

## ***”Spredningsdynamikk for ILA virus i smittet anlegg”***

### **Bakgrunn.**

FHF ga et tilskudd på NOK 550. 000,- den 18 mai 2006 til analysekostnader for gjennomføring av et forskningsprosjekt hos *Polarlaks AS*, lokalitet Skjånes, Finnmark med formål å overvåke og karakterisere den interne smittespredning/-utvikling i anlegget etter at det ble diagnostisert ILA i februar 2006.

I anlegget tiltok dødelighet i spesielt en av merdene i slutten av desember 2005, men ILA ble ikke mistenkt før prøvesvar kom i januar 2006. Endelig diagnose ILA ble stilt medio februar 2006. Av de opprinnelige 6 merder ble 2 merder slaktet ut, merd 1 og 3 i uke 11-06 og 13-06, som følge av ILA utbruddet i perioden februar- mai 2006, det vil si før vårt prosjekt ble igangsatt. Det ble tatt prøver fra de resterende 4 merder, og senere når disse ble splittet til 10 merder i dette prosjektet.

Det ble inngått samarbeidsavtale den 08.05.06 mellom Polarlaks AS, UiB, VI og NVH om prosjektet. Det ble også inngått avtale mellom PatoGen Analyse AS og Polarlaks AS om gjennomføring av real-time RT-PCR analyser i størrelsesorden 2000-4000 prøver. Midlene vi fikk fra FHF har i sin helhet vært brukt slik det ble planlagt, nemlig til real-time RT-PCR diagnostikk av ILAV i henhold til oppsatt forsøksplan. Men forsøksperioden ble ikke så lang som forutsatt på grunn av krav fra Mattilsynet om nedslaktning av resterende fisk på anlegget.

### **Materiale og Metoder**

#### **Organisering og prøveuttak**

Før den systematiske prøvetakingen i dette prosjektet ble det tatt ut nyreprøve fra 60 fisk fra hver merd for å estimere en prevalens av ILAV i anlegget. Ut fra disse resultatene ble det bestemt å ta ut hjerteprøver fra 30 fisk fra hver merd i anlegget ved hvert prøveuttak.

Det ble tatt ut prøver (hjerter) fra 30 fisk på RNAlater på prøveglass fra hver merd med 14 dagers intervaller fra begynnelsen av mai 2006. Prøvene ble tatt ut av personale på anlegget i henhold til protokoll fra prosjektgruppen og sendt til PatoGen Analyse for fortløpende analyse med real-time RT-PCR. Svar ble sendt til Polarlaks, UiB, VI og NVH.

Basert på høy dødelighet i perioden mars-juni og rapporter fra Veterinærinstituttet og Fiskehelsetjenesten tok Mattilsynet den 20/6 en avgjørelse at all fisk på lokaliteten skulle slaktes innen 1.oktober. De siste prøvene i anlegget ble derfor tatt i september måned. Anlegget ble derfor fulgt i dette prosjektet i ca 4 måneder.

På grunn av anleggets isolerte beliggenhet hadde Mattilsynet opprinnelig gitt aksept for at fisken kunne forbli i anlegget etter at fisken i de to merdene (1 + 3) med høyest dødelighet var slaktet, til tross for det forelå en ILA diagnose.

#### **Real-time PCR**

Hver hjerteprøve besto av to biter (A og B). Hjerte ble valgt som testingsorgan ut fra tidligere undersøkelser som har vist at ILAV kan påvises i høyere prevalens i hjerte enn i andre

organer som ble undersøkt. Fra A prøven ble RNA ekstrahert og dette ble brukt i real-time RT-PCR for ILAV, hver prøve ble også undersøkt for tilstedeværelse av et mRNA for elongeringsfaktor 1 alfa (E1A) fra et cellulært husholdningsgen. I celler vil mRNA for husholdningsgener kontinuerlig produseres, videre vil mRNA ha relativt kortvarig halveringstid. Tilstedeværelse og mengde av mRNA for et husholdningsgen som E1A er derfor en indikator om hvor vellykket prosesseringen av prøven har vært. Grenseverdien for akseptabel kvalitetsforringelse ble satt til Ct-verdi 20 for E1A. Denne verdien ble kun overskredet for noen nyreprøver som ble tatt ut før den systematiske innsamlingen i prosjektet.

I en real-time PCR vil Ct verdien indikere relativt hvor mye virus-RNA det var tilstede i prøven. Ct-verdi henspiller til den PCR syklusen en anser prøven for å bli positiv. En lav Ct-verdi for en prøve indikerer mer virus-RNA enn en høy verdi.

For de 30 prøvene fra hver merd ved hvert uttak ble det regnet ut en gjennomsnitt Ct verdi både for ILAV og for E1A. Det var kun resultater fra fisk som var real-time RT-PCR positive for ILAV som ble brukt for å beregne gjennomsnitt Ct verdi for ILAV, mens alle fisk som det ble tatt prøve av ble brukt for å beregne gjennomsnitt Ct verdi for E1A. Disse ble brukt til to ulike sammenlikninger.

1) For å kunne sammenlikne mengden av ILAV RNA innen en merd over tid ble den relative mengde virus RNA i forhold til første ordinære uttak som var 090506, estimert. I en slik sammenlikning ble altså mengden virus RNA satt lik 1 den 090506 i alle merder. Normaliseringsprosedyren var som følger:  $\Delta Ct \text{ sample} = \text{Gjennomsnitt Ct ILAV} - \text{Gjennomsnitt Ct E1A}$ .  $\Delta Ct \text{ calibrator}$  settes til uttaket 090506 = første standardiserte uttak, hjerte. Normalisering relativt til calibrator blir da:  $\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ calibrator} = \Delta \Delta Ct$ . Relativ mengde virus RNA i forhold til tidspunkt 0 som er satt til 090506, =  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ . Dette er regnet ut for hver merd ved hvert prøvetidspunkt.

2) For å kunne sammenlikne mengden virus RNA mellom merder over tid ble Merd 2 satt til å ha virus RNA mengde 1 ved første ordinære uttak den 090506. Denne merden hadde høyest Ct-verdi for ILAV og høyest  $\Delta Ct \text{ sample}$  ved dette tidspunktet. Noe som indikerer at fisk i denne merden hadde gjennomsnittlig den minste mengden ILAV RNA ved dette tidspunktet. Den relative mengden med virus RNA, her kalt Y, i de enkelte merder i forhold til merd 2 for tidspunktet 090506 ble da  $Y = 2^{-\Delta Ct \text{ sample merd 2} - \Delta Ct \text{ sample merd X}}$ . For de andre uttakene blir da den relative mengden av virus RNA i forhold til Merd 2, uttak 090506,;  $Y \times 2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

### **Sekvensering**

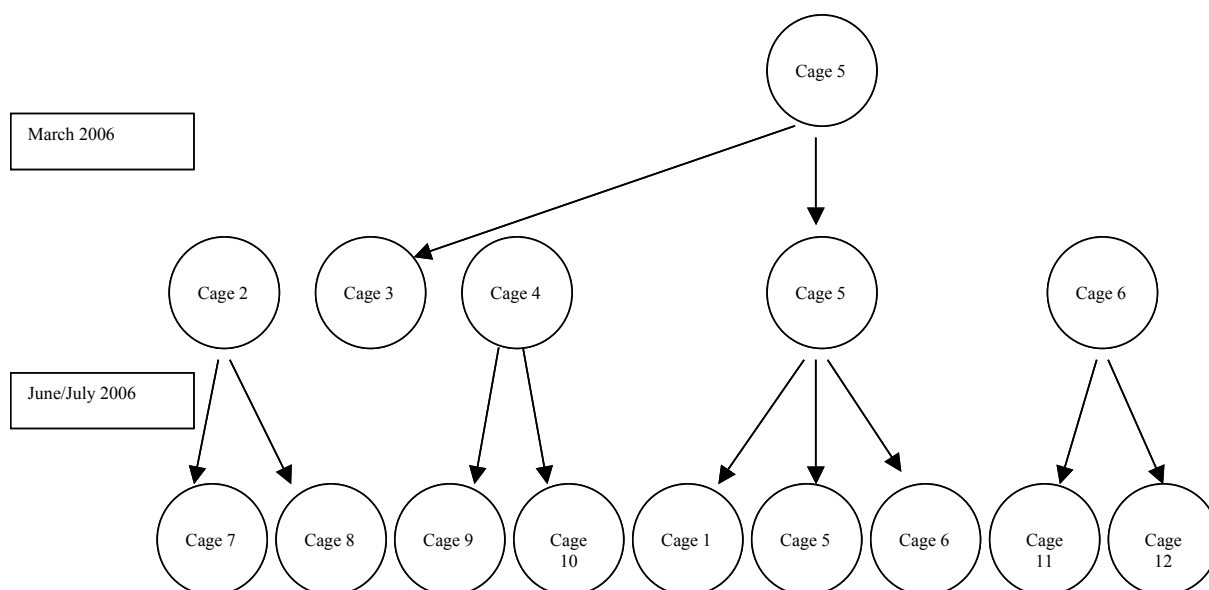
RNA fra prøver som var sterkt positive for ILAV i realtiem RT-PCR ble sendt til UiB for sekvensering og til VI som back-up.

### **Biologiske parametere for fisk**

Fisk i merdene 2 og 4 var av Rauma opphav, levert av Rauma smolt. Merd 5 og 6 var av NLA opphav levert av Midt Finnmark smolt. Fisken var vaksinert med Alphajekt 6-2 (V. anguillarum serotype O1, 02a, V. salmonicida, A, salmonicida var salmonicida, M viscosa, IPNV)

*Splitting av merder:*

Fig 1.



For enkelhets skyld er gjennomsnittet av resultater fra de merder som merd 2, 4, 5 og 6 ble splittet til brukt ved fremstilling av diagrammer som omhandler real-time RT-PCR og dødelighet. Resultater fra alle merder er oppgitt i tabellform.

#### *Antall og størrelse av fisk*

**Table 1. Number of fish, sorting of fish between nets around sorting June/July**

Net	Number of fish prior to sorting	Weight (g) before sorting	Number of fish after sorting	Weight (g) After sorting
1			48836	1405
2	111550	1444		
3	44495	1587	44495	1603
4	106118	1184		
5	149486	1587	54338	1642
6	73894	1976	51278	1472
7			50320	1300
8			63413	800
9			53120	1400
10			57979	800
11			39698	1885
12			44438	1887

#### **Fysiske- og kjemiske parametere**

Vanntemperaturen varierte mellom 3,2 – 5,3 °C fra perioden februar til slutten av mai, deretter steg den til ca 10 °C i begynnelsen av juli og holdt seg der til slakting. Mellom uke 26 og 27 var det en markant temperaturøkning på ca 2 °C fra i underkant av 8 °C til underkant av 10 °C. Det ble aldri målt kritisk lav O<sup>2</sup> nivåer. Det ble ikke målt salinitet, men lokaliteten ble oppgitt å være lite plaget av lus noe som kan indikere lav salinitet.

Gjennomsnittsstrøm ved 5 og 15 m dyp var henholdsvis 0,049 og 0,033 m/s. Anlegget var vurdert til klasse C i bølgeklasse, det vil si stor eksponering for bølger.

## Resultater

Dødelighet og død fisk i de enkelte merder ble målt og fjernet forløpende av personalet på anlegget. I følge Mattilsynets retningslinjer er det grunn til å mistenke ILA dersom man har forhøyet dødelighet sammen med positive laboratoriefunn, som for eksempel RT-PCR. Forhøyet dødelighet i denne sammenheng er definert som  $\geq 0,25$  ‰ per merd per dag, eller tett oppunder denne grensen i en periode på 10 dager. Disse grensene gjelder for fisk over 0,5 kg, som var tilfellet for fisk i anlegget i denne perioden. Dersom en antar en jevn dødelig per dag i en uke så vil Mattilsynets grense for mistanke utgjøre 0,175% per uke ( $0,25$  ‰ x 7). Med unntak av den siste perioden før slakting var dødeligheten i alle merder over eller tett oppunder denne grenseverdien både i 2-3 måneder før prosjektet startet og i store deler av prosjektperioden. Sammenholdt med diagnose fra februar, det vil si 3 måneder før prosjektstart, indikerte RT-PCR resultatene at det per definisjon var klinisk ILA utbrudd i anlegget i store deler av prosjektperioden. Det var kun de siste ukene før utslakting at dødeligheten falt under den oppgitte grenseverdi for berettiget mistanke om sykdom (Table 2).

Ved registrering av antallet død fisk i anleggets egen journal ble antall telt død fisk multiplisert med 1,3 av rutinemessige årsaker. (Muligens fordi dette erfaringsmessig gir det mest reelle tallet på antall dødfisk?).

**Table 2. Average weekly mortality, in per cent**

Cage	Weeks 5-10 / 2006	Weeks 11-20 / 2006	Weeks 21-25 / 2006	Weeks 26-30 / 2006	Week 31-34 / 2006(August)	Week 35 2006 (Sept)
1	1.13	-	-	2.25	0.67	0.0013
2	0.25	0.20	1.35	-	-	-
3	0.63	0.86*	2.90	2.57	0.35	0.00016
4	0.19	0.38	2.43	-	-	-
5	0.018	0.31	1.43	1.74	0.67	0.0017
6	0.12	0.20	1.11	1.55	0.72	0.0017
7	-	-	-	1.27	0.33	0.00026
8	-	-	-	0.20	1.26	0.00017
9	-	-	-	0.20	3.24	0.0002
10	-	-	-	0.20	1.85	0.0004
11	-	-	-	0.30	0.94	0.0012
12	-	-	-	0.26	1.00	0.0013

\*weeks 14-20 /06

## Real-time PCR

Tabellene nedenfor viser real-time resultatene for de enkelte merder. Normaliseringsprosedyre av dataene er oppgitt i M&M.

Det er også vist gjennomsnittsverdier for de merder som merd 2-6 ble splittet til (se Fig 1.). Disse gjennomsnittsverdiene er for enkelthetsskyld brukt i kurvene. Med unntak av merd 3, kulminerte ILAVs RNA mengden alle merdene ved uttaket den 20.06.06. I merd 3 var det en topp i uttaket før og en ny topp i uttaket etter den 20.06.06. Relativ mengde ILAV RNA i forhold til merd 2, 09.05.06, ved uttaket 20.06.06 varierte fra 14.260 til 73.183 (merd 3 unntatt).

### Tables 3-7.

#### Merd 2

Uttak	090506	230506	060606	200606	040706*		180706		080806		290806		190906	
					Merd 7	Merd 8	Merd 7	Merd 8	Merd 7	Merd 8	Merd 7	Merd 8	Merd 7	Merd 8
# realtime ILAV pos	14/30	7/30	26/30	31/31	28/28	30/30	29/30	31/31	30/30	30/30	30/30	30/30	Slaktet**	25/30
Prosent real time ILAV pos	46,7	23,3	86,7	100	100	100	96,7	100	100	100	100	100		83,3
Gjennomsnitt ct ILAV	35,5	29,0	24,7	19,0	22,4	22,3	22,7	23,2	31,2	33,8	31,4	30,9		36,2
Snitt ct Ela	17,0	17,4	16,3	16,5	16,5	16,4	18,3	18,2	17,9	19,2	17,7	17,9		16,4
$\Delta Ct$ sample	<b>18.5</b>	11.6	8.4	2.9	5.9	5.9	4.4	5	13.3	14.6	13.7	13		19.8
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	119	1097	49667	6208	6208	17559	11585	36	24	16	29		0.7
Gjennomsnitt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ merd 7 + 8					6208		14572		30		22,5			
Relativ ILAV RNA i forhold til merd 2 den 090506	1	119	1097	49667	6208	6208	17559	11585	36	24	16	29		0.7
Estimert ukentlig dødelighet i prosent i perioden fram til prøveuttak	0,25	0,67	1,31	1,64	1,06	0,27	1,52	0,20	1,04	2,43	0,39	0,17	0,10***	0,10***
Gjennomsnitt dødelighet merd 7 + 8					0,67		0,86		1,74		0,28		0,10	

\*Mellom 200606 og 040706 ble merd 2 splittet til Merd 7 og 8.

\*\*Mellom 290806 og 190906 ble merd 7 slaktet.

\*\*\* Beregnet tom 070906

### Merd 3

Denne merden ble ikke splittet i juni/juli som de andre merdene. Biomassetettheten økte altså i hele prosjektperioden for denne merden.

Uttak	090506	230506	060606	200606	040706	180706	080806	290806	190906*
# realtime ILAV pos	18/30	27/30	27/30	30/30	30/30	26/30	28/30	27/30	Slaktet
Prosent real timeILAV pos	60	90	90	100	100	86,7	93,3	90	
Gjennomsnitt ct ILAV	28,9	26,6	21,3	24,3	22,3	28,2	27,6	32,5	
Snitt ct Ela	17,0	17,0	16,9	17,4	14,4	18,0	18,0	18,0	
$\Delta Ct$ sample	<b>11.9</b>	9.6	4.4	6.9	7.9	10.2	9.6	14.5	
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	4,9	181	32	16	3,2	4,9	0,16	
Relativ ILAV RNA i forhold til merd 2 090506	97	475	17557	3104	15521	310	475	15	
Estimert ukentlig dødelighet i prosent i perioden fram til prøveuttak	0,68	1,32	1,05	5,62	4,31	1,71	0,77	0,46	0,29**

\*Mellom 290806 og 190906 ble merd 3 slaktet.

\*\* Beregnet tom 070906

#### Merd 4.

Uttak	090506	230506	060606	200606	040706*		180706**		080806		290806		190906	
					Merd 9	Merd10	Merd 9	Merd 10	Merd 9	Merd 10	Merd 9	Merd 10	Merd 9	Merd 10
# real-time ILAV pos	24/30	20/30	31/31	29/30	30/30	28/28	30/30	30/30	30/30	30/30	28/29	26/29	Slaktet***	28/30
Prosent real time ILAV pos	80	66,7	100	96,7	100	100	100	100	100	100	96,6	89,7		93,3
Gjennomsnitt ct ILAV	31,8	27,3	21,8	20,0	21,4	19,3	25,4	25,8	32,2	32,6	30,4	33,1		36,0
Snitt ct Ela	16,8	18,3	15,9	17,7	19,5	16,2	17,9	18,4	17,6	19,2	19,4	17,4		16,4
$\Delta Ct$ sample	<b>15</b>	9	5,9	2,3	1,9	3,1	7,5	7,4	14,6	13,4	11	15,7		19,6
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	64	548	6653	8779	3821	181	194	1,3	3	16	0,6		0,04
Gjennomsnitt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ merd 9 +10					6300		187		2		8			
Relativ ILAV RNA i forhold til merd 2 090506	11	704	6028	73183	69300		2062		23		91			0,4
Estimert ukentlig dødelighet i prosent i forutgående periode	0,47	1,24	1,76	3,70	0,47	0,66	0,52	0,61	3,67	2,92	3,2	0,19	0,09****	0,06****
Gjennomsnitt dødelighet merd 9 +10					0,57		0,57		3,30		1,70		0,075	

\* Mellom200606 og 040706 ble merd 4 splittet til Merd 9 og 10. Snittvekt i merd 4 ved splitting/sortering: 1184g. Snittvekt etter splitting/sortering: Merd 9: 1400g, Merd 10: 800g

\*\*Enkelte negative kontroller var positive for dette uttaket.

\*\*\*Mellom 290806 og 190906 ble merd 9 slaktet.

\*\*\*\* Beregnet tom 070906

### Merd 5

Uttak	090506	230506	060606	200606	040706*			180707			080806			290806			190906		
					Merd 1	Merd 5	Merd 6**	Merd 1	Merd 5	Merd 6	Merd 1	Merd 5	Merd 6	Merd 1	Merd 5	Merd 6	Merd 1	Merd 5	Merd 6
# realtime ILAV pos	15/30	23/30	27/30	27/30	30/30	30/30	27/30	30/30	25/30	26/30	28/29	17/31	21/30	30/30	28/30	30/30	Slaktet***	Slaktet	Slaktet
Prosent real time ILAV pos	50	76,7	90	90	100	100	90	100	83,3	86,7	96,6	54,8	70	100	93,3	100			
Gjennomsnitt ct ILAV	29,4	29,9	25,5	21,6	19,0	24,6	24,1	23,5	26,7	24,5	30,1	28,6	28,9	31,7	31,4	30,8			
Snitt ct Ela	17,0	17,4	18,0	17,4	14,3	14,9	16,7	18,3	17,3	17,7	18,2	18,0	18,1	17,8	18,0	17,7			
$\Delta$ Ct sample	<b>12.4</b>	12.5	7.5	4.2	4.7	9.7	7.4	5.2	9.4	6.8	11.9	10.6	10.8	13.9	13.4	13.1			
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	0.93	24	294	207	6	32	147	8	48	1.4	3	3	0.35	0.5	0.6			
Gjennomsnitt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ merd 1 +5 + 6					81			67			2			0.48					
Relativ ILAV RNA i forhold til merd 2 090506	68	63	1632	19992	5508			4556			136			32					
Estimert ukentlig dødelighet i prosent i forutgående periode	0,36	0,68	1,19	2,00	2,41	2,36	1,09	1,87	1,37	1,15	2,09	1,28	1,67	1,08	1,03	1,58	0,43	0,73	0,55
Gjennomsnittlig dødelighet merd 1 +5 + 6					1,95			1,46			1,68			1,23			0,57****		

\*Mellom 200606 og 040706 ble merd 5 splittet til merd 1, 5 og 6.

\*\*I merd 6 var det positiv svar på negativ kontroll, Ct verdi på 37,0. Det var dog negative prøvesvar (3/30) i dette uttaket.

\*\*\* Mellom 290806 og 190906 ble merd 1, 5 og 6 slaktet.

\*\*\*\*Beregnet tom 070906



## Merd 6

Uttak	090506	230506	060606	200606	040706*		180706		080806		290806		190906	
					Merd 11	Merd 12	Merd 11	Merd 12	Merd 11	Merd 12	Merd 11	Merd 12	Merd 11	Merd 12
# realtime ILAV pos	13/30	13/30	18/30	30/30	23/28	27/29	29/30	28/30	27/30	23/30	30/30	27/31	Slaktet**	26/30
Prosent real time ILAV pos	43,3	43,3	60	100	82,2	93,1	96,7	93,3	90	76,7	100	87,1		86,7
Gjennomsnitt ct ILAV	33,8	33,7	28,9	22,0	26,6	26,7	25,7	25,5	30,1	30,8	33,4	33,6		34,2
Snitt ct Ela	17,4	17,7	18,0	17,4	16,3	16,5	18,1	18,0	19,0	18,9	17,1	17,3		16,6
$\Delta Ct$ sample	<b>16.4</b>	16	10.9	4.6	10.3	10.2	7.6	7.5	11.1	11.9	16.3	16.3		17.6
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	1.3	45	3565	68	73	445	477	39	22	1	1		0.4
Gjennomsnitt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ merd 11 + 12					70		461		30		1			
Relativ ILAV RNA i forhold til merd 2 090506	4	5	180	14260	282		1844		122		4			1.6
Estimert ukentlig dødelighet i prosent i forutgående periode	0,23	0,54	1,30	1,55	0,24	0,25	0,43	0,31	1,38	1,77	0,01	0,01	0,004	0,004
Gjennomsnitt dødelighet merd 11 + 12					0,25		0,37		1,58		0,01		0,004***	

\*Mellom 200606 og 040706 ble merd 5 splittet til merd 1, 5 og 6

\*\* Mellom 290806 og 190906 ble merd 11 slaktet

\*\*\* Beregnet tom 070906



Fig 2. Relativ mengde ISAV RNA innen en merd i forhold til første ordinære uttak  
 Mengde ISAV RNA ved første ordinære uttak er altså satt = 1.

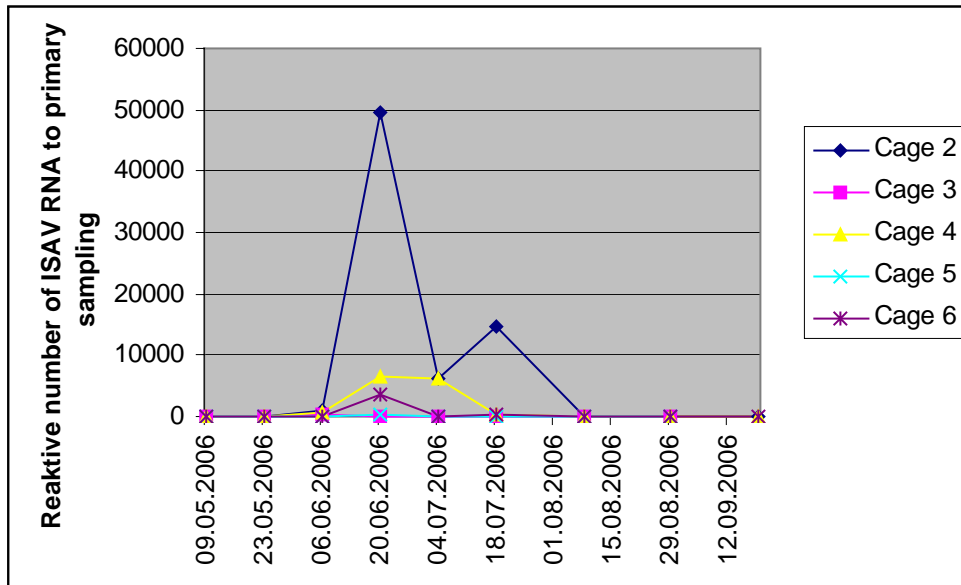


Fig 2. Relativ mengde ISAV RNA i de enkelte merder forhold til første ordinære uttak  
 i Merd 2. Mengde ved første ordinære uttak i Merd 2 er altså satt = 1.

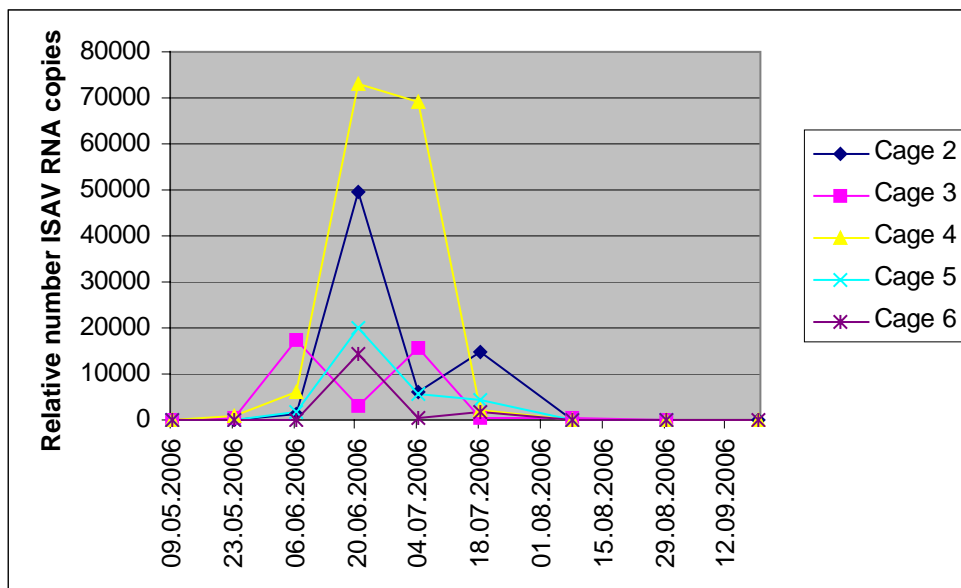
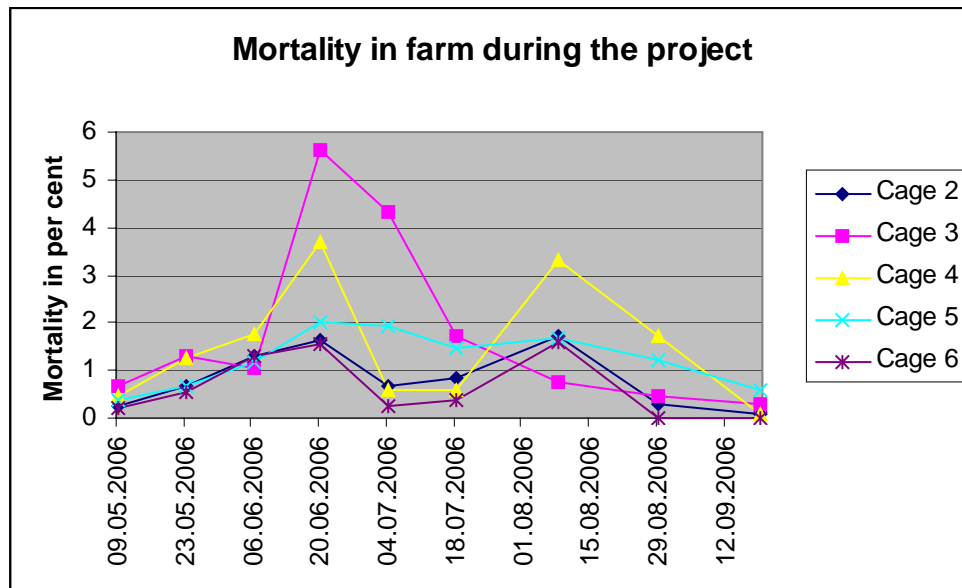


Fig 3. Ukentlig dødelighet i anlegget i prosjektperioden.



### Sekvensering

Resultater fra UiB har kun blitt meddelt muntlig så langt. Dette er også utenfor den delen av prosjektet som ble støttet av FHF. Så vidt jeg forstår er det svært liten variasjon i undersøkt del av HE. I enkelte punkter i diskusjonen tar en utgangspunkt i at variasjonen er så liten at HE sekvensen indikerer at viruset i anlegget bør oppfattes som en klon.

### Diskusjon

Ved et verifisert utbrudd av ILA i et anlegg krever Mattilsynet at fisk i merder med bekreftet diagnose slaktes/destrueres med en gang ("promptly"). Fisk i de andre merdene skal slaktes fortløpende og anlegget skal være tømt for fisk inne 80 dager. Dersom diagnosen er bekreftet på annen grunnlag enn kliniske eller post mortem funn, det vil si på grunnlag av viruspåvisning (dyrking eller RT-PCR eller antigenpåvisning) kan mattilsynet forlenge tidsfristen, gitt at dødeligheten holder seg under tidligere nevnte grenseverdi,  $\geq 0,25$  % per merd per dag. I dette anlegget hadde dødeligheten i alle merder vært tett oppunder eller over denne grenseverdien i hele perioden etter at ILA diagnose var stilt i februar. Mattilsynet hadde altså gjort et unntak for dette anlegget med hensyn på utslakting.

Ved undersøkelse med real-time RT-PCR av hjerte fant vi ved starten av prosjektet var 56% av prøvene ILA RNA positive og dette steg til 100% positive prøver 4-6 uker senere. I de påfølgende ca 10 uker som prosjektet varte holdt andelen positive prøver, med noen få unntak, seg over 85%. Den relative virusmengden, her reflektert i resultater av real-time RT-PCR, kulminerte i 4 av 5 merder ved uttaket 20.06.06. Brukes resultatet fra merd 2 den 09.05.06 som basalnivå var mengden virus RNA relativt sett ca 17.500- 73.000 ganger høyere ved prøveuttak maksimal mengde påvist ILAV RNA. Det er også å bemerke her at utgangspunktet for virus RNA mengden ved prøvestart den 09.05.06 var tilstrekkelig til å gi ILA som jo ved det tidspunktet allerede hadde vart i 3-4 måneder i anlegget. Videre er gjennomsnitt ILA RNA verdier kun beregnet ut fra positive prøver, men fra 20.06.06 og ut prosjektperioden var nesten 100% av fiskene positive, og verdiene representerer dermed en gjennomsnittsfisk i merden/anlegget. Tallene viser at antall fisk som var påvisbar ILAV

positiv steg fra litt over halvparten til opp mot 100% og at virusmengden, målt som virus RNA, i den enkelte viruspositive fisk steg til et 5-sifret tall.

De to merdene med fisk av Rauma stammen hadde relativt sett mest virus med ca 50.000-73.000 ganger basalnivå, mens merdene med fisk av NLA stamme lå under 20.000.

Merdene i anlegget, bortsett fra merd 3, ble splittet mellom uttaket 20.06.06 og 04.07.06. Det vil si at biomassetettheten var høyest i 4 av 5 merder når virus RNA kulminerte. Omtrent 5-6 uker etter kulminering var virus RNA mengden nede på samme nivå som ved prosjektstart i alle merder. Prevalens av ILAV og kulmineringstidspunkt av relativ virusmengde hadde liten variasjon mellom de enkelte merder. Sammenholdt med resultatene fra sekvenseringen av HE genen, som viste *høy homologi i prøver fra alle merder (med forbehold om at jeg har tolket dette riktig)*, spredte viruset seg i anlegget i prosjektperioden som om dette var en populasjon og ikke ulike subpopulasjoner (for eksempel en subpopulasjon kan være en merd). Det bør bemerkes at det var klinisk ILA i anlegget i nesten hele prosjektperioden og at bildet muligens ville vært mer heterogent mellom de enkelte merder i en tidligere fase av infeksjonsforløpet.

Prevalensen av realtime RT-PCR positive fisk var i de ca 12 siste ukene av prosjektet ca 100% i de fleste uttak, med enkelte uttak ned mot 83%. Det vil si at ILAV kan spre seg effektivt innen og mellom merder, og at all fisk må antas å være smittet så langt ut i infeksjonsforløpet i et anlegg. Det bør også bemerkes at prevalensen av realtime RT-PCR positiv fisk holdt seg meget høyt noe som indikerer at en stor andel av laksen ikke blir fri for ILAV, men forblir bærere av viruset. Her skiller ILAV infeksjon hos laks seg fra orthomyxivirusinfeksjoner hos pattedyr hvor en regner med at det enkelte dyr kvitter seg med virus i løpet av et begrenset antall uker. Hvor lenge laksen forblir virusbærer gir ikke dataene fra prosjektet svar på, men prevalensen av realtime RT-PCR positiv fisk var falt lite 12 uker etter kulminering av virusmengde. Noe som indikerer at bærertilstanden i enkelte fisk kan være betydelig lenger enn dette.

Dødeligheten var som nevnt høy i nesten hele forsøksperioden. Den viste to topper, en i perioden med mest virus RNA, og en ca 6-8 uker senere, hvor virus RNA var nesten nede på samme nivå som ved oppstart av prosjektet. Det var ingen markante forskjeller i dødeligheten mellom fisk fra Rauma eller NLA stammen. I perioden før siste prøveuttak (september) var dødeligheten i anlegget meget lav, og langt under Mattilsynets oppgitte grenseverdi.

### **Addendum**

Denne rapporten er utarbeidet på grunnlag av data som er stilt til rådighet fra Polarlaks as, og resultater som er framkommet i prosjektet fra Patogen Analyse as og fra Universitetet i Bergen.

De som har vært involvert i dette prosjektet har vært Bjørn Mikalsen, Polarlaks, Edgar Brun Veterinærinstituttet, Are Nylund, Universitetet i Bergen, Vidar Aspehaug, Patogen Analyse og Espen Rimstad, Norges veterinærhøgskole.

Rapporten er utarbeidet av Espen Rimstad. En tar sikte på at dataene i rapporten kan gi grunnlag for enengelskspråklig artikkel eller short communication.