

Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett

Sluttrapport

Lill-Heidi Johansen, Britt Bang-Jensen, Mona Dverdal Jansen, Torunn Taksdal og Aleksei Krasnov





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-317-6 (trykt) ISBN: 978-82-8296-318-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett Sluttrapport	<i>Rapportnr.:</i> 32/2015
	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Lill-Heidi Johansen, Britt Bang-Jensen, Mona Dverdal Jansen, Torunn Taksdal og Aleksei Krasnov	<i>Dato:</i> 2. juli 2015
<i>Avdeling:</i> Fiskehelse	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 53+3
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900658
<i>Stikkord:</i> Atlantisk laks , multifaktorielle sykdommer , HSMB , IPN	<i>Prosjektnr.:</i> 21267
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Se kapittel 1.	

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	5
2.1	Prosjektets omfang og prosjektorganisering.....	6
2.2	Prosjektgruppens sammensetning.....	6
2.3	Styringsgruppens sammensetning	6
3	Hovedmål og delmål i prosjektet	7
4	Prosjektgjennomføring	8
5	Oppnådde resultater i prosjektet	9
5.1	Arbeidspakke 1: Eksperimentell smittestudie.....	9
5.1.1	Utvikling av IPN virus i forsøksperioden.....	11
5.1.2	Utvikling av PRV i forsøksperioden.....	14
5.1.3	Histologiske undersøkelser av smittet fisk	15
5.1.4	Konklusjon og diskusjon eksperimentell smittestudie	16
5.2	Arbeidspakke 1 - Transkriptomstudier	16
5.2.1	Sammenligning av transkriptomprofilene til HSMI og PD.....	16
5.2.2	Responser mot PRV i røde blodceller hos Atlantisk laks	21
5.2.3	Smoltifisering og overføring til sjø kan undertrykke immunitet og responser mot patogener i Atlantisk laks	23
5.2.4	Ulike immunresponser mot HSMB i parr og smolt.....	25
5.2.5	Immunitet i smolt og prestasjon i sjø.....	27
5.3	Arbeidspakke 2: Risikofaktorer for IPN-utbrudd og dødelighet ved IPN-utbrudd	29
5.3.1	Studiedesign	30
5.3.2	Resultater	34
5.3.4	Diskusjon	37
5.4	Arbeidspakke 2: Infeksjonspunkt for PRV, HSMB inkubasjonsperiode og HSMB-assosiert mortalitet, samt effekten av IPNV og SAV koinfeksjoner.....	37
5.4.1	Studiedesign	38
5.4.2	Dataanalyse	40
5.4.3	Resultater	41
5.4.4	Diskusjon	42
5.5	Arbeidspakke 2: Reaktivering av IPNV i sjø	43
5.5.1	Studiedesign	43
5.5.2	Resultater	44
5.5.3	Diskusjon	46
5.6	Konklusjon arbeidspakke 2.....	46
6	Formidling i prosjektperioden	48
6.1	Muntlig formidling.....	48
6.2	Skriftlig formidling	48
6.3	Annen formidling.....	49
7	Leveranser	50
8	Referanser	52

Vedlegg i

1 Sammendrag

Prosjektet «Multifaktorielle sykdommer i norsk lakseoppdrett» er utført i et samarbeid mellom Nofima, Veterinærinstituttet, AquaGen AS og Patogen AS. Hovedmålet for prosjektet var å øke kunnskapen om utviklingen av multifaktorielle sykdommer ved å vurdere effekten av ulike variabler og deres interaksjon. Effekten av ulike variabler (genetisk resistens mot IPN, IPNV bærer status, IPNV reaktivering og vaksinerings) og kombinasjoner av disse på utviklingen av HSMB har blitt studert. Videre har effekten av QTL for IPN resistens på utviklingen av IPNV bærertilstand og reaktivering av viruset i post-smolt blitt undersøkt. Det var også et mål å prøve å identifisere sykdomsmarkører som kan brukes av industrien for bedre å kunne evaluere helsestatus på fisken. Gjennom analyser av felldata, utbruddsdata og analyser av organmateriale har en sett nærmere på relasjoner i felt mellom IPN status (IPN QTL laks kontra laks uten IPN QTL fisk, IPNV bærerstatus og IPNV reaktivering) i laks i sjøfasen og utbrudd og virustitre av hhv HSMB og PRV. Prosjektet har vært delt opp i 2 arbeidspakker (AP); AP1 Eksperimentelt modellstudie og AP2 Feltstudie. I AP1 ble det gjennomført smitteforsøk med IPNV og PRV, der både dobbeltinfeksjoner med begge patogener og infeksjoner med IPNV og PRV alene ble studert. Laks med og uten QTL for økt IPN resistens ble infisert med IPNV etter badsmitte i ferskvann og en langvarig bærertilstand ble etablert på gruppenivå uavhengig av QTL status. Vaksinert IPN QTL laks hadde lavere prevalens av IPNV og lavere virustitre enn vaksinert og uvaksinert laks uten IPN QTL. Ingen reaktivering av IPNV, kjennetegnet med sterkt økende virusmengder eller påvisbar sykdomsutvikling, ble påvist i noen av forsøksgruppene etter overføring til sjøvann. Dette var noe uventet og førte til at vi ikke kunne konkludere på enkelte problemstillinger i prosjektet, så som evaluering av effekten av vaksinerings av IPN QTL laks og effekten av IPN på utvikling av HSMB. Alle undersøkte PRV smittede fisk ble diagnostisert med HSMB 7 uker etter smitte, noe som sammenfalt med påvisning av de høyeste nivåene av PRV transkripter. HSMB utviklet seg likt uavhengig av IPNV bærerstatus, vaksinerings og QTL status. En bærertilstand med lave IPNV titre påvirker dermed ikke utviklingen av HSMB. *Vice versa* blir ikke en IPNV bærertilstand påvirket av en sekundær infeksjon med PRV. Vaksiner med eller uten IPNV antigen gav ingen uspesifikk beskyttelse mot HSMB. En komparativ studie av laksens respons ved PRV infeksjon og SAV infeksjon avdekket både felles og spesifikke trekk som kan bidra til bedre forståelse av sykdommene i klinisk fase. I klinisk fase gav PRV infeksjonen en sterkere adaptiv immunrespons enn SAV infeksjonen, mens den medfødte immunresponsen var sterkere ved en SAV infeksjon. Det var en sterk sammenheng mellom immunrelaterte genuttrykk og virustitre ved en SAV infeksjon, men ikke ved en PRV infeksjon. Assosiasjonen mellom PRV og HSMB er godt etablert, men det gjenstår fortsatt å forstå bedre årsakssammenhengen og om det kan være andre faktorer som påvirker sykdomsutviklingen. Flere gener viste sykdomsspesifikke forandringer og disse kan være av interesse for diagnostikk, men dette må bearbeides noe mer før det kan tas i bruk. Overraskende lite er kjent om status for immunforsvaret i perioden under og rett etter smoltifisering. To studier som vi har gjennomført i dette prosjektet viste at en nedregulering av immunsystemet kan skje under normale oppdrettsbetingelser i smoltifiseringsperioden og i ukene etter overføring til sjø. Det er spesielt responsen mot virusinfeksjoner som er svekket. Ytterligere studier viste at det er forskjeller i uttrykk av immungener i siste del av ferskvannsfasen, ved sammenligning av smolt som hadde gode og dårlige prestasjoner i sjø (relatert til vekst og dødelighet). Uttrykket av individuelle immungener varierer imidlertid fra prøvesett til prøvesett, og gir dermed ikke et klart mønster som generelt kan brukes til å beskrive gode eller dårlige smoltgrupper. Årsaken til disse variasjonene er foreløpig ikke kjent, men kan være relatert til ulik genetisk bakgrunn på laksen, driftsmessige forhold, miljøforhold og andre faktorer. Vi sammenlignet også immunresponsen mot en PRV infeksjon i parr og

i smolt, og den raskeste responsen ble funnet i parr. Dette kan være med å forklare hvorfor sykdommen hyppigst forekommer i smolt etter overføring til sjø.

I AP2 ble det gjort tre forskjellige studier som brukte hvert sitt unike datasett for å forsøke og besvare spørsmålene vedrørende sammenheng mellom IPN og HSMB, infeksjonstidspunkt for PRV/HSMB og reaktivering av IPN i sjø. I det første studiet ble det brukt et datasett med informasjon om alle kohorter av Atlantisk laks og regnbueørret satt i sjøen i 2009-2012. I dette studiet fant vi at følgende risikofaktorer var signifikante for å øke sannsynligheten for IPN i en fiskekohort (mest betydende først): Økende størrelse på kohorten, kohorttype (vårsmolt hadde høyere risiko enn høstsmolt), år, art, minkende temperatur ved sjøsetting, økende infeksjonspress, IPN på samme lokalitet innenfor de foregående to år og minkende gjennomsnittsvekt ved sjøsetting. I tillegg fant vi at følgende risikofaktorer var signifikante for å øke den prosentvise dødeligheten de første 6 månedene i sjø (rangert etter betydning): IPN i de første 6 månedene, år, PD de første 6 månedene, temperatur ved sjøsetting, kohorttype, HSMB de første 6 månedene og vekt ved sjøsetting. Likesom sannsynlighet for IPN, gav økende temperatur og høyere vekt ved sjøsetting lavere kumulert dødelighet. En tilleggsanalyse på noen av kohortene der vi hadde samlet inn ekstra data via et spørreskjema, ga dessverre ikke noen tydelige svar på effekten av QTL-smolt eller av å ha opplevd IPN i settefiskfasen. I det andre studiet ble det benyttet prøver som var samlet inn for SAV screening og/eller IPNV screening hos Patogen Analyse AS fra lokaliteter beliggende i Midt-Norge. Prøvematerialet besto av hjerteprøver (SAV screening) eller hodenyre (IPNV screening). Totalt 30 lokaliteter fra 3 ulike oppdrettsselskaper var inkludert. Vi fant at alle de studerte utsettene enten fikk påvist PRV infeksjon eller fikk en HSMB diagnose. I dette materialet ble det ikke funnet noen statistisk sammenheng mellom HSMB-relatert dødelighet og ko-infeksjoner med IPN og/eller SAV, noe som sannsynligvis er relatert til det lave prøveantallet. Tidspunkt for PRV påvisning varierte fra 1 til 8 måneder etter sjøsetting. Til tross for usikkerhet rundt infeksjonstidspunkt, viser materialet at PRV-infeksjoner var utbredt blant studielokalitetene som var prøvetatt med annen hensikt enn PRV/HSMB-mistanke. Tidsintervallet mellom PRV-påvisning og HSMB diagnose var gjennomsnittlig 3,8 måneder, med et maksimalt tidsintervall på 9 måneder. Siden det ikke ble tatt ut prøver hver måned, må tidsintervallet fra PRV-påvisning til HSMB diagnose anses som et minimum tidsintervall. Det kunne ikke påvises noen effekt av ko-infeksjoner med IPNV og/eller SAV på dette tidsintervallet. I den tredje studien ble det brukt et datasett med IPNV-sekvenser fra totalt 90 settefisk- og matfiskanlegg fra 2010-2011. På grunn av homologien innenfor norske IPNV-stammer er det ikke tilstrekkelig å bare vise at en sekvens fra et settefiskanlegg er lik en sekvens fra en matfisklokalitet - en må også forsikre seg om at en slik sekvens er mer lik den tilsvarende sekvens fra matfisklokaliteten enn til sekvenser fra alle andre settefiskanlegg eller alle andre matfisklokaliteter. Vi har også analysert om det faktisk stemmer at noen settefiskanlegg har «husstammer» av IPNV. Resultatene våre sier at hver matfisksekvens i gjennomsnitt er mer lik sin matchende settefiskspesifikke sekvens enn det kunne forventes om det var tilfeldig, og at mange settefiskanlegg faktisk har husstammer av IPNV. Dette beviser at virus følger med fisken fra land til sjø, og at sanitering av husstammer av IPNV er ett viktig tiltak for å bekjempe IPN også i sjøfasen.

English Summary

The project "Multifactorial diseases in Norwegian salmon farming" was carried out as a collaboration between Nofima, Norwegian Veterinary Institute, AquaGen AS and Patogen AS. The main objective of the project was to increase knowledge about the development of multifactorial diseases by assessing the effect of different variables and their interaction. The effect of different variables (genetic

resistance to IPN, IPNV carrier status, IPNV reactivation and vaccination) and combinations thereof on the development of HSMI have been studied. Moreover, the effect of QTL for IPN resistance in the development of IPNV carrier state and reactivation of the virus in post-smolt have been investigated. It was also a goal to try to identify disease markers that can be used by industry to better evaluate the health status of the fish. Through analyses of field data, outbreak data and analyses of organ material we have examined the relationships in the field between IPN status (IPN QTL salmon versus salmon without IPN QTL, IPNV carrier status and IPNV reactivation) of salmon in the sea phase and outbreaks and virustitres of respectively HSMI and PRV. The project has been divided into two work packages (WP); WP1 Experimental study and WP2 Field study. In WP1 a challenge experiment was conducted with IPNV and PRV, where double infections with both pathogens and infections with IPNV and PRV alone were studied. Atlantic salmon (with and without IPN QTL) were infected with IPNV after bath infection in freshwater and a long-lasting carrier state was established at group level regardless of QTL status. Vaccinated IPN QTL salmon had lower prevalence and lower virustitres than vaccinated and unvaccinated salmon without the IPN QTL. No reactivation of IPNV, characterized by rises in viral loads and disease progression, was detected in any of the experimental groups after transfer to seawater. This was unexpected and we could therefore not conclude on some of the topics in the project, like effect of vaccinating IPN QTL salmon and effect of IPN on HSMI development. All examined PRV infected fish were diagnosed with HSMI seven weeks after the intraperitoneal infection, which coincided with the measurements of the highest levels of PRV transcripts. HSMI evolved equally regardless of IPNV carrier status, vaccination and QTL status. Thus, a carrier state with low IPNV titres did not affect the development of HSMI. *Vice versa*, an IPNV carrier state was not influenced by a secondary infection with PRV. Vaccines with or without IPNV antigen gave no nonspecific protection against HSMI. A comparative study of the transcriptomic responses to PRV infection and SAV infection revealed common and distinct features that contribute to better understanding of the diseases in clinical phase. In the clinical phase the PRV infection gave a stronger adaptive immune response than the SAV infection, while the innate immune response was strongest in the SAV infection. Comparison of gene expression with virustitres showed a strong correlation with SAV, but not with PRV. The association between PRV and HSMI is well established, but a better understanding of the causal relationship and whether there may be other factors that affect disease development still remains. Several genes showed disease-specific changes and these can be of interest for diagnostics, but needs to be developed further before it can be adopted. Surprisingly little is known about the status of the immune system in the period during and immediately after smoltification. In two studies we have shown that immunosuppression may occur under normal farming conditions during smoltification and in the first few weeks after transfer to sea, and it is particularly the anti-viral response that is impaired. Additional studies showed that there are differences in the expression of immune genes when comparing smolts with good and poor performance (mortality, growth) in the sea, but results vary in different sample sets. Thus, it can't be used to generally describe an immunological status in good or bad smolt groups. The reason for the difference in results in our studies is not known but may be related to genetic background, operational conditions, environmental conditions and other factors. We also compared the immune response against PRV infection in parr and in smolts and responses were faster in parr. This may explain why the disease is most frequently occurring in smolts after transfer to sea.

In AP2, three different studies, each using their own unique dataset, were carried out. The purpose was to attempt to answer the questions regarding the relationship between IPN and HSMI, infection time of PRV / HSMI and reactivation of IPN after sea-transfer. In the first study a dataset with

information on all cohorts of Atlantic salmon and rainbow trout which were in the sea in 2009-2012 was utilised. In this study we found that the following risk factors were significant for the occurrence of IPN in a cohort of fish (most significant first): Increasing cohort-size, type of cohort (spring smolt had higher risk than autumn smolt), year, species, decreasing temperature at sea-transfer, increasing infection pressure, IPN on the same localtion within the preceeding two years and decreasing mean fish weight at sea-transfer. In addition, we found that the following risk factors were significant for the percentage mortality within the first 6 months in sea (ranked by importance): IPN in the first six months, year, PD in the first 6 months, the temperature at sea-transfer, type of cohort, HSMI in the first 6 months and mean fish-weight at sea-transfer. Increasing temperature and higher weight by sea-transfer gave a lower cumulative mortality, similar to the propability of getting IPN. An additional analysis of a subset of the cohorts where we had collected additional data through a questionnaire unfortunately gave no clear answers to the effects of QTL smolt or of having experienced IPN in the hatchery. The second study utilized samples collected in Mid-Norway for SAV-screening and/or IPN-screening by Patogen Analyse AS. The sample material consisted of heart (SAV screening) and headkidney (IPN screening). A total of 30 sites from 3 companies were included in the study. All studied sites had either PRV detected or HSMI diagnosed. We did not find a statistical correlation between HSMI-mortality and co-infection with IPN and/or SAV in this material, however this is likely to be related to the small sample size. Time of PRV detection ranged from 1 to 8 months after transfer to sea. Despite uncertainty surrounding the exact time of infection, our results show that PRV infections were prevalent among study sites that were sampled for purposes other than PRV/HSMI-suspicion. The time interval between PRV detection and HSMI diagnosis was 3.8 months on average, with a maximum time interval of 9 months. Given the lack of monthly sampling, the time interval from PRV detection to HSMI diagnosis must be considered as a minimum time interval. We could not demonstrate any effect of co-infections with IPNV and / or SAV on this time interval. In the third study, we used a dataset with IPNV sequences from a total of 109 hatcheries and grow-out farms from 2010 to 2014, plus 7 older sequences from 2007 to 2009. Because of homology within Norwegian IPNV strains, it is not sufficient to simply show that a sequence from a hatchery is similar to a sequence from a particular grow-out farm, one must also ensure that such a sequence is more similar to the corresponding sequence from the grow-out farm than to sequences from all other hatcheries or any other grow-out farm. We also analyzed whether it is actually true that some hatcheries have "house-strains" of IPNV. Our results show that every grow-out farm sequence is on average more similar to its matching hatchery-specific sequence than could be expected if it was accidental, and that many hatcheries actually have "house-strains" of IPNV.

This proves that the virus is carried within the fish from land to sea and that sanitization of strains of IPNV is an important measure to combat IPN, also in the marine phase of the production.

2 Innledning

Mange har slått fast at de årlige tapene etter sjøsetting av oppdrettslaks er uakseptabelt høye og utgjør en betydelig økonomisk tapsfaktor. Undersøkelser har vist at infeksjøs agens, og ofte virus, er årsak til en stor del av dette tapet. Studier av 2006 generasjonen publisert av Aunsmo og medarbeidere (Aunsmo et al 2008) viste blant annet at dødsårsaken ble klarlagt for hele 92 % av de som døde og at infeksjøs agens var involvert i 64 % av den totale dødeligheten. Men årsakene til at fisk blir smittet og dør i sjøen, gjerne de første ukene etter overføring fra ferskvann kan også skyldes forhold under produksjon av fisken i ferskvannfasen, noe som den ferske undersøkelsen gjennomført av Mattilsynet viser (Tap i sjø, Mattilsynet, 2014). For utsettene H-2010, V- og H-2011 var settefiskrelaterte faktorer predisponerende for en stor andel av registrert svinn. Det var videre stor variasjon i overlevelse i sjø knyttet til settefiskleverandører. Infeksjonssykdommer var fortsatt en betydelig tapsfaktor i flere regioner og sykdommene som forårsaket størst svinn på landsbasis var IPN (infeksiøs pankreasnekrose) i tidlig sjøfase og PD (pankreas disease) i senere sjøfaser. I Troms og Finnmark var det i følge fiskehelsetjenestene i fylkene IPN i over 50 % av anleggene og HSMB (hjerte og skjelettmuskelbetennelse og CMS (cardiomyopati syndrom) ble også påvist i mange anlegg. Dette ble ofte relatert til stress og registrert som bakgrunns dødelighet. I Møre og Romsdal, Trøndelagsfylkene og Nordland uttalte fiskehelsetjenestene at suksessen avhenger av om du får IPN eller ikke. IPN og HSMB ble ofte sett i kombinasjon.

Laksesykdommer kan være forårsaket av en kombinasjon av en eller flere patogener og forhold knyttet til både vert og miljø, inkludert miljørelatert stress, driftsmessige forhold, fysiologiske og endokrine endringer under smoltifisering og kjønnsmodning og ubalansert ernæring. Faktorer som er involvert og deres relative betydning er ofte ukjent, noe som gjør det vanskelig å velge optimale tiltak. Eksempler på multifaktorielle sykdommer er flere. Forholdet mellom forekomsten av patogener og sykdomsutfall er ikke fullt ut etablert for PD, HSMB, CMS og PGI (proliferativ gjellebetennelse). Virus assosiert med CMS (PCMV) og HSMB (PRV) var nylig identifisert da dette prosjektet startet, men det er fortsatt uklart om de er de eneste årsakene til utviklingen av disse sykdommene. Det er lite kjent om verts-patogen interaksjoner og hvilke faktorer som påvirker sykdomsutvikling ved HSMB.

IPN virus (IPNV) er utbredt i norsk oppdrettslaks både i ferskvann og sjøvann og en reaktivering til IPN utbrudd kan skje rett etter overføring til sjø. Mange IPN-utbrudd i sjøvann er dermed trolig forårsaket av IPNV som laksen bærer med seg fra ferskvannfasen. En bærertilstand er en viktig risikofaktor siden en reaktivering av slike infeksjoner kan føre til direkte tap, og også kan påvirke laksens motstand mot andre patogener. Samtidig forekomst av ulike infeksjoner og patogener er kjent, men det er fortsatt uklart om eller hvordan tilstedeværelsen av IPNV kan øke laksens mottakelighet for HSMB.

Avl og vaksinerer er to hovedstrategier for forebygging og reduksjon av IPN, i tillegg til saneringstiltak i settefiskanleggene. En betydelig fremgang er blitt oppnådd av AquaGen AS ved bruk av markørassistert seleksjon av gener (såkalte QTLs) knyttet til resistens mot IPN (Moen et al., 2009). Dette er veldig lovende, men en rekke spørsmål trenger avklaring: Kan fisk med IPN QTL utvikle IPN-virus bærertilstand og påvirker IPN QTL beskyttelsen mot andre virussykdommer, f. ex. HSMB? IPN vaksinerne kan ikke helt forebygge sykdom og dødelighet, og heller ikke fjerne IPN viruset fullstendig. Eksperimentelle forsøk har vist at kommersielle IPN vaksiner gir relativt god beskyttelse mot IPN, men samtidig at oljebaserte vaksiner uten IPNV antigen kan gi uspesifikk beskyttelse mot IPN. En kjenner ikke til om oljebaserte vaksiner gir uspesifikk beskyttelse mot HSMB.

For å løse multifaktorielle sykdomsproblemer, må vi studere samspillet mellom patogener og ulike stressfaktorer. Eksperimentelle modeller, i kombinasjon med tradisjonelle og nyutviklede high-throughput analytiske teknikker, bioinformatiske verktøy (funksjonell genomikk) og metabolomikk, kan gjøre det mulig å analysere forskjellige faktorer i kombinasjon med hverandre.

2.1 Prosjektets omfang og prosjektorganisering

Prosjektet hadde oppstart 1/9 2011 med planlagt avslutning og sluttrapportering 31/12 2014. Det ble bevilget 8,8 millioner fra FHF til prosjektet og det ble senere gitt en tilleggsbevilgning på 143 000,-. I tillegg ble det bevilget 800 000,- fra Nofima til prosjektet i 2011. Prosjektet har vært et samarbeid mellom Nofima, to seksjoner ved Veterinærinstituttet (VI), AquaGen AS og Patogen analyse. Oppdrettsselskapene Lerøy, Marine Harvest og Salmar har bidratt med prøvemateriale (i samarbeid med Patogen AS, der materialet var oppbevart) og produksjonsdata til prosjektets arbeidspakke 2. AquaGen AS bidro med fisk til de eksperimentelle smittestudiene i arbeidspakke 1. Prøvemateriale eid av Patogen AS er brukt til transkriptomanalyser i arbeidspakke 1.

2.2 Prosjektgruppens sammensetning

Nofima: Aleksei Krasnov, Sven Martin Jørgensen og Lill-Heidi Johansen (prosjektleder),

Gerrit Timmerhaus bidro på transkriptomanalyser og Sergey Afanasyev bidro til analyser av transkriptomanalysedata. Mastergradsstudent Ingrid Moan bidro på gjennomføring av smitteforsøk og deler av analysene i arbeidspakke 1. Arbeidet med sammenligning av transkriptomanalyser av laks med PD og HSMB i arbeidspakke 1 er utført i samarbeid med Jorunn Jørgensen, Hanna Thim, Guro Strandskog og Kjerstid Fremmerlid, UiT Norges Arktiske Universitet. Jørgensen og medarbeidere gjennomførte PD forsøket og utførte analyser på materiale som ble høstet i dette forsøket. Transkriptomanalyser av parr og smolt smittet med PRV er utført i samarbeid med Espen Rimstad og Øystein Wessel, NMBU og Maria Dahle, Veterinærinstituttet.

Veterinærinstituttet: Britt Bang Jensen, Mona Dverdal Jansen og Anja Kristoffersen (arbeidspakke 2 epidemiologiske analyser) og Torunn Taksdal (arbeidspakke 1 histologiske undersøkelser)

AquaGen AS: Nina Santi (arbeidspakke 1)

Patogen AS: Vidar Aspehaug, (arbeidspakke 2)

2.3 Styringsgruppens sammensetning

Styringsgruppen i prosjektet bestod av:

Kristin Ottesen, HaVet fiskehelsetjeneste (leder)

Olav Breck, Marine Harvest

Arne Guttvik, Salmar

Vidar Nikolaisen, Lerøy Seafood Group, erstattet av Håvard Hårstad fra april 2013, erstattet av Eirik Monsen august 2014.

Observatør i styringsgruppa og kontaktperson for prosjektet i FHF: Merete Bjørgan Schrøder.

3 Hovedmål og delmål i prosjektet

Hovedmål:

Øke kunnskapen om utviklingen av multifaktorielle sykdommer ved å vurdere effekten av ulike variabler og deres interaksjon.

Delmål:

- Evaluere effekten av ulike variabler på utviklingen av HSMB;
 - genetisk resistens mot IPN
 - IPNV bærer status og reaktivering
 - vaksinerings
 - kombinasjoner av disse
- Evaluere relasjoner i felt mellom IPN status (QTL+/- fisk, IPNV bærerstatus, IPNV reaktivering) i laks i sjøfasen og utbrudd/virustitre av HSMB/PRV.
- Identifisere sykdomsmarkører som kan brukes for bedre å kunne evaluere helsestatus på fisken.
- En risikovurdering av IPN-virusbærere og interaksjoner mellom ulike patogener og stressorer.
- Vurdere effekten av vaksinerings av IPN-resistent laks.
- Økt kunnskap om resistens, toleranse og vert-patogen interaksjoner.
- Kunnskap om hvor en best skal sette inn krefter og penger for å redusere tap med multifaktorielle årsaksforhold.

Prosjektet har vært delt opp i 2 arbeidspakker, AP1 Eksperimentelt modellstudie, opprinnelig planlagt startet 4. kvartal 2011 og AP2 Feltstudie, opprinnelig planlagt startet våren 2012.

4 Prosjektgjennomføring

Arbeidet som er utført i dette prosjektet er beskrevet i kapitlene for de enkelte arbeidspakkene. Endringer og forsinkelser underveis i prosjektperioden førte til revideringer av leveransedatoer i løpet av prosjektperioden og endret sluttdato for prosjektet. Av større endringer kan nevnes at det ble besluttet og ikke gjennomføre et eget feltstudium i arbeidspakke 2. I stedet ble det valgt å utføre analyser på allerede eksisterende data hos oppdrettsselskapene og VI, samt analysere prøvemateriale som var samlet inn i Midt Norge i forbindelse med «Stopp PD» programmet i denne regionen. Dette er nærmere beskrevet i kapitlet om arbeidspakke 2. Videre ble det gjort interessante funn i arbeidspakke 1 ved transkriptomanalyser av laks under smoltifisering og etter overføring til sjøvann. I samråd med styringsgruppen ble det derfor besluttet å gå videre med flere analyser på organmateriale fra fisk før, under og etter smoltifisering. Dette er nærmere beskrevet i kapitlet om arbeidspakke 1.

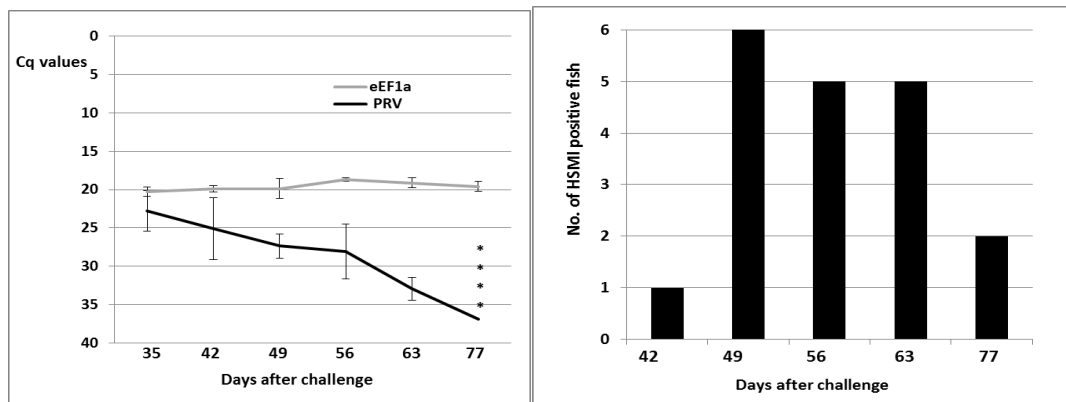
5 Oppnådde resultater i prosjektet

5.1 Arbeidspakke 1: Eksperimentell smittestudie

I denne arbeidspakken skulle vi evaluere effekten av ulike variabler på utviklingen av HSMB, så som genetisk resistens mot IPN, IPNV bærer status og reaktivering, vaksinerings og kombinasjoner av disse. Vi skulle også søke å identifisere sykdomsmarkører som kan brukes for bedre å kunne evaluere helsestatus på fisken.

Vi ville undersøke risikoen av IPN-virusbærere og interaksjoner mellom ulike patogener og stressorer, og vurdere effekten av vaksinerings av IPN-resistent laks. Dette ble søkt løst ved å gjennomføre et stor eksperimentelt smitteforsøk ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Fisken til forsøket, både IPN resistent QTL fisk og fisk som manglet IPN QTL ble levert fra AquaGen AS som startfôringsklar yngel og gikk gjennom starfôrings-, parr og smoltifiseringsfase på Havbruksstasjonen i Tromsø. IPN smittemodellen var innarbeidet i Nofima gjennom flere år med forsøk både på parr og post smolt. I forsøket skulle det etableres IPNV bærere etter smitte med IPNV på parrstadiet før smoltifisering ble igangsatt. I tidligere studier hadde vi da observert en reaktivering av bærerinfeksjonen med økende virustitre rett etter overføring til sjøvann og IPN utbrudd med dødelighet 2-5 uker etter sjøvannsoverføring. Dette modellsystemet ville kunne bidra til å belyse problemstillingene i prosjektet omkring påvirkning av IPNV og IPN på utviklingen av HSMB, om ulik QTL status ville ha innvirkning på bæreretablering og risiko for reaktivering og effekten av vaksinerings med og uten IPNV antigen på både bæreretablering, reaktivering og HSMB utvikling.

For å finne potent materiale til HSMB smitte ble det samlet inn hjerteprøver fra 3 HSMB feltutbrudd i Nord -Norge og disse ble testet i et pre-smitteforsøk 2011. Smolt, både uvaksinert og vaksinert med kommersiell 6-komponent vaksine, ble intraperitonealt injisert med en supernatant fra de tre hjertematerialene rett etter overføring til sjøvann. Alle tre var på forhånd screenet og funnet å være negative for andre kjente viruspatogener (PCMV, IPNV, ILAV, SAV) ved bruk av qPCR. Alle tre var positive for PRV (Ct verdier rundt 26). Smittematerialet som ble brukt i hovedforsøket var det som gav den raskeste utviklingen av HSMB relatert hjertepatologi (Figur 1). PRV fra de tre materialene ble sekvensert av Torstein Tengs, Veterinærinstituttet, og PRV i organmaterialet som ble valgt ut til hovedforsøket var identisk med referansesekvensen som var sendt til GenBank (Palacios et al 2010).



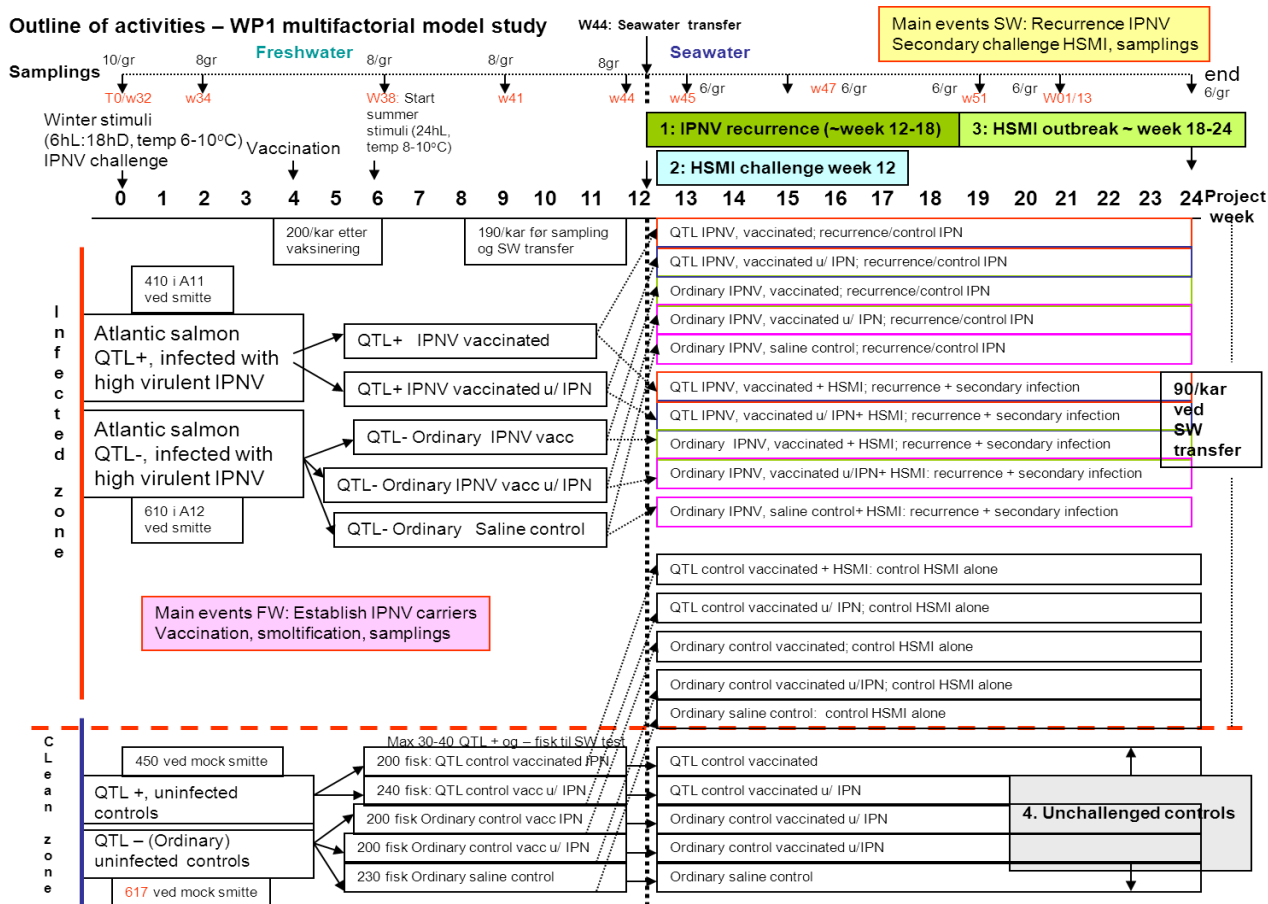
Figur 1 Utvikling av HSMB i eksperimentelt pre-smitteforsøk etter intraperitoneal injeksjonssmitte med supernatant av hjertehomogenat fra HSMB feltutbrudd. Figuren til venstre viser PRV Ct verdier (kalt Cq i figuren) med standardavvik i hjerteprøver 35-77 dager etter smitte. Genet eF1a er tatt med som referanse (n=5). Stjernene på dag 77 representerer negative prøver. Figuren til høyre viser antall fisk med HSMB relatert hjertepatologi 42-77 dager etter smitte, bestemt ved histologisk undersøkelse (n=6). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom vaksinert og uvaksinert fisk hverken i form av virusinnhold eller hjertepatologi. Resultatene er derfor vist for sammenslåtte grupper.

I tillegg til PRV analyser av hjerteprøver ble også hodenyreprøver undersøkt for tilstedeværelse av PRV, og disse vist samme trend i utviklingen som hjerteprøvene (resultater ikke vist). Prøvemateriale fra forsøket ble også brukt til transkriptomanalyser i et komparativt studie med materiale fra SAV smitte fisk (beskrevet i punkt 5.2.1).

Hovedforsøket i AP1 startet i uke 32, 2012 og ble avsluttet i uke 2, 2013. Figur 2 viser en oversikt over forsøket med tidspunkter for bl. a. IPN virus smitte (badsmittemodell), vaksinasjon (med Pharmas AlphaJect micro 6, en 6 komponent vaksine inkludert IPNV antigen og Pharmas AlphaJect 5-3, en 5 komponentvaksine uten IPNV antigen), smitte (i.p. modell) med PRV positivt organmateriale, sjøsetting samt alle tidspunkter for prøvetaking.

Det ble ikke registrert dødelighet som skyldes sykdom i IPN smittede, PRV smittede, eller dobbeltsmittede (IPNV og PRV) grupper underveis i forsøket. Noen sykdomstegn har imidlertid vært observert etter overføring til sjø i smittet fisk (f. eks lys, trådlignende feces, mørkpigmentering, misfarget lever).

Et omfattende prøvemateriale (hodenyre, hjerte, pankreas, blod, gjelle og tarm) ble samlet inn for senere analyser som IPNV titrering, real time qPCR, microarrays og histologi (se tidspunkt for prøvetaking og antall fisk prøvetatt per gang i figur 2).



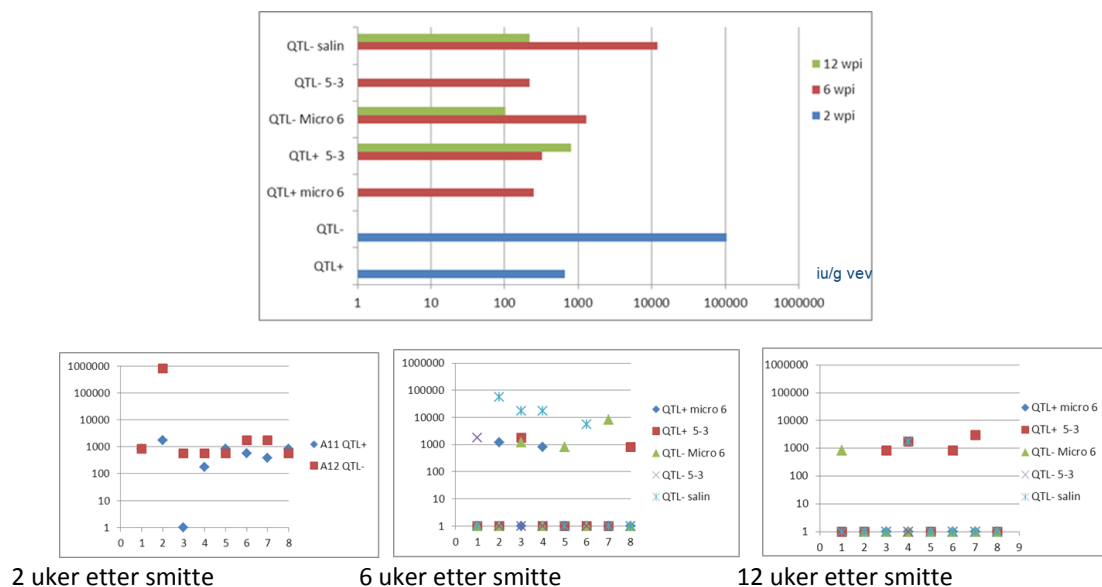
Figur 2 Oversikt over eksperimentelt hoved forsøk gjennomført i arbeidspakke 1. Figuren viser forsøksgruppene og tidspunkter for ulike hendelser i forsøket. QTL + = fisk med IPNV QTL. QTL - /ordinary = fisk uten IPNV QTL. Vaccinated u/IPN = vaksinert med vaksine uten IPNV antigen, Vaccinated = vaksinert med vaksine med IPNV antigen.

5.1.1 Utvikling av IPN virus i forsøksperioden

Hodenyreprøver fra alle forsøksgrupper samlet inn ferskvanns- og sjøvannsperioden er analysert for tilstedeværelse av IPNV ved titrering i CHSE-214 celler i 96 brønners Brett. I tillegg er gruppene analysert for IPNV ved real time qPCR. Resultatene fra titreringen viste at IPNV ble påvist på gruppenivå på alle tidspunkt undersøkt etter smitte (2 til 22 uker), med unntak av uvaksinert kontrollgruppe som var negativ etter sjøsetting (se figur 3 og 4). Samtlige prøver (8 stk) undersøkt 2 uker etter smitte var IPNV positive. Seks uker etter smitte var det signifikant mer virus i uvaksinert gruppe sammenlignet med de vaksinerte gruppene. Titreringen utført 12 uker etter IPNV smitte, samme uke som fisken ble overført til sjøvann, viste at mengde virus var under deteksjonsgrensen i gruppene av IPN QTL fisk gitt vaksine med IPN komponent og i IPN QTL negativ gruppe vaksinert med vaksine uten IPN komponent, mens virus ble funnet i lave mengder i 4 av 8 IPN QTL fisk gitt vaksinen uten IPN komponent og 1 av 8 IPN QTL negative fisk gitt vaksinen med IPN komponent. En av åtte fisk i uvaksinert salingruppe (IPN QTL negativ) var IPNV positiv. Titrene som ble påvist var lave og det var ikke signifikante forskjeller på gruppenivå. Bærertestene av usmittet kontrollgruppe var negativ.

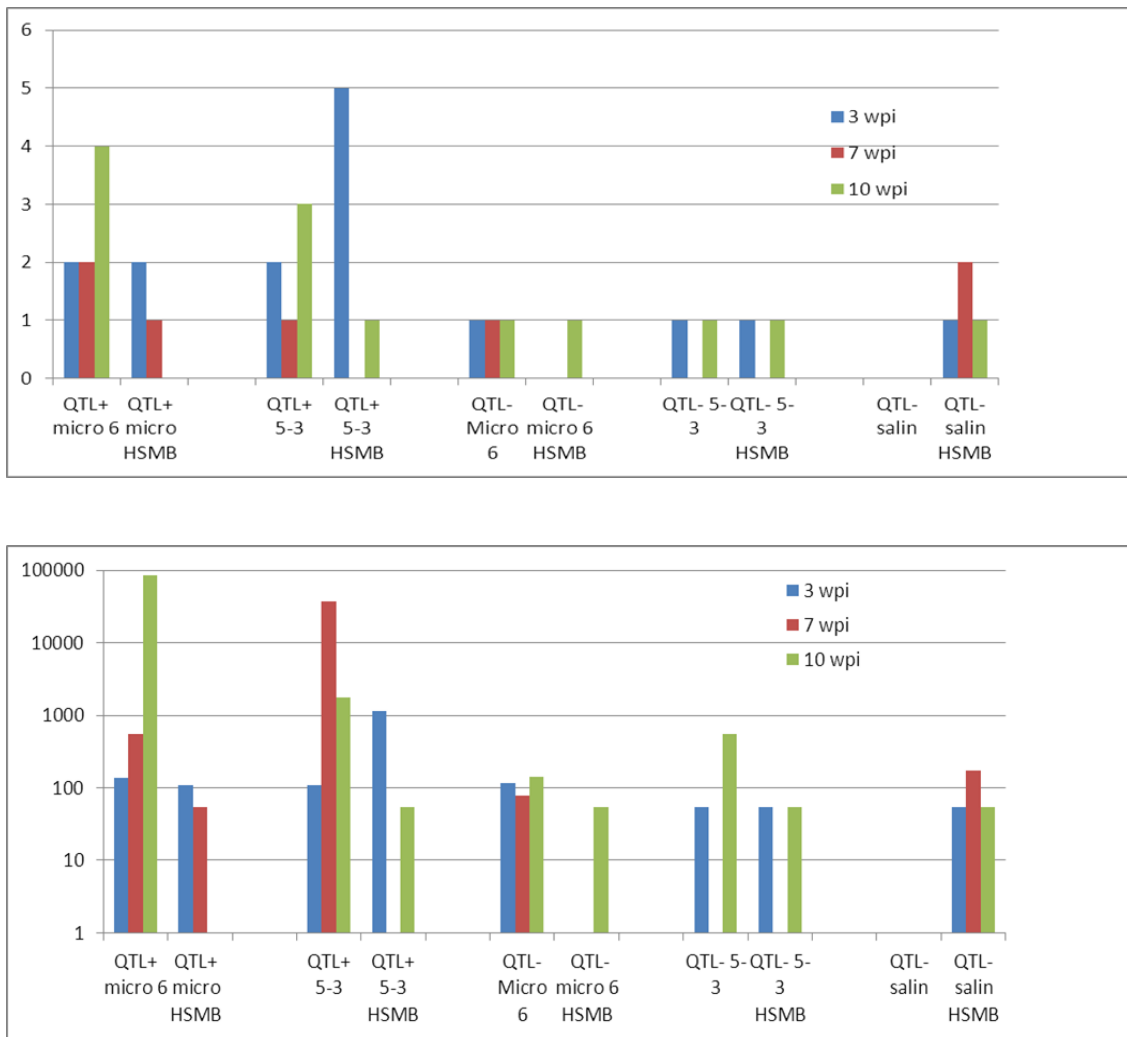
Det ble ikke påvist noe omfattende titerøkning etter overføring til sjøvann (figur 4). Enkeltfisk i de ulike gruppene hadde til dels høye titrer, men i de fleste prøver som var positive ble det påvist relativt lave mengder virus. Det var store individuelle variasjoner og på enkelte tidspunkt var bare 1 av 6 undersøkte prøver i noen av gruppene IPNV positive med denne metoden. Deteksjonsgrensen varierte noe i ulike oppsett og var oppe i ca 800 infeksjøs enheter per gram vev på det høyeste. Det ble ikke påvist at en HSMB infeksjon påvirket titerutviklingen av IPNV. Det ble heller ikke observert vesentlige forskjeller mellom QTL+ og QTL – grupper. Det var for få viruspositive prøver til å foreta noen statistiske beregninger. Basert på dette ble det konkludert at fisken var blitt infisert med IPNV og på gruppenivå var det etablert en bærertilstand som kunne påvises i de fleste forsøksgrupper, men det var ingen reaktivering av viruset med økende virusmengder etter overføring til sjøvann. (Titreringsdata er vist i tabell 1 og 2 som vedlegg sist i denne rapporten).

IPNV titre i ferskvann:

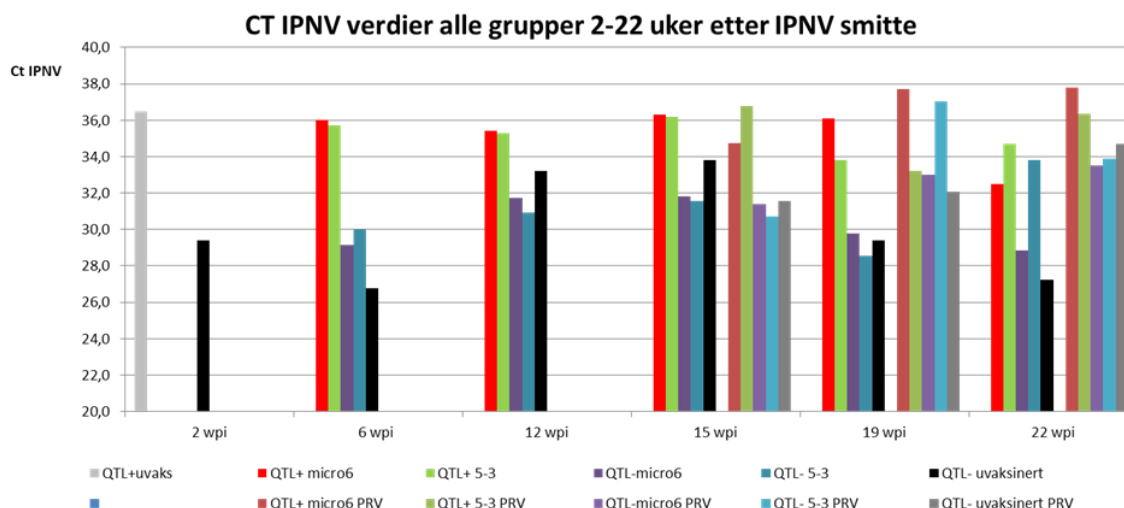


Figur 3 Øverste figur viser gjennomsnittlige IPNV virustitre (infeksjøs enheter per gram vev, log skala) i forsøksgruppene hhv 2, 6 og 12 uker etter badsmitte med IPNV virus (n=8) i ferskvann. De tre nederste figurene viser individuelle titrer (fisk nr 1-8, der ett symbol representerer en fisk). X-aksen viser titer per gram vev (log skala). Ved testing to uker etter smitte (2 wpi; blå kolonner) var forsøksgruppene enda ikke vaksinert. Ved tidspunktene 6 (6 wpi; røde kolonner) og 12 uker etter smitte (12 wpi; grønne kolonner) er gruppene vaksinert med AlphaJect 5-3 (5-3) og AlphaJect Micro 6 (Micro 6), mens en gruppe er salin injisert kontroll. Nedre deteksjonsgrense var ca 80 viruspartikler per gram vev. QTL- = IPNV QTL negativ fisk, QTL+ = IPNV QTL fisk.

IPNV titre i sjøfasen og etter HSMB smitte:



Figur 4 Figuren øverst viser antall positive fisk per gruppe og nederste figur viser gjennomsnittstitre for de ulike gruppene i sjøvannsfasen, hhv 3, 7 og 10 uker etter sjøsetting og HSMB smitte. Dette tilsvarer 15, 19 og 22 uker etter IPNV smitte. Virus gjenfinnes i fisken på alle stadier i både vaksinert og uvaksinert fisk og i både IPN QTL fisk og i IPN QTL negativ fisk, men etter hvert i svært få individer og i svært lave mengder. N=6 på alle tidspunkt.



	2 wpi	6 wpi	12 wpi	15 wpi	19 wpi	22 wpi	SEM 2	SEM 6	SEM 12	SEM 15	SEM 19	SEM 22
QTL+uvaks	36,5						0,000					
QTL+ micro6		36,0	35,4	36,3	36,1	32,5		0,495	0,430	0,932	0,378	4,388
QTL+ 5-3		35,7	35,3	36,2	33,8	34,7		0,436	0,945	0,483	2,830	1,291
QTL-micro6		29,1	31,7	31,8	29,8	28,9		3,194	1,615	2,904	4,481	3,708
QTL- 5-3		30,0	30,9	31,6	28,5	33,8		3,243	3,092	2,179	2,853	2,257
QTL- uvaksinert	29,4	26,8	33,2	33,8	29,4	27,2	4,775	3,040	2,500	2,500	2,382	2,566
QTL+ micro6 PRV				34,7	37,7	37,8				2,362	2,286	2,191
QTL+ 5-3 PRV				36,8	33,2	36,3				2,161	4,674	2,435
QTL-micro6 PRV				31,4	33,0	33,5				2,776	2,482	3,646
QTL- 5-3 PRV				30,7	37,0	33,9				3,275	3,978	4,165
QTL- uvaksinert PRV				31,6	32,1	34,7				2,127	3,809	2,419

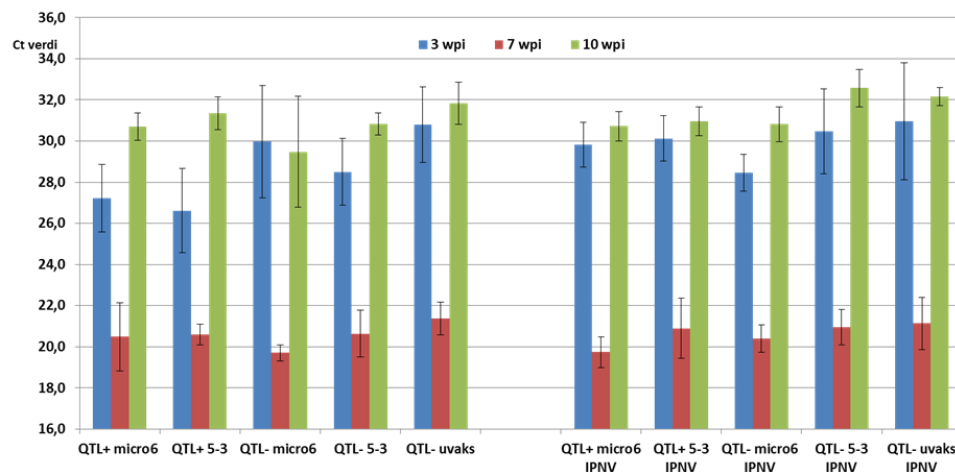
Figur 5 Figuren og tabellen viser gjennomsnitts IPNV Ct verdier 2-22 uker etter IPNV smitte i de ulike forsøksgruppene. Ved real time qPCR analyser for IPNV var det en noe høyere prevalens av IPNV positive prøver enn ved titrering, men bildet er likevel noenlunde likt mht nivåene av IPNV som er tilstede. Høyeste nivåer av virustranskripter ble detektert i uvaksinert IPN QTL negativ fisk (sort stolpe). Vaksinert IPN QTL fisk, uansett vaksine, har svært lave mengder transkripter tilstede (rød og grønn stolpe), mens det var noe mer i vaksinerte IPN QTL negative grupper (illa og blå stolper). I ukene 15-22, dvs etter smitte med HSMB, følger IPNV nivåene rimelig samme profil i PRV smittede grupper og i grupper uten PRV. Det var en tendens til noe høyere IPN virusnivåer på de to siste tidspunktene i gruppene som kun var smittet med IPNV. Dette er i en fase da vi så at PRV infeksjonen har manifestert seg i både høye virusmengder og hjertepatologi. Viral interferens, dvs at et virus «tar over» er vist i flere andre studier med co-infeksjoner i fisk. Tabellen viser gjennomsnitts Ct verdier med standardavvik (gul del) for de ulike gruppene 2-22 uker etter IPNV smitte.

5.1.2 Utvikling av PRV i forsøksperioden

Alle gruppene fulgte samme forløp med hensyn til utvikling av mengde PRV (transkripter) 3, 7 og 10 uker etter smitte. Noen forskjeller ble observert, uten at det så ut til å ha betydning for sykdomsutviklingen (hjertepatologi). En trend var at uvaksinert fisk hadde lavere mengder PRV på alle tidspunkt sammenlignet med vaksinert fisk, men dette var ikke signifikant. Siden vi ikke hadde med en uvaksinert IPN QTL gruppe, er det ikke mulig å si noe om evt forskjeller mellom disse gruppene. Materialet er omfattende og hovedhensikten, å se om IPNV påvirker utviklingen av HSMB og om det er forskjell på IPN QTL fisk og IPN QTL negativ fisk og på vaksinert og uvaksinert fisk, kan vi si noe om uten å gå veldig mye dypere inn i tolkingen av materialet. HSMB utvikles likt i alle grupper uansett QTL

status og vaksinerings og lave mengder IPNV i fisken påvirker ikke dette. IPNV smitten som ble utført i ferskvannsfasen, 12 uker før HSMB smitten, påvirket ikke utviklingen av PRV mengdene i fisken og *vice versa* ble heller ikke IPNV bærertilstanden påvirket av PRV infeksjonen.

CT verdier PRV 3-10 uker etter PRV smitte



Figur 6 Gjennomsnittlige PRV Ct verdier med standardavvik for alle PRV smittede grupper 3 (blå), 7 (rød) og 10 (grønn) uker etter PRV smitte. Vi ser at utviklingen følger samme trend i alle grupper, med høyeste nivåer 7 uker etter smitte, sammenfallende med tidspunktet der all fisk ble diagnostisert med HSMB på bakgrunn av hjertehistologiske undersøkelser.

5.1.3 Histologiske undersøkelser av smittet fisk

Det ble gjort fire prøveuttak, hhv 3, 7, 9 og 10 uker etter sjøsetting og ip smitte. Prøver av hjerte og pankreasvev fra totalt 20 grupper og 6 fisk per gruppe ble undersøkt 3, 7 og 10 uker etter smitte. Totalt 360 fisk (720 snitt) ble undersøkt histologisk. Det ble ikke påvist vevsforandringer i pankreasvev som tilsa at fisken som var smittet med IPNV hadde utviklet IPN. Forandringer i hjerter som er forenelig med HSMB ble påvist i alle HSMB-smittede grupper, men ble ikke påvist i grupper som ikke var smittet med HSMB. Tre uker etter sjøsetting og HSMB-smitte var hjerter fra 59 fisk uten anmerking (10 HSMB smittede grupper á 6 fisk). En fisk (IPN QTL negativ fisk vaksinert med vaksine uten IPNV komponent) hadde tidlige HSMB-forandringer. Sju uker etter sjøsetting og HSMB-smitte var det hjerter fra 60 fisk av totalt 60 fra HSMB smittede grupper som hadde HSMB-forandringer. Ti uker etter sjøsetting og HSMB-smitte hadde fortsatt hjerter fra 50 av totalt 60 fisk HSMB-forandringer, mens hjerter fra 9 fisk var uten anmerking. En fisk var «på grensen».

Alle grupper vaksinert med AlphaJect Micro 6 eller AlphaJect 5-3 inneholdt fisk med alvorlig peritonitt, mens ingen grupper injisert med saltvann (saline kontroll) inneholdt fisk med peritonitt, inkludert grupper injisert med IPNV og/eller HSMB-smitte.

Oppsummert var selve HSMB smitten vellykket, da alle fisk hadde HSMB hjerter 7 uker etter smitte. Det ble ikke avdekket gruppevis forskjeller i forhold til grad av hjerteforandringer. Syv uker etter smitte var mengde PRV i fiskegruppene svært like og uten signifikante forskjeller på gruppenivå og all fisk hadde lik grad av hjerteforandringer. Det kunne vært interessant å undersøke sammenhengen mellom virusmengde og grad av hjerteforandringer, men da burde vi hatt flere prøvetidspunkt i perioden 3-7 uker etter smitte for å få et bedre bilde av virus- og hjertepatologsutviklingen før all fisk ble diagnostisert med HSMB. Basert på resultatene fra transkriptomundersøkelsene i for-forsøket er det imidlertid ikke sikkert at mengde PRV transkripter er høyest når hjerte forandringene er som mest omfattende.

5.1.4 Konklusjon og diskusjon eksperimentell smittestudie

Laks ble infisert med IPNV etter badsmitte i ferskvann og en langvarig bærertilstand ble etablert. Infeksiøse IPN viruspartikler og IPN virus (transkripter) ble påvist i hele forsøksperioden på 22 uker. IPN QTL fisk hadde lavere mengder virus enn i IPN QTL negativ fisk. Det var store individuelle variasjoner virusmengder. Ingen reaktivering av IPNV, kjennetegnet med sterkt økende virusmengder eller påvisbar sykdomsutvikling, ble påvist etter overføring til sjøvann. Dette er tidligere vist i flere eksperimentelle forsøk (Stangeland et al 1996, Johansen og Sommer 2001, Johansen et al 2009, Julin et al 2014). All fisk (60/60 undersøkt) ble diagnostisert med HSMB 7 uker etter i.p. smitte, noe som sammenfalt med at de høyeste nivåene av PRV ble påvist på dette tidspunktet. HSMB utviklet seg likt i både IPNV bærere og ikke-bærere og i både IPN QTL fisk og IPN QTL negativ fisk. En bærertilstand med lave IPNV titre påvirker dermed ikke utviklingen av HSMB. Det samme er tidligere vist i ILAV smittet fisk som var bærere av IPNV (Melby og Falk, 1995, Johansen og Sommer, 2001). En uspesifikk beskyttelse mot HSMB ble ikke oppnådd etter vaksinerings, noe som tidligere er vist for IPN (Eggset et al 1998, Johansen og Sommer, 2001).

5.2 Arbeidspakke 1 - Transkriptomstudier

I utgangspunktet inkluderte forsøksplanen studier av IPNV reaktivering og sammenligning av enkeltinfeksjoner og dobbeltinfeksjoner med IPN og HSMB, og med fokus på virkningen av smoltifisering og sjøvannsoverføring. Det ble imidlertid valgt og ikke utføre transkriptomanalyser på smittet fisk i hovedforsøket i arbeidspakke 1, da det ikke ble IPN utbrudd i forsøket. Det er behov for store kontraster gruppene imellom for å kunne oppnå tydelige forskjeller i microarrayanalysene, og det fikk vi som kjent ikke i dette forsøket. Det ble derfor foreslått å utføre andre typer transkriptomstudier med relevans for problemstillingene i prosjektet: (i) detaljert karakterisering av HSMB og sammenligning med PD, (ii) responser på PRV i røde blodceller (RBC), (iii) effekter av smoltifisering og SWT på immunsystemet til Atlantisk laks og (iv) motstand mot HSMB og (v) forholdet mellom immunitet og ytelse av laks i det marine miljø. Den reviderte planen ble støttet av styringsgruppen. I forbindelse med dette arbeidet er Nofimas ressurser på funksjonell genomforskning av atlantisk laks benyttet, deriblant oligonukleotider, microarrays og bioinformatikkpakken STARS (Krasnov, Timmerhaus et al 2011). Dette systemet er tidligere brukt i flere publiserte studier, inkludert studier av virussykdommer (Krasnov et al. 2011, Timmerhaus et al. 2011, Timmerhaus et al. 2012).

5.2.1 Sammenligning av transkriptomprofilene til HSMB og PD

I denne studien ble transkriptom analyser utført parallelt på hjerter fra atlantisk laks smittet med SAV og PRV i to separate forsøk gjennomført under kontrollerte forhold. Vi fokuserte på den kliniske fasen

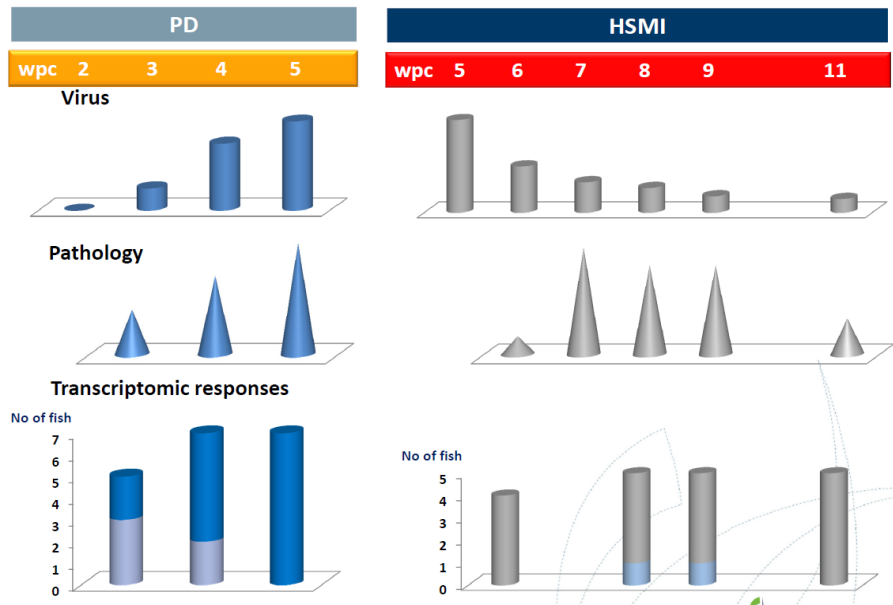
av begge sykdommer og prøver til microarray analysene ble samlet inn henholdsvis 28-35 og 42-77 dager etter smitte (figur 7). Vi ønsket å se etter typiske eller generiske responser på infeksjonene, både generelle og spesifikke. Generelle immunresponser er relativt godt beskrevet - de er sterke, varige og lett å finne. Det er ingen sterk korrelasjon til patogen eller beskyttelse og kvantitative sammenligninger trenger standardisering. Molekylære mekanismer som knyttes til sykdomsspesifikke reaksjoner er mye mindre kjent og mer krevende å finne, men de er viktige for differensialdiagnostikk og utvikling av forebyggende tiltak. Vi ønsket å se etter genetiske markører for infeksjon og patologi og ikke-immunresponser som kan si noe om molekylær patologi og både felles trekk og sykdomsspesifikke trekk.

5.2.1.1 Oppsummering og diskusjon komparativ transkriptomanalyse

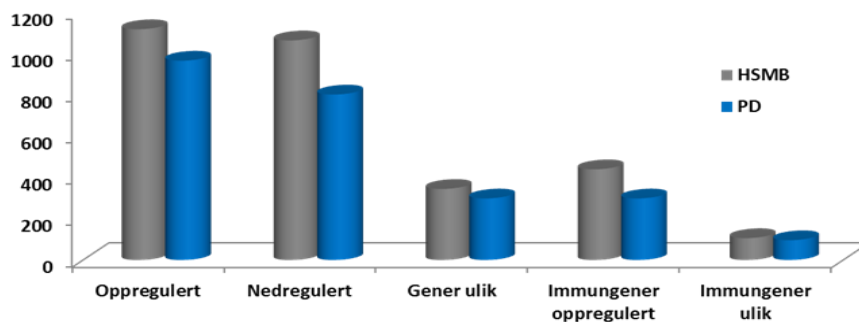
Et stort antall immungener ble aktivert i begge forsøk med prevalens av gener assosiert med tidlige medfødte antivirale responser (figur 8). Ekspresjonsnivåene for disse var noe høyere i SAV smittet fisk (figur 9 og 10). Aktivering av IFN-aksen skjedde parallelt med inflammatoriske endringer som involverer flere ulike humorale og cellulære faktorer. Ervervede immunresponsener var sterkest uttrykt i fisk med HSMB (figur 11 og 12), eksemplifisert ved økt ekspresjon av et stort antall gener assosiert med differensiering og modning av B-lymfocytter og cytotoksiske T-celler. Den største forskjellen ble observert i CD8 alfa og beta. Uttrykk av CD8 alpha og beta var henholdsvis 8,4 og 9,5 ganger høyere. Imidlertid ble PD forsøket avsluttet før HSMB forsøket, og vi kan ikke utelukke at nivået av ervervede responser ville økt i PD smittet fisk på et senere tidspunkt, men da etter at full hjertepatologi var utviklet. Forskjeller i adaptive immunresponser er viktig både i forhold til patologi og beskyttelse. T-celle-drevne betennelsesreaksjoner har blitt foreslått som en primær årsak til hjertepatologi i atlantisk laks med HSMB (Mikalsen et al., 2012), og våre resultater er i tråd med denne konklusjonen. CD8 viste største forskjell mellom de to sykdommene (opp til 60 ganger forskjell basert på real time qPCR resultatene). Utvikling av adaptiv immunitet kom forut for helingsprosessen fra HSMB. T-celle immunitet synes å ha en dobbel rolle også i CMS, der den er involvert i både å fjerne patogenet og i dannelsen av vevsskader (Timmerhaus et al, 2011;. Timmerhaus et al, 2012). Et karakteristisk trekk ved HSMB i forhold til CMS er en massiv aktivering av humoral immunitet, vist ved et stort sett av immunoglobuliner. Den SAV-induserte adaptive immuniteten var fremdeles lav når sykdommen nådde sitt modne stadium, noe som viser viktigheten av effektive vaksiner for å kunne kontrollere PD. Utviklingen av adaptiv respons er generelt sen hos atlantisk laks. Siden siste prøvetaking fra SAV smittet fisk var 35 dager etter smitte, kan man trolig anta at det adaptive immunforsvaret ikke var fullt utviklet, noe som er i tråd med de moderate nivåene av B og T-celle markører som ble målt. I tidligere rapporterte SAV3 kohabitantforsøk ble høyeste nivå av T-celle-relaterte transkripter som CD4 og CD8, i tillegg til en B-celle-markør, påvist ved noe senere tidspunkter, 42 og 56 dager etter infeksjon (Xu et al, 2012; Grove et al, 2013). Kanskje ville vi funnet uttrykk av disse genene på senere tidspunkt også i vårt forsøk, men det ville i så fall vært etter at PD patologien hadde nådd sitt maksimum.

Våre resultater viser at mens sammenhengen mellom virus, patologi og genekspresjon er svak i HSMB, utvikles patologiske forandringer ved relativt høye virusnivåer i PD, og det er en sterk korrelasjon med genekspresjon (Figur 13). Assosiasjonen mellom PRV og HSMB er godt etablert, men det gjenstår fortsatt en del for å forstå årsakssammenhengen. Det kan være andre faktorer som også påvirker sykdomsutviklingen. Lignende endringer i uttrykk er observert i mange gener med ulike roller. Flere gener viser sykdomsspesifikke forandringer og disse kan være av interesse for diagnostikk. Analysene avdekket også en gruppe gener som kan være involvert i beskyttelse og vevsreparasjon, og også signalpeptider. Rollene disse har gjenstår imidlertid å kartlegge. Det ble påvist nedregulering av ikke-

immungener slik som myofiber og mitokondrielle proteiner i både PD og HSMB fisk, noe som mest sannsynlig reflekterer myokard patologi som vil påvirke den funksjonelle tilstanden og kapasiteten til hjertet. En gruppe gener som er viktige for hjertefunksjonen, inkludert B-type natriuretisk peptid og fire neuropeptider, viste et differensielt uttrykk mellom PD og HSMB. En rekke gener som viste sykdomsspesifikke endringer kan være av interesse for diagnostikk, men dette gjenstår å teste ut.

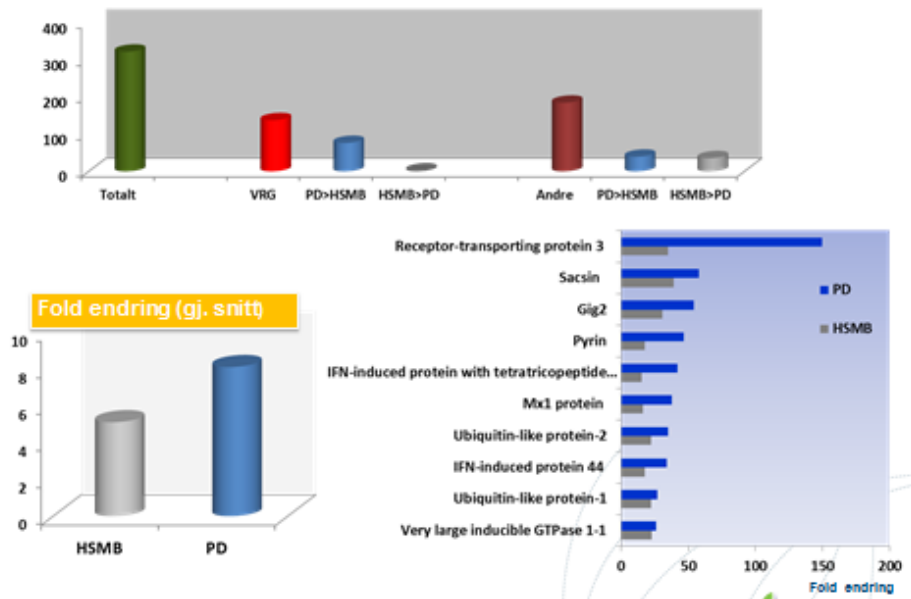


Figur 7 Figuren viser utvikling av virusmengder og patologi i HSMB og PD forsøket og antall fisk som ble brukt i transkriptomanalysene (andel av prøvene med avvikende responser er vist i lys blå farge).

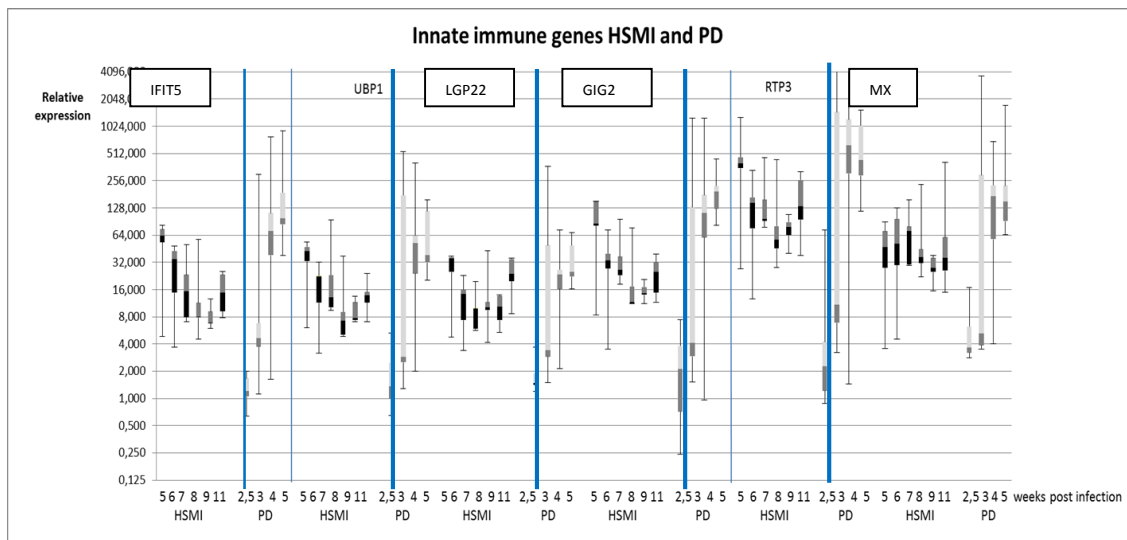


Figur 8 Figuren gir en oversikt over de typiske responsene som ble funnet i PD og HSMB smittet fisk. Til venstre er det totale antallet differensielt uttrykte gener, både de opp-regulerte og de nedregulerte. Samlet sett er responsen til HSMB og PD i samme størrelsesorden og listene over differensielt uttrykte gener overlapper hverandre i stor grad. 1/3 av alle gener er imidlertid forskjellige mellom HSMB og PD. 40 % av de oppregulerte genene er immungener og 1/3 av disse igjen er forskjellige mellom HSMB og PD.

Medfødt immunitet, virus responsive gener (VRG)



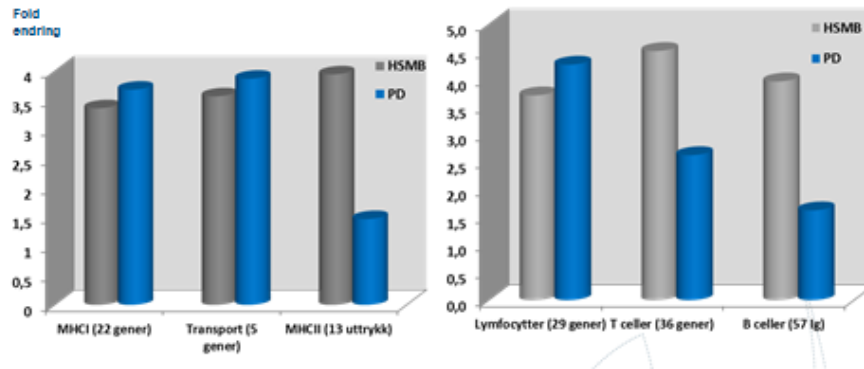
Figur 9 Et stort antall immungener ble aktivert i begge sykdommer, inkludert 137 gener assosiert med tidlige medfødte antivirale responser, såkalte virus responsive gener, hvorav 7 gener viste betydelig høyere ekspresjonsnivåer i laks med PD. Samlet sett var medfødte immunresponser til begge sykdommene sterkest induert i PD smittet laks. Den største gruppen (155 funksjoner) var interferon-relaterte gener som reagerer på alle RNA-virus og syntetisk dobbelt-trådet RNA i atlantisk laks, som vist i våre tidligere studier.



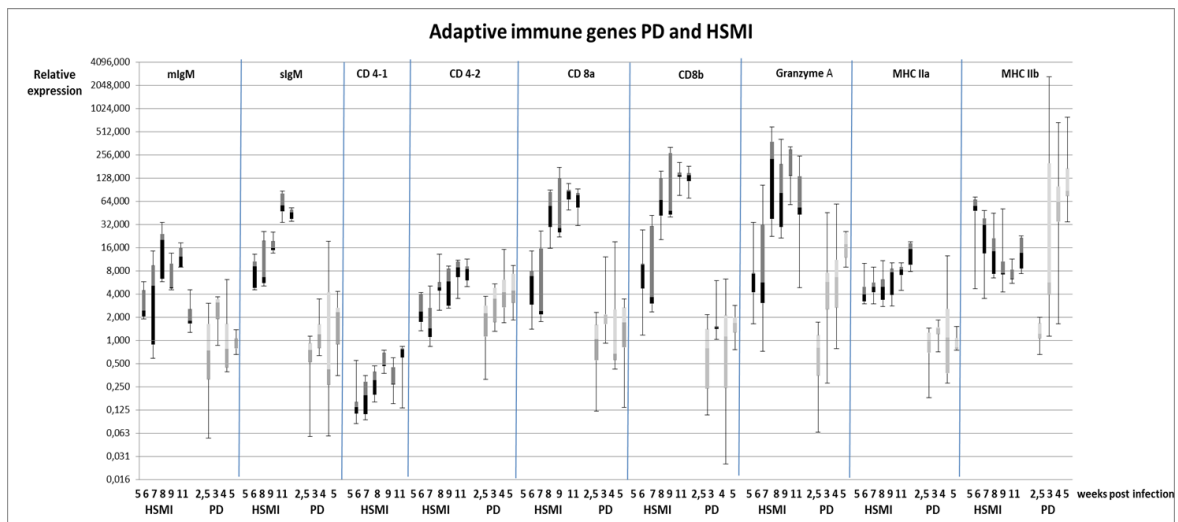
GIG2	VRG	interferon-inducible protein Gig2-like [Salmo salar]
RTP3	VRG	Receptor-transporting protein 3 [Salmo salar]
IFIT5	VRG	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5
UBP1	VRG	Ubiquitin-like protein 1 [Salmo salar]
LGP2	VRG	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58

Figur 10 Real time qPCR analyser (relativt uttrykk) med standardavvik av utvalgte virus responsive gener relatert til medfødt immunrespons i PD og HSMB smittet fisk i moden fase av begge sykdommer, hhv 5-11 (HSMB) og 2,5-5 (PD) uker etter smitte. Det er generelt en sterkere respons i PD fisk i moden fase av sykdommen.

Antigenpresentasjon, lymfocytter

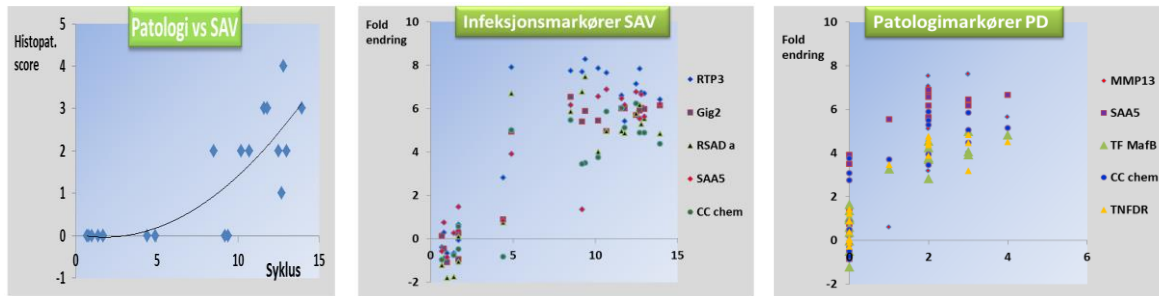


Figur 11 En høyere oppregulering ble observert i HSMB syk fisk sammenlignet med PD syk fisk i et stort antall gener assosiert med antigen presentasjon via MHC klasse II, differensiering av lymfocytter og funksjoner til B-celler og cytotoxiske T-celler.



mIgM/sIgM	Humoralt forsvar	B celle markør
CD4-1 og 2	Cellulært forsvar	Th1 respons
CD8a og b	Cellulært forsvar	CTL respons
Granzyme A	Cellulært forsvar	CTL respons
MHC IIa og b	Humoralt forsvar	Th2 respons

Figur 12 Real time qPCR analyser av utvalgte gener i PD og HSMB smittet fisk relatert til ervervede immunresponser i moden fase av begge sykdommer, hhv 5-11 (HSMB) og 2,5-5 (PD) uker etter smitte. CD4-1 ble ikke funnet uttrykt i PD. Ervervede immunresponser er generelt høyest i HSMB smittet fisk.



Figur 13 PD patologi utvikles ved relativt høye SAV nivåer (figur til venstre). Det er en sterk korrelasjon med genekspressjon. Markørene for infeksjon (figur i midten) og patologi (figur til høyre) er ulike, men det er en delvis overlapp med CC chemokine og serum amyloid. Merk TNF decoy reseptor (TNFDR, gule triangler i figuren nederst), som synes å være en kandidat som patologimarkør.

5.2.2 Responser mot PRV i røde blodceller hos Atlantisk laks

Studiene ble utført i samarbeid med Maria Dahle (VI), Espen Rimstad og Øystein Wessel (NVH) med sikte på å bedre forståelsen av patogenesen forårsaket av PRV og vert - patogen interaksjoner på cellenivå. Tidligere hadde samarbeidspartnerne ved VI og NVH vist at røde blodceller ble smittet med PRV mye tidligere enn andre celler og vev, og lenge før symptomer på HSMB oppsto (Finstad et al. 2014). Imidlertid forårsaker ikke HSMB hypoksi eller reduksjon av hematokritt og påvirker tilsynelatende ikke respirasjon og gassutveksling. Røde blodceller hos fisk kan respondere på patogener (Morera al. 2011), men lite er kjent om deres immune egenskaper og funksjoner. I motsetning til pattedyrenes røde blodceller som ikke har kjerner, viser røde blodceller hos fisk store endringer i genekspressjon under differensiering (Krasnov et al. 2015) og etter virusinfeksjoner (Timmerhaus et al. 2011). Røde blodceller ble isolert fra laks med HSMB i et smitteforsøk og disse inneholdt store mengder PRV. Vi gjennomførte microarrayanalyser for å se på immunresponser og andre endringer som kan påvirke de funksjonelle egenskapene til røde blodceller hos laks.

En induksjon av medfødte antivirale responser var forventet, men omfanget som ble observert var imponerende. Tidligere har vi funnet 117 virus responsive gener (VRG) som aktiveres i laks mot forskjellige RNA-virus og syntetisk dobbeltrådig RNA (Krasnov et al. 2011). PRV infeksjonen induserte hele 180 gener som er kjent å ha roller i medfødt antiviral immunitet (figur 14). Sammenhengen mellom PRV-titrene og ekspressionsprofilene var svært god for flere gener. Sterkest var sammenhengen i gener med sentral betydning i medfødt antiviral immunitet: interferon 1 ($r = 0,94$), interferon responsfaktor 7b ($0,98$) og signaltransduksjons proteinene jak1 ($r = 0,96$) og STAT1 ($r = 0,93$). VRG inkluderer gener som undertrykker immunresponser: SOCS1 og IL10 reseptor, og de var også oppregulert i PRV smittede røde blodceller. I motsetning til alle tidligere studier, observerte vi imidlertid her en undertrykkelse av alle immunveier bortsett fra medfødt antiviral immunitet. Redusert uttrykk ble sett i flere cytokiner, kjemokiner og deres reseptorer, signal transducere, humorale (antibakterielle og akutte fase proteiner, komplement) og cellulære (oxidative burst, lektiner og Ig-reseptorer, matriksmetalloproteinaser) effektorer (Figur 15).

Accession	Gene	Symbol	Pearson r	5 wpc				7 wpc			
				1	2	3	4	1	2	3	4
AY216595	IFNa	ifna2	0.94	2.29	1.30	11.27	26.16	18.46	20.85	25.00	2.23
DQ459470	TLR 3-like protein	tlr3	0.32	2.19	1.95	4.13	3.73	3.23	3.77	2.97	7.77
FN178459	RIG-I-2	rig-1	0.71	5.87	2.76	15.70	10.52	7.24	11.84	6.93	8.34
209154815	RNA helicase DHX58	dhx58	0.46	3.53	1.31	10.25	6.55	3.93	5.51	5.03	13.98
EG820831	RNA helicase LGP2	lgp2	0.55	3.25	1.42	7.54	5.53	3.34	4.68	4.43	7.33
BT073175	Stat1	stat1	0.93	8.96	2.49	38.18	26.63	45.17	32.57	44.47	22.04
117425401	Jak1	jak1	0.96	1.86	1.15	8.50	7.35	10.24	8.16	11.89	4.69
209734939	Interferon regulatory factor 1	irf1b	0.79	9.01	4.96	83.53	98.52	43.09	41.83	71.00	57.42
209151224	Interferon regulatory factor 2	irf2	0.55	1.15	1.04	7.74	6.75	1.69	2.44	3.44	2.60
DY725939	interferon regulatory factor 7	irf7	0.95	3.62	1.86	6.75	7.72	8.08	7.78	9.35	5.80
DW537370	Interferon regulatory factor 9	irf9	0.54	1.61	1.37	2.53	1.75	2.39	3.15	1.83	3.10
209730585	SRK2 tyrosine kinase	srk2	0.68	2.03	1.00	30.23	30.75	10.93	9.81	22.13	5.68
117493558	Receptor transporting protein 3	rtp3	0.94	4.10	1.82	270.29	277.07	245.60	202.90	241.90	1.00
BQ035726	Very large inducible GTPase 1-3	vligp	0.86	3.85	1.00	46.82	47.54	85.48	86.04	79.49	38.61
EG906096	Sacsin	sacs	0.88	9.28	0.77	339.25	113.51	207.29	45.68	67.33	16.44
DY700702	Protein with tetratricopeptide repeats 5-1	ffit5	0.95	5.32	1.75	62.04	71.06	77.67	72.35	115.58	31.15
117522883	Ubiquitin-like protein-2	ubb	0.87	2.09	-1.65	127.99	202.75	77.78	104.08	130.69	33.96
BT043723.1	Mx1	mx1a	0.85	8.16	1.39	75.77	58.55	43.49	43.74	51.59	44.82
U66477	Mx3	mx1	0.93	4.21	1.20	43.85	43.85	44.32	35.19	53.59	20.76
117852370	Fish virus induced TRIM-4	ftr25	0.27	10.68	5.54	18.38	17.60	18.29	8.67	8.20	23.00
DY728694	RSAD, viperin	rsad2	0.79	4.58	1.21	31.84	30.16	14.66	14.97	18.13	18.12
EG884318	Gig2-6		0.77	3.30	2.20	35.65	32.21	11.36	12.00	16.53	8.08
223583798	Nicotinamide phosphoribosyltransferase-1	nampt	0.78	4.03	1.19	13.17	11.29	6.12	6.96	9.52	7.21
EG904504	Poly polymerase 12-2	parp12	0.23	-1.06	1.00	18.43	16.84	3.20	3.50	6.67	12.00
EF523423	dsRNA-activated protein kinase R	pkv	0.81	3.53	1.90	8.56	8.47	4.80	6.17	6.88	5.02
DQ182560	dsRNA activated Z-DNA binding protein kinase	pkz	0.66	2.87	1.57	6.80	6.59	3.10	2.98	6.27	2.56
EG791574	NFX1-type zinc finger containing protein		0.75	2.34	0.76	11.10	8.52	5.43	6.47	6.38	8.98
DQ451008	Tapasin	TAPBP	0.56	2.45	2.13	8.78	8.39	3.35	3.72	5.25	4.49
DQ091796	MHC class I antigen	mhc1ufa	-0.02	2.59	2.57	4.41	3.11	2.79	4.21	0.99	2.27
146147381	Proteasome subunit beta type-9	psmb9a	0.65	2.27	2.27	7.85	7.17	3.59	4.13	5.40	4.22
BT074391	Proteasome subunit beta type 6	psmb11	-0.21	2.43	3.82	3.19	4.58	3.59	3.25	2.44	5.50
DW563373	suppressor of cytokine signaling 1	socs1	0.63	3.70	1.80	14.05	13.20	5.60	6.06	6.72	8.35
223647953	IL-10 receptor beta chain	crfb4	0.91	7.35	4.77	36.46	34.23	23.05	25.55	34.65	12.96

Figur 14. Eksempler på opp-regulerte VRG: gener involvert i medfødte antivirale responser i Atlantisk laks. Data er fold endring sammenlignet med usmittede røde blodceller.

Accession	Gene	Symbol	5 wpc				7 wpc			
			1	2	3	4	1	2	3	4
BT046282	C-C motif chemokine 28	ccl1	-2.57	-2.91	-1.85	-2.22	-1.93	-2.02	-1.48	-1.75
CA347512	C-C motif chemokine 13		-2.52	-2.42	-2.11	-3.22	-1.19	-1.81	-2.12	-1.34
BT049479	IL-18	il18	-3.14	-2.84	-2.91	-1.64	-1.56	-1.96	-2.60	-1.82
EG869657	IL 17D1	il17d	-4.66	-5.46	-4.29	-4.51	-1.90	-4.25	-3.25	-2.97
209149945	Arachidonate 5-lipoxygenase	alox5	-6.30	-4.18	-4.23	-1.93	-2.85	-4.18	-3.34	-4.97
209155549	Prostaglandin G/H synthase 1	ptgs1	-3.82	-3.31	-1.96	-1.60	-2.05	-1.24	-2.15	-3.73
223647193	C-X-C chemokine receptor type 4	cxcr4b	-7.76	-2.39	-3.97	-0.79	-2.18	-2.96	-2.41	-5.92
BT059300	IL-6 receptor subunit alpha	il6ra	-14.66	-4.52	-4.36	-1.25	-2.17	-2.74	-2.49	-3.10
EF579739	IL-1 receptor type II	il1r11	-4.31	-4.50	-3.09	-3.99	-1.69	-3.91	-2.99	-2.50
DY714851	Macrophage colony-stimulating FR	csf1ra	-3.79	-4.37	-3.69	-3.38	-1.36	-2.96	-3.36	-2.09
117829218	IL 2 receptor gamma	il2rga	-4.23	-3.23	-3.81	-1.46	-2.03	-3.27	-3.05	-2.54
117823370	IL-31 receptor A	il31ra	-5.09	-2.52	-3.20	-1.36	-2.06	-2.51	-3.09	-3.15
209154821	Granulocyte colony-stimulating FR	csf3r	-9.11	-8.21	-6.07	-6.05	-1.50	-6.86	-3.65	-3.62
EG931186	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	c3ar1	-4.48	-3.05	-2.17	-2.86	-2.02	-3.53	-2.48	-2.68
209153957	Src-family tyrosine kinase SCK	hck	-9.53	-6.32	-8.91	-2.19	-1.86	-3.34	-4.41	-5.14
DW578491	Suppressor of cytokine signaling 3	socs3b	-3.75	-4.45	-4.71	-3.73	-1.75	-3.31	-4.07	-2.65
117466618	Myeloperoxidase	mpx	-7.41	-6.49	-3.47	-3.93	-3.16	-7.14	-4.21	-6.92
223648963	Serum amyloid P component	sap	-6.95	-4.36	-2.45	-0.74	-2.81	-2.84	-2.79	-4.11
223672506	High affinity Ig receptor subunit gamma	fcer1g	-13.00	-11.36	-7.20	-5.93	-1.54	-4.29	-3.01	-4.03
CT565368	Complement component C3	c3	-4.54	-4.89	-2.45	-2.92	-2.17	-2.35	-2.89	-3.16
CA037566	Complement component C9	c9	-3.57	-3.59	-3.31	-3.53	-1.74	-2.91	-2.63	-1.65
223647567	Neutrophil cytosolic factor 1	ncf1	-11.09	-6.97	-4.41	-1.64	-1.14	-4.96	-2.99	-1.77
117501945	Cytochrome b558 alpha-subunit	cyba	-3.84	-4.81	-2.75	-1.21	-1.01	-2.39	-2.53	-10.01
223577209	Matrix metalloproteinase-9	mmp9	-41.26	-32.47	-17.87	-26.12	-4.56	-30.46	-13.61	-8.21
209156091	MMP 13 or Collagenase 3	mmp13a	-38.08	-26.12	-15.70	-31.73	-4.46	-24.85	-13.19	-6.68
EG903761	Mannan-binding protein-associated protease 3	masp3	-4.91	-6.62	-5.91	-7.85	-2.42	-6.25	-5.92	-5.20
BX871341	Matrix metalloproteinase 14	mmp14	-2.46	-3.80	-2.43	-3.81	-2.67	-2.62	-2.85	-4.42

Figur 15 Eksempler på nedregulerte gener med ulike immunfunksjoner. Data viser fold endring sammenlignet med usmittede røde blodceller.

PRV hadde ingen effekt på gener som er involvert i gassutveksling: gener som er involvert i metabolismen av jern og biosyntesen av heme, hemoglobin, karbonsyreanhydrase og erytrocytt-spesifikke proteiner fra membranen og cytoskjelettet. Likevel vil kanskje PRV infeksjoner kunne

forårsake større endringer av fenotypen til røde blodceller og konsekvensene av dette er vanskelig å forutsi. Nedregulering ble vist for flere gener som koder for proteiner i cytoskjelettet og myofiber (figur 16). Dette kan føre til endringer i form og motilitet av celler. Redusert ekspresjon ble også sett i gener som er involvert i metabolismen av sukker, nukleotider, lipider og spesielt ioner av metaller: Na, K og Ca (figur 16). Sistnevnte kan gjøre røde blodceller mer sårbare for endringer i osmolalitet etter sjøvannsoverføring. Nedregulering ble observert i mange gener for komponentene av ekstracellulær matrix (ECM) og proteiner som er involvert i interaksjoner mellom celler (f.eks erytrocytter og endotel), celler og ECM (data ikke vist). Rollene til disse proteinene i laksens røde blodceller er ukjent og må undersøkes videre. PRV forårsaket også redusert ekspresjon av flere vekstfaktorer og transkripsjonsfaktorer som styrer differensiering.

Accession	Gene	Symbol	5 wpc				7 wpc				Accession	Gene	Symbol	5 wpc				7 wpc										
			1	2	3	4	1	2	3	4				1	2	3	4	1	2	3	4							
Cytoskeleton																												
EG826668	Coronin-1A	coro1a	-12.01	-5.21	-5.38	-1.48	-1.55	-2.58	-2.72	-6.11	209155503	Inward rectifier potassium channel 8	knj8b	-4.28	-3.32	-2.69	-0.30	-1.58	-0.17	-0.55	-2.69							
89865382	Gelsolin	scn1a	-9.34	-4.82	-5.40	-1.71	-1.24	-3.56	-3.75	-3.66	209154071	Amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	accn2	-2.85	-2.68	-2.73	-0.39	-0.27	-0.16	-0.61	-0.97							
221222349	Plastin-2	lcp1	8.41	-4.40	-5.31	-1.07	-1.71	-3.03	-3.11	-5.34	898759222	Voltage-gated hydrogen channel 1	hcn1	-2.26	-3.14	-3.56	-0.37	-0.61	-0.85	-0.13	-0.95							
DW560007	Actin-related protein 2/3 1B	arpc1a	2.65	2.17	2.24	2.54	3.44	3.54	3.62	1.97	CA056364	ATPase Na+/K+ transporting beta 2b	atp1b2b	-3.96	-3.05	-3.97	-0.47	-0.56	-0.73	-0.30	-0.87							
109154937	Keratin 8	kn8	-2.92	-2.94	-3.19	-1.47	-0.98	-1.45	-1.70	-2.40	DC056492	Na+/K+Zn co-transporter	NKCC1a	-3.74	-4.09	-3.93	-0.98	-1.00	-0.28	-0.97	-0.82							
EG798776	Keratin 12	kn12	-3.90	-3.71	-3.80	-3.93	-3.98	-3.97	-3.93	-3.95	DY720750	Sodium channel beta 3 subunit	scn1b	-4.23	-4.03	-3.88	-3.88	-4.20	-3.70	-3.74	-3.29							
EG752465	Ezrin like	ezrl	-2.19	-2.16	-2.16	-2.81	-3.78	-3.62	-3.79	-3.31	223647197	Regucalcin	rgrn	-3.49	-3.75	-3.27	-3.43	-3.63	-3.35	-3.84	-3.34							
EG779910	Annexin A2-A	anna2b	-5.94	-3.13	-4.21	-1.27	-4.28	-2.87	-4.31	-5.77	209782575	S100-A1	s100a10b	-4.98	-4.27	-5.67	-2.08	-1.63	-2.34	-3.02	-3.94							
DN185733	Myosin binding protein H-like	mybpc2b	-5.16	-4.46	-3.84	-3.80	-3.91	-4.27	-4.46	-4.67	Metabolism of lipids, steroids, nucleotides and sugars																	
EH033401	Myosin heavy chain	myh4	-3.13	-3.18	-3.28	-2.56	-3.84	-3.93	-3.05	-3.92	BT072598	Perilipin	adfp	-17.54	-13.46	-9.95	-5.14	-3.20	-4.16	-4.56	-3.94							
223647761	Tropomyosin alpha-3 chain	tpm3	-9.78	-4.07	-2.84	-1.34	-1.49	-1.52	-2.82	-2.98	DW376280	Very long-chain acyl-CoA synthetase	slc27a6	-3.21	-2.95	-3.28	-3.48	-1.11	-0.64	-0.56	-3.28							
EH034139	Myomesin	CR847973.1	-3.31	-2.04	-2.61	-1.88	-3.22	-3.63	-2.71	-2.81	GE77323	Peroxisomal 3,2-trans-enoil-CoA isomerase	ec12	-3.54	-2.70	-3.28	-1.60	-1.55	-0.55	-1.17	-1.27							
AJ557152	Myosin regulatory light chain 2	mlc-2	-3.53	-3.83	-2.90	-4.26	-3.07	-1.65	-1.58	-1.24	CS517643	Acyl-CoA synthetase family member 2 mitochondrial	acsf3	-1.66	-1.02	-1.48	-2.35	-1.67	-0.13	-0.94	-0.58							
EL698000	Actin	acta1a	-2.95	-3.68	-3.13	-2.64	-1.17	-2.66	-2.66	-1.83	CA060167	Hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase	hsd3o2	-2.81	-3.88	-3.31	-3.23	-0.79	-0.58	-4.26	-2.68							
8K859010	WisKott-Aldrich syndrome protein 3	wasf3	-2.90	-2.87	-3.21	-2.74	-1.23	-2.71	-3.39	-3.44	DY717161	Squalene synthetase	sqle1	-3.85	-4.12	-3.95	-3.89	-3.71	-3.44	-3.09	-3.20							
2097970791	Plack-strom	plek	-6.44	-4.87	-3.29	-1.51	-1.38	-1.88	-2.68	-4.24	RQ206252	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	akr1d1	-2.57	-2.85	-1.99	-1.59	-0.89	-0.19	-0.71	-0.57							
Transport, metabolism of ions																												
DY710363	Sodium-dependent neutral amino acid transporter 80	slc5a15	-9.18	-6.15	-4.48	-3.88	-2.99	-4.28	-4.18	-4.10	BT058307.1	Cytidine deaminase	cdia	-3.42	-3.09	-3.43	-3.60	-1.56	-1.39	-0.53	-0.98							
89870999	Monocarboxylate transporter 10	mc10	-10.30	-5.51	-4.84	-1.53	-1.76	-3.43	-3.49	-5.40	BT058411.1	Nucleoside diphosphate transporter 3	slc29a3	-3.79	-3.41	-3.96	-2.98	-1.98	-2.88	-3.28	-3.42							
DY707960	Solute carrier family 22 member 7	slc22a7b	-3.47	-2.11	-3.18	-1.96	-1.75	-2.93	-3.11	-2.86	CA056511	Equilibrative nucleoside transporter 3	slc29a3	-3.54	-3.52	-3.84	-3.58	-1.97	-1.98	-3.64	-3.65							
AF428143	Taurine transporter	SLC6A6	-2.24	-2.54	-2.11	-1.27	-2.42	-2.33	-2.69	-2.09	209154169	Uracil phosphoribosyltransferase	urprt	-2.69	-2.82	-3.90	-1.61	-1.19	-1.43	-1.90	-1.85							
213086123	Solute carrier family 15 member 1	slc15a2	2.84	2.75	2.72	2.23	1.28	2.33	1.98	1.65	88895951	Nucleoside phosphorylase	ppp5a	2.84	2.41	2.15	1.59	2.33	2.62	1.64	2.61							
117566929	P/Q-type calcium channel subunit alpha-2	ca2na1ba	-3.78	-5.56	-3.40	-3.01	-3.80	-3.51	-2.87	-3.00	EG930042	Uridine/cytidine kinase-like 1	uck11b	1.86	1.45	4.58	2.84	2.38	3.08	3.76	2.25							
117855376	L-type calcium channel subunit alpha-2	ca2na1da	-3.92	-4.30	-3.89	-4.62	-3.41	-3.10	-2.75	-3.82	DY737481	Uridine-cytidine kinase 2	uck1	2.50	2.01	3.93	4.37	2.14	2.99	2.26	3.67							
EG794638	L-type calcium channel subunit beta-2	ca2cb4a	-3.11	-3.78	-3.23	-2.93	-1.27	-2.60	-2.21	-2.64	CA052062	Glycogen phosphorylase	pygl	-3.97	-3.94	-3.03	-3.24	-4.88	-3.91	-3.65	-4.26							
EF474015	Voltage-gated calcium channel gamma-3 subunit	ca2g3	-4.65	-4.68	-3.73	-3.83	-1.43	-2.83	-2.83	-2.85	EG079596	fructose 1,6-bisphosphatase	pfp2	-4.24	-3.58	-3.05	-3.50	-3.54	-4.40	-3.64	-3.91							
KC338203	Sodium/potassium/calcium exchanger (SLC24A3)	nxn	2.70	2.04	4.48	3.88	3.88	3.48	3.08	3.47	223648107	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	pegf	-3.29	-2.32	-3.48	-3.13	-3.23	-3.58	-3.52	-3.59							
KX384622	Calcium-activated potassium channel protein	kcma1a	-2.58	-2.25	-3.00	-2.14	-1.58	-2.47	-3.16	-2.68	EG787436	Oximithine decarboxylase 1	odc1	-4.63	-3.77	-3.45	-3.35	-3.22	-4.58	-3.54	-3.00							

Figur 16 Effekt av PRV på ekspresjon av gener som koder for cytoskjelett proteiner og proteiner involvert i metabolisme.

Studien gav ny kunnskap om både PRV og laksens røde blodceller. Nært samsvar mellom PRV-titre og ekspresjon av VRG var i kontrast til resultatene beskrevet i forrige avsnitt: i HSMB smitteforsøket, var ekspresjon av VRG størst ved tidspunktet til de første sykdomstegnene var redusert. Dette gir en usikkerhet i forhold til om PRV er den viktigste eller eneste utløsende faktor for HSMB. Uavhengig av svaret på dette spørsmålet er det velkjent at laks på den ene side kan være tilsynelatende friske selv ved høye nivåer av PRV, og på den andre side at skader forårsaket av dette viruset og symptomer på sykdommen kan være vanskelig å skille fra hverandre. Dette er også i tråd med våre resultater. Til tross for at det ikke var noen direkte innvirkning på oksygentransport og gassutveksling, som vurderes som de viktigste funksjonene i røde blodceller, kan flere endringer påvirke cellene «fitness» under bestemte forhold. Vi fant også sterke bevis for den aktive rollen de røde blodcellene hos laksen har immunologisk.

5.2.3 Smoltifisering og overføring til sjø kan undertrykke immunitet og responser mot patogener i Atlantisk laks

Smoltifisering har alltid vært sentral i lakseforskningen, som hovedsakelig har fokusert på endokrin regulering og endringer i metabolismen (spesielt ionebytte), endringer i morfologi og atferd. Overraskende lite er kjent om status for immunforsvaret i denne perioden selv om man kan anta at betydelige endringer skjer. Under smoltifisering vil produksjon og nivåer av kortisol øke siden dette

hormonet fungerer som glukokortikoid og mineralocorticoid i laks som spiller en viktig rolle i osmoregulering. Kortisol er også kjent som en potent immunsuppressor. Forekomst av virusykdommer øker betydelig etter overføring til sjø enten på grunn av reaktivering av bærervirus (IPNV og PRV) eller ny infeksjon. Dette er trolig assosiert med høyere patogenpress, stress og tilpasning til nytt miljø. Bidrar en eventuell immunsuppresjon i smoltifiseringsfasen til økt mottagelighet for sykdommer? Til tross for at dette er av stor betydning for næringen, har problemet ikke blitt undersøkt i detalj før nå. To studier som vi har gjennomført viste at immunsuppresjon skjer under normale oppdrettsbetingelser og at spesielt responsen mot virusinfeksjoner er svekket.

5.2.3.1 Immunsuppresjon under smoltifisering og etter overføring til sjø

Et eksperiment ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø der smoltifiseringen ble induisert på samme måte som i industrien: parr ble utsatt for konstant lys i seks uker og temperaturøkning. I slutten av denne perioden var fisken helt smoltifisert, som vist ved kloridtester og endringer i utseendet. Prøver ble samlet på fire tidspunkt regnet fra start av smoltifiseringsprosessen; presmolt (uke 3), smolt (uke 6), og en og tre uker etter overføring til sjøvann (uke 7 og 10). Det siste tidspunktet ble inkludert for å se på recovery etter stress. Analysene ble utført i tre vev: gjelle og tarm, som er i direkte kontakt med sjøvann og spiller nøkkelroller i osmoregulering, og hodenyre, det primære immunorganet. Presmolt ble brukt som referanse i hele forsøket. Som ventet påvirket smoltifisering og sjøvannsoverføring ulike funksjonelle grupper og signalveier (pathways) og kompleksiteten i datasettet er svært høy. Vi vil her fokusere på immunitet. Hele spekteret av immunfunksjoner ble berørt (tabell 1). Mens stimulering ble sett i et lite antall gener, ble en stor andel av differensielt uttrykte gener nedregulert.

Tabell 1 Antall immungener som ble regulert under smoltifisering og etter sjøvannsoverføring.

Gruppe, pathway	Gjelle	Hodenyre	Tarm	Totalt
Chemokiner & receptorer	7	11	11	29
Cytokiner & receptorer	25	6	16	47
Eicosanoid signalering	1	2	3	6
Medfødte antivirale responser	27	44	27	98
TNF relatert	10	8	14	32
Transducere, regulatorer	9	10	12	31
Komplement, akutfase, lektiner	14	16	17	47
Effektorer	17	21	22	60
Antigen presentasjon	11	11	19	41
Ig, B celle	7	10	6	23
Lymfocytter	8	10	9	27
T celle	21	16	17	54
Totalt	157	165	173	495

Enkelt beskrevet blir immunresponser initiert med bindingen av patogene komponenter, cytokiner og kjemokiner til reseptorer som aktiverer signaloverføring, noe som i sin tur skrur på genekspresjon. Induserte gener koder for cytokiner og chemokiner som sender inflammatoriske signaler til andre celler, humorale og cellulære effektorer og antigen presentasjon som initierer utvikling av ervervet immunitet. Våre resultater viste at hele systemet ble nedregulert. En suppresjon var godt synlig i smolt og holdt seg stort sett stabilt til slutten av forsøket - det var ingen kompensasjon etter tre uker i sjøvann. Eksempler på nedregulerte gener fra de viktigste funksjonelle gruppene er vist i figur 17, der

medfødte antivirale responser er mest berørt. Et unntak å merke seg var Ig: en forbigående økning ble observert kort etter overføring til sjøvann, spesielt i gjellene, noe som tyder på økt differensiering og rekruttering av B-celler i denne perioden (data ikke vist).

Organ	Gene	Smolt	SWT1	SWT2
Antigen presentation				
Head kidney	MHC class I antigen	-1.6	-7.0	-18.6
Intestine	MHC class I antigen	-1.9	-15.7	-11.8
Intestine	MHC class I MHC class I	-2.6	-7.7	-5.9
Intestine	H-2 class II antigen gamma	-2.5	-2.2	-2.8
Head kidney	H-2 class II antigen gamma	-1.5	-1.5	-2.2
Innate antiviral responses				
Head kidney	Barrier-to-autointegration factor	-3.5	-5.6	-4.1
Head kidney	Viperin	-2.1	-3.8	-2.1
Intestine	Barrier-to-autointegration factor	-2.3	-3.1	-3.4
Gill	Gig2-3	-3.1	-2.1	-3.2
Head kidney	Gig2-3	-3.6	-1.7	-5.1
Cytokines, chemokines & receptors				
Gill	Small inducible cytokine A13	-1.5	-4.2	-6.2
Head kidney	C-C motif chemokine 19	-1.0	-3.3	-5.7
Intestine	C-C motif chemokine 20	-5.9	-3.3	-2.8
Gill	interleukin-1 receptor antagonist	-1.9	-2.8	-3.2
Head kidney	C-X-C motif chemokine 10	-3.1	-5.3	-2.6
Effectors				
Gill	Myeloperoxidase	1.5	-5.1	-14.1
Gill	Natterin-like protein	1.4	-3.9	-6.4
Gill	Inducible nitric oxide synthase	-1.1	-3.1	-5.4
Gill	Amyloid protein beta A4	-1.1	-4.8	-10.3
Head kidney	Antimicrobial peptide 2 (LEAP2)	-1.3	-1.3	-4.5
T cells				
Head kidney	Drebrin-like protein	-1.5	-2.4	-4.3
Intestine	T-cell activation Rho GTPase	-2.1	-3.7	-2.5
Gill	CD8 beta	-3.0	-1.7	-2.1
Intestine	L-plastin	-2.7	-2.2	-1.5
Gill	CD3epsilon	-1.8	-2.5	-2.7

Figur 17 Eksempler på immungener som var nedregulert under smoltifisering. Data viser fold endring sammenlignet med presmolt (uke 3 etter start av smoltifiseringsregimet).

Eksperimentet ga bevis for at storskala immunsuppresjon kan finne sted under smoltifisering og etter sjøvannsoverføring. I motsetning til i enkelte andre eksperimentelle modeller, var fisken selv og betingelsene fisken hadde i denne studien svært relevant for industrien. Vi vet ikke hvor ofte en slik immunsuppresjon skjer: alltid, ofte eller i sjeldne tilfeller? Mange andre spørsmål må også avklares i videre undersøkelser: Påvirker immunsuppresjonen sykdomsresistensen? Returnerer uttrykk av immungener tilbake til opprinnelige nivåer eller forblir det lavt sammenlignet med parr? Hvor lang tid er nødvendig før evt recovery skjer? Er det forskjell mellom stammer og familier, vill og oppdrettet fisk?

5.2.4 Ulike immunresponser mot HSMB i parr og smolt

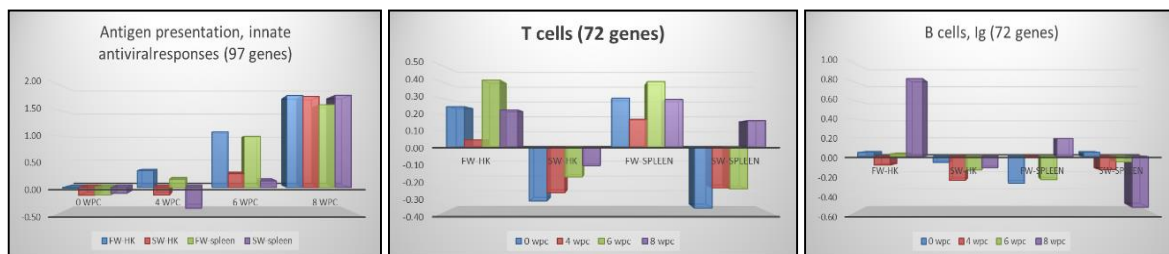
Selv om PRV påvises i parr, noen ganger også i store mengder, har HSMB til nå blitt påvist hovedsakelig i det marine miljø. Vi stilte spørsmålet om mottagelighet for sykdommen kan være relatert til endringer i immunforsvaret som finner sted under smoltifisering og etter sjøvannsoverføring. Studien ble utført i samarbeid med Maria Dahle og Espen Rimstad. Parr og smolt som ble holdt i henholdsvis fersk- og sjøvann ble smittet ved kohabitantsmitte fra laks med HSMB. Som ventet hadde parr ingen patologi i hjertet og PRV ble effektivt fjernet fra milten. Smolt utviklet symptomer på sykdom og viruset holdt et stabilt nivå over en lengre periode. Microarrayanalyser ble utført på hodenyrer og milt 4, 6 og 8 uker etter smitte; usmittet fisk (sammenslåtte prøver av parr og smolt) ble brukt som en felles referanse.

I motsetning til i forrige undersøkelse, var det her ingen massiv immunsuppresjon forårsaket av smoltifisering og sjøvannsoverføring. Imidlertid viste mange immungener høyere ekspresjonsnivåer i parr før smitte og en stor del av disse forskjellene ble opprettholdt ved andre tidspunkter (figur 18).

Disse genene har forskjellige roller, og det er ingen stor overlapping mellom hodenyre og milt. Flere immunfunksjoner var representert med et stort antall differensielt uttrykte gener (Figur 19). T-celle spesifikke gener viste gjennomgående høyere ekspresjon i begge vev fra parr. Men siden denne gruppen ikke viste noen respons på HSMB (ekspresjonen ble opprettholdt på et relativt stabilt nivå uten økning), er rollen til T-celler usikker i forhold til beskyttelse mot HSMB i denne spesifikke studien. To andre grupper viste ulike tidsforløp i forhold til respons. I parr ble medfødt antiviral immunitet stimulert tidligere enn i smolt. Forskjeller dukket først opp 4 uker etter smitte, økte og nådde høyeste nivå 6 uker etter smitte før det flatet ut 8 uker etter smitte. Forskjellen var enda større i B-celle-spesifikke gener som var representert hovedsakelig ved Ig. Åtte uker etter smitte var det en kraftig økning av mengde transkripter i hodenyre fra parr, men ikke i smolt; en lignende men langt svakere trend ble observert også i milt. I vårt eget HSMB forsøk observert vi sterke B-celle responser (se punkt 5.2.1). Mest sannsynlig varte dette eksperimentet ikke lenge nok til å se dette i smolt, men uansett utviklet den ervervede immuniteten seg tidligere i parr.

Role	Gene	Head kidney				Spleen			
		HK 0	HK4	HK6	HK8	Sp 0	Sp4	Sp6	Sp8
Acute phase	Serum amyloid A5	9.99	2.35	-1.60	5.50	3.43	1.23	-1.97	3.67
Antigen presentation	MHC class I antigen	4.34	7.94	3.34	-3.06	2.21	4.01	2.33	-3.11
Antigen presentation	MHC class II antigen alpha chain	3.77	3.35	1.86	1.15	2.03	2.11	1.28	-1.03
Chemokine	C-C motif chemokine 28	3.40	4.18	3.44	2.75	1.00	-1.03	1.06	2.49
Chemokine	C-X-C chemokine 2	3.08	1.51	1.03	-1.77	1.05	-1.16	1.17	-1.68
Chemokine	C-C motif chemokine 25	2.53	1.01	1.00	-1.41	1.18	-1.09	-1.27	-1.29
Chemokine	C-C motif chemokine 19-4	2.36	2.51	2.13	1.45	1.81	1.21	1.42	-1.14
Chemokine	C-X-C motif chemokine 10	2.29	1.61	2.37	1.63	1.04	1.26	1.66	-1.02
Chemokine	CC chemokine	1.25	1.19	1.00	2.67	5.24	2.48	1.97	-1.36
Chemokine	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	1.50	-2.31	-1.84	-2.00	5.21	1.30	-1.68	-1.88
Chemokine	C-X-C motif chemokine 13	1.83	1.84	1.07	1.98	4.39	1.97	2.71	3.25
Cytokine	IL17 D-1	2.65	3.34	2.16	3.20	-1.08	-2.78	1.49	2.18
Dendritic cells	NatTECTIN	1.00	-2.70	1.00	1.05	8.13	2.99	15.72	1.08
Effector	Cathelicidin antimicrobial peptide	5.70	1.36	1.51	2.88	2.43	1.58	1.41	1.50
Effector	Perforin	1.34	-1.62	1.33	-1.38	9.68	2.22	31.92	1.14
Eicosanoid	Prostaglandin D synthase	1.00	1.00	1.00	-1.25	12.89	2.87	24.57	-1.17
Eicosanoid	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating	1.66	1.01	1.23	-1.21	6.18	1.91	1.88	1.14
Innate antiviral response	IFN-induced 44	3.11	2.04	1.23	-2.38	-1.04	-1.12	1.61	-2.67
Innate antiviral response	Stat 1	2.47	2.12	2.83	-1.05	1.13	1.39	1.93	-1.27
Innate antiviral response	Interferon-induced protein 44-1	2.22	2.43	2.55	-1.05	1.10	2.00	2.67	-1.14
Protease	Matrix metalloproteinase-9	1.10	-1.83	-1.67	-3.05	4.44	1.31	-1.70	-1.76
Protease	Collagenase 3	-1.09	-1.23	-1.18	-1.98	4.16	1.45	-1.41	-1.70
Protease	MMP 13 or Collagenase 3	-1.24	-1.44	-1.51	-1.53	4.12	1.43	-1.51	-1.64
Chemokine	C-X-C chemokine 9	3.29	1.69	1.00	1.21	1.01	-1.15	1.11	-1.52
T cell	TCR-gamma constant region 2	3.03	1.38	2.13	1.55	2.48	1.37	1.78	1.15
T cell	TCR-gamma constant region 5	3.01	2.70	1.82	1.31	3.85	1.64	2.60	1.30

Figur 18 Eksempler på immungener som uttrykkes ulikt i parr og smolt. Data vist er ratio mellom ferskvann (parr) og sjøvann (smolt).



Figur 19 Sammenligning av parr og smolt ved grupper av immungener med koordinert uttrykk. Data vist er gjennomsnitt log₂- (ekspresjonsratio).

Studien viste at immunsuppresjon under smoltifisering og etter sjøvannsoverføring ikke alltid skjer, eller i det minste ikke dekker alle immunfunksjoner og signalveier (pathways). Årsaken til forskjellen

mellom studiene er ikke kjent, det kan være relatert til genetisk bakgrunn på laksen, driftsmessige forhold, miljøforhold og andre faktorer. Et viktig funn i denne studien var raskere immunresponser mot HSMB i parr. Forsøksdesignet gir ikke mulighet for å konkludere om klare årsaksforhold. Imidlertid vil en hurtigere aktivering av medfødte antivirale - og B-celle responser åpenbart kunne være fordelaktig i forhold til å bekjempe virusinfeksjonen.

5.2.5 Immunitet i smolt og prestasjon i sjø

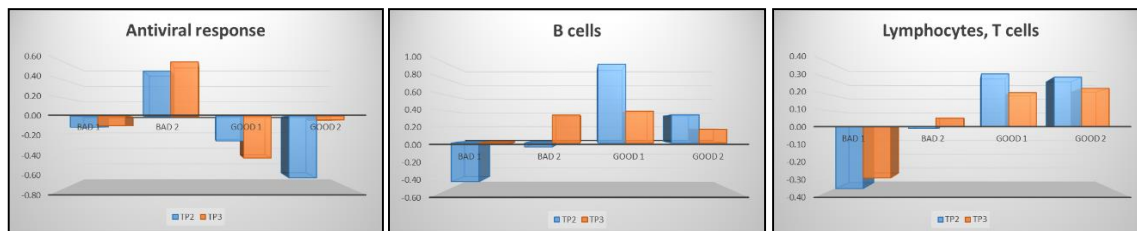
Med resultater som viser at immunforsvaret og responser mot patogener undertrykkes ved smoltifisering og etter sjøvannsoverføring, stilte vi spørsmål om immunstatusen til smolt påvirker deres prestasjoner i sjø. Studien ble utført i samarbeid med Patogen Analyse AS. Patogen mottar gjelleprøver fra industrien for vurdering av smoltifisering med SmoltTimer, en analysemetode som de har utviklet. Vanligvis inkluderer disse prøvesettene tre tidspunkter: ved start av lysstimuleringen, i midtperioden og ved slutten av lysstimuleringen, kort tid før overføring til sjø. Suksess i sjøfasen blir evaluert ved dødelighet og fôrfaktor. Patogen har en prøvebank (langtidslagrede prøver). Dette gjør det mulig å velge grupper av laks som har vist høy og lav ytelse i sjø (for enkelhets skyld kaller vi dem "gode" - G og "dårlige" - D), og undersøke de lagrede prøvene for å søke etter faktorer som kan være avgjørende for suksess i sjøfasen. Vi utførte to sett av analyser som tok sikte på sammenligning av immunparametere i laks som viste forskjellige resultater i sjøfasen.

Det første settet inkluderte to G og to D grupper. Første tidspunkt ble brukt som en referanse og microarrayanalyser ble kjørt med prøver fra presmolt og smolt. En rekke immungener viste forskjeller med høyere ekspresjon i enten G eller D (figur 20).

Role	Gene	TP2	TP3
Cytokine	Interleukin 22	4.10	5.53
Effector	Inducible nitric oxide synthase	2.33	4.13
TNF-related	TNF decoy receptor	1.47	2.91
Effector	Myeloperoxidase	0.83	2.91
Chemokine	CCL4-like chemokine	2.47	2.67
T cell	TCR-gamma constant region 2	1.27	2.58
Dendritic cells	C-type lectin domain family 4 member E	1.62	2.54
Effector	Myeloperoxidase precursor	-1.12	2.18
B cells	Ig kappa chain V-IV region JI precursor	1.81	2.14
T cell	T-cell activation Rho GTPase	1.36	2.11
Antigen presentation	MHC class II alpha	1.51	2.10
Effector	Antimicrobial peptide NK-lysin precursor	1.98	2.07
Lymphocyte	Tyrosine-protein kinase SYK	1.25	2.03
Effector	Complement component 9	2.11	1.78
Antigen presentation	MHC class I heavy chain precursor	2.26	-9.49
Protease	Matrix metalloproteinase-9	-1.40	-5.48
Chemokine	C-X-C motif chemokine 10 precursor	-2.70	-3.80
Lectin	C-type lectin domain family 4 member E	1.04	-3.60
Acute phase	Serum amyloid A	1.36	-3.59
Innate antiviral response	Viperin	0.30	-3.40
Lectin	Mannose-binding protein C precursor	-1.16	-3.11
Acute phase	TNF alpha induced protein 9 STEAP4	1.11	-3.05
Chemokine	C-C motif chemokine 13 precursor	1.34	-2.72
Effector	cathelicidin antimicrobial peptide	1.29	-2.63
Platelet	CD81 antigen	-1.34	-2.58
Innate antiviral response	Ubiquitin-like protein-1	-2.66	-2.33
protease	Collagenase 3 precursor	1.12	-2.29
Complement	Complement C1q-like protein 4	-1.88	-2.24
Lectin	Rhamnose binding lectin STL2	-2.95	-2.22
transducer	Tyrosine-protein kinase Lyn	-1.16	-2.22
protease	MMP 13 or Collagenase 3	1.20	-2.22
Innate antiviral response	VHSV-induced protein-1	-1.47	-2.21

Figur 20 Eksempler på immungener med ekspresjonsforskjeller i laks med god og dårlig prestasjon i sjø: første analysesett. Data viser ratio av gode (G) og dårlige (D) på to tidspunkt, der første tidspunkt er brukt som referanse.

Suksessfaktoren kan åpenbart ikke avgjøres i forhold til høy eller lav immunstatus, og det er neppe mulig å trekke noen konklusjoner fra listen over enkeltgener. Trender kan bedre sees fra de funksjonelle gruppene av immungener (Figur 21). Begge G gruppene viste tendens til lavere ekspresjon av gener som tilhører medfødt antiviral immunitet, men i G2 nådde ekspresjonen startnivå ved slutten av smoltifiseringen. B2 var karakterisert med høyere aktivitet i denne gruppen. En tendens til høyere aktivitet av B-celler ble sett i begge G grupper, men forskjellen var liten ved siste tidspunkt. Uttrykket av T-cellespesifikke gener var gjennomgående høyere i laks som viste gode resultater i sjøen.

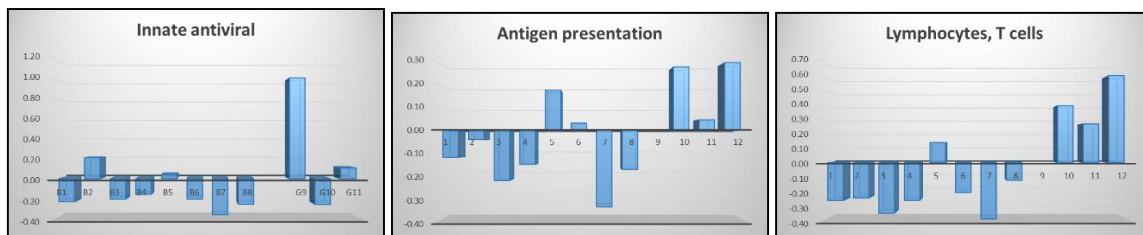


Figur 21 a, b og c Sammenligning av laks med god og dårlig respons i sjø ved grupper av immungener med koordinert uttrykk; første analysesett. Data viser gjennomsnittlig log₂- (Ekspresjonsratio).

Pilotstudien demonstrerte godt de mulighetene man har til å finne forskjeller mellom laks med høy og lav ytelse ved bruk av microarrayanalyser. Det var imidlertid klart at sammenligning av bare fire grupper ikke var tilstrekkelig til å trekke noen endelige konklusjoner. Dessuten viste mange gener større forskjell mellom gruppene enn mellom god og dårlig smolt. Derfor bestemte vi oss for å undersøke et sett til av prøver med et større antall og et større mangfold av grupper. Åtte D-grupper hadde, i tillegg til dødelighet og dårlig fôrutnyttelse, også andre problemer så som ufullstendig smoltifisering, IPN, HSMB og *Moritella*. En av de tre G-gruppene hadde høye nivåer av PRV i ferskvannsfasen, noe som imidlertid ikke hadde negativ virkning på ytelsen i sjøen. Denne gang ble kun smolt som var klar for sjøvannsoverføring inkludert i analysene. I og med at mangfoldet var mye høyere i dette materialet, var det ikke så rart at et mindre antall gener viste signifikante forskjeller mellom G og D-grupper, men denne gangen viste de fleste genene høyere uttrykk i G og deres funksjonelle slektskap ble bedre synliggjort (figur 22). Høyere uttrykk av VRG skyldtes en PRV-infisert G-gruppe (figur 23); selv etter å ha beregnet gjennomsnitt var den fortsatt signifikant forskjellig fra D. Omtrent halvparten av genene er spesifikke for lymfocytter og T-celler og denne gruppen gener viste gjennomgående høyere uttrykk i god smolt. Selv om immungener med betydelige ekspresjonsforskjeller mellom G og D ble funnet i begge settene, var sammensetningen av disse listene forskjellige.

Role	Gene	G/B
Antigen presentation	TAP2b	2.0
Chemokine	C-C motif chemokine 8	2.0
Effector	Complement component 9, Perforin-1	2.1
Effector	Lysozyme g	1.7
Effector	inducible nitric oxide synthase	-2.2
Effector	Ornithine decarboxylase 1	-2.2
Eicosanoid	Arachidonate 5-lipoxygenase	2.0
Innate antiviral response	Viperin	2.2
Innate antiviral response	Very large inducible GTPase 1-1	2.0
Innate antiviral response	Interferon-induced protein 44	1.9
Innate antiviral response	Barrier-to-autointegration factor	1.9
Innate antiviral response	Stat 1	1.7
Lymphocyte	SH2 domain-containing protein 1A	1.8
Lymphocyte	Hematopoietic adaptor SH3 and SAM	1.8
Lymphocyte	Plastin-2	1.8
Lymphocyte	Kinase C delta type	1.7
T cell	T-cell antigen receptor	2.0
T cell	TCR-gamma constant region 5	1.9
T cell	CD3epsilon	1.9
T cell	CD28 T-cell-specific surface glycoprotein	1.8
T cell	T cell receptor alpha chain	1.8
T cell	T-cell activation Rho GTPase-activating protein	1.8
T cell	T-cell receptor beta chain	1.7
T cell	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK	1.7
Protease	Matrix metalloproteinase-9	-1.9

Figur 22 Immungener med ekspresjonsforskjeller i laks med høy og lav prestasjon i sjø: andre prøvesett.



Figur 23 Sammenligning av laks med høy og lav prestasjon i sjø ved immungener med koordinert ekspresjon: andre prøvesett. Data vist er gjennomsnittlig log₂-(ekspresjon ratio).

Oppsummert har vi vist at det er forskjeller i uttrykk av immungener ved sammenligning av smolt med gode og dårlige prestasjoner i sjø, men resultatene varierer avhengig av sammensetningen av prøvesettene. Ulike deler av immunsystemet kan være viktig i denne sammenheng, avhengig av situasjonen og problemene som fisken møter. Totalt sett kan vi ikke gjennom disse studiene dokumentere at immunstatus alene er en avgjørende faktor for suksess etter overføring til sjø.

5.3 Arbeidspakke 2: Risikofaktorer for IPN-utbrudd og dødelighet ved IPN-utbrudd

Målet med denne arbeidspakken er å undersøke sammenhenger mellom IPN-status og infeksjon med PRV og utbrudd av HSMB på laks i sjøfasen, samt at validere helsemarkørene som ble identifisert i AP1 i prøver fra felt.

Endringer i arbeidspakken:

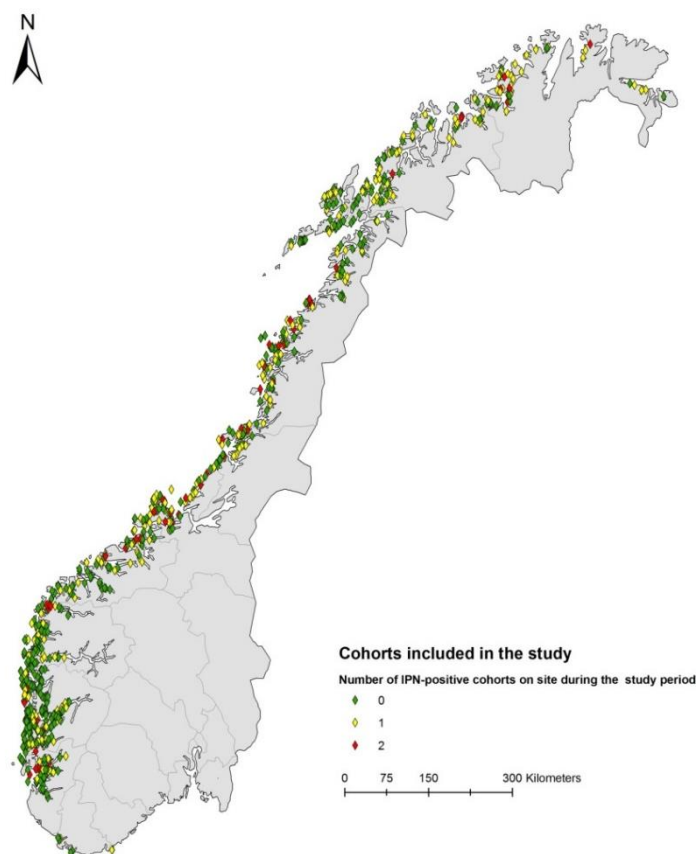
Denne arbeidspakken var opprinnelig tenkt som et feltstudie, der 30 lokaliteter skulle velges ut fra Havbruksregisteret, og prøvetas 6 ganger i løpet av perioden fra sjøsetting til slakt. Det skulle tas ut 30 fisk per prøvetaking, som skulle sjekkes for IPNV og PRV. Disse prøvene skulle også brukes til validering

av helsemarkører identifisert i AP1. I forbindelse med planlegging av prøvetakingen, fant vi ut at det ville være mer kostnadseffektivt å benytte allerede innsamlede data og prøver, idet vi mente dette ville kunne besvare de stilte spørsmål. Anvendt data og analyser samt resultater er beskrevet under for hver av tre underdeler av AP2.

Målet med denne delen av arbeidspakke 2 var å undersøke risikofaktorer for utbrudd av IPN i matfiskanlegg og å kvantifisere dødeligheten i de første 6 månedene i sjø. Dette studiet er også beskrevet i en vitenskapelig artikkel som er publisert i Diseases of Aquatic Organisms (http://www.int-res.com/articles/dao_oa/d114p177.pdf). For en mer detaljert beskrivelse av metoder osv henvises til denne artikkelen.

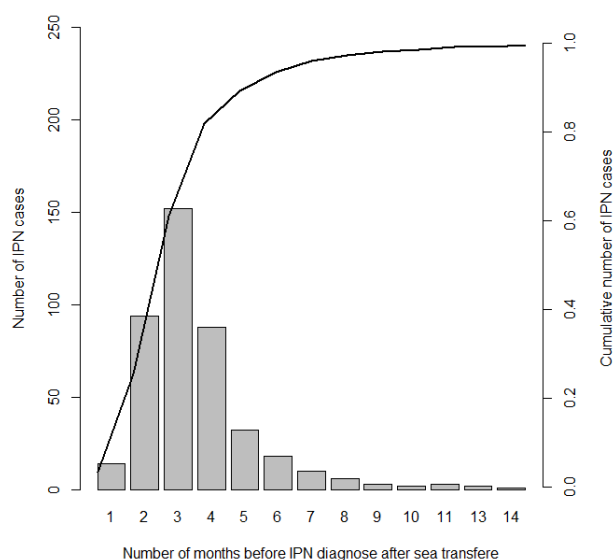
5.3.1 Studiedesign

Til dette brukte vi et datasett med informasjoner om alle kohorter av Atlantisk laks og regnbueørret satt i sjøen i 2009-2012. Informasjon om produksjonsparametere fikk vi fra Fiskeridirektoratet og Mattilsynet sine databaser. Informasjon om IPN og andre sykdommer i kohortene fikk vi fra VI sitt journalsystem. Kohortene ble delt inn i kasus og kontroller: Kasus var alle kohorter som hadde fått IPN-diagnose enten ved histopatologi eller PCR, basert på prøver sendt inn til VI for sykdomsutredning. Kontroller var alle de kohortene som ikke hadde fått IPN diagnose i løpet av tiden i sjø. Fordi vi inkluderte fisk satt ut over en fireårs-periode, hadde matfisklokalitetene oftest mer enn en kohort inkludert. Et kart over lokaliteter som var inkludert og antallet av IPN-positive kohorter på hver lokalitet kan sees i figur 24.



Figur 24 Kart over alle 1169 kohorter inkludert i studiet. Kohortene er plassert på 756 unike lokaliteter, hvor 336 hadde minst ett tilfelle av IPN i perioden 2009-2012 (gule og røde prikker). 137 av lokalitetene markert med gult (1 IPN tilfelle) eller rødt (2 IPN tilfeller) hadde også en kohort uten IPN i studieperioden.

Dødelighet per måned for hver kohort fikk vi fra Mattilsynet sin database. Ut i fra figur 25 kan en se, at 93,3 % av IPN-utbruddene skjedde innenfor de første 6 måneder etter sjøsetting. Derfor brukte vi kumulativ dødelighet i de første 6 måneder som responsvariabel i analysene om dødelighet.



Figur 25 Grå stolper viser antallet av IPN kasus per måned etter sjøsetting. Den sorte linjen viser den kumulative prosentvise dødeligheten per måned. 93,6 % av alle tilfeller skjedde i løpet av de første 6 måneder etter sjøsetting.

De faktorer som ble testet som mulige forklaringsvariabler for dødelighet kan sees i tabell 2, inklusive antall kohorter og gjennomsnittlig dødelighet for hvert nivå av variabelen. For flere detaljer om variablene henvises til vitenskapelig artikkel.

Tabell 2 Faktorer testet som mulige forklaringsvariabler for dødelighet. Inklusive antall kohorter og gjennomsnittlige dødelighet for hvert nivå av variabelen.

	Gjennomsnitt (standard-avvik i parentes)	80% interval	Nivåer (intervaller for kontinuerte variable basert på kvartiler)	Gjennomsnittlig dødelighet i de første 6 mdr for ulike nivåer (%)	80 % intervall for gj.snittlig dødelighet (%)
IPN i de første 6 mdr	Nei: 771 Ja: 398			6,0 14,0	1,2 – 12,8 3,9 – 28,4
Kohort type	Vår: 649 Høst: 520			10,9 5,9	2,3 – 23,2 1,1 – 12,9
Temperatur ved sjøsetting (°C)	9,3 (3,5)	5,0 – 14,3	< 6,7 6,7 – 8,9 8,9 – 12,0 > 12,0	11,8 9,7 7,9 5,4	2,5 – 24,9 2,1 – 19,4 1,1 – 18,8 1,3 – 11,6
Temperatur-forskjell mellom måned 1 og 6 (°C)	-0,8 (6,5)	-9,3 – 7,6	< -6,9 -6,9 – 0 0 – 5,0 > 5,0	5,5 7,5 9,5 12,1	1,2 – 11,6 1,1 – 17,3 2,2 – 19,3 2,5 – 26,7
År	2009: 287 2010: 295 2011: 297 2012: 290			10,1 10,4 8,1 6,2	1,9 – 19,3 2,1 – 24,8 1,5 – 17,4 1,1 – 13,9
HSMB i de første 6 mdr	Nei: 1043 Ja: 126			8,3 11,6	1,4 – 18,1 2,8 – 24,8
Infeksjons-press (1/km)	0,11 (0,08)	0,008 – 0,22	< 0,04 0,04 – 0,10 0,10 – 0,22 > 0,22	8,0 8,3 8,6 10,0	1,0 – 17,9 1,4 – 19,6 1,7 – 17,5 2,0 – 22,2
Maksimum tetthet (1/m ³)	9,2 (4,6)	4,2 – 14,9	< 5,3 5,3 – 8,4 8,4 – 11,7 > 11,7	6,6 8,1 10,0 9,9	1,0 – 14,7 1,7 – 16,8 2,0 – 22,7 1,7 – 22,2
Kohort størrelse (10 ³)	882 (516)	303 – 1576	< 507 507 – 806 806 – 1144 >1144	7,4 8,6 9,1 9,7	1,1 – 16,2 1,7 – 19,0 1,7 – 18,0 1,7 – 22,8
PD i de første 6 mdr	Nei: 1095 Ja: 74			8,5 11,6	1,5 – 18,8 2,4 – 23,2
Vekt ved sjøsetting (gram)	114 (38)	73 – 165	< 87 87 – 107 107 – 133 > 133	9,9 8,6 8,2 8,1	1,7 – 22,8 1,6 – 19,4 1,5 – 16,6 1,5 – 17,0
Art	Laks: 1086 Regnbue-ørret: 83			8,9 6,3	1,5 – 19,6 1,7 – 13,2
Geo indeks (se tekst)	10,6 (7,9)	2,7 – 21,3	< 3,5 3,5 – 8,67 8,67 – 16,7 >16,7	7,4 8,7 10,1 8,6	1,3 – 17,2 1,6 – 18,2 1,6 – 23,4 1,7 – 17,3
IPN innenfor de siste 2 år	Nei: 948 Ja: 221			8,4 9,9	1,4 – 18,2 1,7 – 21,6

For noen av kohortene klarte vi å finne ut om de hadde brukt IPN-resistent smolt («QTL-smolt») eller ikke, ved å samle inn data fra Aquagen AS. Andelen av QTL-smolt i kohortene var ikke tilgjengelig, så vi definerte en kohorte som QTL+ om den hadde fått smolt fra minst ett QTL+ settefiskanlegg, og QTL- om den ikke hadde fått smolt fra sånne anlegg. Derved ble 13 av 264 kohorter definert som QTL+ i 2010, 25 av 178 i 2011 og 4 av 45 i 2012.

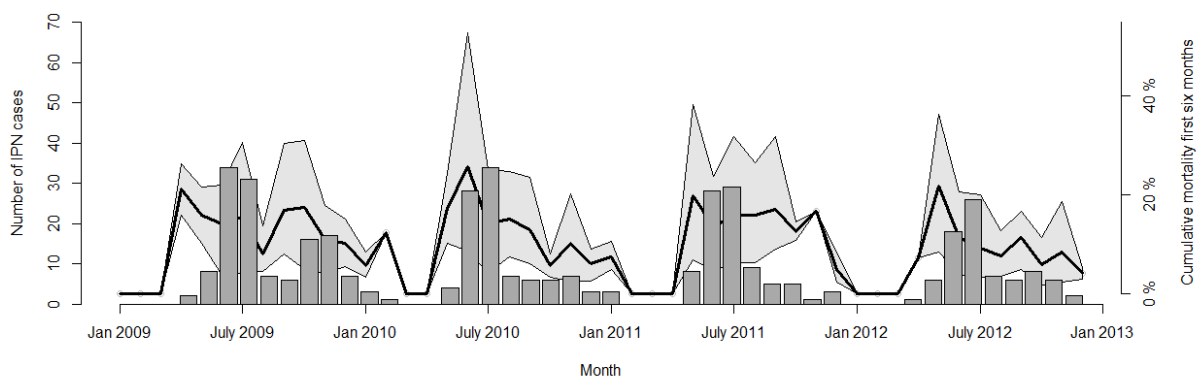
Via et spørreskjema fikk vi informasjon om hvilke settefiskanlegg som hadde levert smolten for 187 kohorter som ble satt i sjø i 2010-2012. Vi brukte listen over antall IPN-tilfeller til å finne ut hvilke settefiskanlegg som hadde klinisk IPN diagnose. Om en kohort hadde mottatt smolt fra minst ett settefiskanlegg med klinisk IPN, ble den klassifisert som «IPN i settefiskfasen: positiv», mens kohorter som ikke hadde mottatt smolt fra noen settefiskanlegg med klinisk IPN ble klassifisert som «IPN i settefiskfasen: negativ».

Vi brukte en multivariabel logistisk regresjonsanalyse for å teste forskjellene mellom kasus og kontroll kohorter. Totalt ble det inkludert 398 kasus og 771 kontroll kohorter. Et 95 % sikkerhetsnivå ble brukt, og odds ratioer ble beregnet for hver av de signifikante variablene når den endelige modellen var klar.

Ut i fra den endelige modellen, ble det beregnet en predikert sannsynlighet for IPN (\hat{y}) for de kohortene hvor vi hadde ekstra informasjon om bruk av IPN-resistent smolt, antall settefiskleverandører eller IPN i settefiskfasen som beskrevet over. Denne \hat{y} ble deretter brukt i en semi univariat logistisk regresjons modell som estimerte sannsynligheten fro IPN for hver enkelt kohort. På samme vis brukte vi den endelige modellen for mortalitet til å regne ut en predikert mortalitet (\hat{m}_i) for hver av kohortene med ekstra informasjon, og brukte dette i en modell der mortaliteten som følge av den ekstra risikofaktoren ble beregnet.

5.3.2 Resultater

Antall månedlige IPN registreringer varierte fra 0 til 34. De fleste registreringer skjedde i sommermånedene. Den kumulerte dødeligheten i de første 6 måneder i sjø varierte fra 3,9 % til 28,4 %, med et gjennomsnitt på 14,0 %. Det var en tendens til at dødeligheten toppet i sommer månedene, i likhet med antall registreringer (figur 26).



Figur 26 Stolpene viser antall IPN registreringer per måned. Linjen og det tilhørende grå området viser gjennomsnittlig og 10 % og 90 % dødelighet i de første 6 måneder i sjø for IPN kasus.

Følgende risikofaktorer var signifikante for å øke sannsynligheten for IPN i en kohort (mest betydende først): Økende størrelse på kohorten, kohorttype (vår/smolt), år, art, minkende temperatur ved sjøsetting, økende infeksjonspress, IPN på samme lokalitet innenfor de foregående to år og minkende gjennomsnittsvekt med sjøsetting (tabell 3). For hver øking av kohortstørrelsen på 516 000 fisk, økte sannsynligheten for IPN med 1,62. For en temperaturøkning på 3,5°C over 9,3°C, minket oddsen for IPN med 0,68. På tilsvarende vis, reduserte gjennomsnittsvekt over 114 gram ved sjøsetting oddsen for å få IPN.

Tabell 3 Parameter estimater og p-verdier fra den multivariable logistiske regresjonen, som modellerer sannsynligheten for IPN. KI: Konfidens intervall.

Variabel	Standardisert koeffisient estimat	SE	p	Odds ratio (95 % KI)
Intercept	-0,24	0,14	0,081	
Kohort størrelse	0,49	0,07	<0,001	1,62 (1,41 – 1,87)
Kohort type = vår	0,50	0,10	<0,001	1,65 (1,37 – 1,99)
År (2009)	0			*
2010	-0,74	0,20	<0,001	
2011	-0,96	0,20	<0,001	
2012	-0,94	0,21	<0,001	
Art=laks	0,46	0,14	<0,001	1,59 (1,21 – 2,08)
Temperatur ved sjøsetting	-0,38	0,10	<0,001	0,68 (0,56 – 0,83)
Infeksjonspress	0,27	0,07	<0,001	1,31 (1,13 – 1,51)
IPN de siste 2 år	0,22	0,07	0,001	1,25 (1,09 – 1,43)
Vekt ved sjøsetting	-0,20	0,07	0,007	0,81 (0,71 – 0,95)

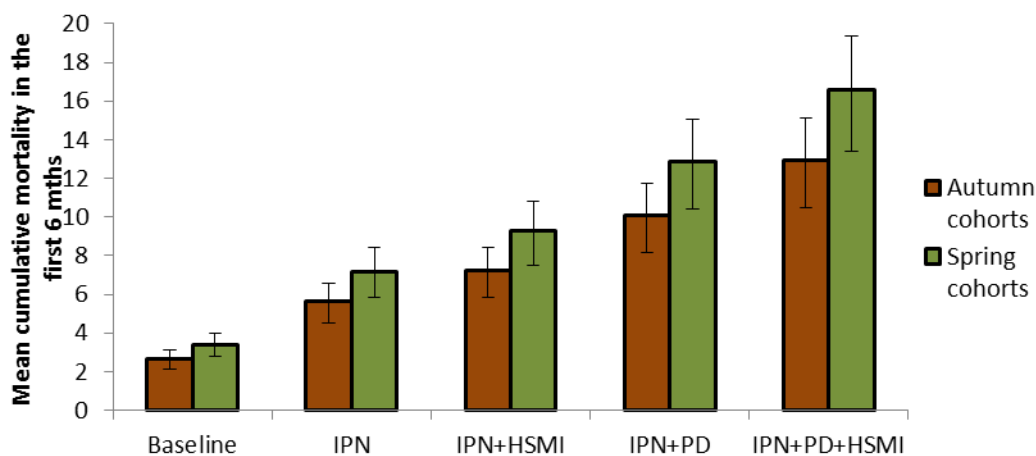
*År er en faktor, derfor blir ikke OR beregnet for denne variabelen.

Følgende risikofaktorer var signifikante for å øke den prosentvise dødeligheten de første 6 månedene i sjø (rangert etter betydning): IPN i de første 6 månedene, år, PD de første 6 månedene, temperatur ved sjøsetting, kohorttype, HSMB de første 6 månedene og vekt ved sjøsetting (tabell 4). Likesom for sannsynligheten for IPN, gav økende temperatur og høyere vekt ved sjøsetting lavere kumulert dødelighet. Dødeligheten minket generelt over årene, med lavest gjennomsnittlig dødelighet i 2012. Vårsmolt hadde høyere dødelighet enn høstsmolt (10,9 % vs. 5,9 %).

Tabell 4 Parameter estimater og p-verdier fra den multivariable modell av kumulativ dødelighet de første 6 månedene i sjø.

Variabel	Standardisert koeffisient estimat	SE	P
Intercept	-2,77	0,05	<0,001
IPN de første 6 mdr	0,35	0,03	<0,001
År (2009)	0		
2010	0,06	0,07	0,388
2011	-0,18	0,07	0,008
2012	-0,43	0,07	<0,001
PD de første 6 mdr	0,14	0,02	<0,001
Temperatur ved sjøsetting	-0,14	0,03	<0,001
Kohort type = vår	0,12	0,03	<0,001
HSMB de første 6 mdr	0,08	0,02	0,002
Vekt ved sjøsetting	-0,07	0,02	<0,001

I figur 26 illustreres det hvordan den gjennomsnittlige dødeligheten de første 6 månedene varierer ved ulike scenarier: Et «baseline» scenarie for kohorter uten sykdom, «IPN» for kohorter med bare IPN, «IPN+HSMI» for kohorter med begge disse sykdommene, «IPN+PD» for kohorter med begge disse sykdommene, og «IPN+PD+HSMI» for kohorter med alle tre sykdommer:



Figur 26 Gjennomsnittlig kumulativ dødelighet for de første 6 månedene i sjø for vår og høstsmolt under ulike scenarier. I alle scenariene var vekt ved sjøsetting satt til medianen (107g), og temperatur ved sjøsetting var 9.3°C (median). Variasjonslinjene viser hhv 10 % og 90 % temperatur ved sjøsetting. År=2012.

Fra analysen av om noen av de ekstra risikofaktorene hadde innflytelse på sannsynligheten for IPN eller den kumulerte dødeligheten fant vi at det bare var om det hadde vært IPN i settefiskfasen som hadde innflytelse på dødelighet i de første 6 månedene (de med IPN i settefiskfasen hadde høyere kumulativ dødelighet), mens det ikke var noen effekt av antall settefiskleverandører eller bruk av IPN-resistent smolt på hverken sannsynlighet for IPN eller kumulativ dødelighet.

5.3.4 Diskusjon

Fra disse analysene fant vi at de viktigste risikofaktorene for IPN var størrelse på kohorten (antall fisk på lokaliteten) og om en brukte vårmolt fremfor høstmolt og laks fremfor regnbueørret. Et høyt antall fisk på lokaliteten har også vist seg å øke risikoen for andre sykdommer som CMS og HSMB.

Infeksjonspresset var også en viktig risikofaktor for å få IPN. Med den pågående nedgangen i antall IPN-tilfeller, vil infeksjonspresset lette, hvilket vil føre til enda færre IPN-tilfeller –en er altså inne i en god sirkel. Det enkelte anlegg har altså nytte av sanitering av IPN i omkringliggende anlegg.

I tillegg til at de hadde høyere risiko for å få IPN, så hadde også vårmolt gjennomsnittlig høyere dødelighet i de første 6 månedene i sjø. Dette henger trolig sammen med at IPN primært rammer på sommeren, innenfor de første 6 månedene etter at vårmolten er satt i sjø.

Av figur D sees tydelig effekten av koinfeksjoner på dødeligheten. Det er klart, at en kan redusere effekten av IPN ved å prøve å unngå å bli smittet med andre sykdommer; her er biosikkerhet på lokaliteten alfa og omega.

Fra analysen vår fant vi ikke noen effekt av bruk av IPN-resistent smolt. Dette skyldes trolig for lite data og at vi ikke var i stand til å differensiere mellom anlegg som hadde full dekning av QTL-smolt og de som har en lav andel. Om en hadde mulighet for å analysere på merdnivå, hadde en kunne si med større sikkerhet om det er en effekt av QTL-smolt eller ikke. Vi fant heller ikke noen effekt av bruk av flere settefiskleverandører. Det vi fant var, at om fisken kom fra et settefiskanlegg som hadde hatt klinisk IPN, var dødeligheten høyere enn ellers. Dette antyder, at fisken ikke blir «immun» mot infeksjon i sjøfasen, som noen ellers har foreslått. Det støtter heller opp om teorien at fisken tar med seg infeksjon fra land til sjø, og at sykdommen kan blusse opp igjen når fisken stresses ved sjøsettingen.

Et annet viktig utbytte av den analysen vi har gjort er, at vi har funnet den gjennomsnittlige kumulative dødeligheten for kohorter som har hatt IPN, og de som ikke har hatt IPN. I den univariate analysen fant vi at de med IPN hadde en gjennomsnittlige kumulativ dødelighet på 14,0 %, med et 80 % intervall på 3,9-28,4 %. Til sammenligning var de tilsvarende tallene for kohorter uten IPN hhv 6,0 % og 1,2-12,8 %. Når alle signifikante risikofaktorer ble inkludert, var den gjennomsnittlige dødeligheten for IPN kohorter 7,2 % for vårmolt og 5,6 % for høstmolt, hvilket da var dobbelt så høyt som for kohorter uten sykdommer. Dødeligheten viste seg å være opp til 5 ganger høyere for de kohorter som hadde både PD, HSMB og IPN enn for de som ikke hadde noen av disse sykdommene. Dette viser tydelig, at det er helt nødvendig å inkludere alle signifikante risikofaktorer når en beregner dødelighet.

5.4 Arbeidspakke 2: Infeksjonspunkt for PRV, HSMB inkubasjonsperiode og HSMB-assosiert mortalitet, samt effekten av IPNV og SAV koinfeksjoner

Målet med dette delstudiet var å øke kunnskapen omkring tidspunkt for PRV infeksjon, HSMB inkubasjonsperiode og HSMB-assosiert mortalitet. I tillegg skulle effekten av koinfeksjoner med IPNV og SAV på disse undersøkes.

5.4.1 Studiedesign

Studiet var opprinnelig planlagt som et feltforsøk, men ble i samråd med styringsgruppen erstattet av prøver som var samlet inn for SAV screening og/eller IPNV screening hos Patogen Analyse AS fra lokaliteter beliggende i Midt-Norge. Prøvematerialet besto av hjerteprøver (SAV screening) eller hodenyre (IPNV screening). Innsendt materiale besto av mellom en og ti prøver fra en til fire merder per lokalitet. De innsamlede SAV-screeningprøvene (hjerterevsprøver) ble screenet for PRV av Patogen Analyse AS for dette prosjektet. Det var ikke mulig å benytte prøver av hodenyre (IPNV-screeningprøvene) for PRV screening eller prøver av hjertevev (SAV-screeningprøvene) til IPNV påvisning.

Totalt 42 lokaliteter fra 3 ulike oppdrettsselskaper ble utvalgt for inkludering i prosjektet, basert på følgende kriterier:

- Satt i sjø etter januar 2011.
- V11-V12 generasjon, eller H12-generasjon med påvist HSMB diagnose (HSMB-diagnose var påkrevet for H12-generasjon på grunn av kort tid mellom sjøsetting og opprinnelig prosjektavslutning).
- Har fisk i sjøen (ifølge Havbruksregistret) på tidspunkt for prøveuttak.
- Har tilgjengelige prøver tatt ut før eller på samme tidspunkt som en HSMB-diagnose.

Spørreskjema ble benyttet for å samle inn data fra de inkluderte lokalitetene. Følgende informasjon ble innhentet: påvisning av IPNV i settefiskfasen, påvisning av HSMB, IPN eller andre sykdommer, andel QTL-fisk, andel IPN-vaksinerte fisk og opplysninger om flytting av fisk.

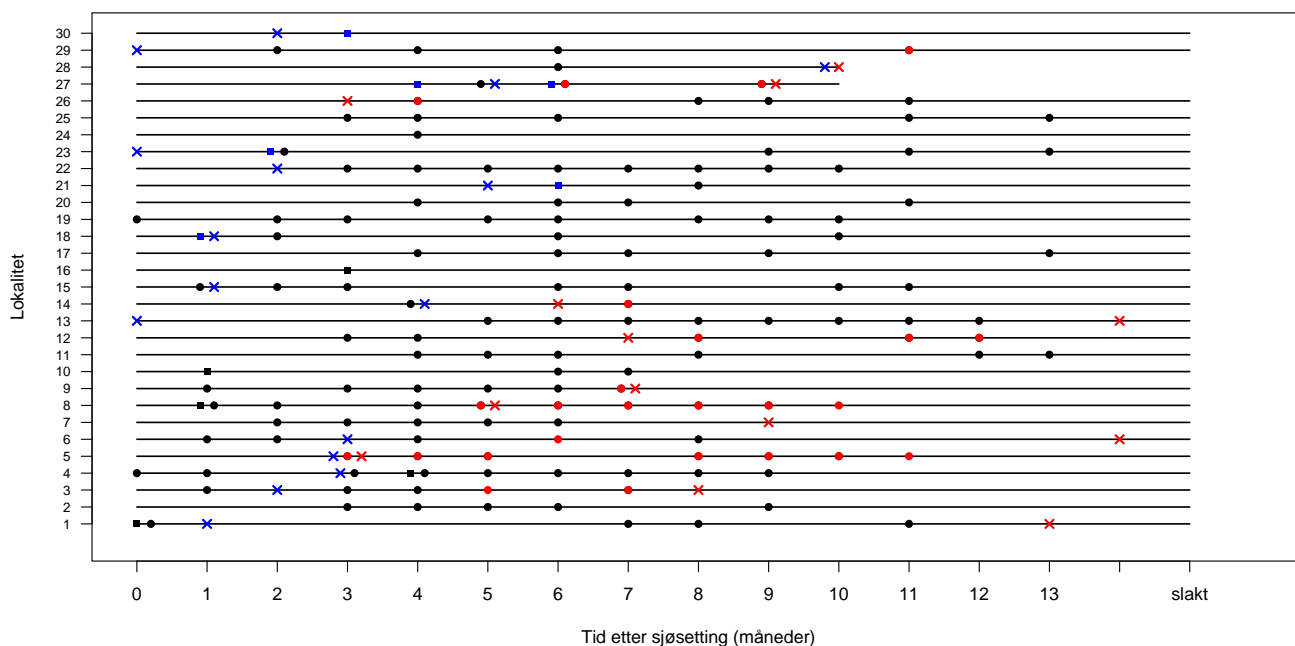
Spørreskjemadata og prøver for PRV analyse eller IPNV screening var tilgjengelig for totalt 33 lokaliteter. To av disse lokalitetene ble ekskludert fordi fisk med HSMB diagnose ble flyttet dit fra en annen studielokalitet. En lokalitet ble ekskludert på grunn av mottak av flyttet fisk 11 måneder etter sjøsetting kombinert med at prøveuttak kun var tilgjengelig ved slakt. Det var dermed totalt 30 lokaliteter som kunne inkluderes i studien. I løpet av studieperioden ble fisk flyttet fra to av de inkluderte lokalitetene 10 måneder etter sjøsetting, men disse kunne likevel inkluderes i studien basert på PRV resultater og sykdomshistorie. Den geografiske fordelingen av lokalitetene er vist i Figur 27.



Figur 27 Kart over inkluderte lokaliteter.

Opplysninger om beholdning og tap på hver lokalitet ble innhentet fra Havbruksdata og var tilgjengelig for 28 av lokalitetene. Sykdomshistorie for hver lokalitet ble sjekket mot VI sin diagnostikkdatabase. I studieperioden var både HSMB og PD meldepliktige sykdommer og informasjonen om disse diagnosene antas å være komplett.

Antall prøveuttak for IPNV og SAV screening, samt tidspunkt for disse, varierte fra lokalitet til lokalitet. Tidspunkt for innsending av screeningprøver, samt resultat av screeninganalysene, er vist i Figur 28, sammen med påvisninger av IPN og PD.



Figur 28 Screeningresultater for IPNV og SAV. Positive IPNV-prøver er vist med blå firkant, positive SAV-prøver med rød prikk, IPN påvisning med blått kryss og PD påvisning med rødt kryss. Negative IPNV-prøver og SAV prøver er vist som henholdsvis sorte firkanter og sorte prikker.

5.4.2 Dataanalyse

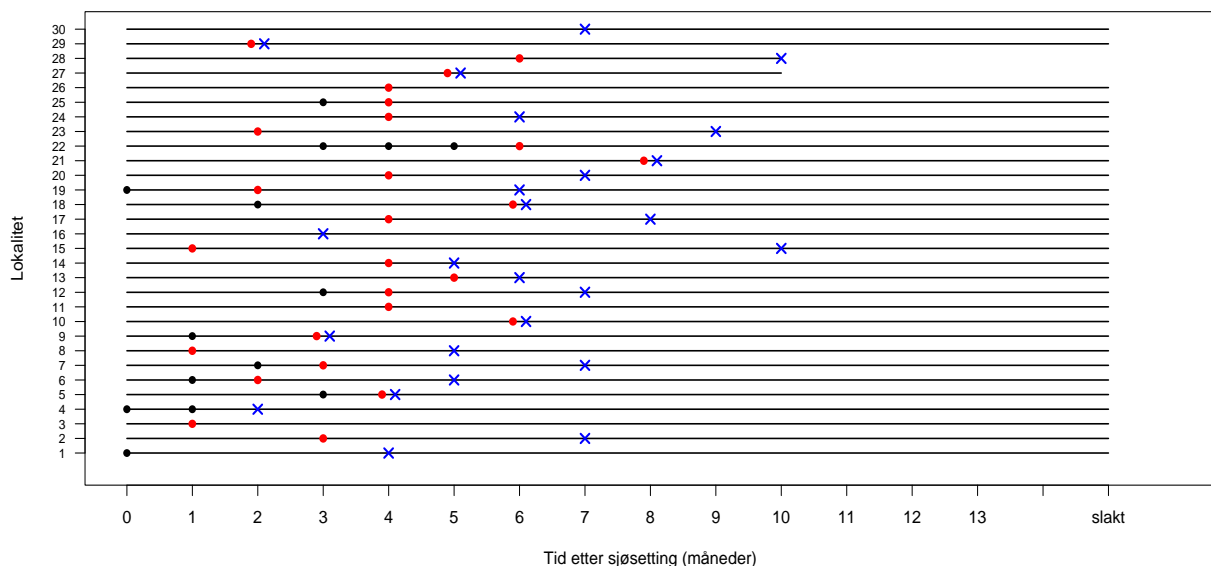
Alle tilgjengelige prøver ble analysert for PRV inntil PRV ble påvist eller lokaliteten fikk en HSMB diagnose. Tidsintervallet mellom PRV påvisning og HSMB diagnose ble kalkulert. For å undersøke effekten av koinfeksjoner på dette tidsintervallet ble ulike sammenligninger benyttet: IPNV-positive vs IPNV-negative lokaliteter, SAV-positive vs SAV-negative lokaliteter og IPNV/SAV-positive vs IPNV/SAV-negative lokaliteter. En IPNV-positiv lokalitet ble her definert som en lokalitet med IPNV-påvisning eller IPN diagnose før eller samme måned som HSMB diagnosen. Tilsvarende ble SAV-positive lokaliteter definert som lokaliteter med SAV-påvisning eller PD diagnose før eller samme måned som HSMB diagnosen. I tillegg ble en kombinasjonskategori definert der IPNV- og/eller SAV-positive lokaliteter ble gruppert. Forskjeller i tidsintervall mellom disse koinfeksjonsgruppene ble evaluert ved hjelp av t-tester.

Kumulativ HSMB-assosiert mortalitet ble kalkulert basert på tapstall fra en måned før HSMB diagnosen til to måneder etter HSMB diagnosen. For HSMB-assosiert mortalitet ble koinfeksjonsstatusen definert for tidsrommet før eller i løpet av HSMB-mortalitetsperioden, altså inntil to måneder etter tidspunktet for en HSMB diagnose. Forskjeller i HSMB-assosiert mortalitet for lokaliteter i de ulike koinfeksjonsgruppene ble igjen evaluert ved hjelp av t-tester.

I samråd med styringsgruppen ble alle resultatene analysert på lokalitetsnivå.

5.4.3 Resultater

Resultatene fra PRV analysene er vist i Figur 29. Gjennomsnittlig tid fra utsett til PRV påvisning var 3,8 måneder, men varierte fra 1 til 8 måneder. Ni lokaliteter hadde PRV-negative prøveuttak mellom 1 og 4 måneder før PRV-påvisning.



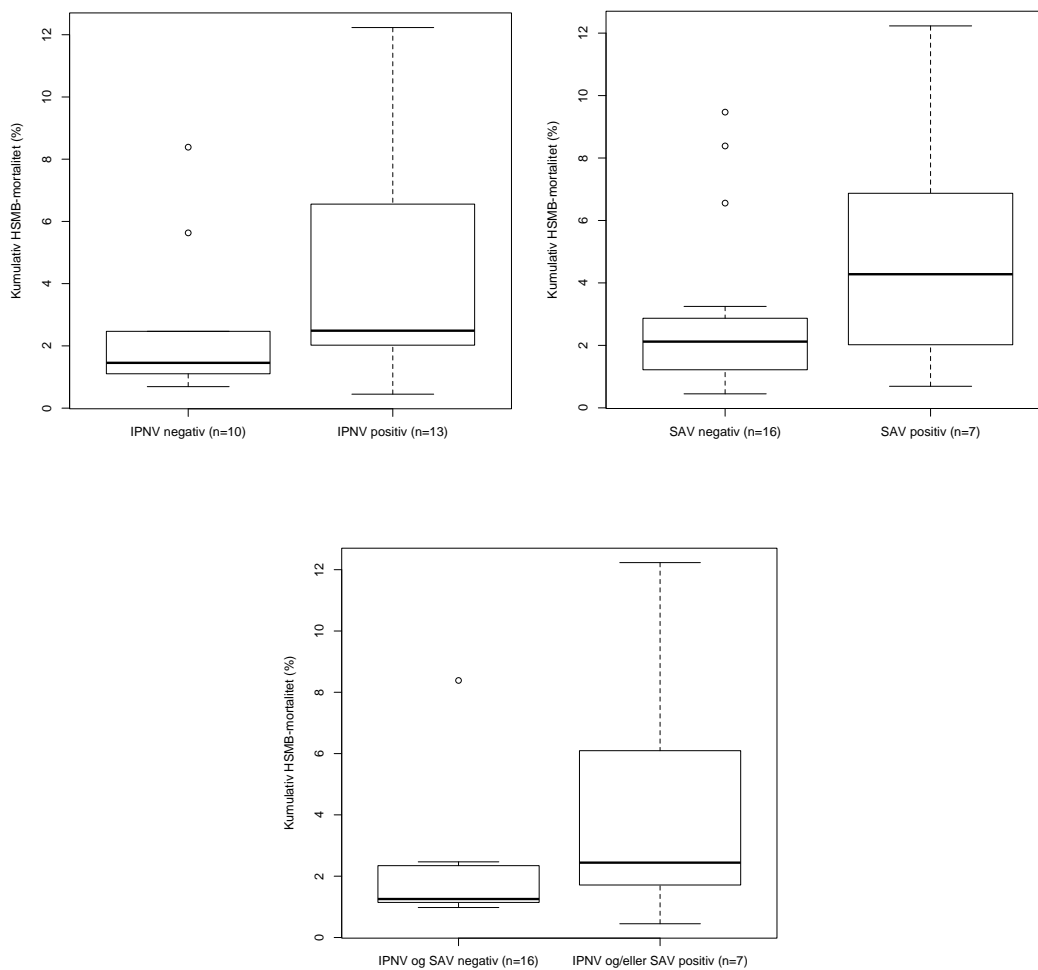
Figur 29 Tidspunkt for PRV-påvisning (rød prikk) og HSMB diagnose (blått kryss), samt tidspunkt for PRV-negative prøver (sort prikk).

Totalt fikk 25 studielokaliteter diagnosen HSMB (Figur 29). Fire av disse hadde ikke PRV påvist før diagnosen (kun to av disse hadde prøveuttak egnet for PRV-analyse før diagnosen). Av de resterende 21 lokalitetene med HSMB fikk 7 PRV påvist samme måned som HSMB diagnosen, mens 14 lokaliteter fikk PRV påvist tidligere. For disse 14 lokalitetene varierte tidsintervallet mellom PRV-påvisning og HSMB diagnose fra 1 til 9 måneder, med et gjennomsnitt på 3,8 måneder. Dette tidsintervallet var ikke signifikant forskjellig mellom de ulike koinfeksjonsgruppene ($p = 0,64$ for IPNV, $p = 0,31$ for SAV og $p = 0,63$ for IPNV/SAV).

Fem PRV-positive lokaliteter, med PRV påvist mellom 1 måned og 6 måneder etter sjøsetting, fikk ikke påvist HSMB i løpet av produksjonsperioden.

Tallgrunnlag for kalkulering av kumulativ HSMB-relatert mortalitet var tilgjengelig i Havbruksregisteret for 23 av de 25 HSMB-positive lokalitetene. Gjennomsnittlig kumulativ HSMB-mortalitet ble estimert til 3,6 %, med en variasjon fra 0,5 % til 12,2 % (median 2,4 %).

Kumulativ HSMB-assosiert mortalitet, fordelt på de ulike koinfeksjonsgruppene, er vist i figur 30. Det var ikke signifikante forskjeller i mortalitetsnivået mellom de ulike gruppene ($p = 0,17$ for IPNV koinfeksjon, $p = 0,26$ for SAV koinfeksjon og $0,25$ for IPNV/SAV koinfeksjon).



Figur 30 Boksploetter av kumulert HSMB-assosiert mortalitet for IPNV koinfeksjon (øverst til venstre), SAV koinfeksjon (øverst til høyre) og IPNV og/eller SAV koinfeksjon (nederst).

5.4.4 Diskusjon

Det har vært noe usikkerhet om hvorvidt "alle" utsett av laks i sjø infiseres med PRV. Funn i dette studiet viser at alle de studerte utsettene enten fikk påvist PRV infeksjon eller fikk en HSMB diagnose. PRV er sterkt assosiert med HSMB, men det er foreløpig ikke bevist at PRV forårsaker HSMB. Det kan dermed ikke fastslås med sikkerhet at de fire lokalitetene i studiet som fikk en HSMB diagnose uten at vi hadde PRV-positive prøver faktisk var PRV infisert. PRV-status for ferskvannsfasen for de studerte fiskegruppene var ikke tilgjengelig og det var dermed ikke mulig å avgjøre om noen av fiskegruppene var PRV-infisert før sjøsetting.

Tidspunkt for PRV påvisning varierte fra 1 måned til 8 måneder etter sjøsetting. I det opprinnelig planlagte feltstudiet skulle lokaliteter prøvetas månedlig fra sjøsetting til PRV påvisning. Overgangen til å benytte allerede innsamlede screeningprøver resulterte i stor variasjon i antall prøveuttak for hver lokalitet, samt i antall prøvetatte individer ved hvert prøveuttak. For de PRV-negative prøveuttakene i denne studien varierte antallet prøvetatte fisk fra 3 til 20, noe som betyr at noen av disse uttakene kan ha blitt feilaktig klassifisert som PRV-negative på grunn av lavt prøveantall. Til tross for usikkerhet rundt

infeksjonstidspunkt viser materialet at PRV-infeksjon var utbredt blant studielokalitetene som var prøvetatt med annen hensikt enn PRV/HSMB-mistanke.

Tidsintervallet mellom PRV-påvisning og HSMB diagnose var gjennomsnittlig 3,8 måneder, med et maksimalt tidsintervall på 9 måneder. På grunn av usikkerheten med hensyn til tidspunkt for PRV-infeksjon har ikke begrepet "inkubasjonstid" blitt benyttet i dette sammendraget, annet enn som referanse til de opprinnelige studiemålsetningene. Tidsintervallet fra PRV-påvisning til HSMB diagnose må dermed anses som et minimum tidsintervall. Det kunne ikke påvises noen effekt av koinfeksjoner med IPNV og/eller SAV på dette tidsintervallet, men det kan ikke utelukkes at det er relatert til feilmålinger av infeksjonstidspunkt eller det relativt lave antallet studielokaliteter. Det er planlagt smittforsøk i regi av Veterinærinstituttet for å undersøke effekten av PRV og SAV koinfeksjon i et annet FHF-finansiert prosjekt (FHF-prosjekt 901001). Her vil både marin SAV2 og SAV3 bli inkludert, og det er antatt at dette vil bidra til å fastsette om de manglende effektene av koinfeksjon funnet i dette studiet er reelle.

Det kunne heller ikke påvises noen effekt av koinfeksjoner på den kumulative, HSMB-assosierte mortaliteten i det tilgjengelige materialet. Det var imidlertid mulig å besvare spørsmålet ved hjelp av et alternativt datasett, da en annen del av denne arbeidspakken benyttet et datasett som inkluderte alle kohorter satt i sjø perioden 2009- 2012. Som vist i figur 26 i seksjon 2.1 øker mortaliteten med antallet koinfeksjoner.

5.5 Arbeidspakke 2: Reaktivering av IPNV i sjø

En av målsettingene med prosjektet var å finne ut om settefisken bærer IPNV med seg ut i sjøen. For å finne ut dette, fikk vi tak i et datasett som inneholdt resultater av screening for IPNV i Marine Harvest sine settefisk- og matanlegg i årene 2010-2011. En del av de viruspositive prøvene har blitt sekvensert, som illustrert i tabell 5.

Tabell 5 Oversikt over antall lokaliteter og fiskegrupper testet, antall IPNV positive lokaliteter og antall prøver sekvensert fra positive prøver fra hhv settefisk- og matfisk lokaliteter.

Settefisk	Antall lokaliteter testet for IPNV	Antall IPNV positive lokaliteter	Antall prøver sekvensert fra positive lokaliteter	Antall fiskegrupper testet for IPNV	Antall IPNV positive fiskegrupper	Antall prøver sekvensert fra positive fiskegrupper
2010	25	14	11	36	25	16
2011	23	12	8	78	30	15
Matfisk						
2010	19	16	14	43	28	25
2011	22	16	3	24	18	3

5.5.1 Studiedesign

For å bestemme om viruset følger fisken fra settefiskanlegg til den marine fase, er det nødvendig å forsikre seg om at en sekvens fra et settefiskanlegg er mer lik den tilsvarende sekvens fra matfisklokaliteten enn til sekvenser fra alle andre settefiskanlegg eller alle andre matfisklokaliteter. På grunn av homologien innenfor norske IPNV-stammer, er det ikke tilstrekkelig og bare vise at en sekvens fra et settefiskanlegg er lik en sekvens fra en matfisklokalitet.

I 11 tilfeller var det sekvenserte prøver tilgjengelig fra samme fiskegruppe fra både settefisk- og matfiskanlegg. Disse prøvene ble derfor parete. For å sammenligne likheten av en sekvens fra et settefiskanlegg og en fra en marin fisk gruppe, ble andelen av mutasjoner innenfor sekvensdeler sekvensert i begge sekvenser beregnet. For hver marin sekvens med en medfølgende settefisksekvens ble andelen av mutasjoner i sekvensene til alle de forskjellige settefiskanlegg beregnet og sortert, slik at sekvensene ble rangert fra lav til høy, etter andelen mutasjoner. For hver matfiskgruppe ble posisjonen av den tilhørende settefisksekvensen i denne rangeringen identifisert og delt på antall ulike proporsjoner av mutasjoner mellom denne marine sekvens og alle settefiskanlegg sekvenser. Slik fant vi kvantilen for hver sekvenspar. En Wilcoxon test ble brukt for å teste om kvantilen for de sammenkoblede sekvensene var mindre enn 0,5, med statistisk signifikans. Likt fordelte kvantiler antas å ha en gjennomsnittlig kvantil på 0,5, mens gjennomsnittskvantiler mindre enn 0,5 indikerer at det er flere likheter mellom sekvenser i et par enn det som kunne forventes ved tilfeldigheter.

Vi ønsket også å teste om det finnes settefiskspesifikke sekvenser, altså sekvenser som går igjen i ulike fiskegrupper på anleggene. Settefiskspesifikke sekvenser kan potensielt representere en "husvariant" av IPN-viruset. For å teste dette, sammenlignet vi om sekvenser fra samme settefiskanlegg var mer like enn alle sekvenser fra settefiskanlegg. Til dette beregnet vi kvantilen av forskjellene mellom den settefiskspesifikke sekvensen og alle andre sekvenser og testet om denne var forskjellig fra en teoretisk kvantil som ble beregnet ut i fra en forutsetning om at det ikke var noen sammenheng. Med en Wilcoxon test, ble det beregnet en p-verdi som indikerer om sekvenser fra samme settefisk anlegg er mer like enn hva en kunne forvente om det ikke var noen sammenheng (for flere detaljer, se vitenskapelig artikkel).

Om det stemmer at det finns settefiskspesifikke sekvenser, vil det også være mulig å sammenligne likheten av en sekvens fra et settefiskanlegg og en fra en marin fisk gruppe, uansett om sekvensen ikke kommer fra akkurat samme fiskegruppe.

I 25 tilfeller fantes det sekvenser fra en eller flere fiskegrupper fra samme anlegg som det som ble levert til matfisklokaliteten. Disse sekvensene kan komme fra fiskegrupper sekvensert før, i samme tidsrom eller etter "vår" fiskegruppen var på settefiskanlegget.

På samme måte som for sammenkoblede sekvenser, fant vi kvantilen fra hver marin fiskegruppe sekvens til den nærmeste tilsvarende settefiskspesifikke sekvens. En Wilcoxon test ble brukt for å teste om hvert av de identifiserte minste kvantilene var signifikant mindre enn q_i :

$$q_i = \frac{1}{n_i + 1}$$

q_i representerer den i gjennomsnitt minste kvantil vi forventer å oppnå når n_i sammenligninger er gjort for hver marine sekvens. Nullhypotesen vi her antar er at det ikke er flere likheter mellom disse sekvensene enn mellom alle andre sekvenser.

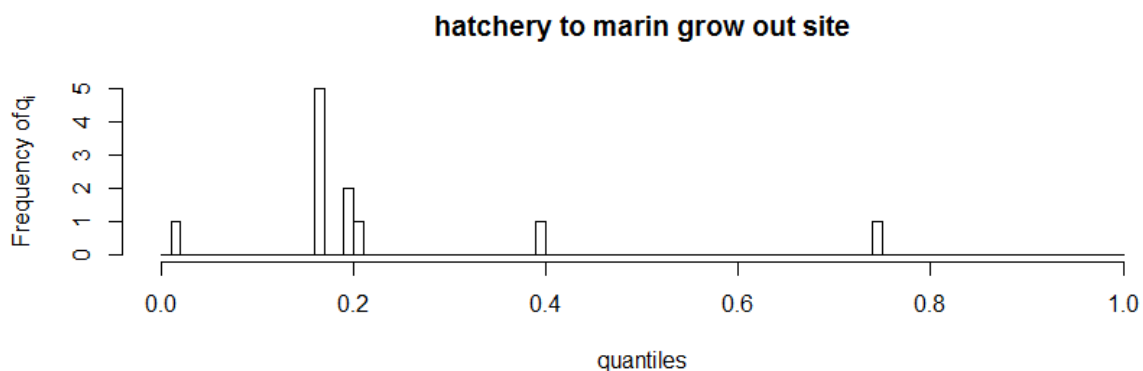
5.5.2 Resultater

En Chi-square test viste, at prevalensen mellom de to årene ikke endret seg hverken i settefisk- eller matfiskanlegg, uansett om det var anlegg eller fiskegruppenivå.

Lengden på den delen av sekvensen som var felles mellom alle settefiskssekvenser og matfisksekvenser varierte mellom 1319 bp og 2908 bp, med en median på 2104bp (5 % og 95 % kvantil: 1882 bp og 2893bp). Andelen av mutasjoner varierte mellom 0 og 0,0126 med en median på 0,0019 (5 % og 95 % kvantil: 0 og 0,0088).

Resultat av test av sekvenser fra samme fiskegruppe fra settefisk- og matfiskanlegg:

11 sekvenspar fra samme fiskegruppe fra settefisk- og matfiskanlegg var sekvensert. Kvantilene for disse parene varierte mellom 0,021 og 0,754 med en median på 0,033 (5 % og 95 % kvantil: 0,024 og 0,524) (figur 31).



Figur 31 Histogram over de ulike kvantiler oppnådd når mutasjonsprosenten for hvert av de 11 parede sekvenser fra same fiskegruppe ble sammenlignet med mutasjonsprosentene for hver marine sekvens med alle settefiskanlegg sekvenser.

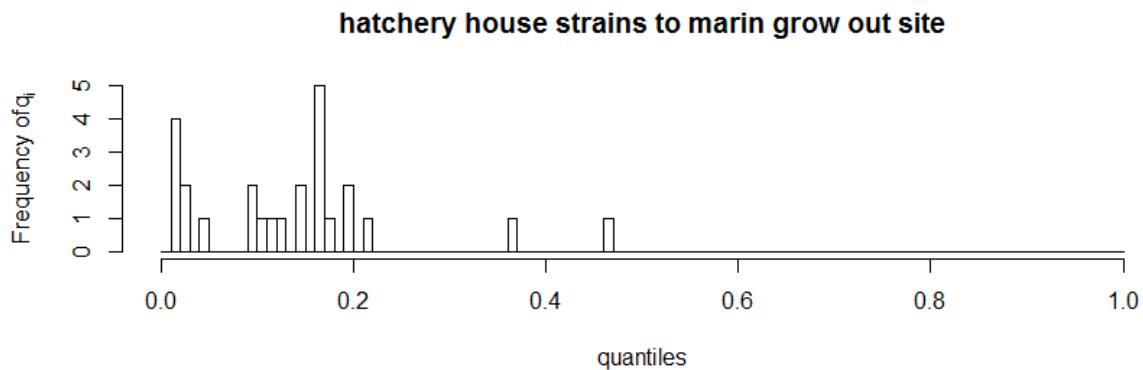
Wilcoxon testen viste, at disse kvantilene var mindre enn 0,5 ($p = 0,003$). Dette betyr, at kvantilene ikke er tilfeldig distribuerte mellom 0 og 1, og derfor er mer like enn vi ellers ville ha forventet. Dette viser med statistisk signifikans at IPN virusisolater følger med fisken fra settefiskanlegg til sjø.

Resultat av test av settefiskspesifikke sekvenser («husstammer» av IPNV):

Mutasjonsprosenten for sekvenser fra same anlegg varierte fra 0 % til 0,94 %, med en median på 0,13 %, og mutasjonsprosenten mellom anlegg varierte fra 0 % til 1,03 % med en median på 0,20 %. Resultatet av Wilcoxon testen var en p-verdi på 0,051, hvilket betyr at like sekvenser blir funnet oftere innom settefiskanlegg enn hva en skulle ha forventet om det ikke var noen sammenheng. På dette viset har vi vist at teorien om at noen settefiskanlegg har sin egen husvariant av IPNV stemmer.

Dette betydde også, at vi kunne inkludere flere sekvenser i våres test av om virus følger fisken fra land til sjø, siden vi kunne pare sekvenser fra matfiskanlegg med sekvenser fra settefiskanlegg, uansett om sistnevnte stammet fra samme fiskegruppe eller ikke. Når vi inkluderte alle settefiskspesifikke sekvenser, fant vi 25 sekvenspar. Antallet av settefiskspesifikke sekvenser for et matfiskanlegg varierte mellom 1 og 7 med en median på 3 (5 % og 95 % kvantil: 1 og 4).

Kvantilen for den laveste andelen av mutasjoner mellom sekvenser fra settefiskanlegget og den spesifikke matfisksekvens varierte mellom 0,014 og 0,538 med en median på 0,033 (5 % og 95 % kvantil: 0,017 og 0,348) (Figur 32).



Figur 32 Histogram over ulike kvantiler oppnådd når mutasjonsprosenten for hvert av de 25 parede sekvenser fra matfisk og tilhørende settefiskanlegg ble sammenlignet med mutasjonsprosentene for hver marine sekvens med alle settefiskanlegg sekvenser.

Wilcoxon testen viste at disse kvantiler var mindre enn de gjennomsnittlig minste kvantilene q_i ($p < 0,001$). Det betyr, at hver matfisksekvens i gjennomsnitt er mer lik sin matchende settefiskspesifikke sekvens enn det kunne forventes om det var tilfeldig, og understøtter resultatet av den første testen vår.

5.5.3 Diskusjon

Det er ofte blitt hevdet at noen settefiskanlegg har deres egne «husstammer» av IPNV, som infiserer hver ny fiskegruppe som blir satt i anlegget. Vi har bevist at dette stemmer. Dette har betydning for kontroll av IPN, da anlegg som har slike husstammer, må gjøre en ekstraordinær innsats for å bli kvit dem og dermed unngå infeksjon av etterfølgende fiskegrupper.

Vi har også vist, med statistisk signifikans, at IPNV følger fisken fra settefiskanlegget til den marine fasen. Dette betyr, at sanitering av IPNV i settefiskfasen, bør redusere antallet IPN-utbrudd i den marine fasen. I de senere årene har en sett en nedgang av IPN-tilfeller i både settefisk- og matfiskanlegg, noe som blir tilskrevet bruk av IPN-resistent smolt og økt fokus på sanitering av settefiskanlegg. Resultatene våre tilsier, at det er mulig å redusere forekomsten av IPN selv om en kanskje ikke har tilgang på IPN-resistent smolt.

5.6 Konklusjon arbeidspakke 2

Ved å benytte allerede innsamlet materiale, har vi fått svar på de fleste av spørsmålene som er stilt i AP2:

- Miljøfaktors innflytelse på sykdomsutvikling:
 - År, temperatur og infeksjonspress er alle faktorer som influerer risikoen for IPN-utbrudd. Temperatur og år har i tillegg innflytelse på akkumulert dødelighet de første 6 mdr i sjø.
- Produksjonsfaktors innflytelse på sykdomsutvikling:

- Størrelse på anlegg, art, bruk av høst eller vårmolt, vekt ved sjøsetting og tidligere IPN-utbrudd er alle faktorer som influerer risikoen for IPN-utbrudd. IPN, PD, HSMB, vekt ved sjøsetting og bruk av vår eller høstsmolt er alle faktorer med betydning for akkumulert dødelighet de første 6 mdr i sjø.
- Sammenhenger mellom HSMB-status og infeksjon med PRV:
 - Funn i dette studiet viser at alle de studerte utsettene enten fikk påvist PRV infeksjon eller fikk en HSMB diagnose.
- Sammenhenger mellom IPN-status og utbrudd av HSMB på laks i sjøfasen:
 - Det ble ikke funnet noen statistisk sammenheng mellom HSMB og utbrudd av IPN. Men det ble vist, at koinfeksjon med IPN og HSMB øker mortaliteten i de første 6 mdr i sjø, sammenlignet med infeksjon med bare IPN.
- Tidspunkt for introduksjon av IPN/PRV:
 - Tidspunkt for PRV påvisning varierte fra 1 måned til 8 måneder etter sjøsetting. Til tross for usikkerhet rundt infeksjonstidspunkt viser materialet at PRV-infeksjon var utbredt blant studielokalitetene som var prøvetatt med annen hensikt enn PRV/HSMB-mistanke.
 - Prøvematerialet viste seg ikke å være egnet til å teste for IPNV. Men analyse av genetiske sekvenser fra settefisk- og tilhørende matfiskanlegg viste at virus kan bæres over fra land til sjø.
- Tidsintervall PRV-påvisning - HSMB:
 - Tidsintervallet mellom PRV-påvisning og HSMB diagnose var gjennomsnittlig 3,8 måneder, med et maksimalt tidsintervall på 9 måneder. På grunn av usikkerheten med hensyn til tidspunkt for PRV-infeksjon må tidsintervallet fra PRV-påvisning til HSMB diagnose anses som et minimum tidsintervall. Det kunne ikke påvises noen effekt av koinfeksjoner med IPNV og/eller SAV på dette tidsintervallet.
- Reaktivering av IPN i sjø:
 - Vi har vist, med statistisk signifikans, at de samme virusisolatene følger fisken fra settefiskanlegg til matfiskanlegg.
- Validering av helsemarkørene som ble identifisert i AP1 (Se avsnitt om AP1).

Ytterligere resultater oppnådd:

- Vi har vist, med statistisk signifikans, at det finnes «husstammer» av IPNV i noen settefiskanlegg.
- Ulike risikofaktorer innflytelse på kumulert dødelighet de første 6 mdr i sjø for et datasett som dekker hele Norge er blitt kvantifisert. I tillegg er sesongvariasjonen i IPN-utbrudd og tilhørende dødelighet blitt publisert og diskutert.
- En vitenskapelig publisering om risikofaktorer for IPN er sendt inn til et vitenskapelig tidsskrift.
- En vitenskapelig publisering om reaktivering av IPNV i sjø er nesten klar til innsendelse til et vitenskapelig tidsskrift.
- I tillegg er en artikkel om «Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming», utarbeidet i prosjektperioden, blitt publisert i tidsskriftet Preventive Veterinary Medicine.

6 Formidling i prosjektperioden

6.1 Muntlig formidling

Resultater fra AP1 er presentert internasjonalt på International Society of Fish and Shellfish Immunology konferansen i Vigo, Spania juni 2013 (LH Johansen et al), på The 9th International Workshop on Salmonid Smoltification 13-17 August 2013 på Island (A Krasnov et al) og på EAS konferansen (Aquaculture Europe) i San Sebastian, Spania oktober 2014 (L-H Johansen et al). Resultater er også presentert nasjonalt på Havbrukskonferansen i Tromsø mars/april 2014 (Havbruk 2014) (L-H Johansen et al) og på Frisk Fisk konferansen i Tromsø, 3-4 mars 2015 (Johansen et al). Resultater er videre presentert på FHF sine fagsamlinger i Bergen i august 2013 og på Værnes i november 2014 (begge av L-H Johansen). Data fra prosjektet ble fremlagt på AkvaNor i Trondheim august 2013 i et miniseminar med tema «Tap i sjø» arrangert av Nofima (L-H Johansen).

En samlet fremstilling av resultater fra arbeidspakke 2 ble presentert FHF sin fagsamling på Værnes i november 2014 (Mona D. Jansen)

Et foredrag med tittelen:» IPNV følger fisken fra settefiskanlegg til sjø - Etterprøvd ved molekylær spring» (forfattere: Britt Bang Jensen & Anja B. Kristoffersen, Veterinærinstituttet og Magnus Devold, Vidar Aspehaug & Ove Gjelstenli, Patogen analyse AS) skulle vært avholdt på Frisk Fisk konferansen i Tromsø 4.mars 2015, men måtte avlyses pga flystreik.

Et abstract med tittelen: «RISK FACTORS FOR OUTBREAKS OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS (IPN) AND FOR MORTALITY IN NORWEGIAN SALMONID POSTSMOLTS” (forfattere: B. Bang Jensen & A. B. Kristoffersen) er sendt inn til 17th International conference on disease of fish and shellfish, som skal avholdes i Las Palmas 7-11 september 2015.

Et abstract med tittelen: «MOLECULAR TRACING CONFIRMS THAT INFECTION WITH INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS (IPNV) FOLLOWS THE SMOLT FROM HATCHERY TO GROW OUT FARM” (forfattere: A B Kristoffersen, B Bang Jensen, V Aspehaug, O Gjelstenli, O Breck og M Devold) er sendt inn til 17th International conference on disease of fish and shellfish, som skal avholdes i Las Palmas 7-11 september 2015.

6.2 Skriftlig formidling

En vitenskapelig artikkel med tittelen: »Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming” (forfattere: Britt Bang Jensen & Anja B. Kristoffersen) er publisert i Diseases of Aquatic Organisms Vol. 114: 177–187, 2015 (http://www.int-res.com/articles/dao_oa/d114p177.pdf). En populær-vitenskapelig versjon av denne artikkelen forventes utarbeidet og innsendt til Norsk Fiskeoppdrett før sommeren 2015.

Fiskehelsebiolog Ingrid Moan leverte våren 2013 sin masteroppgave med tittel «Studier av HSMB i Atlantisk laks – effekter av IPNV og vaksinasjon på utviklingen av HSMB *i vivo* og etablering av primærkulturer av hjerteceller for dyrking av PRV *in vitro*». Ingrid Moan har vært masterstudent ved Nofima med Lill-Heidi Johansen som veileder og i oppgaven er data som omhandler IPN QTL negative grupper inkludert. Torunn Taksdal, VI, bidro med histologianalyser. Data fra et annet Nofima prosjekt (MABIT finansiert og i samarbeid med Ingwill Jensen, UiT Norges arktiske universitet) som omhandler

etablering av protokoll for isolering og hold av hjerteceller og infeksjonsforsøk med PRV er også inkludert i denne oppgaven.

-En artikkel med resultater fra arbeidspakke 1 med tittel «Immunsystemet svekket hos laksesmolt» er publisert i Norsk Fiskeoppdrett (NF Expert) januar 2015. Denne ble også gjengitt på nettstedene Nofima.no, Kyst.no og Intrafish.no og i Nofima rapporten «Næringsnytte 2014» utgitt januar 2015.

Manuskript som er til vurdering i Fish and Shellfish Immunology etter 1. revidering:

-Johansen et al: Comparison of transcriptomic responses to pancreas disease (PD) and heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L).

Manuskripter under utarbeidelse 2015:

-Short communication på resultater fra det eksperimentelle smitteforsøket med arbeidstittel “ Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) as risk factor in the development of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)”.

-Manuskript med resultater fra transkriptom analysene på smolt med fokus på immunologi.

En artikkel med arbeidstittelen: „Molecular tracing demonstrates that infection with Infectious Pancreatic Necrosis virus (IPNV) may follow the fish from hatchery to grow out farm“ (forfattere: Anja B Kristoffersen, Britt Bang Jensen, Vidar Aspehaug, Magnus Devold, Ove Gjelstenli og Olav Breck) er under utarbeidelse, og forventes innsendt til vitenskapelig tidsskrift før sommeren 2015.

6.3 Annen formidling

Informasjon om prosjektet ble publisert på nettsidene Nofima.no, Kyst.no og Forskning.no ved årsskiftet 2011/2012. Prosjektet ble også presentert i en workshop arrangert av Veterinærinstituttet i Oslo 15/5 2012 der tema var HSMB og PRV.

7 Leveranser

(Leveranseliste oppdatert per 19/11 2013 fra FHF i rød tekst)

- 15.11.11 **Formidlingsplan for prosjektet.** Formidlingsplan levert 18.11.11.
- 15.12.11 **Prosjektet presenteres som nyhetssak på Nofimas, VIs og FHF's hjemmeside:** presentert på Nofimas hjemmesider 12/11 2011, på Kyst.no 14.12.11 og på Forskning.no 15.12.11.
- 31.12.11 **Statusrapport** Rapport levert 27.12.11.
- 06.01.12 **Revidert formidlingsplan for prosjektet.** Levert 06.01.12
- 01.03.12 **Referat fra styringsgruppemøte.** Styringsgruppemøte (oppstartsmøte) gjennomført 13.03.12. Referat levert 30.03.12.
- 01.07.12 **Statusrapport.** Statusrapport levert 22.06.12.
- Revidert formidlingsplan levert 31.07.12.
- Styringsgruppemøte (telefon) avholdt 05.10.12. Referat levert 12.10.12.
- Revidert plan for Arbeidspakke 2 levert 20.12.12.
- 31.12.12 **Statusrapport.** Statusrapport levert 28.01.13.
- 01.02.13 **Referat fra telefonmøte 18.01.13.** Referat levert 21.03.13
- 01.05.13 **Referat fra styringsgruppemøte 11.04.13.** Referat levert 26.04.13
- 01.06.2013 **Prosjektbeskrivelse inkludert budsjett for Arbeidspakke 3.** Utsatt i samråd med styringsgruppen etter diskusjon i styringsgruppemøtet 11.04.13. Ny behandling planlagt i styringsgruppemøte 2014.
- 01.06.2013 **Artikkel i norsk fiskeoppdrett 1:** Pga forskyvninger og utsettelse i arbeidspakkene ble det ikke utarbeidet artikkel til Norsk Fiskeoppdrett innen denne datoen. Artikkel ble sendt til Norsk Fiskeoppdrett 01.12.14 og senere utgitt i NF Expert januar 2015 (Johansen og Krasnov: Immunsystemet svekket hos laksesmolt.
- 01.07.2013 **Statusrapport pr 01.07.13.** Statusrapport levert 12.07.13.
- Revidert plan for AP2 levert 14.10.13.
- Styringsgruppemøte (telefon) avholdt 28.10.13. Referat levert 12.11.13.
- 19.11.2013 ble revidert formidlingsplan levert .

- 01.12.2013** **Manus til vitenskaplig artikkel 1:** Artikkel publisert april 2013: A.B. Kristoffersen, B.B. Jensen, P.A. Jansen: Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming. Preventive Veterinary Medicine, 109; 1–2, 136–143 (basert delvis på allerede igangsatt arbeid).
- 31.12.2013** **Statusrapport.** Statusrapport levert 20.12.13.
- Styringsgruppemøte avholdt 25.04.14. Referat levert 21.05.14. Forslag til omdisponering av midler og tilleggsbevilgning diskutert i møtet og søknad om dette sendt til FHF 21.05.15. Godkjenning fra FHF mottatt 12.09.14. og tilsagnsbrev for tilleggsbevilgning mottatt 10.10.14. Forslag til arbeidspakke 3 ble også diskutert i møtet, og ble vedtatt utsatt til prosjektets slutt pga de endringer og forskyvninger som har vært i prosjektet.
- 01.07.2014** **Manus til vitenskaplig artikkel 2 og 3:** Manus 2 sendt til Diseases of Aquatic Organisms høsten 2014. Senere akseptert og publisert: B.B. Jensen, A.B. Kristoffersen »Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming” Diseases of Aquatic Organisms Vol. 114: 177–187, 2015 (http://www.int-res.com/articles/dao_oa/d114p177.pdf).
- Manus 3 (Johansen et al) sendt til Fish and Shellfish Immunology 01.03.15. Revidert manus innsendt 12.06.15.
- 01.07.14** **Statusrapport.** Statusrapport levert 28.07.14.
- 01.12.14** **Artikkel i norsk fiskeoppdrett 2.** Utsatt pga endringer og forskyvninger i APene. Planlagt levert til sommeren 2015.
- 31.12.14** **Sluttrapport med populærvitenskaplig sammendrag eller faktaark.** Utsatt pga endringer og forskyvninger i prosjektet. Utkast til sluttrapport levert 10.04.15 til styringsgruppen.
- 31.12.14** **Manus til vitenskaplig artikkel 4.** Utsatt pga endringer og forskyvninger i prosjektet. Planlagt innsendt innen 01.12.15
- 31.12.14** **Populærvitenskaplig artikkel 3.** Utsatt pga endringer og forskyvninger i prosjektet. Planlagt innsendt innen 01.12.15.
- 05.03.15** Avslutningsmøte for prosjektet med styringsgruppe og prosjektgruppe. Innhold i sluttrapport samt forslag til oppfølging av prosjektet (Arbeidspakke 3) diskutert. Utkast til sluttrapport levert 10.04.14.

8 Referanser

- Aunsmo A, Bruheim T, Sandberg M, Skjerve E, Romstad S and Larssen RB, 2008. Methods for investigating patterns of mortality and quantifying cause-specific mortality in sea-farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Org* 81 (2); 99-107.
- Eggset G, Mortensen A, Johansen L-H and Sommer A-I, 1998. Susceptibility to furunculosis, cold water vibriosis and infectious pancreatic necrosis (IPN) in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) as a function of smolt status by seawater transfer. *Aquaculture* 158: 179-191.
- Finstad O W, Dahle, M K, Lindholm T H, Nyman I B, Lovoll M, Wallace C, Olsen M, Storset A K and Rimstad E, 2014. Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Vet Res* 45: 35.
- Grove S, Austbø L, Hodneland K, Frost P, Løvoll M, McLoughlin M, Thim HL, Braaen S, König M, Syed M, Jørgensen JB, Rimstad E, 2013. Immune parameters correlating with reduced susceptibility to pancreas disease in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol* 34(3): 789-798.
- Johansen L-H, Eggset G and Sommer A-I, 2009. Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr; recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts. *Aquaculture*, 290, 9-14.
- Johansen L-H and Sommer A-I, 2001. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) affects the outcome of secondary infections with *Vibrio salmonicida* or infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Dis Aquat Org* 47: 109-117.
- Julin K, Johansen L-H, Sommer A-I and Jørgensen JB, 2014. Persistent infections with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of different virulence in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Dis*. doi: 10.1111/jfd.12317
- Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S and Jørgensen S M, 2011. Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 6(1): 31-38.
- Krasnov, A., G. Timmerhaus, B. L. Schiøtz, J. Torgersen, S. Afanasyev, D. Iliev, J. Jørgensen, H. Takle and S. M. Jørgensen (2011). "Genomic survey of early responses to viruses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *Mol Immunol* 49(1-2): 163-174.
- Krasnov A, Wesmajervi Breiland M S, Hatlen B, Afanasyev S and Skugor S, 2015. Sexual maturation and administration of 17beta-estradiol and testosterone induce complex gene expression changes in skin and increase resistance of Atlantic salmon to ectoparasite salmon louse. *Gen Comp Endocrinol* 212C: 34-43.
- Melby HP, Falk K, 1995. Study on the interaction between a persistent infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) infection and experimental infectious salmon anaemia (ISA) in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 18; 576-586.
- Mikalsen AB, Haugland O, Rode M, Solbakk IT, Evensen O. 2012. Atlantic salmon reovirus infection causes a CD8 T cell myocarditis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*, 7: e37269.
- Moen T, Baranski M, Sonesson AK and Kjølglum S, 2009. Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics* 10, Article Number: 368
- Morera D, Roher N, Ribas L, Balasch J C, Donate C, Callol A, Boltana S, Roberts S, Goetz G, Goetz F W and MacKenzie S A, 2011. RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes." *PLoS One* 6(10): e26998.

- Palacios G, Lovoll M, Tengs T, Hornig M, Hutchison S, et al. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. PLoS ONE 2010; 5: e11487. doi:10.1371/journal.pone.0011487
- Stangeland K, Høye S and Taksdal T, 1996. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. J Fish Dis 19; 323-327.
- Timmerhaus, G., A. Krasnov, P. Nilsen, M. Alarcon, S. Afanasyev, M. Rode, H. Takle and S. M. Jorgensen (2011). "Transcriptome profiling of immune responses to cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon." BMC Genomics 12: 459.
- Timmerhaus, G., A. Krasnov, H. Takle, S. Afanasyev, P. Nilsen, M. Rode and S. M. Jorgensen (2012). "Comparison of Atlantic salmon individuals with different outcomes of cardiomyopathy syndrome (CMS)." BMC Genomics 13: 205.
- Xu C, Guo T-C, Mutoloki S, Haugland Ø, Evensen Ø. 2012. Gene expression studies of host response to Salmonid alphavirus subtype 3 experimental infections in Atlantic salmon. Vet Res, 43(1): 78.

Vedlegg

Tabell 1 AP1 hovedforsøket: IPN virus titre (infeksiøse enheter per gram vev) 2 til 12 uker etter smitte (ferskvannsfasen).

IPN virustitre uke 34 - 2 uker etter smitte					
Fisk nr:	A11 QTL+	A12 QTL-			
1	818,5	818,5			
2	1750	820000			
3	0	553			
4	175	553			
5	818,5	553			
6	553	1750			
7	374	1750			
8	820	553			
Gjennomsnitt	663,6	103316,3	(933 u/ fisk 2)		
Std. Avvik	538,2	289584,4			
% positive	87,5	100			
Deteksjonsgrense 81,8					
IPN virustitre uke 38 - 6 uker etter smitte (2 uker etter vaksinasjon)					
Fisk nr:	QTL+ micro 6	QTL+ 5-3	QTL- Micro 6	QTL- 5-3	QTL- salin
1	0	0	0	1750	0
2	1183	0	0	0	55340
3	0	1750	1183	0	17500
4	818,5	0	0	0	17500
5	0	0	818,5	0	0
6	0	0	0	0	5534
7	0	0	818,5	0	0
8	0	818,5	0	0	0
Gj.snitt:	250,2	321,1	1273,4	218,8	11984,3
Std avvik	473,4	644,5	2830,9	618,7	19111,2
% IPNV positive	25	25	37,5	12,5	50
Deteksjonsgrense 818,5					
IPN virustitre uke 44 - 12 uker etter smitte, ved sjøsetting					
Fisk nr:	QTL+ micro 6	QTL+ 5-3	QTL- Micro 6	QTL- 5-3	QTL- salin
1	0	0	818,5	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	818,5	0	0	0
4	0	1750	0	0	1750
5	0	0	0	0	0
6	0	818,5	0	0	0
7	0	2972	0	0	0
8	0	0	0	0	0
Gj.snitt:	0,0	794,9	102,3	0,0	218,8
Std avvik	0,0	1081,0	289,4	0,0	618,7
% IPNV positive	0	50	12,5	0	12,5
Deteksjonsgrense 818,5					

Tabell 2 AP1 hoved forsøk: IPN virus titre i sjøvannsfasen, etter smitte med HSMB. Kolonner med hvit heading = grupper smitta med IPNV i ferskvannsfasen. Kolonner med gul heading = parallele grupper smitta med IPNV i ferskvannsfasen og deretter smitta med HSMB etter sjøsetting.

IPN virus titre uke 47 - 15 uker etter IPNV smitte, 2 uker etter HSMB smitte og sjøsetting										
Fisk nr:	QTL+ micro 6	QTL+ micro 6 HSMB	QTL+ 5-3	QTL+ 5-3 HSMB	QTL- Micro 6	QTL- Micro 6 HSMB	QTL- 5-3	QTL- 5-3 HSMB	QTL- salin	QTL- salin HSMB
1	0	327	0	327	0	0	327,00	0	0	0
2	327,00	0	327	3950	700,00	0	0	0	0	0
3	0	0	0	700	0	0	0	0	0	0
4	500,00	0	327	0	0	0	0	0	0	0
5	0	327	0	327	0	0	0	327	0	0
6	0	0	0	1500	0	0	0	0	0	327
Gj.snitt:	137,83	109,00	109,00	1134,00	116,67	0,00	54,50	54,50	0	54,50
Std avvik	220,43	168,86	168,86	1472,46	285,77	0,00	133,50	133,50	0	133,50
Deteksjonsgrense 330										
IPN virus titre uke 51 - 19 uker etter IPNV smitte, 7 uker etter HSMB smitte og sjøsetting										
Fisk nr:	QTL+ micro 6	QTL+ micro 6/HSMB	QTL+ 5-3	QTL+ 5-3/HSMB	QTL- Micro 6	QTL- Micro 6/HSMB	QTL- 5-3	QTL- 5-3/HSMB	QTL- salin	QTL- salin/HSMB
1	3000,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	330
3	0	330	220000	0	470,00	0	0	0	0	0
4	330,00	0	0	0	0	0	0	0	0	700
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gj.snitt:	555,00	55,00	36666,67	0,00	78,33	0	0	0	0	171,67
Std avvik	1205,05	134,72	89814,62	0,00	191,88	0	0	0	0	290,55
Deteksjonsgrense 330										
IPN virus titre uke 02-13 - 22 uker etter IPNV smitte, 9 uker etter HSMB smitte og sjøsetting										
Fisk nr:	QTL+ micro 6	QTL+ micro 6/HSMB	QTL+ 5-3	QTL+ 5-3/HSMB	QTL- Micro 6	QTL- Micro 6/HSMB	QTL- 5-3	QTL- 5-3/HSMB	QTL- salin	QTL- salin/HSMB
1	33000,00	0	0	0	0	330	0	330	0,00	0
2	470000,00	0	1500	0	0	0	0	0	0,00	0
3	330,00	0	7000	330	0	0	0	0	0,00	0
4	0,00	0	0	0	700,00	0	3300,00	0	0,00	330
5	330,00	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
6	0,00	0	2200	0	300,00	0	0	0	0,00	0
Gj.snitt:	83943,33	0,00	1783,33	55,00	166,67	55,00	550,00	55,00	0,00	55,00
Std avvik	189583,92	0,00	2720,60	134,72	287,52	134,72	1347,22	134,72	0,00	134,72
Deteksjonsgrense 330										

Tabell 3 (se neste side). AP1 hoved forsøk: Ct- verdier og Delta Ct verdier for IPNV sammenholdt med IPNV titre fra QTL – grupper av fisk 2 til 22 uker etter smitte med IPNV. Elongeringsfaktor 1 alfa (eEF1a) er referanse gen. Alle prøver er analysert samtidig (på samme brett) i 2 paralleller. 18 prøver hadde bare 1 parallell med Ct verdi (snitt Ct for disse var 35,3), mens parallell nr 2 var «undetermined». Disse er merket rødt i tabellen.

Gjennomsnitt Ct verdi for eEF1a er 16,26 (0,61 i standardavvik). Kun 3 prøver har eEF1a Ct verdier med avvik mer enn 1 Ct verdi. Disse er merket gult i tabell. Laveste Delta Ct verdi er 5,37. 7 prøver har delta Ct over 19, disse er merka oransje i tabellen.

Standardavvik (SD) og gjennomsnittsavvik (SEM) er vist. P-verdier er oppgitt (paired two-tailed student T-test, p < 0,05 er signifikant).

Sample	Ct EF1a	Group mean	Ct IPNV	Group mean	Delta CT (=Ct EF1a-Ct IPNV)	Group mean delta Ct	SD	SEM	p-value A03/A04 or A04/A05	p-value A03/A05	Titre (iu/g tissue)
A12 w34 1	16,04		Undetermined		neg						819
A12 w34 2	16,37		21,74		5,37						820000
A12 w34 3	15,99		33,38		17,39						553
A12 w34 4	16,28		Undetermined		neg						553
A12 w34 5	15,87		34,78		18,91						553
A12 w34 6	15,94	16,08	35,26	29,38	19,32	13,30	5,746	4,937			1750
A03 w38 1	16,25		29,29		13,04						0
A03 w38 2	15,49		27,27		11,78						0
A03 w38 3	16,78		34,51		17,72						1183
A03 w38 4	16,27		25,67		9,40						0
A03 w38 5	18,58		26,47		7,88				A03/A04		819
A03 w38 6	16,11	16,58	34,21	29,15	18,10	12,57	3,852	3,301	0,510	0,346	0
A04 w38 1	15,25		30,79		15,54						1750
A04 w38 2	15,68		33,81		18,13						0
A04 w38 3	16,01		23,86		7,85						0
A04 w38 4	15,84		33,81		17,97						0
A04 w38 5	16,17		27,66		11,49				A04/A05		0
A04 w38 6	15,63	15,76	33,83	29,99	18,20	14,23	3,924	3,461	0,110		0
A05 w38 1	15,75		33,02		17,27						0
A05 w38 2	15,97		23,85		7,87						55340
A05 w38 3	16,51		23,31		6,80						17500
A05 w38 4	16,84		24,07		7,23						17500
A05 w38 5	16,75		29,20		12,45						0
A05 w38 6	16,90	16,45	27,25	26,78	10,35	10,33	3,670	3,028			5534
A03 w44 1	16,01		32,65		16,64						819
A03 w44 2	15,55		27,29		11,74						0
A03 w44 3	16,09		32,47		16,38						0
A03 w44 4	16,27		34,03		17,75						0
A03 w44 5	16,04		32,86		16,82				A03/A04		0
A03 w44 6	16,17	16,02	31,44	31,71	15,28	15,69	1,944	1,507	0,601		0
A04 w44 1	16,14		24,54		8,39						0
A04 w44 2	16,52		30,51		13,99						0
A04 w44 3	16,40		29,95		13,55						0
A04 w44 4	16,49		34,81		18,32						0
A04 w44 5	16,68		Undetermined		neg						0
A04 w44 6	16,92	16,52	34,73	30,91	17,82	14,38	3,579	2,925			0
A03 w47 1	15,75		35,85		20,10						0
A03 w47 2	15,41		38,10		22,69						700
A03 w47 3	15,72		32,75		17,03						0
A03 w47 4	15,69		26,99		11,30						0
A03 w47 5	15,66		29,70		14,04				A03/A04		0
A03 w47 6	16,03	15,71	32,59	31,80	16,56	16,09	3,729	2,987	0,414		0
A04 w47 1	15,84		30,58		14,74						330
A04 w47 2	15,52		32,83		17,31						0
A04 w47 3	16,16		34,56		18,39						0
A04 w47 4	16,17		29,48		13,31						0
A04 w47 5	16,36		28,86		12,50						0
A04 w47 6	16,60	16,11	34,61	31,57	18,00	15,46	2,310	2,194			0
A03 w51 1	15,83		39,14		23,31						0
A03 w51 2	15,51		26,47		10,95						0
A03 w51 3	15,68		26,84		11,16						470
A03 w51 4	16,31		33,67		17,37						0
A03 w51 5	15,69		33,24		17,55				A03/A04		0
A03 w51 6	15,68	15,78	25,86	29,76	10,18	13,98	4,751	4,321	0,660	0,828	0
A04 w51 1	15,83		25,90		10,06						0
A04 w51 2	16,15		26,49		10,34						0
A04 w51 3	16,36		35,25		18,89						0
A04 w51 4	16,29		30,31		14,01						0
A04 w51 5	16,63		Undetermined		neg				A04/A05		0
A04 w51 6	16,61	16,31	28,13	28,54	11,51	12,23	3,277	2,792	0,445		0
A05 w51 1	16,89		Undetermined		neg						0
A05 w51 2	15,85		26,19		10,34						0
A05 w51 3	16,60		29,31		12,71						0
A05 w51 4	15,88		Undetermined		neg						0
A05 w51 5	19,04		34,85		15,82						0
A05 w51 6	18,26	17,09	30,00	29,41	11,75	12,32	2,012	1,610			0
A03 w02 1	16,44		27,35		10,91						0
A03 w02 2	16,34		26,64		10,30						0
A03 w02 3	16,57		32,64		16,06						0
A03 w02 4	16,85		25,99		9,14						700
A03 w02 5	16,83		37,67		20,84				A03/A04		0
A03 w02 6	16,45	16,58	27,27	28,86	10,81	12,28	4,126	3,627	0,014	0,283	0
A04 w02 1	16,29		34,50		18,22						0
A04 w02 2	16,10		31,82		15,72						0
A04 w02 3	16,41		35,01		18,60						0
A04 w02 4	16,04		35,87		19,82						3300
A04 w02 5	16,07		38,97		22,90				A03/A05		0
A04 w02 6	16,55	16,24	30,20	33,81	13,65	17,56	2,938	2,313	0,012		0
A05 w02 1	15,89		24,71		8,83						0
A05 w02 2	15,96		24,94		8,98						0
A05 w02 3	16,71		34,93		18,21						0
A05 w02 4	16,47		25,34		8,87						0
A05 w02 5	16,63		26,70		10,07						0
A05 w02 6	16,73	16,40	26,76	27,23	10,03	10,83	3,343	2,461			0
average EF1a	16,26										
SD EF1a	0,608										

