulatet underveis, noe som har vist seg nødvendig for å oppnå CPE. Dette kan tyde på at viruset selekteres eller muteres over tid slik at viruset blir bedre tilpasset cellene som brukes. For påvisning av virusreplikasjon i cellekultur kan man bruke mikroskopi, immunfarging med monoklonale antistoffer for SAV og qPCR [9].

Forsøk med SAV1 har vist at mengden plakkdannende (PFU) enheter har en halveringstid in vitro som er omvendt proporsjonal med økende temperatur dersom viruset ikke har mulighet til replikasjon. I supernatant fra cellekultur ble det funnet en halveringstid på 25,3 dager ved 4°C, mot 4,6 dager ved 15°C. I den samme studien ble det også observert at viruset raskt blir ødelagt eller inaktivert ved pH 12,0 og pH 4,0 ved 4°C [11]. Dette tyder på at viruset er ustabil in vitro, og håndtering og lagring må derfor tilpasses etter dette.



Figur 4. Friske CHSE-celler (innfelt) og CHSE-celler med tegn til CPE etter infeksjon av SAV1 [3].

2. Materialer og metoder

2.1 Prøveuttak

Uttak 1 var 10 laks (*Salmo salar*) fra et oppdrettsanlegg (anlegg A) i Møre og Romsdal. SAV2 påvist hos anlegget 2 uker tidligere (tabell 1). Utbruddet var antatt å være i den akutte fasen. Individene (gjennomsnittsvekt på 4,3kg og en gjennomsnittslengde på 67cm) ble tatt fra bunnen av merden og ble antatt å være svimere, typisk for SAV2-rammet laks i den akutte fasen av PD. Transport og lagring på is/kjølerom. Vevsprøver tatt fra hjerte, gjeller og rød muskulatur med ny skalpell for hver prøve for å unngå krysskontaminering. 2x2mm prøver fiksert i RNAlater, inkubert ved 4°C i 48 timer før nedfrysing ved -20°C frem til qPCR-analyse hos PatoGen Analyse AS for påvisning og kvantifisering av SAV2-RNA (tabell 2), samt vevsprøver på ca. 1 gram fra gjeller og rød muskulatur for ekstraksjon av virus for kultivering i cellekultur (plassert i 15mL sentrifugerør på is med 9mL celledyrkingsmedium uten FBS). Disse ble homogenisert i en stomacherpose vha. en stomacher (Lab-Blender) i 3 x 1 min, sentrifugert ved 2500rpm ved 4°C i 10 minutter, pipettert over til 1,5mL eppendorfrør og fryst ned til -80°C.

Uttak 2 var 10 laks fra et annet oppdrettsanlegg (anlegg B) i Møre og Romsdal med påvist SAV2 5 måneder tidligere (tabell 1). Individene var lange og tynne (gjennomsnittsvekt 3,2kg og gjennomsnittslengde 69cm), typisk for PD-rammet laks i den kroniske fasen av sykdommen. Transport og lagring på is/kjølerom. Vevsprøver fra hjerte, gjeller og rød muskel ble tatt og bearbeidet på samme måte som ved anlegg A. Prøvene i RNAlater ble sendt til qPCR-analyse hos PatoGen Analyse AS (tabell 2).

Uttak 3 bestod av prøveresultater (tabell 2) fra 10 laks tatt fra et tredje oppdrettsanlegg (anlegg C) 14 måneder etter påvist SAV2 (tabell 1). Prøvene var analysert hos PatoGen Analyse AS.

Tabell 1: Oversikt over oppdrettsanlegg for prøveuttak. Tabellen viser utsettsdato, antall fisk, når PD med SAV2 ble påvist, dato for prøveuttak og andelen fisk som testet positivt ved uttak.

	Anlegg A	Anlegg B	Anlegg C
Utsettsdato	2014/09	2014/10	2012/06
Antall fisk*	-	1100000	1540000
PD oppdaget	2016/02	2015/08	2012/10
Prøveuttak	2016/14/03	2016/25/01	2014/02
Prosentvis påvisning ved uttak	40%	80%	50%

*Ingen data for anlegg A.

Tabell 2: Oversikt over prøveresultat fra vevsprøver. Alle analysene ble utført av PatoGen Analyse AS. Resultat for anlegg C er hentet fra et tidligere prøveuttak. Se vedlegg 1 og 2 for datagrunnlag for anlegg A og B.

	Anlegg A			Anlegg B			Anlegg C		
Vevsprøve	Hjerte	Gjelle	Rød muskel	Hjerte	Gjelle	Rød muskel	Hjerte	Gjelle	Rød muskel
Antall prøver	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Positive prøver	4	3	4	4	8	6	0	3	3
Ct-verdi*	32.4	32.4	28.4	33.3	29.8	31.1	-	29.1	33.1
Ct-område	26.9-34.6	30.6-34.1	26.5-32.0	31.4-35.2	31.0-36.7	27.1-36.7	-	26.6-35.1	30.2-35.4

* Middelverdi av alle prøvene fra samme type vev fra samme uttak.

2.2 Cellekultur

Arbeid med celler foregikk sterilt i LAF-benk. Utstyr ble desinfisert med autoklav eller 70% etanol før bruk, og løsninger romtemperert før bruk. CHSE-celler valgt som vertsceller. Celledyrkningsmediet var Leibovitz's L-15 Medium (Thermo Fisher) tilsatt 10mL L-glutamin (Corning), 25mL føtalt kalveserum (FBS, BioWhittaker) og 5mL Antibiotic-Antimycotic (100x). Et Motic AE31 inversmikroskop med fasekontrast ble brukt til inspeksjon av cellekultur.

Et cryorør med 1mL CHSE-celler i frysemedium ble tatt opp fra flytende nitrogen, tint i vannbad ved 20°C, tilsatt 1mL celledyrkningsmedium og overført til en liten (25cm²) celledyrkningsflaske med 5mL celledyrkningsmedium og inkubert ved 20°C i 48 timer før bytte av celledyrkningsmedium og videre inkubering. Kulturen ble regelmessig inspisert frem til konfluent vekst ble observert, og deretter splittet og fordelt på to medium

(75cm²) celleflasker tilsatt 17mL celledyrkningsmedium. Splitting ble gjort ved å fjerne gammelt celledyrkningsmedium, skylle cellene med 2 x 3,5mL Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) og trypsinering med 0,5mL trypsin-EDTA. 6mL celledyrkningsmedium ble tilsatt ved tilfredsstillende (>80%) trypsinering og 3,5mL celleløsning fordelt i hver celleflaske som så ble inkubert ved 20°C. Inspeksjon og splitting av cellekultur på tilsvarende måte som forklart over ble foretatt hver 7. dag, eventuelt når konfluent vekst ble observert. Cellekulturene ble fordelt på små (25cm²), medium (75cm²) og store (175cm²) celleflasker etter behov.

2.3 SAV2-kultivering i cellekultur

Små (25cm²) celleflasker med konfluente celler og ferskt celledyrkningsmedium ble brukt for kultivering av virus. To celleflasker per prøve (tabell 3) for uttak 1 (anlegg A) og én celleflaske per prøve (tabell 3) for uttak 2 (anlegg B). Et (uttak 2) eller to (uttak 1) eppendorfrør med 1mL vevsekstrakt fra hver positiv vevsprøve ble tint i romtemperatur, overført til cellekultur og satt til absorpsjon i 3 timer ved 15°C før celledyrkningsmediet med vevsekstrakt ble helt av og ferskt medium tilsatt. Celleflaskene ble satt til inkubering ved 15°C i tre uker før analyse og videre passering av 1mL supernatant til ny cellekultur. Cellekulturer inspisert hver 7. dag for tegn til CPE. På grunn av begrenset tid og kapasitet ble prøver fra anlegg A passert videre én gang, mens prøver fra anlegg B ble passert videre 3 ganger. Prøver som var negative etter 2. passering ble ikke passert videre.

Tabell 3: Oversikt over vevsprøver fra rød muskulatur og gjeller som testet positivt for SAV2 med tilhørende Ct-verdi. Prøver navngis etter prøvenummer og anlegg, og prøver fra rød muskulatur benevnes (R) og prøver fra gjeller benevnes (G). ND = not detected. Se vedlegg 1 og 2 for datagrunnlag.

Anlegg A			Anlegg B		
Prøve	Rød muskel (R)	Gjelle (G)	Prøve	Rød Muskel (R)	Gjelle (G)
5A (R), 5A(G)	26.5	ND	1B (R), 1B (G)	ND	35,2
6A (R), 6A (G)	28.5	34.1	2B (R), 2B (G)	36.7	34.3
8A (R), 8A (G)	32.0	30.6	3B (R), 3B (G)	30.7	35.9
10A (R), 10A (G)	26.7	32.5	4B (R), 4B (G)	27.1	33.5
			5B (R), 5B (G)	30.4	31.0
			8B (R), 8B (G)	36.7	34.4
			9B (R), 9B (G)	27.2	33.7
			10B (R), 10B (G)	ND	33.6

2.4 Test av virusstabilitet in vitro

Virusstabilitet in vitro ble testet under to ulike forhold. For test under forhold med antatt lav enzymaktivitet ble 1mL cellefri supernatant fra 3 prøver med lav Ct-verdi (tabell 4) tilsatt i 3 små (25cm²) celledyrkningsflasker med 5mL sterilt celledyrkningsmedium. For test under forhold med antatt normal enzymaktivitet ble 1mL cellefri supernatant fra 3 tilsvarende prøver (tabell 4) som forklart over tilsatt i 3 celledyrkningsflasker med 5mL cellefri supernatant fra fersk cellekultur. Prøvene ble inkubert ved 15°C i 2 uker før kvantifisering med qPCR.

Tabell 4: Oversikt over prøver brukt i test av virusstabilitet under to ulike forhold. Prøver er navngitt etter prøvenummer, anlegg, parallell og vevstype.

Prøve	Ct-verdi i prøve*	Forhold
10A2 (G)	23.4	Supernatant
10A2 (R)	21.0	Supernatant
8A2 (R)	21.2	Supernatant
10A2 (G)	23.4	Celledyrkningsmedium
10A1 (R)	23.9	Celledyrkningsmedium
8A2 (R)	21.2	Celledyrkningsmedium

* Gjennomsnittlig Ct-verdi i prøve fra samme cellekultur.

2.5 qPCR-analyse

Påvisning og kvantifisering av SAV2 i cellekultur ble gjort ved qPCR-analyse 3 uker etter tilsetning av vevsekstrakt, og deretter etter 2 uker for hver passering. Analyser av prøver for virusstabilitet ble utført på tilsvarende måte. Cellekulturene ble fryst (-20°C) og tint for å lysere cellene, supernatanten (ca. 4mL) overført til 10mL sentrifugatrør og sentrifugert ved 2500rpm og 4°C i 10 minutter for å fjerne cellerester. 3 x 1mL supernatant fra hver prøve ble pipettert over til 1,5mL eppendorfrør. To av disse ble fryst ned ved -80°C, og det siste sentrifugert ved 14000rpm og 4°C i 1 time. 860µL av supernatanten ble fjernet fra hvert rør og pelleten resuspendert i de resterende 140µL. Viralt RNA i prøvene isolert vha. standard prosedyre for QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Etter isolering ble mengden RNA kvantifisert vha. standard prosedyre for Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

Identifisering og kvantifisering av SAV2 vha. 1-steps RT-qPCR (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System) etter PatoGen Analyses AS akkrediterte metode. Syklusen

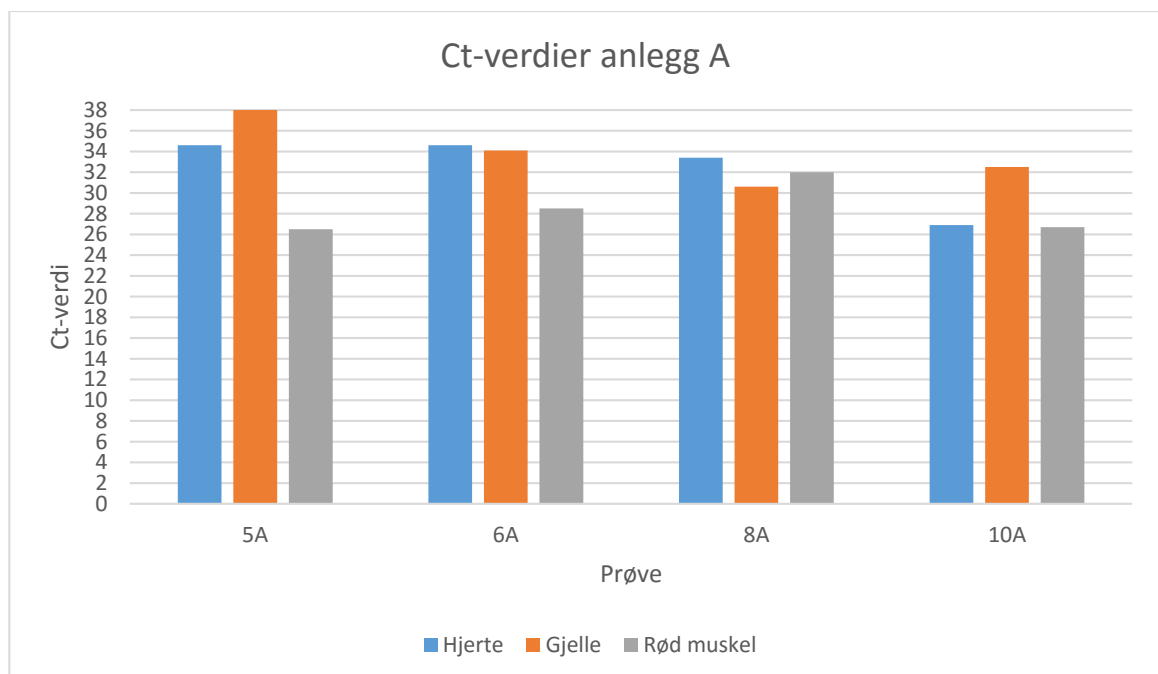
var 50°C i 30 minutter, 95°C i 15 minutter og 45 repetisjoner med 95°C i 15 sekunder og 60°C i 1 minutt. SAV2-RNA brukt som positiv kontroll og nukleasefritt vann som negativ kontroll. Threshold satt til starten av den eksponentielle fasen, og forventet middelvei for positive kontroller var 28,8 med et akseptabelt standardavvik på 2,8. Cutoff ble satt til 38. Det ble kjørt 3 paralleller på alle prøver og kontroller. For prøver med bare én positiv parallell ble det kjørt 3 nye paralleller.

3. Resultat

3.1 Ct-verdier i vevsprøver

3.1.1 Anlegg A

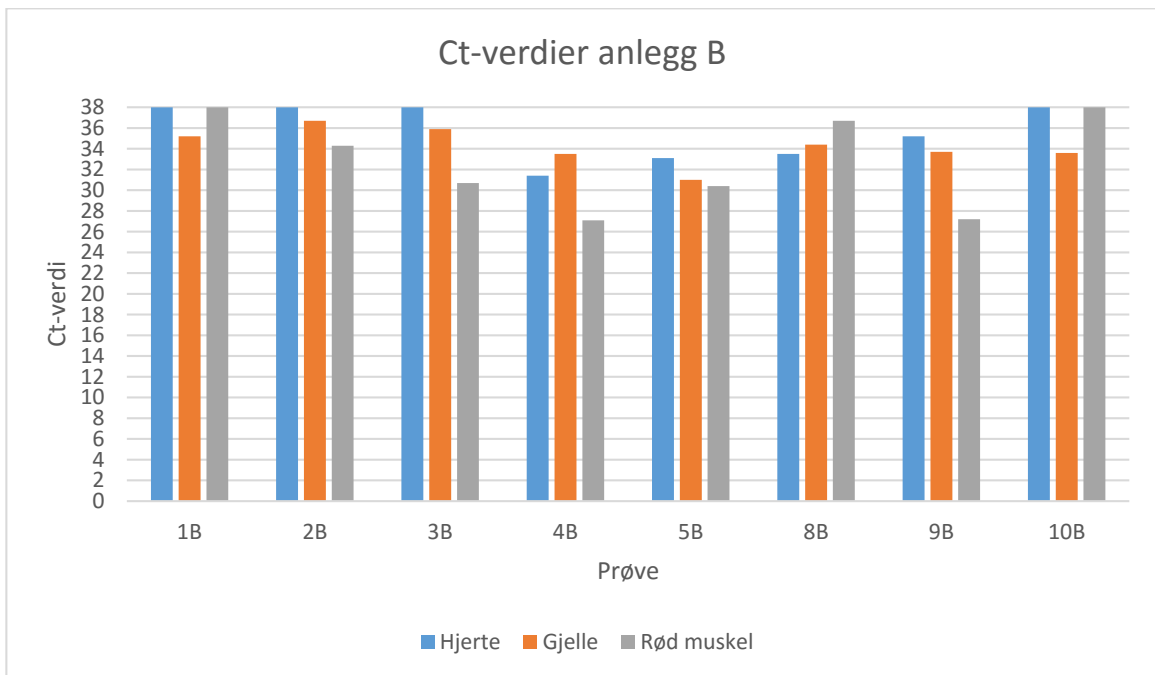
Hos anlegg A testet 4 av 10 fisk positive for SAV2 to uker etter at PD/SAV2 ble påvist. Figur 5 viser at blant disse var det 3 positive prøver fra gjeller og 4 positive prøver fra både hjerte og rød muskel. Prøvene fra rød muskel hadde den laveste gjennomsnittlige Ct-verdien med en Ct-verdi på 28,4, mens både prøvene fra hjerte og gjeller hadde en Ct-verdi på 32,4 (tabell 2). Hos 3 av de 4 fiskene ble SAV2 påvist i alle vevstyper. Alle positive prøver var under cutoff.



Figur 5. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg A. Positive prøver var under cutoff (38). SAV2 ble påvist i hjerte og rød muskel hos alle de 4 fiskene, mot 3 positive gjelleprøver.

3.1.2 Anlegg B

Hos anlegg B testet 8 av 10 fisk SAV2-positivt 5 måneder etter at PD/SAV2 ble påvist. Figur 6 viser at 4 prøver var positive fra hjerte, 8 fra gjeller og 6 fra rød muskulatur. Prøvene fra gjeller hadde lavest gjennomsnittlig Ct-verdi med en Ct-verdi på 29,8, mens prøvene fra hjerte og rød muskel hadde en gjennomsnittlig Ct-verdi på henholdsvis 33,3 og 31,1 (tabell 2). Hos 4 av de 8 fiskene ble SAV2 påvist i alle vevstyper. Alle positive prøver var under cutoff.

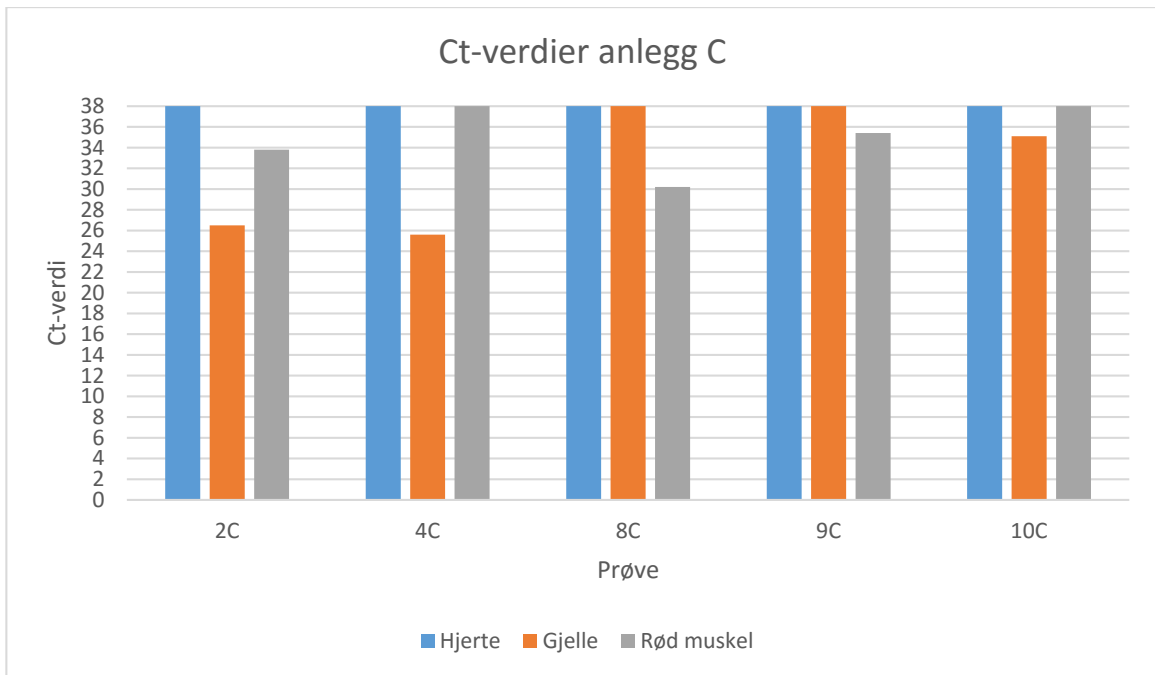


Figur 6. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg B. Positive prøver var under cutoff (38). Gjelleprøvene var positive hos alle de 8 fiskene, mens 6 og 4 fisk testet positivt i henholdsvis rød muskel og hjerte.

3.1.3 Anlegg C

Hos anlegg C testet 5 av 10 fisk positivt for SAV2 14 måneder etter påvist PD/SAV2.

Figur 7 viser at det ikke var noen positive hjerteprøver, mens 3 prøver fra gjeller og rød muskel var positive. To av disse prøvene var fra den samme fisken, mens hos 4 av de 5 fiskene ble SAV2 bare påvist i én vevstype. Positive prøver var under cutoff. Prøvene fra gjeller hadde lavest gjennomsnittlig Ct-verdi med en Ct-verdi på 29,1 mot 33,1 i rød muskel (tabell 2).



Figur 7. Grafisk fremstilling av positive prøver fra anlegg C. Positive prøver er under cutoff (38). SAV2 ble påvist i 5 av 10 fisk. Ingen hjerteprøver var positive.

3.2 Ct-verdier i cellekultur

3.2.1 Anlegg A

Tabell 5 viser at av de 7 prøvene fra anlegg A som ble tilsatt i cellekultur (tabell 3) var det 6 som testet positivt for SAV2 etter 3 ukers inkubering. To av disse (5A og 6A) testet bare positivt i 1 av 3 paralleller i én av de to parallelle cellekulturene (5A1 og 6A2). Begge disse var prøver fra rød muskulatur. For 6A1 var Ct-verdien over cutoff. Hos de resterende prøvene var alle paralleller i alle cellekulturene positive og under cutoff, med unntak av 10A1 (R) der 2 av 3 paralleller var positive (vedlegg 3A). Etter 1. passering var det igjen én positiv parallell for 5A1 (R). For 6A1 (R) var det to positive paralleller. For de resterende prøvene var alle paralleller positive og under cutoff (vedlegg 3B). Det ble ikke observert noen sikre tegn til CPE i noen av cellekulturene underveis.

Tabell 5: Positive prøveresultater fra cellekultur for anlegg A. Tabellen viser antall paralleller, antall positive prøver, Ct-verdi og Ct-område for primært inokulat og 1. passering. Prøver er navngitt etter prøvenummer, anlegg, parallellnummer og vevstype.

Anlegg A				
Prøve	Antall paralleller	Antall positive paralleller	Ct-verdier	Gjennomsnittlig Ct-verdi
5A1 (R) – Primært inokulat	3	1	35.8	-
5A1 (R) – 1. passering	3	1	36.6	-
6A1 (R) – Primært inokulat	3	1	38.5	-
6A1 (R) – 1. passering	3	2	33.9, 35.9	34.9
6A2 (R) – Primært inokulat	3	1	36.7	-
6A2 (R) – 1. passering	3	3	36.9, 36.2, 36.1	36.4
8A1 (G) – Primært inokulat	3	3	24.1, 24.2, 24.3	24.3
8A1 (G) – 1. passering	3	3	23.2, 23.5, 22.8	23.2
8A2 (G) – Primært inokulat	3	3	24.1, 24.1, 24.1	24.1
8A2 (G) – 1. passering	3	3	25.0, 23.7, 24.4	24.4
8A1 (R) – Primært inokulat	3	3	22.3, 22.5, 22.4	22.4
8A1 (R) – 1. passering	3	3	19.2, 19.2, 19.4	19.2
8A2 (R) – Primært inokulat	3	3	21.2, 21.1, 21.2	21.2
8A2 (R) – 1. passering	3	3	22.3, 21.9, 22.5	22.23
10A1 (G) – Primært inokulat	3	3	23.8, 24.2, 23.7	23.9
10A1 (G) – 1. passering	3	3	22.7, 23.1, 21.4	22.4
10A2 (G) – Primært inokulat	3	3	23.5, 23.4, 23.2	23.4
10A2 (G) – 1. passering	3	3	21.8, 21.7, 21.5	21.7
10A1 (R) – Primært inokulat	3	3	23.9, 23.8, 23.8	23.8
10A1 (R) – 1. passering	3	3	21.6, 21.9, 21.7	21.7
10A2 (R) – Primært inokulat	3	2	20.9, 21.0	21.0
10A2 (R) – 1. passering	3	3	17.3, 18.1, 18.2	17.9

3.2.2 Anlegg B

Tabell 6 viser at av de 14 prøvene fra anlegg B som ble tilsatt i cellekultur (tabell 3) var det to som testet positivt for SAV2 etter 3 ukers inkubering. Begge disse var vevsprøver fra rød muskulatur (4B og 5B) som testet positivt for SAV2 med en Ct-verdi på henholdsvis 27,1 og 30,4 (tabell 3). Av 6 paralleller per prøve var det to positive for både 4B og 5B (vedlegg 4A og 4B). Alle disse hadde en Ct-verdi like under cutoff. Etter 1. passering var det én positiv parallell med en Ct-verdi på 37,1 for 4B og ingen positive paralleller for 5B (vedlegg 4C), og etter 2. passering var det igjen én positiv parallell for 4B med en Ct-verdi på 36,5 (vedlegg 4D). Etter den 3. og siste passeringen var det to

positive paralleller for 4B med en Ct-verdi på henholdsvis 36,9 og 36,4 (vedlegg 4E). CPE ble ikke observert i noen av cellekulturene.

Tabell 6: Oversikt over prøveresultater fra cellekultur for anlegg B. Tabellen viser antall paralleller, antall positive prøver, Ct-verdier og gjennomsnittlig Ct-verdi for prøver fra cellekultur med primært inokulat og videre passeringer. Prøver er navngitt etter prøvenummer, anlegg og vevstype.

Anlegg B				
Prøve	Paralleller	Positive prøver	Ct-verdier	Gjennomsnittlig Ct-verdi
4B (R) – Primært inokulat	6	2	37.5, 36.9	37.2
4B (R) – 1. passering	6	1	37.1	37.1
4B (R) – 2. passering	6	1	36.5	36.5
4B (R) – 3. passering	6	2	36.9, 36.4	36.7
5B (R) – Primært inokulat	6	2	35.0, 36.8	35.9
5B (R) – 1. passering	6	0	-	-
5B (R) – 2. passering	6	0	-	-

3.3 Virusstabilitet in vitro

SAV-RNA ble detektert i alle de 6 prøvene etter to ukers inkubering ved 15°C (tabell 7). I prøvene som ble inkubert i supernatant fra cellekultur i 2 uker ved 15°C var Ct-verdien gjennomsnittlig 3,6 sykluser høyere enn før passering, og 4,9 sykluser høyere enn de tilsvarende prøvene inkubert i cellekultur (tabell 5). I prøvene som ble inkubert i sterilt celledyrkningsmedium var Ct-verdien gjennomsnittlig 2,5 sykluser høyere enn før passering, og 3,4 sykluser høyere enn tilsvarende prøver inkubert i cellekultur.

Tabell 7: Resultat fra inkubering under to ulike forhold for å teste virusstabilitet. Tabellen viser også Ct-verdi for prøve før inkubering og prøveresultat fra tilsvarende prøver inkubert i cellekultur.

Prøve	Ct-verdi i prøve*	Ct-verdi etter to ukers inkubering*	Ct-verdi i prøve inkubert i cellekultur*	Forhold
10A2 (G)	23.4	26.1	21.7	Supernatant
10A2 (R)	21.0	26.8	17.9	Supernatant
8A2 (R)	21.2	23.6	22.2	Supernatant
10A2 (G)	23.4	23.2	21.7	Celledyrkningsmedium
10A1 (R)	23.9	27.7	21.7	Celledyrkningsmedium
8A2 (R)	21.2	24.9	22.2	Celledyrkningsmedium

* Gjennomsnittlig Ct-verdi for prøve.

4. Diskusjon

For denne studien ble det hentet inn vevsprøver fra til sammen 20 fisk i to ulike oppdrettsanlegg i Møre og Romsdal. I tillegg ble det hentet inn relevante prøveresultat fra et tilsvarende uttak ved et tredje anlegg i samme region. Alle anleggene hadde fått påvist SAV2-relatert PD ved hjelp av qPCR tidligere ved ulike tidspunkt, henholdsvis 2 uker, 5 måneder og 14 måneder før prøveuttak. De ulike tidspunktene for prøveuttak kan kanskje gi et grunnlag for å sammenligne prøveresultatene fra ulike vev ved ulike stadier i sykdomsforløpet. Videre skulle vevsprøvene fra de to første anleggene brukes for å isolere SAV2 i cellekultur. Prøvene fra anlegget i antatt akutt fase var hovedsakelig ment for å bekrefte at replikerende SAV2 i cellekultur kan påvises med qPCR. Prøvene fra anlegget i kronisk fase skulle derimot brukes for å undersøke om aktivt virus fortsatt var til stede i vevet.

4.1 Vevsprøver

Vevsprøvene ble analysert hos PatoGen Analyse AS etter en standardisert metode som brukes ved kontroll av oppdrettsfisk etter utbrudd av PD. Dette gir resultatene et godt grunnlag for sammenligning med reelle prøveresultater som blant annet brukes av oppdrettsnæringen. Ved å sammenligne resultatene fra de forskjellige anleggene kan det se ut til at forskjellige typer vev kan ha ulike egenskaper når det gjelder halveringstiden av SAV2 eller SAV2-RNA in vivo. Mest påfallende er det at andelen positive hjerteprøver ser ut til å gå ned i en høyere grad enn for gjeller og rød muskulatur.

Hos anlegg A ble utbruddet antatt å være i akutt fase på grunn av nylig oppdaget smitte og høy dødelighet i anlegget. Alle hjerteprøver var positive i de individene der det ble påvist SAV2. Dette var forventet, siden hjertemuskulaturen er et av de første vevene som rammes av sykdommen. Fisken som ble tatt ut lå i bunnen av merden, og det ble derfor antatt at de var svimere. Siden typiske svimere har store vevsskader i rød muskulatur ble fisken antatt å være gode utgangspunkt for isolering av viruset. Likevel ble SAV2 bare påvist hos 4 av 10 individer. Det lave antallet kan ha en sammenheng med at kardiomyopatisyndrom også var påvist hos anlegget, og at symptomene som ble vurdert som PD-relaterte likevel ikke var det. I en studie med eksperimentell smitte av SAV2 hos regnbueørret ble det ikke sett tegn til typiske svimere før 42 dager etter infeksjon [5]. Siden PD ikke var påvist i anlegget før noen få uker tidligere kan dette være en mulig årsak til funnene. I noen tilfeller kan

SAV3 detekteres ved hjelp av qPCR i lang tid før kliniske tegn til sykdommen. Det er derfor også mulig at den høye dødeligheten i anlegget ikke var relatert til PD. Dersom symptomene skyldes noe annet enn PD er det derfor ikke overraskende at så få individer testet positivt. Tilsvarende funn med relativt få positive individer i tidlig i utbruddet har vært rapportert tidligere ved SAV3-relatert PD i norske oppdrettsanlegg [9]. På grunn av uklarheten rundt symptomene på klinisk sykdom er det derfor vanskelig å si noe om andelen fisk med påvist SAV2. Likevel kan det se ut til at prøver av hjertet på dette tidspunktet gjenspeilet fiskens PD-tilstand godt fra et diagnostisk perspektiv.

Hos anlegg B, med uttak 5 måneder etter at PD ble oppdaget, ble SAV2 påvist i 8 av 10 individer. Halvparten av disse testet positivt i hjerteprøvene. Fisken som det ble tatt prøver av ble valgt ut basert på utseendet, og alle individene ble karakterisert som typiske pinner. Det er derfor rimelig å anta at alle disse hadde vært smittet av PD tidligere, og dermed var i den kroniske fasen av sykdommen. Slike individer kan tenkes å ha store skader på bukspyttkjertelen, og det er derfor ikke usannsynlig at tilsvarende skader kan finnes i andre vevstyper. Det kan derfor tenkes at disse vil være gode reservoar for virus sent i sykdomsforløpet, noe som kan forklare den høye andelen positive individer. Denne forklaringen stemmer også overens med funn fra en tidligere studie, der fisk med tydelige sykdomstegn hadde en mye større sjanse for å teste positivt enn tilfeldig utvalgt fisk [9]. Funnene peker i tillegg mot en nedgang i andelen positive hjerteprøver sammenlignet med resultatene fra anlegg A.

Innhentede data fra anlegg C viste ingen positive hjerteprøver 14 måneder etter utbruddet ble oppdaget. SAV2 ble likevel påvist hos 5 individer. Prøvene ble tatt fra fisk som nylig hadde dødd, men disse dødsfallene var ikke antatt å være relatert til PD. Det er derfor vanskelig å si noe om andelen fisk som testet positivt. Resultatene kan likevel tyde på at andelen positive hjerteprøver igjen har gått ned i forhold til antallet positive individer.

Trenden som ble observert i de ulike vevsprøvene kan kanskje forklares ved at ulike organer og vev har forskjellige behov for blodtilførsel. Dette gjelder spesielt for vev i hjertet og skjelettmuskulatur, som vil ha store forskjeller i blodtilførsel. Eventuelle skader på vevet som følge av sykdom også kan påvirke dette. Vev med god blodtilførsel vil blant annet ha en bedre forsyning av immunceller og antistoffer. Det kan av den grunn tenkes at viruspartikler eller viralt RNA som blir utsatt for en god blodtilførsel i hjertet vil brytes

raskere ned enn viruspartikler i nekrotisert vev i skjelettmuskulaturen. Samtidig er det ikke usannsynlig at individer med store skader i hjertet og andre organer dør tidlig, og at individer med relativt lite virus i hjertet og andre viktige organer derfor selekteres tidlig i utbruddet. Siden omfattende skader i skjelettmuskulaturen ofte ses ved PD som følge av SAV2, er dette likevel en mulig forklaring på de relativt lave Ct-verdien som ble observert i en del av prøvene fra rød muskulatur. Samtidig var det totalt sett flere positive gjelleprøver enn muskelprøver, dog med en høyere gjennomsnittlig Ct-verdi enn i rød muskulatur. Friske gjeller har en god blodtilførsel som på sett og vis kan sammenlignes med hjertet, men dersom gjellene var skadet som følge av PD eller andre sykdommer kan dette kanskje forklare disse funnene. Ved anlegg med stort smittepress kan positive gjelleprøver også komme av virusholdig vann som filtreres gjennom dem. Ved prøveuttak sent i utbruddet kan det likevel finnes en annen forklaring. En histopatologisk undersøkelse av de ulike vevene kunne kanskje gitt grunnlag for en bedre forklaring. En slik undersøkelse var likevel ikke mulig i dette forsøket på grunn av studiens begrensede omfang. Dette gjør at en tolkning av resultatene må gjøres på grunnlag av spekulasjoner. Basert på det prøveuttaket som har blitt gjort i dette forsøket kan det likevel se ut til at andelen positive hjerteprøver går ned over tid i en større grad enn i rød muskulatur og gjeller. På grunn av at undersøkelsen av vevsprøvene var begrenset til qPCR er det vanskelig å gi en god forklaring på hvorfor det er slik, men resultatene kan tyde på at dette stemmer. Dette kan bety at hjertet ikke er det optimale vevet for påvisning av SAV2 i den kroniske fasen av sykdommen. Alternative vev derfor bør kanskje vurderes for kontroll sent i sykdomsforløpet. Både gjeller og rød muskulatur har her vist seg å teste positivt i lang tid etter utbruddet, men ingen av de har vist seg å være et klart bedre valg enn den andre. Andre vev kan derfor tenkes å være bedre egnet, og en mer omfattende kartlegging av Ct-verdier i ulike vevstyper over tid kan derfor være nyttig.

4.2 Virusstabilitet in vitro

For å kunne si noe om resultatene etter inkubering av SAV2 i cellekultur var det viktig å vite hvilke resultater en burde forvente dersom viruset ikke har mulighet for replikasjon. Dette var spesielt viktig ved bruk av qPCR, siden metoden ikke skiller mellom intakt virus eller viralt RNA. En tidligere studie av SAV1 har vist at mengden plakkdannende enheter har en halveringstid på mellom 4 og 5 dager ved inkubering i supernatant fra cellekultur ved 15°C [11]. Om en med qPCR vil måle den samme halveringstiden ble ikke undersøkt i

denne studien. En tilsvarende halveringstid for RNA kunne kanskje forklart den forhøyede Ct-verdien som ble observert under dette forsøket. En viss økning i Ct-verdi etter inkubering, uavhengig av degradert RNA, var forventet pga. fortynningen som ble gjort. Samtidig ble det også antatt at Ct-verdien ville øke med økende ribonukleaseaktivitet, og denne antagelsen kan se ut til å stemme. I prøvene som ble inkubert i sterilt celledyrkningsmedium ble det målt en liten økning i Ct-verdi. Denne økningen kan kanskje forklares av fortynningen ved passering, samt en spontan degradering av RNA, delvis katalysert av en liten mengde enzymer fra passering av viruset. I prøvene som ble inkubert i supernatant fra cellekultur ble det observert en vesentlig større økning i Ct-verdi. I tillegg til fortynningen kan dette forklares av en større mengde enzymer som i mye større grad vil katalysere nedbrytingen av RNA. Enzymaktiviteten i de sistnevnte prøvene er antatt å være tilsvarende de i en aktiv cellekultur, men det ble ikke gjort noen undersøkelse for å bekrefte dette. For å måle økningen i Ct-verdi som følge av selve degradering av RNA under inkubering burde det ha blitt tatt en prøve rett etter fortynning. Ved å sammenligne Ct-verdien i starten og ved slutten av inkuberingen ville en da fått et bedre bilde på hvor mye Ct-verdien endret seg som følge av selve degraderingen. Funnene som ble gjort, sammen med funnene i den tidligere nevnte studien, styrker likevel antagelsen om at SAV2 og SAV2-RNA er ustabil in vitro. Det kan derfor være naturlig å forvente en stigende Ct-verdi for hver passering dersom viruset ikke har muligheter for replikasjon. Dette kan tenkes å gi et bedre grunnlag for å kunne bekrefte replikerende SAV2 ved hjelp av qPCR. Likevel må en ta hensyn til flere faktorer som vil spille inn på degraderingen. Ved bruk av enzym som katalysatorer er reaksjonshastigheten i stor grad avhengig av både enzymkonsentrasjon og substratkonsentrasjon. Ved lave viruskonsentrasjoner er det derfor ikke usannsynlig at en ikke vil se en tilsvarende økning i Ct-verdi.

4.3 SAV2 i cellekultur

Hovedfokuset i denne studien var å undersøke om det er mulig å påvise replikerende SAV2 i cellekultur tilsatt vevsekstrakt fra rød muskulatur hos kronisk syk fisk. En fungerende teknikk for kultivering av viruset, samt en pålitelig metode for påvisning av replikasjon var derfor viktig. Resultatene fra cellekultur med vevsekstrakt fra anlegg A kan tyde på at viruset kan kultiveres fra vevsprøver fra det som ble antatt å være akutt syk fisk. Samtidig ser det ut til at qPCR i slike tilfeller kan være godt egnet for å påvise replikasjon. Resultatene fra kronisk syk fisk i anlegg B pekte likevel mot at andre metoder for

påvisning av viruset bør brukes ved lave viruskonsentrasjoner. Det som ble observert kan til tross for dette indikere en liten, men konstant replikasjon av SAV2 fra fisk med kronisk PD.

De ulike Ct-verdiene etter 3 ukers inkubering med vevsekstrakt fra antatt akutt syk fisk kan tyde på ulike mengder SAV2 og SAV2-RNA i vevet. To av prøvene fra anlegg A testet bare positivt i prøver med vevsekstrakt fra rød muskulatur. I disse ble det målt relativt høye Ct-verdier. I de to andre prøvene fra anlegget ble det funnet vesentlig lavere Ct-verdier, både i prøver fra gjeller og i prøver fra rød muskulatur. Dette kan kanskje tyde på at individene hadde blitt smittet ved ulike tidspunkt, og at mengden intakte viruspartikler derfor var ulik. Ulik immunrespons som følge av stress eller andre sykdommer er også en mulig forklaring, og en serologisk test for antistoffer i plasma kunne kanskje sagt noe om tidspunktet for smitte. Mistanken om ulike mengder virus ble forsterket etter 1. passering, der analysen igjen viste tilsvarende resultat med relativt høye Ct-verdier for de to første individene og vesentlig lavere for de to siste. I flere prøver ble det observert en vesentlig nedgang i Ct-verdi etter passering. Samtidig ble en liten økning i Ct-verdi observert i to av parallellene fra det ene individet. Dette kan bety at viruset fra samme vev har oppført seg forskjellig etter at de ble introdusert til cellekultur. Økningen tilsvarer likevel det ikke som ble observert når viruset ikke har mulighet for replikasjon. En mulig forklaring på dette kan være spontane mutasjoner som påvirker virulensen til viruset. En sekvensering av isolatene kunne gitt svar på dette, men en slik undersøkelse var utenfor rekkevidden av denne studien. Dersom man ser på de prøvene med en tydelig nedgang i Ct-verdi, og samtidig tar til betraktning at prøvene ble fortynnet ved passering, vil det være naturlig å anta at en lavere Ct-verdi skyldes replikerende virus. Når disse prøveresultatene i tillegg sammenlignes med de tilsvarende prøvene for test av virusstabilitet, styrkes denne antagelsen. Det som ble observert i denne delen av forsøket kan derfor tyde på at qPCR er en egnet metode for å påvise replikerende SAV2 i cellekultur.

Videre tydet resultatene etter 3 ukers inkubering med vevsekstrakt fra kronisk syk fisk på at de fleste vevsprøvene ikke inneholdt aktivt virus. Bare to av prøvene som ble inkubert i cellekultur testet positivt etter inkubering. Det er derfor naturlig å anta at det som ble detektert av SAV2 i de fleste vevsprøvene var RNA eller inaktivert virus, og at dette ble degradert i løpet av inkubasjonstiden. De to prøvene som testet positivt etter inkubering

var begge fra rød muskulatur, men bare én av disse testet positivt i de 3 neste passeringene. Ct-verdien for denne prøven holdt seg enten stabil eller gikk noe ned for hver passering. Disse funnene kan tyde på at det kreves visse forutsetninger for at prøven skal teste positivt etter inkubering. Slike forutsetninger kan være en relativt høy konsentrasjon av virus eller RNA, eller at viruset replikerer og at konsentrasjonen derfor øker eller holder seg konstant. Basert på dette kan resultatene indikere at intakt og replikerende SAV2 har vært til stede i den ene prøven, muligens i en latent tilstand med minimal replikasjon. Det er dog vanskelig å si noe sikkert på grunn av få positive paralleller og en Ct-verdi som ikke gikk vesentlig ned i løpet av passeringene. Flere passeringer kunne gitt et sikrere resultat, da mange passeringer ofte har vist seg å være nødvendig for å isolere SAV i cellekultur. Det lave antallet passeringer kan også forklare hvorfor CPE ikke ble observert i noen av kulturrene. Det kunne i tillegg vært aktuelt å bruke immunfarging med monoklonale antistoffer spesifikk for SAV for påvisning av viruset i cellekultur. Dette er en mye brukt metode ved isolering av SAV in vitro, og dette ville samtidig påvist viruset i intakt form og dermed også styrket mistanken om replikasjon. Resultatene fra dette forsøket gir likevel noen indikasjoner på replikerende SAV2 i cellekultur 5 måneder etter utbrudd. Siden SAV3 fra hjerte- og nyrevev har blitt isolert i cellekultur opp til 6 måneder etter utbrudd er det ikke urealistisk å forvente at dette også kan gjelde for SAV2 [9].

Ved å se på resultatene fra de to uttakene er det mye som tyder på replikerende virus. Dette gjelder først og fremst fra prøvene tatt fra anlegg A, der vesentlig lavere Ct-verdier for flere av prøvene etter inkubering nærmest bekrefter replikasjon. Dette viste samtidig at qPCR i slike tilfeller kan være en god metode for å detektere replikasjonen. For å få en endelig bekreftelse på at denne metoden fungerer, kunne den vært brukt parallelt med immunfarging. Dersom en i tillegg tar hensyn til fortynningen ved passering kan metoden også tenkes å være nyttig for å kvantifisere virusmengden underveis og dermed måle hastigheten på replikasjonen. Dette kan være spesielt nyttig dersom en vil følge med på mengden replikerende virus i vevet over tid. Hos anlegg B var resultatene mye mindre overbevisende, men det kan likevel argumenteres for at funnene kan vise tegn til replikasjon. Den stabile Ct-verdien som ble observert etter flere passeringer stemmer ikke overens med det som ble observert under ikke-replikerende forhold. Hvorvidt dette skyldes replikerende virus eller andre faktorer bør undersøkes nærmere. Dette kan kanskje relateres til den lave RNA-konsentrasjonen i prøvene. Det er derfor viktig å legge vekt på at det ikke kan trekkes noen endelige slutninger basert på denne delen av forsøket. Den

begrensede størrelsen på uttakene, samt relativt få passeringer og bare én deteksjonsmetode for virus i cellekultur gjør at resultatene i beste fall kan gi grunnlag for videre arbeid. Ideelt sett kunne man prøvd å infisere levende fisk med isolatet for å se om sykdommen utviklet seg. Et slikt funn ville uten tvil vært svært oppsiktsvekkende, men på grunn av begrensningene av både tid og ressurser hadde ikke dette vært mulig å gjennomføre i denne studien. Funnene som er gjort er likevel svært interessante, og dersom resultatene stemmer og det viser seg at SAV2 fra kronisk syk fisk kan kultiveres in vitro, så kan det ikke utelukkes at fisken også er en potensiell smittebærer. Det har blitt foreslått tidligere at når et anlegg først har fått påvist SAV3, så kan populasjonen være et potensielt reservoar for virus frem til slakting [9]. Dette kan også tenkes å gjelde for SAV2. Dersom dette ikke blir tatt hensyn til ved håndtering og transport av kronisk syk fisk kan dette vise seg å være en viktig smittevei. Spesielt siden fisken kan dø av andre årsaker, og dermed brytes ned slik at vevet eksponeres for miljøet rundt. Dette kan potensielt spre viruset over lange avstander siden det har vist seg å overleve over lang tid i sjøvann [11]. Det samme gjelder ved bruk og transport av brønnbåter og utstyr, som lenge har vært mistenkt å være en av mange smitteveier [2]. På grunnlag av disse funnene kan det være aktuelt å utføre mer omfattende studie med fokus på laks med kronisk PD som en mulig smittebærer av SAV2.

5. Konklusjon

Det ble gjort en rekke interessante observasjoner i løpet av denne studien. Ved bruk av standardiserte analysemetoder har vevsprøver fra hjertet potensielt vist seg å være lite egnet for kontroll av laks med kronisk PD. Andre vevstyper bør derfor vurderes ved kontroll utover i sykdomsforløpet. Vevsprøver fra rød muskulatur og gjeller har her ved to ulike tilfeller av kronisk PD vist seg å være godt egnet for å detektere SAV2 i individer med negative hjerteprøver sent i sykdomsforløpet. Videre er det mye som tyder på at replikerende SAV2 fra nylig infisert laks lett kan påvises i cellekultur ved bruk av qPCR. For kronisk syk fisk kan det derimot ikke trekkes noen konklusjoner, men funnene gir indikasjoner på at aktivt SAV2 kan være mulig å isolere fra rød muskulatur hos slike individer. Dette åpner muligheten for at kronisk syk fisk kan være bærer av SAV2 i rød muskulatur lenge etter at utbruddet er over. Sett i sammenheng kan disse funnene bety at individer som tester negativt i hjerteprøver likevel kan være smittebærere av SAV2. Dette kan potensielt vise seg å være en viktig og hittil ukjent smittekilde.

6. Referanser

1. Norsk sjømatråd (NO). Laks og ørret for 50 millioner i 2015 [Internett]. Tromsø: Norsk sjømatråd; 05.01.2016. [Hentet 20.05.2016]. Tilgjengelig fra: <http://www.seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Laks-og-%C3%B8rret-for-50-milliarder-i-2015>.
2. Stene A. Transmission of Pancreas Disease in marine salmon farming in Norway. Norges veterinærhøgskole; 2013. 57 s. (ISBN: 1890-0364)
3. McLoughlin M, Graham D. Alphavirus infections in salmonids – a review. J. Fish Dis. 2007; 30: s. 511-531.
4. Poppe T. Fiskehelse og fiskesykdommer. 2. utgave. Oslo: Universitetsforlaget; 2007. 411 s. (ISBN: 82-0012718-4)
5. Boscher S, McLoughlin M, Ven AL, Cabon J, Baud M, Castric J. Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. J. Fish. Dis. 2006; 29: s. 263-273.
6. Hjortaas MJ, Skjelstad HR, Taksdal T, Olsen AB, Johansen R, Bang-Jensen B, et al. The first detection of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic Salmon, *salmo salar* L., in Norway. J. Fish. Dis. 2013; 36: s. 71-74.
7. Veterinærinstituttet (NO). Fakta om: Pankreassykdom (PD) [Internett]. Oslo: Veterinærinstituttet; 17.03.2015. [Hentet 24.01.2016]. Tilgjengelig fra <http://www.vetinst.no/Faktabank/Pankreassykdom-PD>.
8. Svåsand T, Karlsen Ø, Kvamme BO, Stien LH, Taranger GL, Boxaspen KK, et al. Risikovurdering norske fiskeoppdrett 2016. Bergen: Havforskningsinstituttet; 2016. Fisken og havet. 2016: 2.
9. Jansen MD, Wasmuth MA, Olsen AB, Gjerset B, Modahl I, Breck O, et al. Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. J. Fish. Dis. 2010; 33: 723-736.
10. Hjeltne B, Walde CS, Jensen BB, Haukaas A, Lillehaug A, Høgåsen HR, et al. Fiskehelse rapporten 2015. Veterinærinstituttets rapportserie. Oslo: Veterinærinstituttet; 2016:3.

11. Graham DA, Staples C, Wilson CJ, Jewhurst, Cherry L, Gordon A, et al. Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influence of temperature and pH on virus survival. *J. Fish. Dis.* 2007; 30: s. 533-543.
12. Stene A, Hellebø A, Viljugrein H, Solevåg SE, Devold M, Aspehaug V. Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J. Fish Dis.* 2015; 39: s. 531-57.
13. Stene A, Viljugrein H, Yndestad H, Tavornpanich S, Skjerve E. Transmission of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *J. Fish. Dis.* 2014; 37: s. 123-134.
14. Christie KE, Graham DA, McLoughlin MF, Villoing S, Todd D, Knappskog D. Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *DAO.* 2007; 75: s. 13-22.
15. Kongtorp RT, Stene A, Andreassen PA, Asphaug V, Graham DA, Lyngstad TM, et al. Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish. Dis.* 2010; 33: s. 879-888.
16. Hodneland K. Salmonid Alphavirus (SAV) – Genetic characterisation of a new subtype, SAV3, and implementation of a novel diagnostic method. Universitetet I Bergen; 2006. 67 s. (ISBN: 82-308-0282-3)
17. Graham DA, Wilson C, Jewhurst H, Rowley H. Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influence of cell line and temperature. *J. Fish. Dis.* 2008; 31: s. 859-868.

7. Vedlegg

Vedlegg 1: qPCR-resultat for vevsprøver fra anlegg A.

Barcode	Tissue	Fish No	Clin. sign	SAV-ST	Ct-values** SAV-ST	Control Ela*
FR10353695	Heart	1	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353715	Heart	3	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353725	Heart	5	Svimer	Positive	34.6	Ok
FR10353718	Heart	7	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353720	Heart	9	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353703	Gills	1	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353723	Gills	3	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353701	Gills	5	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353712	Gills	7	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353705	Gills	9	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353711	Muscle	1	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353724	Muscle	3	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353702	Muscle	5	Svimer	Positive	26.5	Ok
FR10353697	Muscle	7	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353714	Muscle	9	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353699	Heart	2	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353700	Heart	4	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353709	Heart	6	Svimer	Positive	34.6	Ok
FR10353698	Heart	8	Svimer	Positive	33.4	Ok
FR10353722	Heart	10	Svimer	Positive	26.9	Ok
FR10353728	Gills	2	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353708	Gills	4	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353717	Gills	6	Svimer	Positive	34.1	Ok
FR10353706	Gills	8	Svimer	Positive	30.6	Ok
FR10353719	Gills	10	Svimer	Positive	32.5	Ok
FR10353707	Muscle	2	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353716	Muscle	4	Svimer	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353710	Muscle	6	Svimer	Positive	28.5	Ok
FR10353729	Muscle	8	Svimer	Positive	32.0	Ok
FR10353713	Muscle	10	Svimer	Positive	26.7	Ok

qPCR-resultater for vevsprøver fra anlegg A.

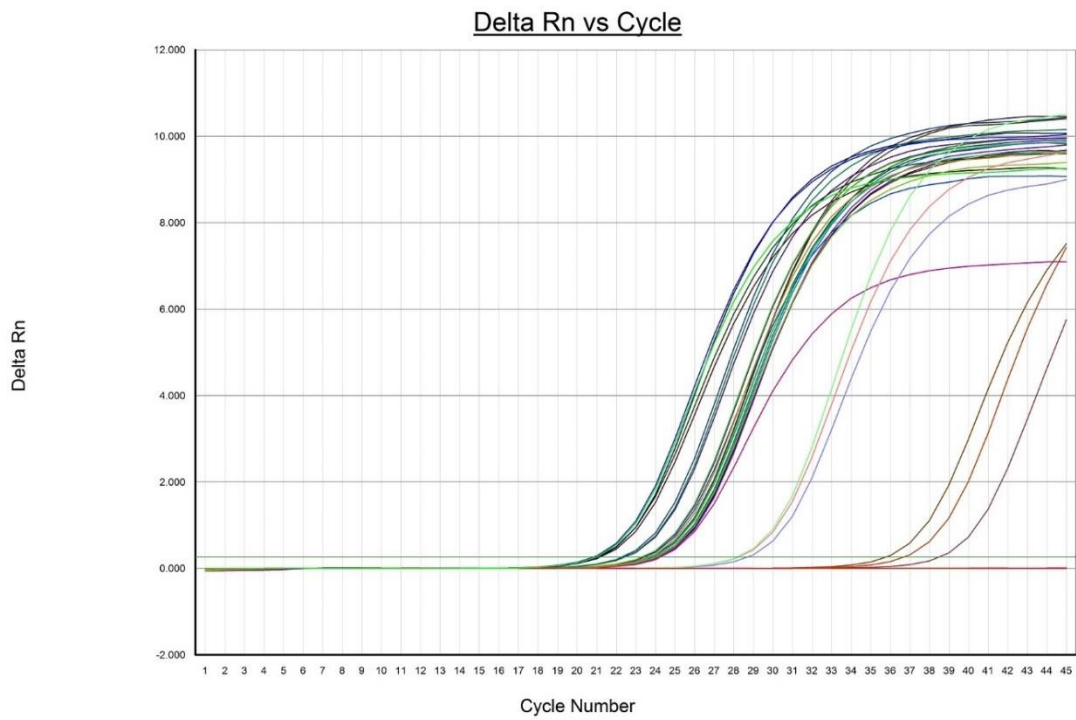
Vedlegg 2: qPCR-resultat for vevsprøver fra anlegg B.

Detailed Report for PatoGen Real-Time RT-PCR Analyses

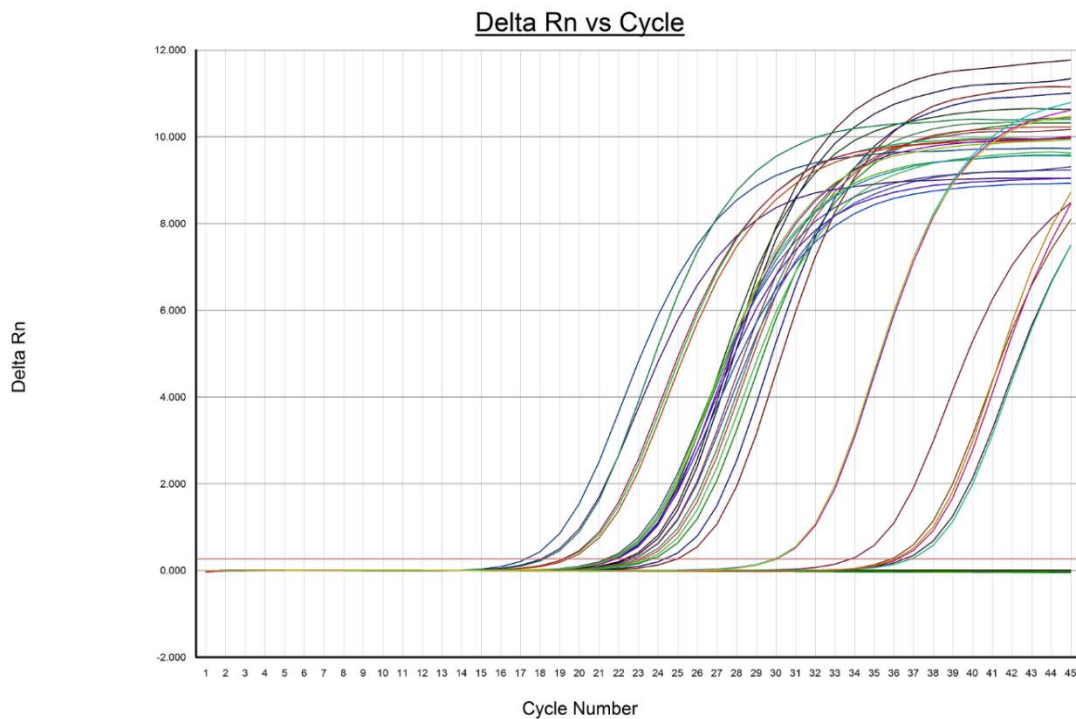
Barcode	Tissue	Fish No	SAV-ST	Ct-values** SAV-ST	Control Ela*
FR10353679	Muscle	11	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353680	Gills	11	Positive	35.2	
FR10353681	Heart	11	Not Detected	Not Detected	
FR10353682	Heart	2	Not Detected	Not Detected	
FR10353683	Gills	2	Positive	36.7	
FR10353684	Muscle	2	Positive	34.3	Ok
FR10353685	Heart	3	Not Detected	Not Detected	
FR10353686	Gills	3	Positive	35.9	
FR10353687	Muscle	3	Positive	30.7	Ok
FR10353688	Gills	14	Positive	33.5	
FR10353689	Muscle	14	Positive	27.1	Ok
FR10353690	Heart	14	Positive	31.4	
FR10353691	Gills	10	Positive	31.0	
FR10353692	Heart	10	Positive	33.1	
FR10353693	Muscle	10	Positive	30.4	Ok
FR10353694	Gills	13	Not Detected	Not Detected	
FR10353735	Heart	13	Not Detected	Not Detected	
FR10353736	Muscle	13	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353742	Heart	9	Not Detected	Not Detected	
FR10353741	Gills	9	Not Detected	Not Detected	
FR10353740	Muscle	9	Not Detected	Not Detected	Ok
FR10353739	Heart	6	Positive	33.5	
FR10353738	Gills	6	Positive	34.4	
FR10353737	Muscle	6	Positive	36.7	Ok
FR10353734	Heart	12	Positive	35.2	
FR10353733	Gills	12	Positive	33.7	
FR10353732	Muscle	12	Positive	27.2	Ok
FR10353731	Heart	8	Not Detected	Not Detected	
FR10353730	Gills	8	Positive	33.6	
FR10353726	Muscle	8	Not Detected	Not Detected	Ok

qPCR-resultater for vevsprøver fra anlegg B. På grunn av at noen individer fra det samme uttaket ble brukt i andre studier har nummereringen på individene blitt endret og navngitt fortløpende fra toppen (11 = 1A osv.).

Vedlegg 3: Plott fra qPCR for anlegg A.

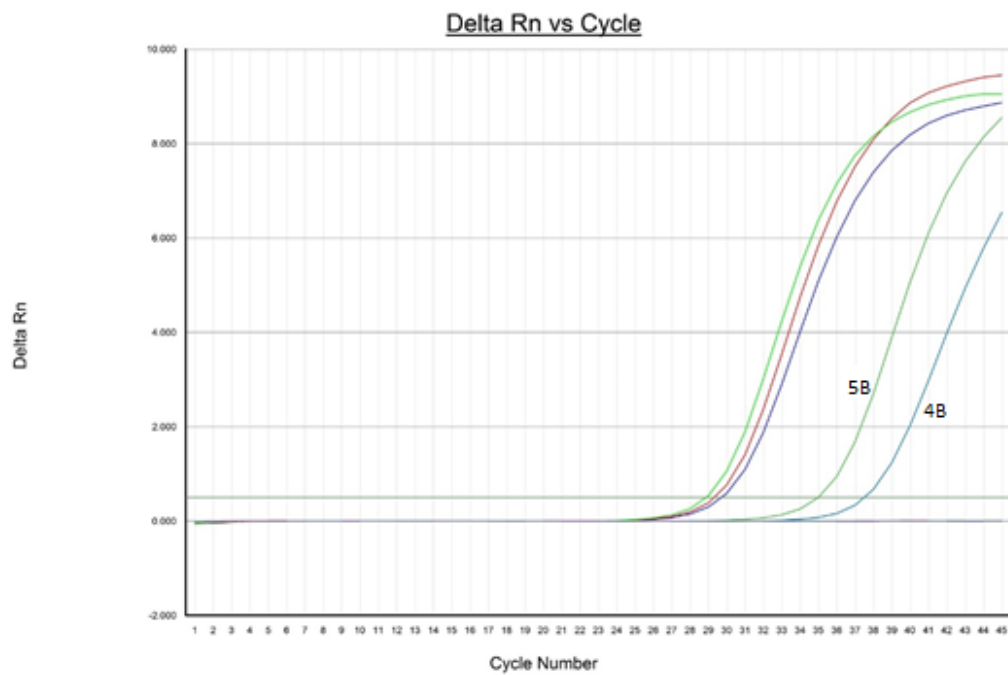


A: Plott for qPCR for prøver fra cellekultur med primært inokulat fra anlegg A (tabell 5).

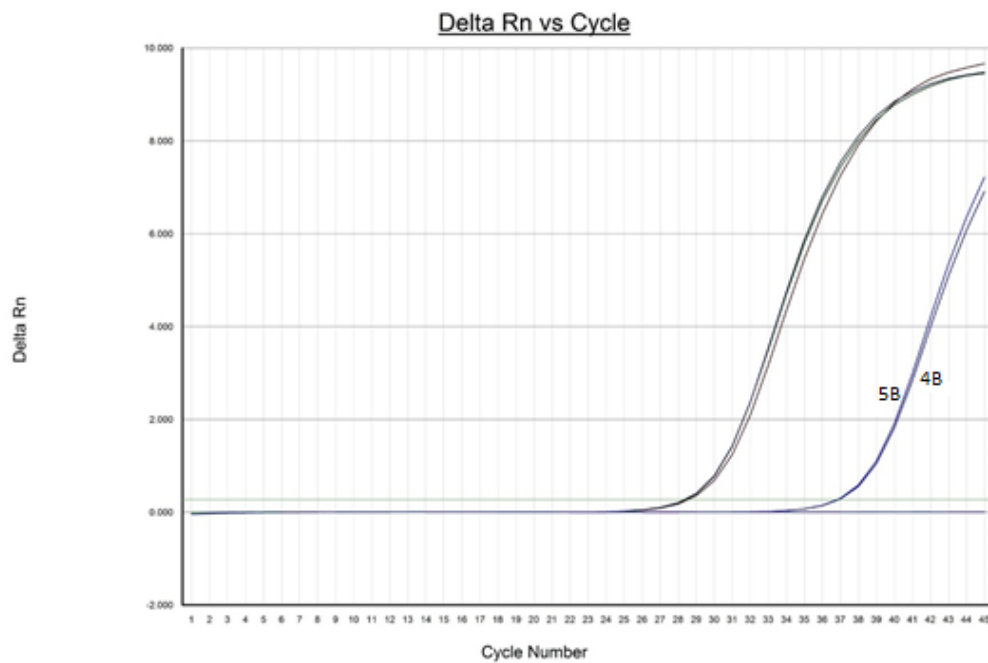


B: Plott for qPCR for prøver fra anlegg A i cellekultur etter 1. passering (tabell 5).

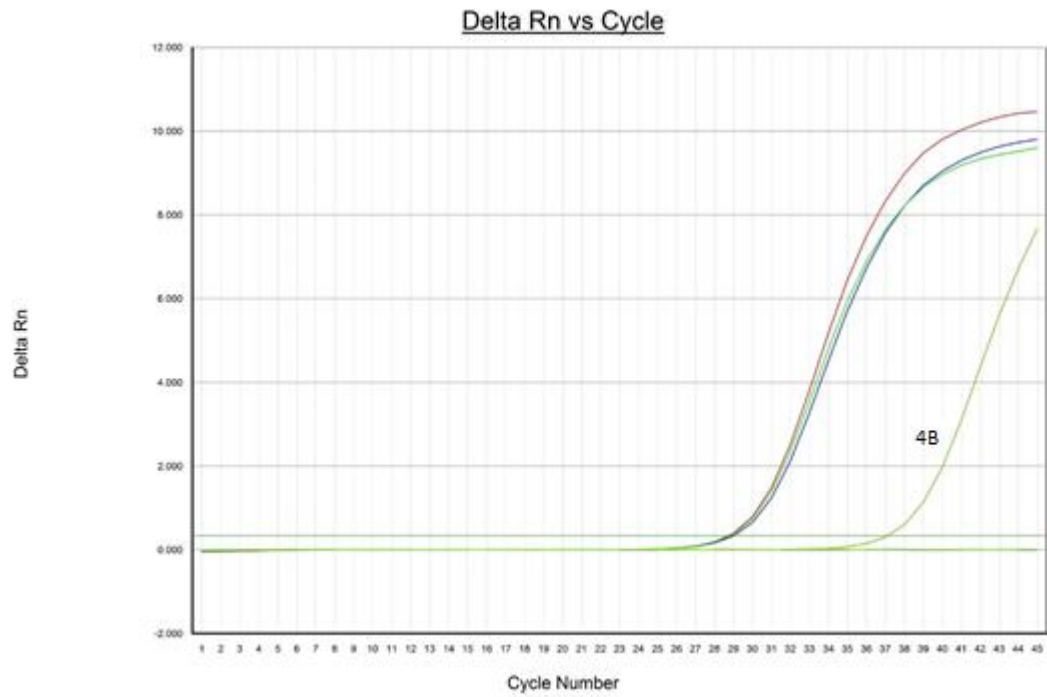
Vedlegg 4: Plott for qPCR fra anlegg B.



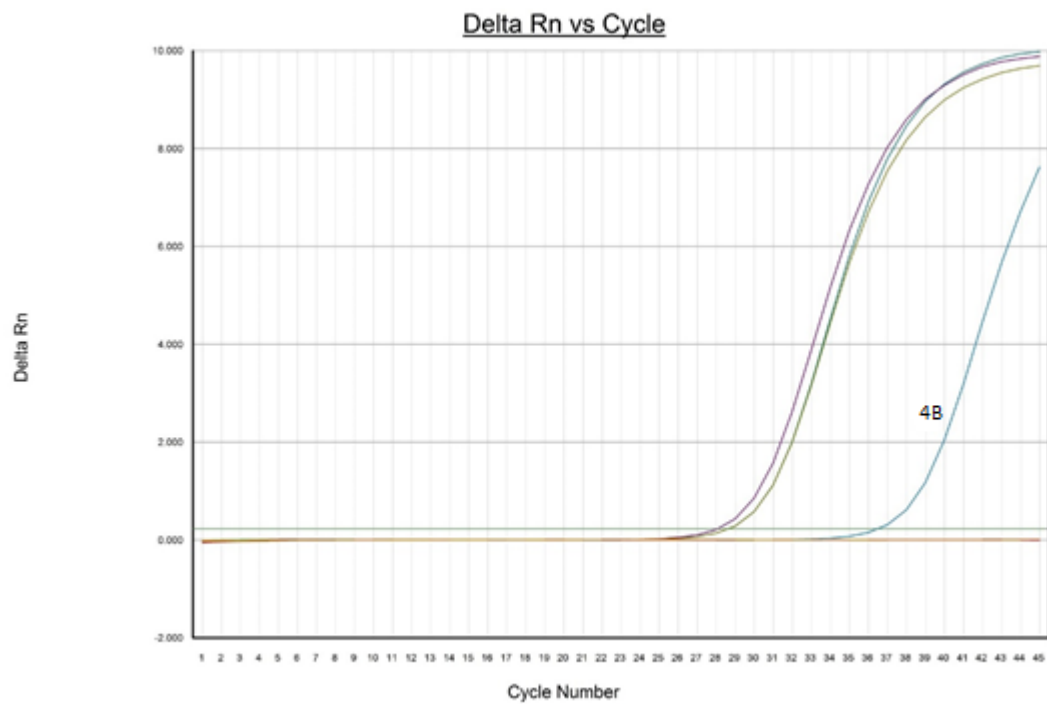
A: Plott for qPCR for prøver fra cellekultur med primært inokulat fra anlegg B (tabell 6).



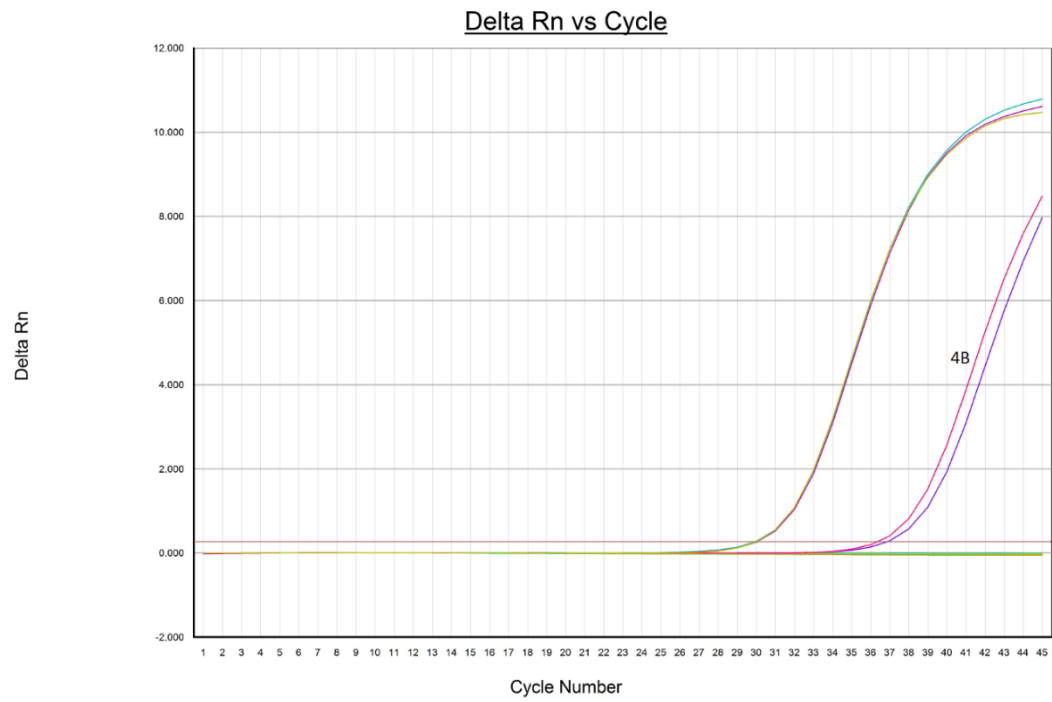
B: Plott for qPCR for parallell 4-6 for prøve 4B (R) og 5B (R) fra primært inokulat (tabell 6).



C: Plott for qPCR for prøver fra anlegg B i cellekultur etter 1. passering (tabell 6)..



D: Plott for qPCR for prøver fra anlegg B i cellekultur etter 2. passering (tabell 6).



E: Plott for qPCR for prøve 4B i cellekultur etter 3. passering (tabell 6).