



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
NMBU Veterinærhøgskolen  
Institutt for prekliniske fag og patologi  
Faggruppe Biokjemi, Prepat

Fordypningsoppgave 2022

Produksjonsdyr og mattrygghet

## **Kartlegging av *PRNP*-variasjoner hos reinsdyr i Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke, og *PRNP* sin betydning for reetableringsprosessen**

Study of *PRNP*-variations in reindeer in Reinheimen-Breheimen and Setesdal Ryfylke, and the role of *PRNP* in the reestablishment process

Ragnhild L. G. Husom, Oda M. Ingstad, Ida Marie Løland, Marie Håkonsen

Kull 2016

Veileder: Michael A. Tranulis

Forkortelser/begreper .....	3
Summary .....	4
Sammendrag .....	5
Teori .....	6
Prioner – hva er det, og hva vet vi om prioner .....	6
CWD – en alvorlig smittsom sykdom hos hjortedyr .....	8
PRNP-genet .....	12
Skrapesyke hos sau – kunnskap og erfaringer .....	16
Zoonotisk potensiale – vil CWD kunne smitte mennesker?.....	18
Testing for CWD .....	21
Genetikk hos villrein i Norge .....	22
Reinheimen-Breheimen .....	24
Setesdal Ryfylke .....	25
Reetablering av villrein i Nordfjella .....	25
Reetableringsgruppen .....	25
Aktørene.....	27
Villreinen er rødlistet .....	30
Friskmelding av bestander .....	31
Materiale og metode.....	33
Resultater.....	37
Diskusjon.....	48
PRNP i reetableringsgruppen .....	48
Første samling.....	49
Kunnskapsgrunnlag legges frem.....	49
Gruppeoppgaver.....	52
Andre samling.....	58
Gruppeoppgaver.....	58
Tredje samling .....	62
I hvor stor grad er PRNP av betydning?.....	62
Grunnlaget for inndeling av PRNP etter følsomhet .....	62
Mulige kontrolltiltak .....	63
Konklusjon .....	65
DNA-analysene .....	65
Oppsummering av møtene.....	65
Takk til bidragsytere.....	68
Referanser.....	69
Vedlegg A .....	74

Vedlegg B.....	78
Vedlegg C.....	80
Vedlegg D .....	81
Vedlegg E.....	82
Vedlegg F .....	83

## Forkortelser/begreper

CWD	Chronic Wasting Disease
TSEer	Transmissible spongiform encephalopathies
BSE	Bovin Spongiform Encefalopathy (kugalskap)
CJS	Creutzfeldt-Jakob sykdom
ORF	Open Reading Frame
SNV	Single Nucleotide Variation
BP	Basepar
PCR	Polymerase chain reaction
VI	Veterinærinstituttet
<i>PRNP</i> -gen	Gen som koder for prionproteinene PrP <sup>C</sup>
LMD	Landbruks -og matdepartementet
VKM	Vitenskapskomiteen for mat og miljø
IUCN	Den internasjonale naturvernunionen

## Summary

Chronic Wasting Disease was for the first time detected in Norway in the late winter of 2016. It was detected from a wild reindeer (*Rangifer tarandus*) in Nordfjella zone 1. Nordfjella is one of 23 wild reindeer areas in Norway, and includes the municipalities of Aurland, Lærdal, Hemsedal, Hol, Ål and Ulvik. Highway 50 between Aurland and Hol divides the area into two zones, zone 1 in the north and zone 2 in the south. The highway is a strong barrier for movement of reindeer. To prevent further spread of CWD, and possibly eradicate the disease, the wild reindeer population in Nordfjella zone 1 was culled in the winter of 17/18. The sanitation plan described a set-aside period of at least 5 years, and then a reestablishment with healthy reindeer as soon as possible.

This thesis consists of two parts. In the first part, we have studied the occurrence of the different *PRNP*-genotypes in two chosen wild reindeer populations: Reinheimen-Breheimen and Setesdal Ryfylke. It is interesting to investigate the occurrence of different genotypes for *PRNP* in different wild reindeer areas, because this can be a significant factor in the choice of source population when reestablishing the herd in Nordfjella zone 1. It has been seen that different gene variants in the *PRNP* gene give different susceptibility to infection with CWD. The population studied in this thesis have barely been looked at with regard to *PRNP* genetics in the past. The population in Setesdal Ryfylke is interesting to investigate because it has much the same genetics as the other populations in Langfjella, and is therefore a possible source population. The genetics of the Reinheimen-Breheimen population shows that it originates from domestic reindeer. Domestic reindeer generally have a higher prevalence of *PRNP* genotypes that are more resistant to CWD. This makes it interesting to investigate whether this applies to the Reinheimen-Breheimen population as well. At best, these herds may be relevant to use as a source stock in the reestablishment.

The second part of the thesis deals with the process of reestablishing wild reindeer in Nordfjella zone 1. The Norwegian Environment Agency and the Norwegian Food Safety Authority have set up a reestablishment committee, which will provide input to the departments' further processing of the case. In this part of the thesis, the administrative aspects behind the process and the theory of the process work are presented. Furthermore, the actors who participate in the process are presented, as well as how they work towards the reestablishment. The thesis then contains a summary from the meetings where the

reestablishment was discussed. The summaries should give the reader an insight into what was discussed, and thus also the complexity of the case.

## Sammendrag

Senvinteren 2016 ble Chronic Wasting Disease (CWD) påvist for første gang i Norge. Det ble påvist fra en villrein i Nordfjella sone 1. Nordfjella er et av 23 villreinområder i Norge, og omfatter kommunene Aurland, Lærdal, Hemsedal, Hol, Ål og Ulvik. Riksvei 50 mellom Aurland og Hol deler området i to soner, sone 1 i nord og sone 2 i sør, siden riksveien er en sterk trekkbarriere. For å hindre videre spredning av CWD ble villreinstammen i Nordfjella sone 1 sanert vinteren 17/18. Det ble i saneringsplanen beskrevet en brakkleggingsperiode på minst 5 år, og deretter en reetablering med friske reinsdyr så snart som mulig.

Dette er en todelt oppgave. I den ene delen av oppgaven ble det sett på forekomst av de ulike *PRNP*-variantene i to utvalgte villreinstammer, Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke. Det er interessant å undersøke forekomst av ulike genotyper for *PRNP* i forskjellige reinsdyrstammer fordi dette kan være en betydningsfull faktor ved valg av kildebestand ved reetablering av stammen i Nordfjella sone 1. Det er sett at forskjellige genvarianter i *PRNP*-genet gir ulik følsomhet for smitte med CWD. Bestandene som er sett på i oppgaven har blitt lite undersøkt med tanke på *PRNP*-genetikk tidligere. Bestanden i Setesdal Ryfylke er interessant å undersøke fordi den har mye lik genetikk som de andre bestandene i Langfjella, og er av den grunn en mulig kildebestand. Reinheimen-Breheimen-bestanden har en genetikk som viser at den har opphav fra tamrein. Tamrein har generelt høyere prevalens av *PRNP*-genotyper som er mer motstandsdyktig mot CWD. Det gjør det interessant å undersøke om dette gjelder Reinheimen-Breheimen bestanden også. I beste fall kan disse flokkene være aktuelle å bruke som kildebestand i reetableringen.

Andre del av oppgaven tar for seg prosessen med reetablering av villrein i Nordfjella sone 1. Miljødirektoratet og Mattilsynet har satt ned en reetableringskomite, som skal komme med innspill til departementenes videre behandling av saken. I denne delen av oppgaven legges det forvaltningsmessige som ligger bak prosessen og teori om prosessarbeidet fram. Videre presenteres aktørene som deltar i prosessen, samt hvordan de arbeider frem mot reetableringen. Oppgaven inneholder deretter resymé fra samlingene oppgaveforfatterne overvar. Resymeene skal gi leseren et innblikk i hva som ble diskutert, og dermed også sakens kompleksitet.

## Teori

I teoridelen legges det fram hva prionsykdommer og CWD er, og hvilke konsekvenser denne sykdommen har og kan få. Dette gjøres for å skape forståelse for hvor alvorlig spredning av CWD kan være. Videre presenteres teori som legger et grunnlag for å forstå prosessen og diskusjonen rundt reetableringen.

### Prioner – hva er det, og hva vet vi om prioner

Prioner er smittestoff som skiller seg fra alle andre kjente smittestoff ved at de ikke inneholder nukleinsyrer. Prioner består kun av protein, som er bygget opp av aminosyrer bundet til hverandre med peptidbindinger. Proteiner har en tredimensjonal struktur som trengs for at de skal utøve sin funksjon, og hvis denne strukturen ikke oppnås og opprettholdes brytes proteinet ned. Denne nedbrytningen og erstatning med nysyntetisert protein er en normal prosess som pågår i så å si alle celler i kroppen. Hvor lang funksjonstid ulike proteiner har vil variere mye, fra noen minutter til timer og i noen tilfeller flere år i kroppen. Det er flere systemer cellene har for å opprettholde proteostase – en balanse mellom oppbygging og nedbrytning av proteinene. De viktigste systemene for nedbrytning av protein er de cytoplasmatiske proteasomene og de membranavgrensede lysosomene. Disse proteinnedbrytende prosessene sikrer at det ikke skjer en opphopning av proteiner med feil i eller rundt cellene. Skjer det feil i proteostasen kan en opphopning av proteiner eller proteinfragmenter i eller rundt neuroner bidra til sykdom i sentralnervesystemet, blant annet Alzheimer's sykdom og Parkinson's hos menneske. Slike sykdommer kalles med en fellesbetegnelse for proteinopatier.

Det som skiller prioner fra de andre proteinaggregater, er at prionaggregatene som hoper seg opp i/mellom celler kan overføres eksperimentelt, og i noen tilfeller under naturlige omstendigheter, til andre individer og gi sykdom hos dem. Disse overførbare lidelsene har fellesbetegnelsen «transmissible spongiform encephalopathies» (TSEs). Eksempler på kjente prionsykdommer er Creutzfeldt-Jakob sykdom hos menneske, Bovin Spongiform Encefalopathy (kugalskap) hos kyr og skrapesyke hos småfe. Hos hjortevilt kalles sykdommen Chronic Wasting Disease (CWD).

*PRNP* er genet som koder for det «normale» cellulære prionproteinet PrP<sup>C</sup>. *PRNP* uttrykkes i de fleste celler i kroppen, men aller mest i neuroner og gliaceller i hjernen. Det er ingen celler som uttrykker proteinet like mye som neuroner (Zomosa-Signoret et al., 2008). Det kan tyde

på at prionproteinet har en viktig rolle i neuroner, og man finner PrP<sup>C</sup> ved neuronenes synapse, både pre-, og postsynaptisk (Barmada et al., 2004; Herms et al., 1999; Salès et al., 1998). PrP<sup>C</sup> finnes også i mange andre celler i kroppen, og uttrykkes i et mangfold av vev, som lymfoid vev, gastrointestinaltraktus, hjerte, lunger og jurvev.

Det at *PRNP*-genet har blitt bevart gjennom evolusjonen hos så mange ulike arter, tyder på at det har en fordelaktig funksjon, men hva som er den fysiologiske rollen til PrP<sup>C</sup> har lenge vært et mysterium. Hos mus der PrP<sup>C</sup> ikke er uttrykt eksperimentelt, har man ikke sett noen betydningsfulle anatomiske- eller utviklingsdefekter (Büeler et al., 1992). Hos norsk melkegeit er det en linje som har et prematurt stoppkodon i *PRNP*-genet, og som derfor ikke uttrykker PrP<sup>C</sup> hos dyr som er homozygote for dette allelet. I doktorgradsarbeidet til Reiten ble det vist at disse geitene hadde få endringer i de sirkulerende blodcellene, og basale immunceller fremsto uaffiserte av fraværet av PrP<sup>C</sup>. Hos geitekillinger så de en endring i hematologien, med flere røde blodceller med mindre cellevolum, i tillegg til flere neutrofile (Reiten, 2017).

Det har vært spekulert i om PrP<sup>C</sup> har tilknytning til søvn og hukommelse via å regulere ionekanaler, G-protein-koblede reseptorer og reseptorer for neurotransmittorer, og om det har funksjoner knyttet til fosterutvikling og beskyttelse av nerveceller mot skader. PrP<sup>C</sup> har også metallbindende egenskaper, da det binder kobberioner og beskytter mot reaktive oksygenforbindelser («Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet», 2019). En annen foreslått funksjon er at PrP<sup>C</sup> er involvert i immunmodulering, og bidrar til beskyttelse mot inflammatorisk skade i vev (Salvesen et al., 2017). I tillegg har man sett at PrP<sup>C</sup> er viktig for opprettholdelse og vedlikehold av myelin rundt perifere nerver. I en studie av Skedsmo et al brukte man geitelinjen som ikke uttrykker PrP<sup>C</sup>, og så at disse hadde histopatologiske forandringer som var forenlig med demyeliniserende nevropati (Skedsmo et al., 2021).

Den sykdomsfremkallende varianten av PrP kalles PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> får den normale, cellulære formen (PrP<sup>C</sup>) til å endre seg. Prosessen er ikke helt forstått, men PrP<sup>Sc</sup> binder seg til PrP<sup>C</sup> og får proteinet til å endre komformasjon til PrP<sup>Sc</sup> (Acevedo & Wille, 2014). PrP<sup>Sc</sup> dannes derfor med PrP<sup>C</sup> som utgangspunkt. Begge formene av PrP har helt lik aminosyresekvens, men aminosyrekjeden er foldet på to ulike måter. En del av  $\alpha$ -helix strukturen til PrP<sup>C</sup> blir omdannet til  $\beta$ -platestruktur i PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> får derfor helt andre fysiokjemiske egenskaper, blant annet blir det resistent mot nedbryting av proteaser, og mindre løselig (A. Espenes, 2000). Det gjør at PrP<sup>Sc</sup> ikke brytes ned, og det hopper seg opp i hjernevev. PrP<sup>Sc</sup> kan



aggregere til hverandre og danne amyloid-fibriller. Disse amyloidfibrillene avsettes i og mellom celler i hjernen, og gjør at neuroner gjennomgår apoptose. Dermed utvikler det seg hulrom i hjernen som medfører kliniske tegn tilknyttet nervesystemet («Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet», 2019).

### **CWD – en alvorlig smittsom sykdom hos hjortedyr**

CWD er en prionsykdom som angriper hjortedyr. Det ble først beskrevet i Colorado i USA i 1967 hos mulhjort i fangenskap, og hos viltlevende hjort i 1981. Typiske kliniske tegn på CWD er atypisk gange, tap av koordinasjon, de blir mindre menneskeskye, sikling, hengende ører, alvorlig vekttap, sløvhet og overdreven tørst eller urinering. Det er vanskelig å diagnostisere CWD på kliniske tegn alene ("Center for Disease Control and Prevention", 2021). Inkubasjonstiden for CWD er lang, og det kan ta opptil flere år fra et dyr blir smittet til det utvikler symptomer. Sykdommen har oftest blitt funnet hos unge voksne dyr (Veterinærinstituttet, [u.å.]-c). Flertallet av de CWD-positive dyrene fra Nordfjella var i den prekliniske fasen, og hadde ingen, unntatt det første tilfellet hadde kliniske tegn på sykdom. Alle tilfellene testet positivt på retrofaryngeal lymfeknute, men bare 53% var positive i hjernestammen (10/19). Dette tolkes slik at de fleste var nylig smittet, da prioner etter opptak fra mage-tarmkanalen ofte påvises i lymfoid vev (lymfeknuter og milt) før det kan oppdages i hjernen senere i sykdomsforløpet (Ersdal et al., 2003; Heggebo et al., 2000).

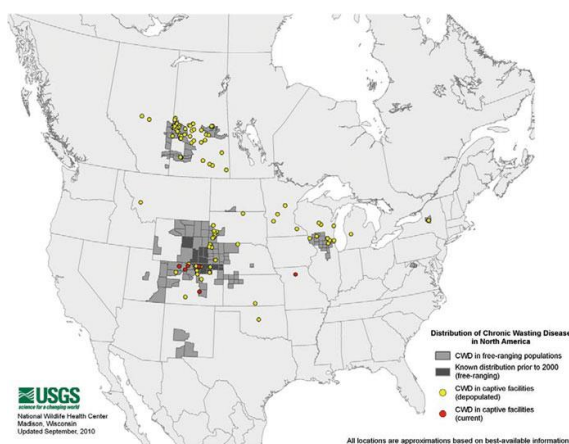
De diagnostiske funnene hos hjortevilt i USA stemmer godt overens med funnene som ble gjort på villreinen som var positiv for CWD i Nordfjella sone 1. Da det kort tid etter ble funnet CWD hos elg i Selbu som hadde andre, atypiske funn i forhold til tidligere beskrivelser av CWD, ble begrepene klassisk og atypisk CWD introdusert av norske forskningsmiljøer. Den typen smittsom CWD hos villrein i Norge betegnes klassisk CWD, mens den som er observert hos elg og hjort kalles atypisk CWD. Det er kun hos hjortedyr med klassisk CWD det er sett smittespredning mellom dyr med normal kontakt (Våge et al., 2019).

Det er flere ulikheter mellom elgene og villreinen med påvist CWD. Affisert villrein hadde størst forekomst av PrP<sup>Sc</sup> i hjernestammen, og prioner ble også påvist i lymfatisk vev. Horisontal smitte mellom dyr er sett der PrP<sup>Sc</sup> er til stede i lymfatisk vev, og er satt i forbindelse med utskilling av prioner i urin, avføring og spytt. (Våge et al., 2019). Dette er tilfelle ved klassisk CWD (Sigurdson et al., 1999). Den atypiske formen som ble funnet hos elgene hadde en mer diffus utbredelse av PrP<sup>Sc</sup> i hele hjernen, lavere molekylvekt av prionet,

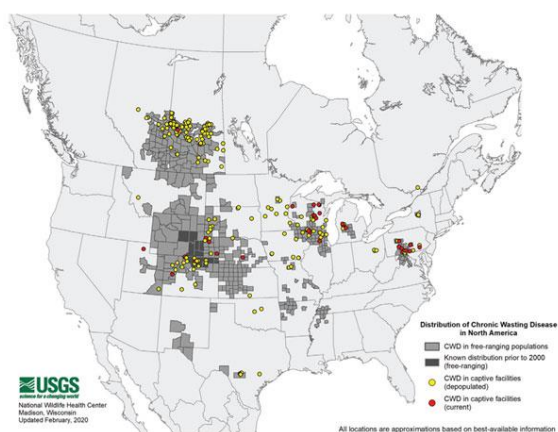
og det ble ikke påvist prioner i lymfatisk vev. Det ble heller ikke funnet prioner i lymfatisk vev hos en hjort som testet positivt for CWD i 2017. (Vikøren et al., 2019). Senere (2021 og 2022) er ytterligere to viltlevende hjort påvist med det forskerne tror er samme sykdom.

CWD er en fatal sykdom for dyrene som rammes. Det er ingen vaksine, og siden sykdommen ikke gir en immunrespons, er det også vanskelig å utvikle ("Center for Disease Control and Prevention", 2021). Prioner kan overleve lenge i naturen siden de er svært resistente mot kjemiske og fysiske påvirkninger. Miljøsmitte er derfor en stor utfordring i bekjempelsen av sykdommen. Siden inkubasjonstiden er lang, kan smittede dyr skille ut smittestoff lenge før de selv blir klinisk syke, og beite der syke dyr har vært kan være smittefarlig i lang tid (Veterinærinstituttet, [u.å.]-c).

I USA er sykdommen endemisk. CWD har spredd seg til 30 stater i USA og 4 provinser i Canada (frittlevende og dyr i fangenskap sett under ett) ("National Wildlife Health Center", 2022). Der har sykdommen hatt store konsekvenser, også utover dyrevelferden for det enkelte dyr som blir sykt. I over 175 anlegg for hjortevilt har over 80 % av dyrene blitt infisert (Keane et al., 2008), noe som har ført til sanering med dyre kompensasjonsordninger (Carlson et al., 2017). Det som bidrar mest til spredning til nye områder er forflytning av hjortevilt, og mye tyder på at CWD har blitt spredd mellom viltlevende hjortevilt og hjortevilt i anlegg. Se Figur 3 og Figur 4 for hvor rask spredning det har vært av CWD i løpet av en tiårsperiode (2010-2020).



Figur 3: Utbredelse av CWD i Nord-Amerika i 2010. Hentet fra USGS.



Figur 4: Utbredelse av CWD i Nord-Amerika i 2020. Hentet fra USGS.

I USA har undersøkelser vist at rundt halvparten (49%) av jegere vil slutte å jakte hvis 50 % av viltet er infisert med CWD (Needham et al., 2004). Slike undersøker er ikke gjort i Norge, men i mangel på sikrere data kan man anta lignende resultat her. Blir nedgangen i antall jegere stor vil det få negative ringvirkninger. Jakt er viktig som rekreasjon og friluftaktivitet for jegere, men det er også den viktigste aktøren forvaltningen har for å regulere bestander. I tillegg kan jakt være et viktig grunnlag for næringsutvikling og verdiskapning i distriktene (Miljødirektoratet, [u.å.]).

En spredning av CWD fra vilt til tamreinbestander i Norge vil være katastrofalt for tamreinnæringen. Sanering av bestander, og i verste fall kan utradering av tamreindriften, bli resultatet (Nymo, 2021). CWD er en direkte trussel for tradisjonelle, kulturbærende næringer som samisk og ikke-samisk tamreindrift. En spredning av CWD vil altså få konsekvenser langt utover for det enkelte dyr som blir smittet.

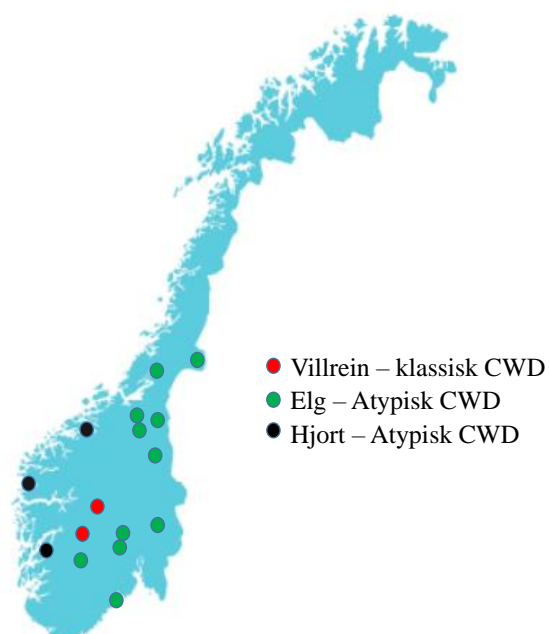
Det er gjort flere studier på hvordan CWD har påvirket bestandene i USA. Studier fra området hvor CWD først ble oppdaget hos viltbestanden, Colorado og Wyoming, har sett på endring i bestandsstørrelse på grunn av CWD. En studie (Geremia et al., 2015) så på fire populasjoner i Colorado. Her var CWD prevalensen relativt lav (<10 %). Deres modeller fant at CWD førte til, eller bidro til, lokal reduksjon i to av bestandene, mens i to av bestandene der CWD prevalensen var lavest, fant de ingen endring i bestandsstørrelse som kan tilskrives CWD. For at bestandene skulle holdes stabile måtte imidlertid jaktuttaket innskrenkes. Tre andre studier, også fra samme område (Devivo et al., 2017; Edmunds et al., 2016; Miller et al., 2008) så på bestander med en prevalens av CWD på 20-42 %. Deres modeller fant at bestandene minket med 3-20 % i størrelse per år, og at dette kunne tilskrives CWD.

Da CWD først ble oppdaget i Norge var en teori at det var smitte fra Nord-Amerika som var bragt inn. Nyere forskning både i Norge og i samarbeid med internasjonale laboratorier har gjort at denne hypotesen er svekket. Det er blitt brukt musemodeller som er mottakelige for prioner fra hjortedyr. De har blitt podet intracerebrat med prioner, og ut ifra lesjoner, inkubasjonstid og mønster som vises på western blot kan man dele prionene inn i ulike typer. Det har blitt sett type-forskjeller mellom prionene hos norsk villrein og hos hjortedyr i Nord-Amerika, som gjør det mindre sannsynlig at opprinnelsen til CWD som sett i Norge stammer derfra. Dette er blitt grundig diskutert i en review artikkel (Tranulis, M. A. et al., 2021). Det er ikke avklart hvordan skrantesyke oppsto i Norge (Veterinærinstituttet, [u.å.]-a).

Tabell 1 og Figur 5 viser en oversikt over antall dyr og steder hvor CWD er påvist i Norge.

Tabell 1 Oversikt over antall CWD tilfeller hos villrein, vill hjort og elg i Norge. (Veterinærinstituttet, 2022)

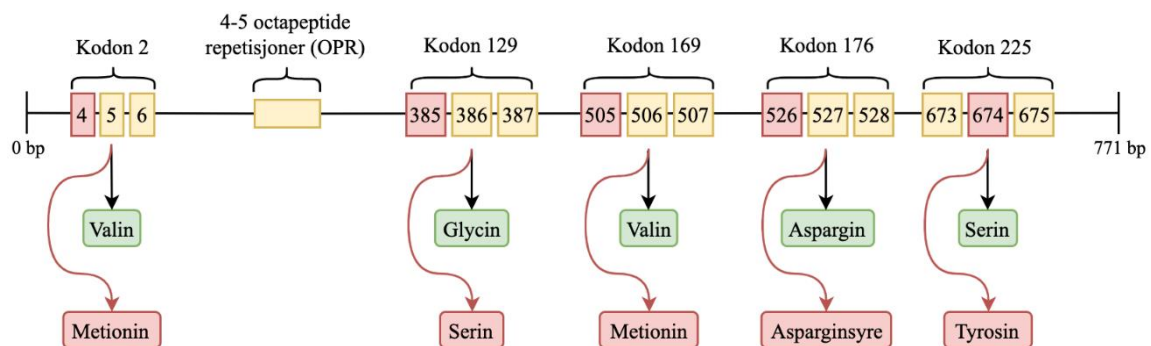
	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	Totalt
Villrein	4	9	6	0	1	0	0	20
Vill hjort	0	1	0	0	0	1	1	3
Elg	2	1	1	2	1	2	2	11
Totalt	6	11	7	2	2	3	3	34



Figur 5 Geografisk fordeling av de ulike tilfellene mellom villrein, vill hjort og elg. (Hjortevilt, 2021). Hvert punkt representerer ett tilfelle, med unntak av det nordligste villreinpunktet (rød), som representerer de 19 tilfellene i Nordfjella.

## PRNP-genet

Etter utbruddet av CWD i Nordfjella sone 1, undersøkte man forekomsten av naturlig variasjon i *PRNP* genet, for å se om noen genvarianter var over- eller underrepresentert blant CWD tilfellene. Varianter av samme gen kalles for alleler; i det påfølgende vil begrepene genvariant og allel brukes som synonyme. Hvert individ har to kopier av *PRNP*, ett fra hver forelder. Kombinasjonen av disse to kalles for en genotype. Undersøkelsene ble gjort for å se om det var noen sammenheng mellom *PRNP*-genotype og mottakelighet for CWD. I 2019 ble det publisert en studie som så på mottakelighet for CWD basert på *PRNP*-genotype hos norsk villrein (Güere et al., 2020). Dette er den første studien som har analysert variasjoner i *PRNP*-genet mellom kontroller og CWD-positive i en villreinstamme med påvist CWD. I denne studien ble *PRNP*-genet til 19 CWD-positive villrein og 101 negative kontroller fra Nordfjella sone 1 sekvensert. Det innebærer at det var minst fire negative kontroller per positive prøve. Dyrene som ble satt opp mot hverandre var i samme alderskategori og hadde samme kjønn (Güere et al., 2020). Det ble funnet 6 variasjoner innenfor ORF. Det ble identifisert 5 SNV (single nucleotide variation) og én delesjon på 24 bp.



Figur 6 Skjematisk oversikt over open reading frame til PRNP med nummererte basepar (gult) og områder med SNV (rødt). Røde piler indikerer aminosyren som oppstår ved mutasjon.

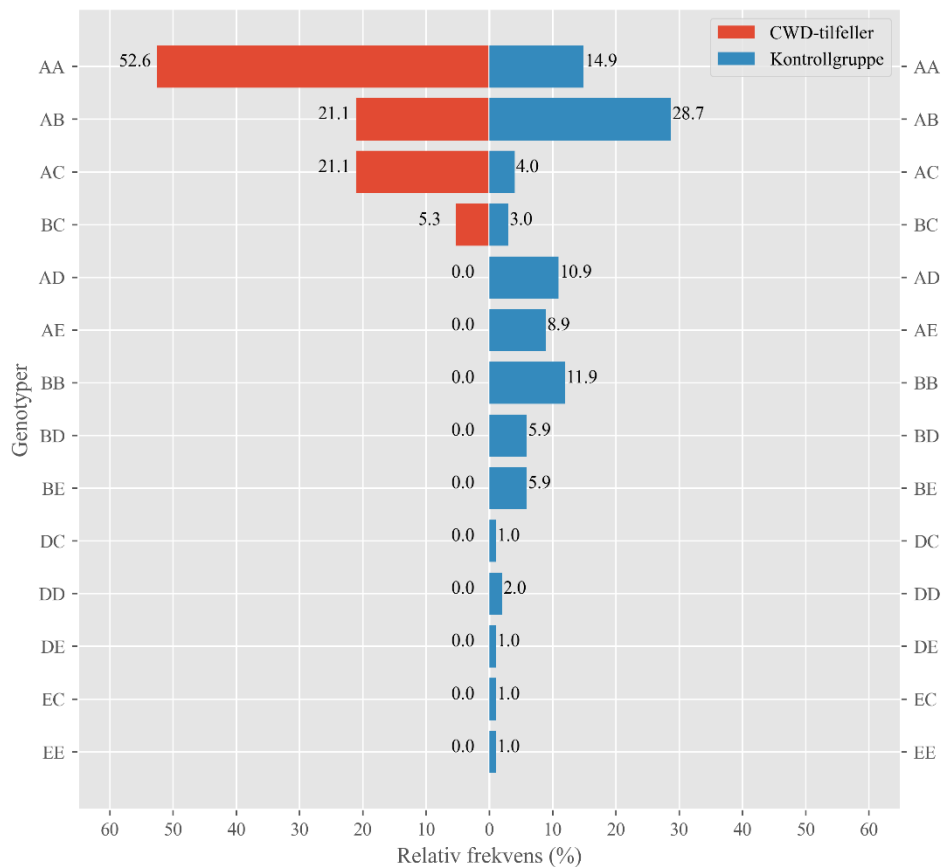
Figur 6 viser en skjematisk oversikt over ORF til *PRNP*-genet hos villrein. Denne er på 771 basepar, og SNV ble funnet på kodon 2, 129, 169, 176 og 225. Figuren viser hvilke to aminosyrer disse SNV kan variere mellom. I tillegg ble det identifisert en delesjon på 24 bp mellom kodon 2 og 129. OPR-regionen består av fire eller fem octapeptid repetisjoner. Et octapeptid består av åtte aminosyrer.

Blant disse 6 variasjonene i ORF ble det funnet 5 ulike kombinasjoner, som fikk betegnelsene allel A, B, C, D og E. Tabell 2 viser forskjellen mellom allelene.

Tabell 2 Ulikhetene mellom allel A, B, C, D og E

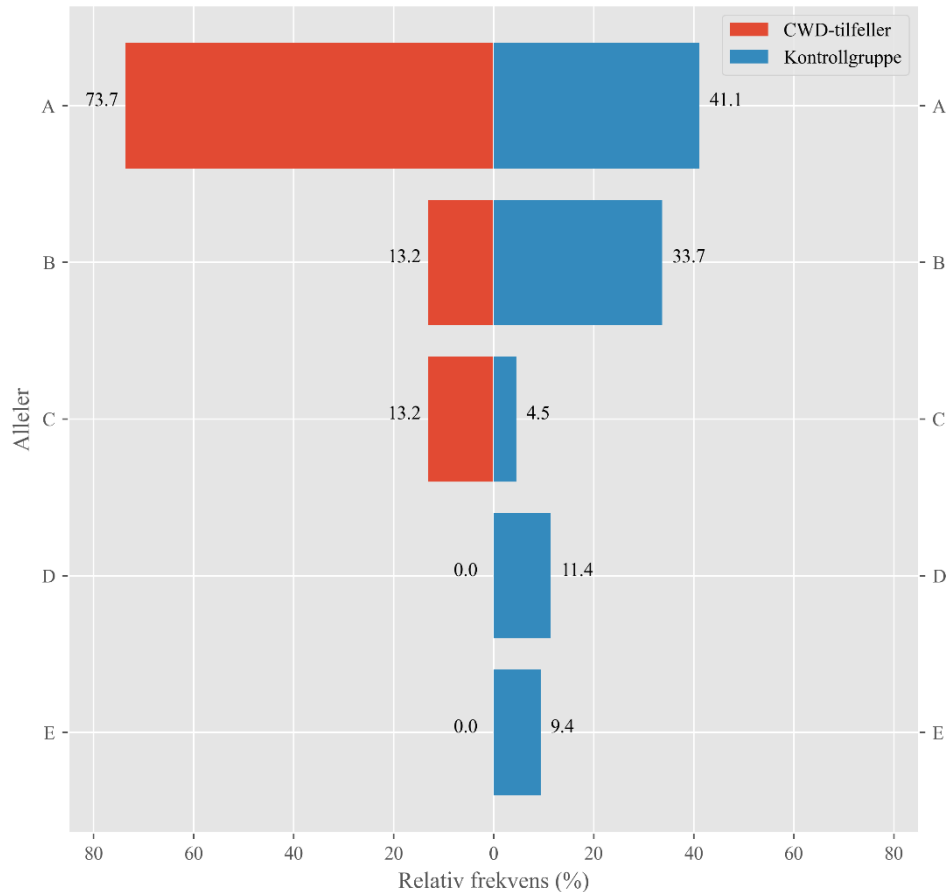
Allel	Kodon 2	OPR	Kodon 129	Kodon 169	Kodon 176	Kodon 225
A	Valin	5	Glycin	Valin	Aspargin	Serin
B	Valin	5	Glycin	Valin	Aspargin	<b>Tyrosin</b>
C	Valin	<b>4</b>	Glycin	Valin	Aspargin	Serin
D	Valin	5	Glycin	Valin	<b>Asparginsyre</b>	Serin
E	<b>Metionin</b>	5	<b>Serin</b>	<b>Metionin</b>	Aspargin	Serin

Disse allelene utgjør 14 genotyper; AA, AB, AC, AD, AE, BB, BC, BD, BE, DC, DD, DE, EC, og EE. Genotypene AB (27,5 %) og AA (20,8 %) var de vanligste, de andre genotypene hadde en frekvens på 10 % eller under. Individier homozygote for allel C, er ikke blitt observert. Blant de 19 CWD-positive individene var det kun fire genotyper som ble identifisert; AA, AB, AC og BC. Alle de positive dyrene hadde altså allelene A og/eller C, og disse allelene var overrepresentert i forhold til kontrollgruppen (Güere et al., 2020). AA utgjorde 52,6 %. Blant de 101 kontrollene ble alle 14 genotypene identifisert. AB utgjorde flertallet med 28,7 %, som vist i Figur 7. Den CWD-positive bukken fra Hardangervidda hadde genotype AD (Ytrehus et al., 2021). Denne genotypen ble ikke identifisert blant CWD-tilfellene på Nordfjella sone 1, men allel A er til stede.



Figur 7 Genotype-frekvens hos kontrollgruppen og CWD-gruppen. Kilde: (Güere et al., 2020)

Blant genotypene som ikke ble identifisert hos de CWD-positive utgjorde genotype BB flertallet med sine 11,9 %.



Figur 8 Allel-frekvens hos kontrollgruppen og CWD-gruppen. (Güere et al., 2020)

I Figur 8 vises allelfrekvensen hos både kontroll- og CWD-gruppen. På allelnivå var det allel A som var mest utbredt hos begge gruppene. Allel C var også mer vanlig blant CWD-gruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Allel B var derimot mer vanlig blant kontrollgruppen. Genotype BB var også den genotypen som var mest utbredt blant kontrollgruppen og som ikke ble identifisert blant CWD-gruppen.

Resultatet av en regresjonsanalyse utført av Güere et al. viste at risikoen for CWD økte ved å gå fra genotype BB til enten AA eller AC. Allel A og allel C er veldig like, forskjellen er at allel C har 4 oktapeptid repetisjoner og ikke 5, dvs en delesjon på 24 bp. Allel B derimot, har tyrosin på kodon 225 istedenfor serin, som allel A og C har. *In vitro* undersøkelser har



tidligere vist at en slik substitusjon fra serin til tyrosin har gjort at PrP bruker lengre tid på å omdanne seg fra PrP<sup>C</sup> til PrP<sup>Sc</sup>, som igjen fører til at inkubasjonstiden øker (Güere et al., 2020). I tamreinflokker er det Allel B som dominerer (Güere et al., 2021).

Allel D og E ble ikke observert hos CWD-gruppen i Nordfjella, men bidro med 20,8 % av alle allelene som ble identifisert hos kontrollgruppen. Allel D har asparaginsyre på kodon 176, en slik substitusjon på kodon 176 er også blitt observert hos sau, og regnes som resistent mot klassisk skrapesyke. I tillegg har man sett at reinsdyr som er bærere av en enkel kopi av allel E ikke har utviklet CWD etter oral eksponering. Hos tamrein har høyere frekvens av allel D og E enn villrein blitt observert (Güere et al., 2020).

I gjennomsnitt har villrein 55 % forekomst av allelene som er knyttet til høy følsomhet for CWD, mot 20 % hos tamrein. Det er uvisst om dette er grunnet ulikt opphav eller seleksjon gjennom avl (Güere et al., 2021). Uavhengig av årsak, så ser man tendens til at tamreinen har mer gunstig *PRNP*-genetikk enn villrein.

### **Skrapesyke hos sau – kunnskap og erfaringer**

Skrapesyke, også kalt scrapie, er på lik linje med CWD en prionsykdom. Dette er en sykdom som har vært kjent i mer enn 250 år og er utbredt over store deler av verden. Hos sau vet man at det er stor forskjell i mottakelighet avhengig av sauens *PRNP* genotype. Skrapesyke ble for første gang påvist i Norge i 1981. Fram til 1995 hadde man bare sett enkelttilfeller av sykdommen, men i 1995 så man en økning i antall smittede flokker. Mer enn 30 besetninger fikk påvist skrapesyke i 1996. Da startet arbeidet med nedslaktning av smittede besetninger og kontaktflokker, og antall nye tilfeller av skrapesyke ble sterkt redusert. Klassisk skrapesyke ble sist påvist i Norge i 2009. Den atypiske formen av skrapesyke, som først ble påvist i 1998, skiller seg fra den klassiske formen ved at hjerneforandringene oppstår på et annet sted i hjernen. I Norge er det ca. 5-12 tilfeller av atypisk skrapesyke i året (Veterinærinstituttet, [ u.å.]).

Hos sau har man sett at det er variasjoner på tre kodoner innenfor *PRNP*-genet: A136V, R154H og Q171R/H. Fra disse kan det dannes fem alleler: ARQ, ARR, AHQ, ARH og VRQ (Goldmann, 2004), som vist i Tabell 3.

Tabell 3 Oversikt over de ulike allelene og hvilke aminosyrer de gir i de ulike variantene. A: alanin, V: valin, R: arginin, H: histidin, Q: glutamin.

Allel	Kodon	Kodon	Kodon
	136	154	171
ARQ	A	R	Q
ARR	A	R	R
AHQ	A	H	Q
ARH	A	R	H
VRQ	V	R	Q

Allelene kan gi opphav til 15 ulike genotyper, som vist Tabell 4.

Tabell 4 Oversikt over hvordan de ulike allelene gir ulik følsomhet for sykdommen. Rødt: Svært følsomme, oransje: middels følsomme, gul: lite følsomme, grønn: svært lite følsomme. Kilde: (Mead et al., 2019)

	ARQ	ARR	AHQ	ARH	VRQ
ARQ	Orange	Gul	Orange	Orange	Rødt
ARR	Gul	Grønn	Hvit	Gul	Rødt
AHQ	Orange	Hvit	Orange	Orange	Rødt
ARH	Orange	Gul	Orange	Orange	Rødt
VRQ	Rødt	Rødt	Rødt	Rødt	Rødt

Tabell 4 viser at det er særlig allel VRQ som er knyttet til høy mottakelighet. Allel ARQ er knyttet til noe mindre mottakelighet. Sau med allel ARR har svært lav mottakelighet, spesielt om allelet forekommer i dobbel dose (homozygot). De individene som genetisk sett er mer mottakelig for sykdommen utvikler symptomer mye tidligere enn de som er mindre mottakelige. Noe av forskjellene i mottakelighet mellom PrP genotyper kan forklares med at noen genotyper produserer PrP<sup>C</sup> som lettere lar seg omdanne til PrP<sup>Sc</sup> i cellene, og dermed gir lettere grunnlag for utvikling av sykdom. Sannsynligvis er det også andre genetiske elementer som er av betydning.

Kunnskapen om genetikken har vært viktig for å kunne begrense sykdommen ved hjelp av avl. Målet er å oppnå flokkimmunitet, hvor sykdommens smittetall  $R_0$  blir mindre enn 1. I praksis betyr det at hvert sykt individ i gjennomsnitt smitter færre enn ett friskt individ, og på

den måten vil sykdommen gradvis avta. Ved å øke andelen dyr med ARR-allelet, som er lite mottakelig, vil smittetallet reduseres. Et slikt avlsprogram er blitt brukt i flere land, særlig i Storbritannia, Frankrike og Nederland. Resultatene fra blant annet Nederland viser at når frekvensen av ARR-allelet i sauepopulasjonen kommer opp i 70 %, vil  $R_0$  bli mindre enn 1. Selv om enkelte genotyper hos reinen i Nordfjella er mindre følsomme enn andre, er trolig ikke disse like beskyttende som ARR-allelet hos sau. Selv en vesentlig lavere beskyttelsesgrad enn 99% kan allikevel ha stor effekt på forekomsten av en slik smittsom sykdom, og dermed begrense eventuelt nye utbrudd (Ytrehus et al., 2021).

### **Zoonotisk potensiale – vil CWD kunne smitte mennesker?**

Det er en stor bekymring om hvorvidt CWD kan smitte over til mennesker. Hvordan en eventuell smitte til folk vil arte seg er ukjent, og det kan være en enorm trussel som vi kanskje ikke har evne til å oppdage om oppstår. Det er vanligvis en sterk artsbarriere for overføring av TSEer, og det er sjeldent med prionsykdommer som krysser mellom arter, men kugalskap er et eksempel. Det er vanskelig å predikere om det er en artsbarriere basert på den genetiske variasjonen i *PRNP*-genet. For eksempel har PrP sekvensen hos storfe og sau/geit samme grad av forskjell fra den humane sekvensen, og er 99 % like seg imellom. Likevel er det bare TSE varianten hos storfe som har blitt overført til menneske (Rongyan et al., 2008). Det er derfor vanskelig å si noe om CWD sitt zoonotiske potensiale kun basert på *PRNP*-genetikken.

Den klassiske formen av BSE fikk katastrofale følger i Storbritannia på 80-tallet, da det viste seg at den kunne smitte til mennesker. Sykdommen hos mennesker fikk navnet variant Creutzfeldt-Jacobs sykdom (vCJD), for å skille det fra Creutzfeldt-Jacobs sykdom (CJD), som oppstår spontant og i sjeldne tilfeller som arvelig. I Storbritannia oppdaget man at mange unge mennesker fikk lignende symptomer som ved CJD, som hovedsakelig rammer eldre. Ved starten av utbruddet viste man ikke at det hadde sammenheng med fôring av kyr på kjøttbenmel som inneholdt prioner. Etter at man i 1992-1993 sluttet med dette i Storbritannia, avtok epidemien. Det har aldri vært påvist klassisk kugalskap hos dyr i Norge (Veterinærinstituttet, [u.å.]-b).

På oppdrag fra Mattilsynet utnevnte Vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM) en prosjektgruppe for å kartlegge kunnskapen om det zoonotiske potensialet til CWD. Den første VKM-rapporten i 2017 konkluderte med at det zoonotiske potensiale til den norske CWD varianten var svært lav ved håndtering av slakt og konsum av kjøtt. Terminologien «svært

lav» betyr at det ses på som en svært sjelden hendelse, men at det ikke kan utelukkes (VKM, 2017a). En ny rapport ble bestilt i 2020, da det etter den forrige rapporten ble gitt ut hadde kommet nye studier som så på det zoonotiske potensialet til CWD. Rapporten fra VKM «Oppdatert kunnskap om det zoonotiske potensialet av skrantesyke ved håndtering av slakt og konsum av kjøtt» kom i 2021 og konkluderte med det samme som den tidligere rapporten hadde gjort (Tranulis, M. et al., 2021).

Hos reinsdyr med CWD har man sett at det er prioner i lymfeknuter, selv om det enda ikke finnes i hjernen. I en preklinisk fase kan det som tidligere nevnt være prioner i perifere lymfoide organer uten at man ser sykdomstegn. Før det har blitt undersøkt nøyere bør det ses på som mulig at det kan være prionsmitte i muskulatur hos reinsdyr selv hos symptomfrie dyr. Studier som undersøker det zoonotiske potensialet til CWD er avgjørende for å unngå en lignende situasjon som når det viste seg at kugalskap kunne smitte til mennesker.

For å se på det zoonotiske potensialet er det blitt gjort flere studier på ulike arter. Studier på makakaper er spesielt relevante fordi makakaper har vist seg å være mottakelige for prioner som rammer mennesker, og utviklet sykdom etter relativt kort inkubasjonstid. I en studie fra 2014 (Race B, 2014) ble makakaper podet med CWD-prioner både oralt og intrakranielt. Ingen utviklet prionsykdom. Studien inkluderte også poding av CWD-prioner hos ekornaper. Av 13 ekornaper som ble fôret med CWD-infisert kjøtt utviklet 12 prionsykdom. Det samme gjorde alle som ble podet intrakranielt. Det er usikkert hvorfor ekornaper var mottakelig for CWD, mens makakaper ikke utviklet sykdom, men man tror at forskjeller i *PRNP*-genet har betydning. Sammenligning av *PRNP*-genet hos ekornaper og makakaper har vist at det er forskjeller på 5 kodoner (56, 100, 108, 159 og 182). Det er foreløpig ikke klart hva ulikhetene har å si for utvikling av prionsykdom, men av disse 5 kodonene, er makakaper og mennesker identiske på tre av kodonene (56, 159 og 182) (Race B, 2014). Studien ble videreført, og etter observasjon i 10 år viste fortsatt ingen av makakapene tegn til prionsykdom (Race et al., 2018).

En annen studie startet i 2009 brukte også makakaper som modeller, med fokus på inntak av kjøtt oralt. Studien er ikke publisert enda, men foreløpige resultater er lagt fram, blant annet under en internasjonal konferanse mai 2017 (Czub, 2017). Foreløpige resultater fra denne studien viser at makakaper er mottakelige for CWD, både oralt og via direkte poding i hjernen, og studien ble grundig behandlet i rapporten fra 2017 (VKM, 2017a). I 2021

bekrefter den ansvarlige for studien nå, Dr. Hermann Schätzl, i e-post til Dr. Michael Tranulis, at CWD har blitt overført til makakaper både etter inntak av CWD-infisert kjøtt og intrakranial poding. Inntak av CWD-infisert kjøtt er en sannsynlig måte mennesker kan bli eksponert for CWD-smitte på. Schätzl konkluderer med at studien indikerer at artsbarrieren for CWD til å smitte mennesker sannsynligvis ikke er absolutt (Tranulis, M. et al., 2021).

I tillegg til studier på primater, er det blitt gjort studier på transgene (Tg) mus som uttrykker menneskets prionprotein. Den første studien hvor man podet slike «humaniserte» Tg-mus med CWD-smitte fra reinsdyr og elg i Norge ble publisert i 2021 (Wadsworth et al., 2021). I studien ble det brukt to ulike muselinjer der begge overuttrykker human PRNP. Resultatet av studien var at ingen mus utviklet prionsykdom. Hjernen til enkelte av musene ble også undersøkt for PrP<sup>Sc</sup> ved hjelp av immunhistokjemi, også disse testene var negative. Studier med sekundærpodinger er igangsatt, men foreløpig ikke publisert. Dersom utfallet av dette blir at det bekreftes sekundær transmisjon til Tg-mus, så er det større grunn til bekymring når det gjelder human smitte.

Selv om rapportene fra VKM har konkludert med at det zoonotiske potensialet er svært lavt, kan det imidlertid ikke utelukkes at CWD-isolater fra norsk villrein kan forårsake sykdom hos menneske. For å sørge for at mennesker eksponeres minst mulig for CWD-smitte er det viktig at prevalensen av skrantesyke hos norsk hjortevilt holdes lavt. Det er vanskelig å kunne påvise en eventuell smitte til menneske. Det finnes foreløpig ingen enkelt-test for å kunne diagnostisere prionsykdom hos levende pasienter med raskt progrediert demens (Folkehelseinstituttet, 2010). For å kunne påvise prionene og hvor de stammer fra må pasientene obduseres med hjerneuttak. Dette er noe som i Norge gjøres sjeldnere og sjeldnere på grunn av potensiell smitte til ansatte som gjennomfører obduksjonen, i tillegg til at det ikke finnes egnede obduksjonsfasiliteter (Tranulis, M. et al., 2021). Det vil derfor være vanskelig å kunne skille mellom pasienter med for eksempel spontan CJS og pasienter som kan være smittet med CWD-prioner.

Økt eksponering av smittestoffet til mennesker øker sannsynligheten for at artsbarrieren krysses (Tranulis, M. et al., 2021). For å minske human eksponering har Canadian Food Inspection Agency utviklet retningslinjer man kan følge dersom man velger å spise viltkjøtt fra hjortevilt. De anbefaler befolkningen å kun kjøpe hjortevilt fra offentlige aktører. Kjøtt fra CWD-positive hjortevilt skal ikke til konsum. Dersom man får eller kjøper viltkjøtt fra jegere

eller andre private aktører, anbefales det å spørre om dyret kommer fra et område hvor det er påvist CWD, eller om dyret er blitt testet for CWD. Konsum av viltkjøtt fra hjortevilt som kommer fra områder med påvist smitte anbefales ikke, særlig ikke hvis dyret ikke er blitt testet (Canada, 2020). Slike retningslinjer har oss bekjent foreløpig ikke blitt publisert av Helsedirektoratet i Norge.

## Testing for CWD

I 2001 startet Helseovervåkingsprogrammet for Hjortevilt (HOP) i Norge. Da var det ikke noe skjematisk testing av hjortedyr for CWD, men den økende sykdomstrenden i Nord-Amerika og Canada gjorde at Norge startet med diagnostikk i 2003. Frem til 2016, ble det kun tatt 2159 prøver fra hjortedyr, og bare 10 av disse var fra villrein. Tabell 5 viser antall testede villrein de siste årene.

Tabell 5 Fordeling av antall testede sortert etter år og art. (Veterinærinstituttet, 2022)

År	2003-15	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022 per. 23/5	Totalt
Antall testede villrein	10	842	2922	3650	3334	3213	3511	22	<b>17504</b>

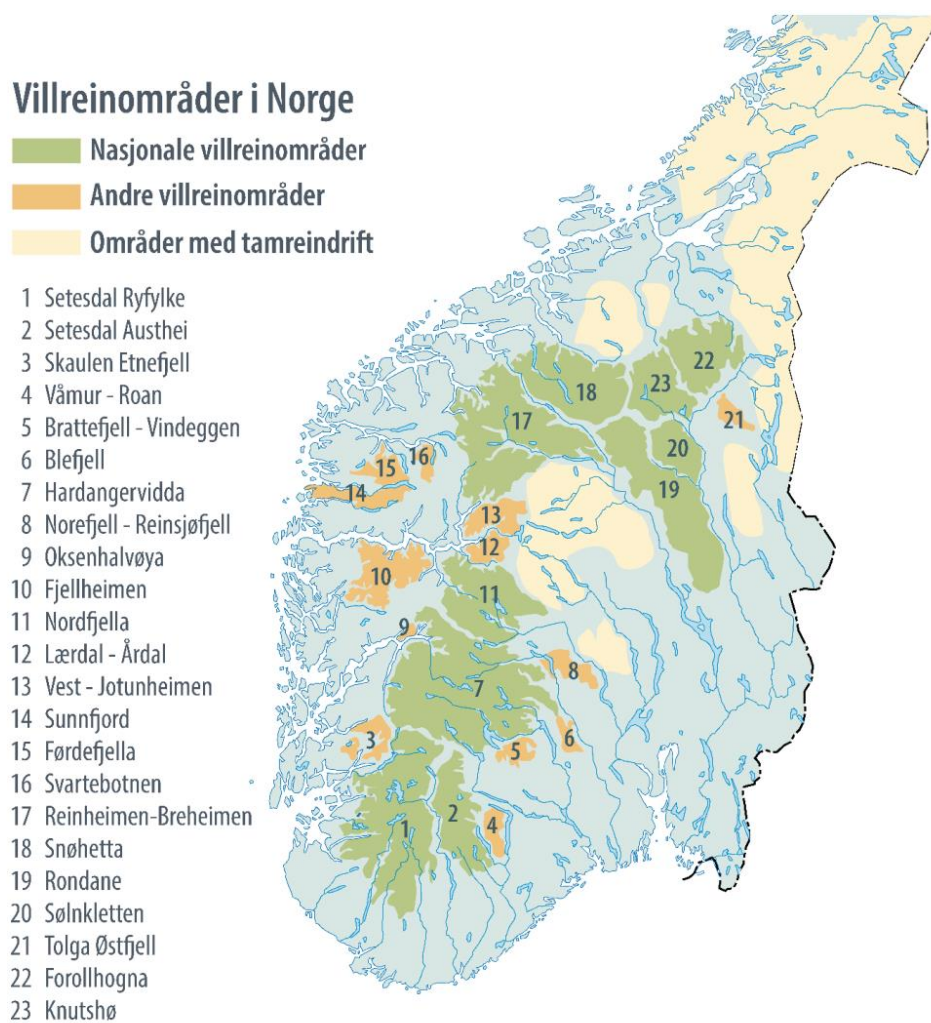
Fra og med høsten 2018 ble det lagt opp til obligatorisk prøveinnsamling av villrein (1 år og eldre) i alle norske villreinområder. Alle jegere med relevant fellingstillatelse får tildelt en utstyrspakke for å foreta testing av felt villrein. Det tas prøver av både hjerne (medulla oblongata) og lymfeknute (*Inn. retropharyngealis*). Hjernevevet som analyseres tas fra et bestemt område, *obex*, som ofte er det første stedet hvor PrP<sup>Sc</sup> akkumuleres i hjernen. Tidligere ble det kun tatt prøver av hjerne, men siden man tidligere i sykdomsforløpet kan detektere prioner i lymfeknuter, la man til dette i 2016. Alle prøvene sendes til Veterinærinstituttet for analyse (Våge, 2021).

Veterinærinstituttet (VI) er nasjonalt referanselaboratorium for TSE hos dyr, og ble i 2018 oppnevnt av Verdens dyrehelseorganisasjon (OIE) som referanselaboratorium for CWD. Prøvene analyseres først med hurtigtester som baserer seg på ELISA av samleprøver med vev fra både hjerne og lymfeknuter. Dersom en samleprøve blir positiv, går man tilbake og tester alle prøvene hver for seg med samme ELISA-test. En positiv prøve blir videre bekreftet med Western-blot (Våge, 2021). En annen metode som også kan verifisere en positiv ELISA, er

immunhistokjemi (IHK) som visualiserer proteinase-resistent prionprotein (PrP<sup>Sc</sup>) i histologiske snitt. Denne metoden brukes særlig i forskning.

Metoder for å kunne diagnostisere CWD hos levende hjortevilt er under utvikling, for eksempel i form av rektalbiopsi eller tonsillbiopsi (Våge et al., 2019). Rektalbiopsi er brukt som metode for å avdekke CWD hos ett tilfelle. Slik testing av levende dyr er svært kostnadskrevende da dyrene må immobiliseres før prøvetaking. I tillegg må dyrene holdes fanget og under oppsyn også etter prøvetakingen (Mattilsynet, 2017).

## Genetikk hos villrein i Norge

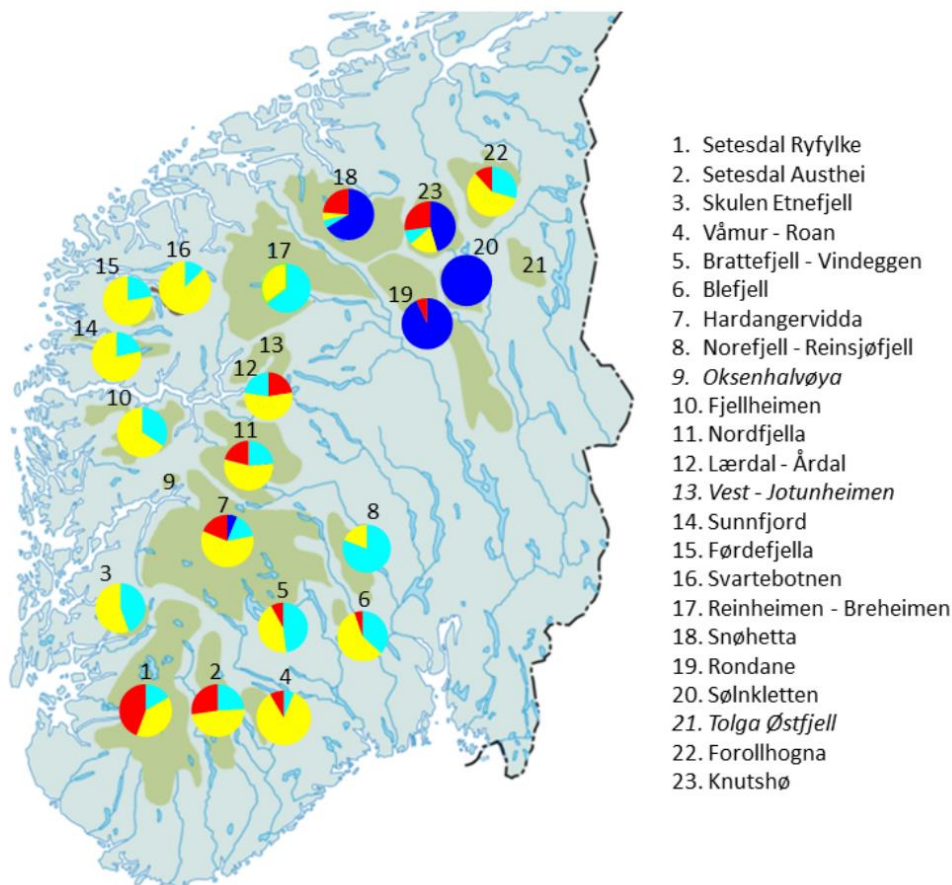


Figur 9 Villreinområdene i Norge. Figuren er hentet fra Kjærstad m.fl. 2017.

I 2021 ble det publisert en studie fra Güere et al. som så på variasjon i *PRNP*-genet hos reinsdyr (både fra tamrein og villreinstammer), elg, hjort og rådyr (Güere et al., 2020). Det ble funnet en signifikant forskjell mellom forekomst av motstandsdyktige genvarianter hos villrein og tamrein. Hos villreinstammene ble det i snitt funnet alleler forbundet med høy mottakelighet for CWD hos 55 % av dyrene, mens det hos tamrein ble funnet hos under 20 %. I studien ble det tatt prøver fra syv villreinstammer og fem tamreinstammer. Stammene i Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke ble ikke studert.

Mikrosatellitter og mitokondrielt DNA (mtDNA) brukes som genetiske markører i studier hos tam- og villrein (og mange andre arter). Mikrosatellitter er repeterte nukleotidsekvenser i DNA-tråden, og man kan se at det har skjedd en mutasjon når antallet repetisjoner forandres. Det kan være mange ulike alleler som kommer av ulike antall repetisjoner. Bare i Nordfjella har man studert 141 forskjellige alleler. (Røed et al 2008). MtDNA er ofte bedre bevart i arkeologisk materiale enn mikrosatellitter. MtDNA nedarves gjennom morlinjene, og kan derfor si noe om artens evolusjon. Ved å se på utbredelsen av mtDNA haplogrupper hos rein, kan man vurdere hvor reinen kommer fra, og hvordan genetikken har endret seg etter blanding med tamrein, som vist i Figur 10. Hvis man ser på den genetiske variasjonen mellom reinsdyrene i Norge, kan man basert på gen-poolen dele de inn i tre hovedgrupper: Flokkene i Dovrefjell/Rondane, Langfjella og tamrein. Langfjella er en samlebetegnelse for fjellområdene som strekker seg fra Dovrefjell i nord til Setesdalsheiene i sør. Reinen i Langfjella er betydelig preget av innkryssing med tamrein. Det er ingen genetisk variasjon i mikrosatellittene mellom reinen i sone 1 og 2 i Nordfjella, og de kan derfor anses som de samme reinsdyrene genetisk sett (personlig kommunikasjon, Røed, K.).





Figur 10 Fordeling av mtDNA haplotyp hovedgrupper. Blå: Haplotyp hovedgruppe 1a, Turkis: Haplotyp hovedgruppe 1b, Gult: Haplotyp hovedgruppe 2, Rødt: Haplotyp hovedgruppe 1. Figuren er hentet fra Miljøkvalitetsnorm for villrein.

### Reinheimen-Breheimen

Reinheimen-Breheimen (område 17, Figur 9) er delt i tre, Reinheimen, Breheimen Sørøst og Breheimen Sørvest, og er et av de nasjonale villreinområdene ("Norsk Villreinsenter", [u.å.]a). Telling i 2021 ga et antall på totalt 2863 dyr, fordelt på 2063, 510 og 290 i de tre områdene ("Reinheimen-Breheimen Villreinutvalg", 2021). Ut ifra geografiske forhold ser man at Reinheimen-Breheimen stammen er relativt isolert. Mellom Reinheimen-Breheimen stammen og Snøhattastammen (område 18, Figur 9) går Romsdalen. I øst er E6 et skille mellom Reinheimen-Breheimenstammen og Rondanestammen (område 19, Figur 9). I sør er det Riksvei 55 som skiller Reinheimen-Breheimen stammen fra Vest-Jotunheimen stammen (område 13, Figur 9).

I gammelt reinmateriale fra dagens Breheimen-Reinheimen område ser man lignende genetisk struktur som Rondane/Dovre stammen, men genetiske studier har vist at dagens villreinstamme stammer fra tidligere tamreindrift i området, og har en genetisk variasjon som

ligner mye på den man ser hos nåtidens tamrein (Kjørstad et al., 2017). Dagens stamme har altså lite til felles med Rondane/Dovre stammen, men er en del av den genetiske bestanden med primær tamreinopprinnelse. Stammen skiller seg også fra stammen i Vest-Jotunheimen, som har Langfjella som genetisk hovedbestand.

### **Setesdal Ryfylke**

Setesdal Ryfylke (område 1, Figur ) er det sørligste villreinområdet, og er også et av de nasjonale villreinområdene ("Norsk Villreinsenter", [u.å.]-b). Det er mindre isolert, og her utveksles det rein både med Hardangervidda i nord og Setesdal Austhei i øst. I 2017 ble det estimert at det var ca. 3300 villrein i området, fordelt på 1300 i sørområdet og 2000 i nordområdet (forsiktig estimat) (Jerstad & Stegarud, 2019). Av Figur 10 ser man at det er en stor andel av haplotypehovedgruppe 1, som er den genetiske hovedbestanden i Langfjella.

## **Reetablering av villrein i Nordfjella**

### **Reetableringsgruppen**

Villreinen i Nordfjella sone 1 ble avlivet med en forutsetning om reetablering av en frisk villreinstamme i området. For at reetableringen skal kunne gjennomføres, må sone 1 brakklegges i minst 5 år, miljøet må være fritt for smitte, og sone 2 og kildebestanden skal friskmeldes på bestandsnivå (Mattilsynet, 2017).

Reetableringsgruppen ble opprettet av Mattilsynet og Miljødirektoratet, på bestilling fra Landbruks- og matdepartementet (LMD) i samråd med Klima –og miljødepartementet (KMD). Reetableringsgruppens arbeid skal fungere som et grunnlag for direktoratenes fremtidige arbeid med reetableringsplanen. Rådene gruppen kommer med vurderes av direktoratene, som etter en helhetsvurdering vil lage en revidert plan for reetableringen (Miljødirektoratet 2020). Rapporten skal så overrekkes departementene, og anbefalingen skal tas til følge, men til slutt er det politikere som tar avgjørelsen om hvordan reetableringen skal gjennomføres. Da kan andre faktorer enn det faglige grunnlaget også spille inn, som budsjettering og tiltakenes popularitet blant velgerne.

Miljødirektoratet og Mattilsynet har i «Revisjon av reetableringsplan for villrein i Nordfjella sone 1», gitt reetableringsgruppen et mandat og avgrensning. Gruppen har fått i oppgave å

levere en felles rapport til direktoratene, som skal bidra til at 3 mål nås. Målene er listet under, ordrett, slik de står i «Revisjon av reetableringsplan for villrein i Nordfjella sone 1»

- 1) sikre fravær av skrantesyke, god dyrehelse og god dyrevelferd
- 2) ivaretagelse av villrein som nasjonal ansvarsart og villrein faglige forutsetninger
- 3) sikre god lokal forankring av reetableringsprosessen og bestandsplan

Skulle det være temaer som splitter gruppen, og man ikke kommer frem til konsensus, skal dette fremgå på en tydelig måte i rapporten (Miljødirektoratet 2020). I «Revisjon av reetableringsplan for villrein i Nordfjella sone 1» står det eksplisitt hva gruppens mandat er:

- konkretisere mål og delmål for reetableringen
- identifisere tiltak som skal sikre målene
- vurdere og anbefale valg av kildebestander og individer fra kildebestander. Flere alternativer skal vurderes, også det å hente dyr fra flere kildebestander i samme alternativ
- vurdere og anbefale praktisk gjennomføring av reetableringen, herunder metoder for overføring av rein
- utarbeide en tentativ tidsplan for reetableringens ulike faser
- konkretisere lokal forankring av prosessen, herunder kommunikasjon
- vurdere usikkerheter og kritiske avveininger for en vellykket reetablering

Arbeidsformen til reetableringsgruppen er en deltakende dialogprosess basert på AEAM-metoden. AEAM står for «Adaptive Environmental Assessment and Management». AEAM ble utviklet på 70-tallet av C.S. Holling og hans kollegaer, og brukt i Norge for første gang på starten av 90-tallet. NINA (Norsk institutt for naturforskning) har videreutviklet arbeidsformen, slik at den kan benyttes i mange situasjoner. Hovedprinsippet til metoden er arbeidsseminarer hvor de ulike aktører deltar, og dialog som veksler mellom plenum og arbeid i grupper (Kjørstad et al., 2017).

AEAM-metoden baserer seg på en trinnprosess som inkluderer forberedelser og arbeid som gjøres under dialogprosessen. I den forberedende fasen beskrives aktiviteter og kunnskapsstatus, samt at deltakere identifiseres. Det er en forutsetning med konsensus om kunnskapsgrunnlaget for en vellykket dialogprosess. Dersom mulig, vil det være en fordel

hvis deltakerne orienteres med kunnskapsgrunnlaget før dialogprosessen starter, alternativt presenteres kunnskapsgrunnlaget under innledningen av prosessen. Under utvelgelse av deltakere til en dialogprosess, bør flere faktorer vektlegges: fagpersoner innenfor de aktuelle fagområder som skal diskuteres, ulik sammensetning med hensyn til kjønn og alder, men også deltakere som viser mangfoldet i samfunnet. Selve dialogprosessen følger et trinn-for-trinn prinsipp, som tradisjonelt inneholder disse punktene: indentifisering av påvirkningsfaktorer, identifisere fokuskomponenter, konstruere årsak-virkningskart, formulere virkningshypoteser og til slutt gi anbefalinger (Kjørstad et al., 2017).

Dialogprosessen i reetableringsgruppen tar utgangspunkt i 9 oppgaver, hvorav de 4 første adresseres på det første møtet (Thomassen, 2021a). Oppgavene er basert på mandatet fra Mattilsynet og Miljødirektoratet. Møtet var en noe modifisert versjon av AEAM, da enkelte av trinnene var utelatt. Første dagen startet med innledning og presentasjon av deltakere, etterfulgt av en fremstilling av kunnskapsgrunnlaget holdt av aktører fra forsknings- og utdanningsinstitusjoner. Deltakerne var på forhånd delt inn i to grupper. Begge gruppene skulle behandle alle spørsmålene, slik at gruppene underveis i prosessen kunne diskutere i plenum. Hver av gruppene hadde en sekretær fra Norsk villreinsenter sør eller NINA, som førte notater inn i rapporteringsskjemaer (Thomassen, 2021b).

### **Aktørene**

Det er mange aktører som bidrar til forvaltningen av villrein i Norge, og som derfor er representert i reetableringsgruppen. Dette er et stort arbeid, da arten er en norsk ansvarssart (Artsdatabanken, 2021a), og presset på dyrene stadig øker fra flere hold. Menneskers ferdsel i naturen, økt arealbruk og utbruddet av CWD er noen av årsakene til at forvaltningen er kompleks. Derfor er det viktig med et samarbeid på tvers av ulike instanser, fagmiljøer og interessegrupper. De ulike aktørene er illustrert i Figur 11.

Klima -og miljødepartementet er det øverste politiske forvaltningsorganet for villreinen. Forvaltningsorganer utøver offentlig virksomhet for stat, fylkeskommune eller kommune (Nesje, 2021). Departementet forvalter fjelloven og viltloven. Departementet er ansvarlige for budsjetter som omfatter villreinen og at politiske vedtak som er fattet av Stortinget blir gjennomført. Det var også dette departementet som fastsatte kvalitetsnormen for villrein i 2020. Den skal bidra til at villrein og villreinområdene forvaltes slik at internasjonale avtaler overholdes, og at målsetninger om levedyktige bestander nås (Kjørstad et al., 2017). Generelt

sett kan man si at departementet i samarbeid med regjeringen gir politiske føringer for hvordan villreinforvaltningen skal foregå.

Landbruks -og matdepartementet sine ansvarsområder omfatter jord -og skogbruk, arealforvaltning, husdyrhold og reindrift (Regjeringen.no, 2018). Sammen med klima -og miljødepartementet forvalter de fjelloven og viltloven, og er ansvarlige for villreinnemdene og bestandsforvaltningen.

Miljødirektoratet er underlagt Klima –og miljødepartementet, og jobber derfor med miljøpolitikken som den sittende regjeringen utarbeider. Det er det øverste faglige villreinorganet og har en rekke ansvarsområder. De er sentrale i utarbeiding av forskrifter som omhandler villreinen, tildeling av midler til villreinområdene, forskning og overvåking, og å legge fram kunnskapsbehov. Statens naturoppsyn (SNO) arbeider for direktoratet, ofte i tett samarbeid med det lokale fjellstyret og politi. Miljødirektoratet fungerer også som klageinstans for de vedtakene som villreinnemndene fatter.

Villreinnemnda er en offentlig nemnd som oppnevnes av Miljødirektoratet for en fireårsperiode, og som har ansvar for et eller flere villreinområder. De er underlagt Miljødirektoratets arbeidsoppgaver, og skal blant annet fastsette fellingskvoter, godkjenne bestandsplaner og delta i arealforvaltningen som omfatter villreinens leveområder. De skal jobbe for en bærekraftig forvaltning av villreinen i samsvar med viltloven og naturmangfoldloven. Kommunen er hovedansvarlig for arealforvaltningen, men villreinnemndene får ofte uttale seg i saker som omhandler leveområdene til villreinen. På denne måten blir de et talerør for villreinen ved spørsmål om utbygging i disse sårbare områdene (Kjørstad et al., 2017)

Villreinutvalget er rettighetshavernes organ, og består av lokale personer og rettighetshavere. Ofte kan det være medlemmer av fjellstyret og grunneierlag. Som regel er det grunneiere som har jaktretten for et område, og derfor er forvaltningen av flokken av stor betydning for grunneieren. Oppgaven til villreinutvalget er å ivareta rettighetshavernes interesser knyttet til villrein, og å være et kontaktorgan mellom myndighetene og rettighetshaverne. Utvalget er også viktig for forvaltningen ved å utarbeide mål for bestandsutviklingen, gjennomføre tellinger, og utarbeide forslag til fellingskvoter.

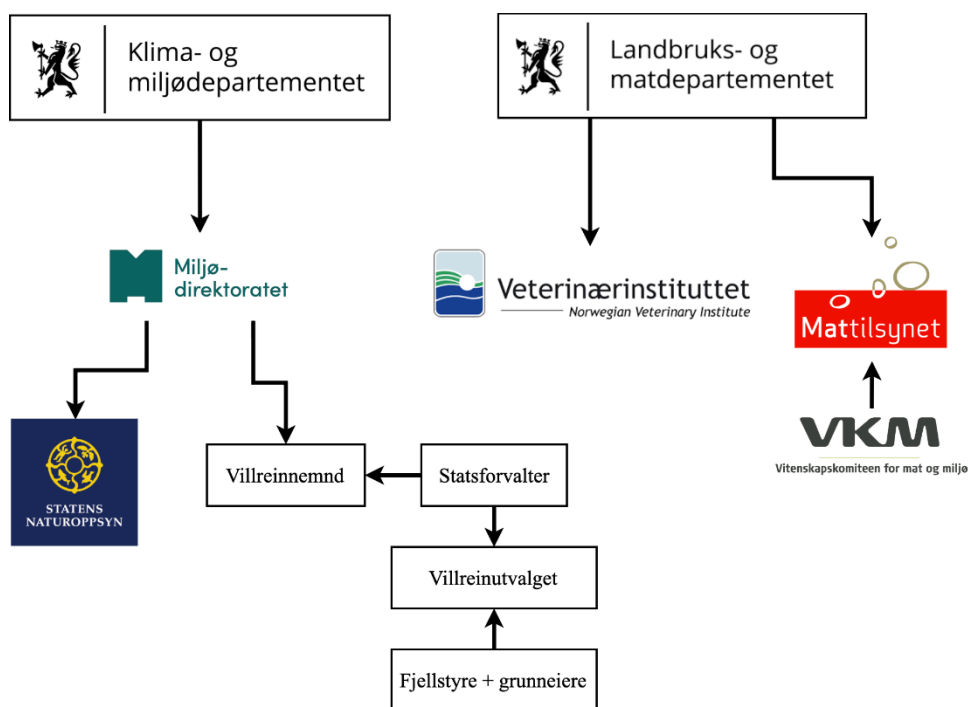
Statsforvalteren, tidligere kalt fylkesmannen, sin miljøvernavdeling skal gi råd til villreinutvalget og villreinnemdene, og er også viktig i arealforvaltningen av områder som omfatter villreinen. Det er en statsforvalter som er hovedansvarlig i hver villreinnemnd, og vedkommende er også ansvarlig for nemndas økonomi (Bitustøyl, u.å.).

Villreintrådet er en frivillig organisasjon som består av medlemmer fra villreinnemdaer og villreinutvalg fra de 24 villreinområdene i Norge. Deres mål er å ivareta villreinen i et langsiktig perspektiv. De arrangerer årlige fagseminarer, gir ut årboka Villreinen, og tar opp saker knyttet til forvaltningen. Rådet når ut til mange, og har stor innvirkningskraft på villreinforvaltningen (Kjørstad et al., 2017).

Mattilsynet er et offentlig organ som forvalter dyrevelferdsloven, matloven og de tilhørende forskriftene. De gir også faglige råd til blant annet LMD (Regjeringen.no, 2022). For å opparbeide seg kompetanse til å kunne rådgi LMD, kan de gi oppdrag til Vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM), som gjør uavhengige vitenskapelige risikovurderinger. Medlemmer av VKM oppnevnes på bakgrunn av sin faglige kompetanse ("Vitenskapskomiteen for mat og miljø"), og flere av medlemmene i reetableringsgruppen er også med i VKM.

Mattilsynet er også ansvarlige for risikohåndtering, beredskap og bekjempelse av dyresykdommer (Aspøy, 2021). For å vurdere alvorlighetsgraden av en sykdom, klassifiseres sykdommene som A-, B- eller C-sykdommer. CWD er en B-sykdom, og anses derfor som en alvorlig sykdom som krever systematisk bekjempelse for å kontrolleres (jfr. «Forskrift om varsel og melding om sykdom hos dyr»). Derfor er Mattilsynet sentrale i håndteringen av sykdommen.

Veterinærinstituttet er Norges ledende fagmiljø innenfor biosikkerhet for landdyr og fisk, og kan anses som et forvaltningsorgan med støtte fra Landbruks -og matdepartementet. De gjennomfører risikovurderinger tilknyttet dyresykdommer, analyserer prøver og har blant annet ansvar for overvåkningsprogrammet for CWD og Helseovervåkningsprogrammet for vilt (ViltHOP). Det gir dem en viktig rolle i håndteringen av CWD.



Figur 11 Oversikt over de ulike aktørene.

## Villreinen er rødlistet

Siden 2016 har villreinen vært på den internasjonale naturvernunionen (IUCN) sin globale rødliste over truede dyrearter. Som eneste landet i Europa med villrein, gir dette Norge et stort internasjonalt ansvar for ivaretagelse av arten. Den 24. november 2021, ble arten vurdert som nært truet av Artsdatabanken, som har ansvar for den norske rødlista. Det innebærer at arten oppfyller minst ett av kriteriene som brukes for å definere en truet art. Metoden er utviklet av IUCN. Terskelverdier for hvert av kriteriene avgjør om arten defineres som truet. Kriteriene er som følger:

- A. Populasjonsreduksjon
- B. Begrenset utbredelsesområde eller forekomstareal
- C. Begrenset populasjonsstørrelse og pågående nedgang
- D. Svært liten populasjon, svært begrenset forekomstareal eller få lokaliteter
- E. Kvantitativ analyse (kan gjennomføres dersom man har nok kunnskap om risiko for utdøing av arten, men slik kunnskap har man sjelden, og ingen arter er rødlistet etter dette kriteriet) (Artsdatabanken, 2021b).

Uttak av villrein som følge av bekjempelse av CWD har ført til en populasjonsreduksjon (A-kriteriet), og det anses som svært sannsynlig at det vil skje en bestandsreduksjon på Hardangervidda i løpet av de nærmeste årene. For å friskmelde en kildebestand er det også mulig at man må ta ut et økt antall dyr. Tiltakene som gjennomføres for å beskytte villrein mot CWD, er altså også med på å svekke den.

Arten har i tillegg fått negativ påvirkning av patogener (CWD), som er et underkriterium under A-kriteriet. Det foregår en pågående reduksjon i populasjonsstørrelse av villreinen, som allerede er en begrenset populasjonsstørrelse (C-kriteriet). Det er også en kvantifisert pågående nedgang av arten, som totalt sett gjør at arten vurderes som nær truet.

Selv om økt uttak av villrein ved bekjempelse av CWD har vært av stor betydning for arten, har andre påvirkningsfaktorer også negativ effekt. Det kan være utbygging av infrastruktur, boligbebyggelse og kraftledninger, reduksjon av beiteområder til fordel for annet dyrehold, forurensning, klimaendringer, og menneskelige forstyrrelser i form av rekreasjon og turisme. For eksempel fungerer riksvei 7 som en barriere for vandringsmulighetene nordover for reinen på Hardangervidda. Veien medfører også økt menneskelig aktivitet i området, hvilket fører til at dyrene holder seg unna. Dette begrenser beiteområdene til den sårbare reinsflokk i Norges største villreinområde (Strand et al., 2015). I tillegg vil den pågående utbyggingen av Eidfjord Resort i Sysendalen i Eidfjord kommune innskrenke leveområdene til Hardangerviddas villrein ytterligere (Sonnenberg et al., 2020). Dette er et tydelig eksempel på hvordan villrein stadig blir presset av menneskelig aktivitet, og får mindre areal å leve på. Selv om det foregår en pågående reduksjon og fragmentering av villreinens leveområder, er de fortsatt over IUCNs grenseverdier for B-kriteriet (Eldegard et al., 2021).

Det er altså en stor samlet belastning på villreinen, hvorav CWD kun er én av flere faktorer som har negativ innvirkning på arten. På en allerede hardt presset art, kan utbrudd av en slik sykdom bli avgjørende for artens fremtid.

### **Friskmelding av bestander**

Mattilsynets krav for friskmelding av sone 2 og kildebestand, er at bestanden må ha absolutt frihet fra smitte. Det brukes en smitteoppdagelsesmodell for å finne en god balansegang mellom å oppdage flere smittetilfeller og ikke redusere bestandene mer enn nødvendig. I denne tas det hensyn til demografisk smitemønster, som er hvordan smitten fordeler seg blant



ulike alderskategorier og kjønn. For eksempel antas det at voksen bukk har dobbelt så stor risiko for å smittes som simler, og fire ganger så stor risiko for å smittes som ungdyr (Ytrehus et al., 2021). Det vektlegges også hva slags vevstyper det prøvetas fra. Overvåkingsdata brukes for å beregne bestandsstørrelser og simulering av mulige scenarioer ved framtidig jakt (Åmdal, 2018)

Myndighetene har satt et sikkerhetsnivå på 99 % for smittefrihet. Et slikt estimat er vanskelig å oppnå, da bestandene er ville og man ikke har tester som er gode på levende dyr.

Designprevalens brukes for å estimere sannsynligheten for fravær av CWD på et gitt nivå (Cannon, 2002). I denne smitteopplagsmodellen er terskelen satt til 4, hvilket betyr at man ved overvåking skal kunne oppdage dersom det er flere enn 4 dyr i en bestand som er smittet. Det viser altså til sensitiviteten til overvåkingsprogrammet (Viljugrein et al., 2019). Nivået er satt ut ifra kunnskap om epidemiologi og hva slags risiko man er villig til å ta før smitte oppdages (Ytrehus et al., 2021).

I 2015, da man ikke hadde noe data på CWD-status i sone 2, antok man at det var 50 % sannsynlighet for at det ikke var smitte i bestanden, hvilket gir en prior på 0,5. Prior er en betegnelse på antatt sannsynlighet for et utfall før data er innsamlet (Gelman, 2002). Det kan brukes som et begrep for en forutsetning man har tatt. I smitteopplagsmodellen er prior i dag satt til 0,25 i sone 2. Den ble justert til prior 0,25 (25 %) etter smittetilfellet på Hardangervidda, da sannsynligheten for at det var smitte i sone 2 økte med dette funnet. Det er ikke et beregnet estimat, men antagelser som tas på bakgrunn av kunnskapen man innehar. Prior kan justeres over tid basert på økt datainnsamling og kunnskap (Ytrehus et al., 2021).

## **Materiale og metode**

### **Studiedesign og studieutvalg**

Dette er en tversnittstudie som ser på forekomsten av ulike genotyper i *PRNP*-genet hos to ulike villreinbestander, Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke. Disse stammene ble valgt ut fordi *PRNP* variasjonen her var lite undersøkt i tidligere studier, og det var enkel tilgang til allerede innsamlet prøvemateriale. Som studieutvalg benytter denne studien seg av 26 villrein fra Reinheimen-Breheimen og 43 villrein fra Setesdal Ryfylke.

Fra villreinstammen i Reinheimen-Breheimen ble *PRNP*-genet til 19 av 26 prøver kartlagt, og 8 av 43 prøver fra Setesdal Ryfylke. På grunn av dårlig DNA kvalitet (fragmentert DNA) ble det få prøver fra Setesdal Ryfylke som egnet seg for analyse.

### **Prøvetakingsmetode**

Prøvene er samlet inn av villreinjegere. Innsamlingen er gjort på vegne av Knut Røed og Kjersti Kvie, og er utført over flere år. Jegerne ble anmodet om å holde prøvene kalde fram til sending. Prøvene ble sendt med post uten kjøling.

### **Analyse av prøvene**

For å kunne analysere for ulike genotyper må DNA ekstraheres fra vevsbiten og det aktuelle genområdet oppformeres før videre analyse. Vi mottok allerede ekstraherte DNA, med info om at genomisk DNA hadde blitt rensset med et kit (DNeasy Blood and Tissue kit Qiagen, Oslo, Norge), og prosedyre angitt i kitet var blitt fulgt, se vedlegg A for prosedyre.

For å undersøke konsentrasjonen av DNA i prøvene ble de undersøkt ved spektrofotometrisk metode, på bølgelengde 260 nm, 230 nm og 280 nm, ved bruk av Epoch Bio-Tek maskin. 2,0 µl av buffer AL (elueringsbuffer fra QIAGEN DNeasy Blood and Tissue) ble lagt i fire av brønnene på en Take3 plate (Bio-Tek) og benyttet som blank. Platen var først rengjort med nukleasefritt vann. 2,0 µl av hver prøve ble lagt i to parallelle brønner. I programmet Gen5 ble DNA\_230 mode valgt, og programmet ble kjørt. Prøvene ble tatt med videre dersom de inneholdt nok DNA, en grense vi satt på ca. 4 ng/µl DNA. Grensen på 4 ng/µl er basert på tidligere erfaringer, der prøver under denne grensen ikke alltid får PCR produkt (personlig kommunikasjon, Tranulis, M.). I tillegg til mengde DNA ble det også 260/280- og 260/230-

verdiene vurdert. 260/280-verdien sier noe om hvor «ren» prøven er, og bør ligge rundt 1,8 for DNA. Verdien for 260/230 er vanligvis mellom 2,0-2,2, og er verdien en del lavere enn det, kan det indikere kontaminering av prøven.

Videre ble den åpne leserammen i PRNP genet, som i sin helhet er i ekson 3 i genet, amplifisert med PCR med disse primerne: Ce19\_F (5'-ATTTTGCAGAGATAAGTCATC\_3') og Ce778\_R (5'-AGAAGATAATGAAAACAGGAAG-3'). Disse primerne er beskrevet i «Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer» av O'Rourke et al. i 2004 (O'Rourke et al., 2004). PCR maskinen som ble brukt var av type SimpliAmp, merke Thermo Fisher Scientific. Tabell 6 viser miksen som ble satt inn i PCR maskinen for amplifisering av DNA, etter program som vist i Tabell 7.

Tabell 6 Ulike komponenter, mengde av komponentene og produsent av komponentene i miks satt inn i PCR maskin for amplifisering av DNA.

	Mengde	Produsent
Dream Taq PCR Master Mix	25 µl	Thermo Fisher Scientific
PCR primer Ce19_F	2,5 µl	Eurofins genomics, Luxembourg
PCR primer Ce778_R	2,5 µl	Eurofins genomics, Luxembourg
Nukleasefritt vann	15 µl	Thermo Fisher Scientific
DNA-prøve	5 µl	

Tabell 7 Program ved amplifisering.

Temp (C)	Tid (min)	Sykluser
95°	3	
95°	0.5	} 36
51°	0.5	
72°	0.75	
72°	7	
4°	∞	

Når DNAet var amplifisert ble det brukt agarosegel elektroforese for å estimere om konsentrasjonen av DNA var blitt høy nok. Agarosegelen ble laget med 50 ml 1 % agarose, som ble smeltet i mikrobølgeovn. Det ble tilsatt 5 µl SybrSafe (S33102, Thermo Fisher Scientific), og blandingen ble kjølt ned til 60 grader. Blandingene ble deretter helt over i en Bio-Rad form, og sto i 20-30 minutter under aluminiumsfolie. Gelen ble så tatt ut av formen og lagt i elektroforesekammer med TAE buffer (Tris, Acetic Acid og EDTA). I brønnene i gelen ble det applisert 5 µl DNA blandet med 4 µl nukleasefritt vann og 1 µl BlueJuice (loadingbuffer, produsent Thermo Fisher Scientific). Blue Juice er en konsentret loadingbuffer på 10x (typiske loadingbuffer er på 6x), og det ble derfor brukt 4 µl nukleasefritt vann som fortynning. I den første brønnen per rekke ble størrelsesmarkør på 1 kb plassert (Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA N0550S. Produsent: New England BioLabs). I en av brønnene ble det plassert en non-template control (NTC). Det ble deretter satt på 95 V spenning i ca. 30 minutter, og gelen ble plassert oppå en SafeImager fra Thermo Fisher Scientific, og fotografert med en Genosmart GelDoc VWR. Intensiteten på båndene ble vurdert, og prøven ble tatt med videre dersom intensiteten på båndet var over cirka halvparten av intensiteten på 1 kb båndet på størrelsesmarkøren. Videre ble DNAet rensset ved bruk av QIAGEN MinElute PCR Purification Kit etter protokoll fra produsent (se vedlegg B).

DNA ble igjen undersøkt ved spektrofotometrisk metode (Epoch Bio-Tek), på samme måte som beskrevet tidligere, og sendt til Eurofins Genomics i Köln for sekvensering av *PRNP*-genet om konsentrasjonen var over 70 ng/µl. Dette er en høy terskel. Det henger sammen med at primeren vi brukte (Ce19\_F) ikke er optimal. Det er også gjort praktiske erfaringer med at prøver under 65 ng/µl gir dårlige sekvenser (personlig kommunikasjon, Tranulis, M.). 2,0 µl av prøven ble blandet med 2,5 µl primer (kun Ce19\_F) og 5,5 µl nukleasefritt vann samme morgen som prøvene ble sendt.

Kromatogramfilene fra Eurofins ble behandlet med programmet Geneious Prime. Baser med PHRED verdi under 20 ble kuttet bort. Translaterte sekvenser ble sammenstilt med referansesekvensen for PrP.

Programvaren SciPy, en modul for vitenskapelig og statistisk analyse for programmeringsspråket Python, ble brukt for de statistiske beregningene. Det ble brukt Fisher's exact test, som er gitt ved denne formelen:

$$p = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{\binom{a+b}{b} \binom{c+d}{d}}{\binom{n}{b+d}} = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! n!},$$

for å undersøke om det var statistisk signifikante forskjeller i PRNP genetikken mellom ulike grupper. Se vedlegg C for kildekode. Nullhypotese er at det ikke er noen forskjell mellom gruppene. Konfidensintervall ble satt til 95 %. I Tabell 8 vises en oversikt over de ulike gruppene og kategoriene som ble sammenlignet i Fisher's exact test.

Tabell 8 Grupper og kategorier sammenlignet i Fisher's exact test.

Test	Gruppe 1	Gruppe 2	Kategori 1	Kategori 2
1	Setesdal Ryfylket	Reinheimen-Breheimen	A-allel	B-allel
2	Setesdal Ryfylket	Reinheimen-Breheimen	Mindre følsomme varianter (BB, BE, DE)	Følsomme og svært følsomme varianter (AB, AD, AE, AA)
3	Setesdal Ryfylket	Setesdal Austhei	A-allel	B-allel
4	Setesdal Ryfylket	Nordfjella	A-allel	B-allel
5	Setesdal Ryfylket	Hardangervidda	A-allel	B-allel

## Resultater

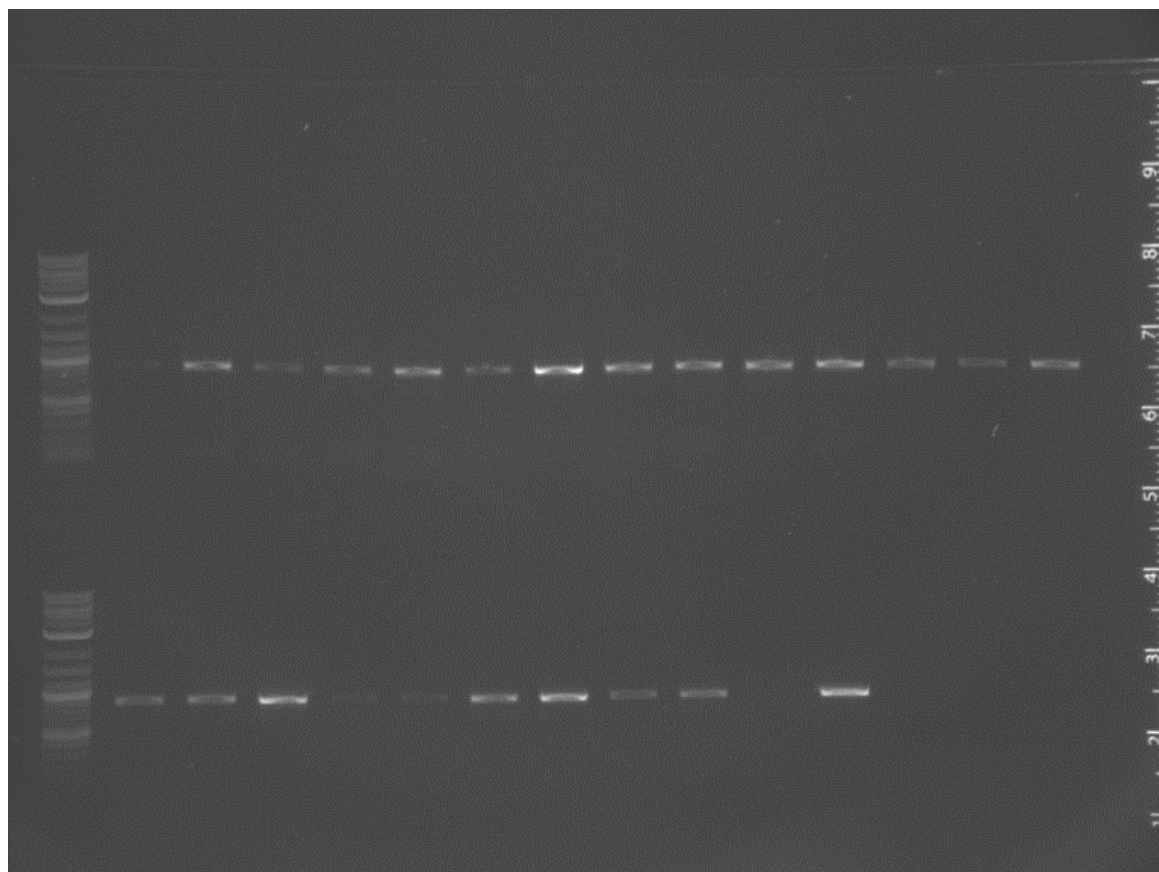
Tabell 9 viser resultatene av måling av DNA konsentrasjon i prøver fra Setesdal Ryfylke. Alle prøvene med unntak av prøvenummer 8984 ble tatt med videre til amplifisering i PCR-maskin, selv om sannsynligheten for at en del av prøvene kom til å bli forkastet etter amplifisering og gel-elektroferese ble ansett som stor, på grunn av lave DNA konsentrasjoner. I tillegg var 260/280- og 260/230-verdiene for en stor andel av prøvene veldig unormale. 260/230-verdiene har alt fra negative tall til veldig høye verdier. 260/280-verdiene ligger noe nærmere normalområdet, men også her er det relativt store variasjoner.

Tabell 9 Oversikt over resultat etter måling av DNA konsentrasjon i prøver fra Setesdal-Ryylke i Epoch Bio-Tek maksin før amplifisering. Forkastet prøve er markert i rødt.

Name	260/280	260/230	ng/ $\mu$ L	Mean	CV (%)
8979	1,5	-135	3,701	3,372	13,797
	1,914	-1,018	3,043		
8980	1,951	14,829	14,29	14,345	0,543
	1,909	13,41	14,4		
8981	1,797	-2,459	9,003	8,884	1,907
	1,922	-3,753	8,764		
8982	1,93	2,583	9,841	8,854	15,762
	2,08	-22,077	7,867		
8983	1,933	6,818	10,19	9,474	10,688
	1,994	5,873	8,758		
8984	1,7	0,067	-0,461	0,245	407,426
	1,944	-0,202	0,951		
8985	2,01	1,878	16,242	18	13,813
	1,847	1,269	19,758		
8986	1,847	4,691	39,561	35,568	15,877
	1,926	7,16	31,575		
8987	1,884	42,818	12,911	10,937	25,52
	1,97	-1,595	8,964		
8988	2,03	5,85	20,457	20,843	2,615
	1,997	3,521	21,228		
8992	1,53	2,386	8,343	7,949	7,006
	2,052	11,957	7,555		
8993	1,63	-375	10,28	11,266	12,387
	1,91	7,576	12,253		
8994	2,085	-0,774	4,647	4,425	7,094
	1,649	-0,728	4,203		
9003	2,075	-1,278	8,216	8,116	1,738
	1,867	-1,185	8,016		
9004	1,886	1,193	20,146	20,812	4,526
	1,893	1,235	21,478		
9005	1,82	8,273	2,467	2,357	6,655
	2,184	-1,566	2,246		
9006	1,416	1,792	10,17	10,115	0,767
	1,892	1,462	10,06		
9007	1,934	1,504	45,677	42,979	8,878
	1,88	1,414	40,281		

9008	1,626	1,617	7,792	6,245	35,034
	1,819	3,353	4,698		
9009	1,77	0,263	3,591	3,591	0
	1,77	0,382	3,591		
9010	2,056	1,066	7,038	6,597	9,465
	1,924	0,876	6,155		
9011	1,736	-1,217	5,179	5,837	15,938
	1,838	-1,695	6,495		
9012	2,056	-0,235	3,01	3,051	1,892
	1,855	-0,235	3,091		
9013	1,82	1,766	34,246	41,839	25,665
	1,948	1,529	49,432		
9014	1,868	1,459	33,087	30,455	12,22
	1,832	1,258	27,823		

Etter amplifisering i PCR-maskin ble det kjørt en gel-elektroforese. Bilde av resultatet av dette er vist i Figur 12.



Figur 12 Gel-elektroferese av prøvene fra Setesdal Ryfylke. 2 rekker med prøver. Ladder i første brønnene i hver rekke. Nest siste brønn på rekke 2 (brønn nr. 11) er NTC (non-template control).

Videre ble de 10 prøvene med sterkest bånd tatt med videre, det var prøvenummer: 8983, 8986, 8987, 8988, 8992, 8993, 9007, 9010, 9011, 9014 (henholdsvis brønn nr. 6,8,9,10,11 og 12 på rekke 1 og brønn nr. 4,7,8 og 12 på rekke 2 i Figur 12).

Alle 10 prøvene ble sendt inn for sekvensering, se vedlegg D for DNA-konsentrasjoner etter PCR og rensing. Det ble mottatt kromatogramfiler fra Eurofins Genomics for 4 av dem, og filene ble behandlet i Geneious Prime. Siden kun 4 av prøvene egnede seg for sekvensering ble 18 prøver til fra området undersøkt. Av disse ble 6 sendt inn, og det ble mottatt kromatogramfiler for 4 av dem. Eksempel på alignments fra Geneious Prime ses i vedlegg F. Translaterte sekvenser ble sammenstilt, og vises i Tabell 10.

Tabell 10 Sekvensering, alleler og følsomhet i PRNP i de ulike prøvene fra Setesdal Ryfylke. SF=Svært følsom, F=Følsom, MF=Mindre følsom. «Reindeer\_seq\_translation» er referansesekvens, og ikke en del av prøvemateriale.

Setesdal Ryfylke										
Prøvenr.	C2	C129	C138	C169	C176	C207	C211	C225	Alleler	Følsomhet
8993	-	G	S	V	N	K	R	S	AA	SF
9007	-	G	S	V	N	K	R	S	AA	SF
9010	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9011	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9050	-	G	S	V	N	K	R	S	AA	SF
9052	-	X	S	X	N	K	R	S	AE	F
9063	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9070B	-	X	S	X	N	K	R	X	BE	MF
reindeer_seq_translation	V	S	S	V	N	K	R	S	-	

Av praktiske hensyn ble 24 av de 26 prøvene vi hadde til rådighet fra Reinheimen-Breheimen undersøkt. I disse prøvene var DNA-konsentrasjonen høyere, Tabell 11 viser resultatene av måling av DNA-konsentrasjone. Også her var 260/280-verdiene litt varierende og 260/230-verdiene lave, men mer jevne enn i prøvene fra Setesdal Ryfylke. Alle 24 prøvene ble vurdert som gode nok til å bli tatt med videre til amplifisering i PCR-maskin.

Tabell 11 Oversikt over resultat etter måling av DNA konsentrasjon i prøver fra Reinheimen-Breheimen i Epoch Bio-Tek maskin før amplifisering. Ingen prøver ble forkastet etter måling av DNA-konsentrasjon.

Name	260/280	260/230	ng/μL	Mean	CV (%)
9096	1,854	0,357	27,603	28,076	2,381
	1,767	0,374	28,548		
9097	1,944	0,496	15,022	14,789	2,225
	1,942	0,53	14,556		
9098	2,137	0,441	13,651	12,555	12,351
	1,962	0,448	11,458		
9099	2,063	0,485	14,372	14,482	1,075
	2,062	0,494	14,593		
9100	1,911	0,596	16,465	15,732	6,583
	2,125	0,583	15		
9101	1,86	0,938	30,647	30,208	2,053
	1,964	0,973	29,77		
9102	1,908	0,673	24,675	23,923	4,441



	1,92	0,628	23,172		
9103	2,16	1,186	45,282	44,854	1,349
	2,169	1,204	44,426		
9104	2,096	0,696	23,958	24,342	2,23
	2,027	0,705	24,726		
9105	1,906	0,451	17,896	19,108	8,966
	2,022	0,466	20,319		
9106	1,91	0,495	39,813	38,78	3,766
	1,885	0,488	37,747		
9107	2,037	0,974	30,428	29,55	4,198
	2,055	1,014	28,673		
9108	1,971	0,625	29,62	29,587	0,154
	1,929	0,614	29,555		
9109	1,975	0,565	25,759	26,276	2,783
	1,937	0,549	26,793		
9110	1,879	0,32	15,13	16,355	10,594
	1,735	0,343	17,581		
9111	1,96	0,283	5,369	5,742	9,187
	2	0,34	6,115		
9112	2,036	0,447	12,555	11,897	7,821
	2,124	0,429	11,239		
9113	2,041	1,418	59,637	59,637	0
	2,049	1,374	59,637		
9090	1,96	0,668	21,641	20,518	7,738
	2,023	0,635	19,396		
9091	2,181	0,567	23,739	22,862	5,426
	2,222	0,573	21,985		
9092	2,101	0,525	20,38	20,141	1,678
	1,887	0,511	19,902		
9093	2,025	0,738	17,842	18,133	2,271
	2,061	0,753	18,424		
9094	1,977	0,589	18,275	19,756	10,598
	1,791	0,613	21,237		
9095	1,888	0,726	31,182	31,635	2,026
	1,922	0,745	32,089		

Etter amplifisering i PCR-maskin ble det kjørt en gel-elektroforese. Bilde av resultatet av dette er vist i Figure 13.

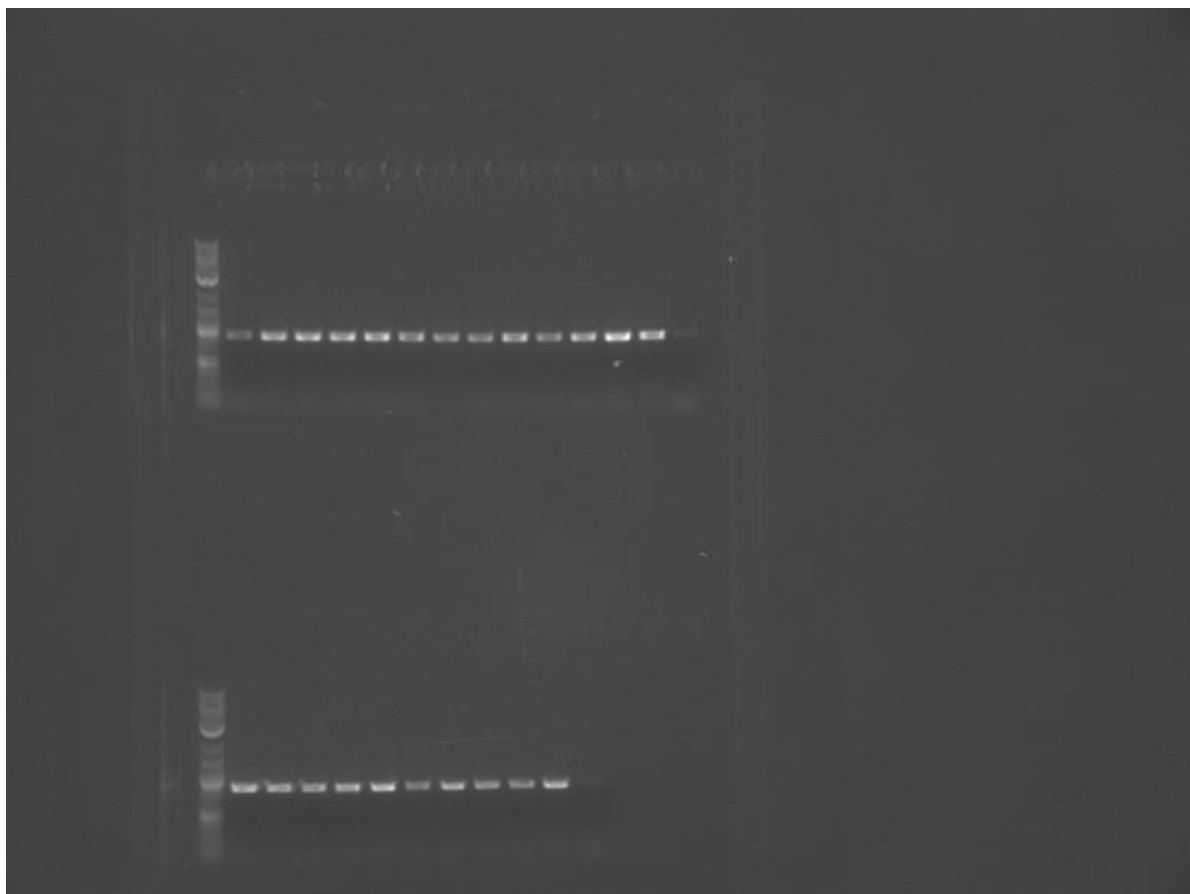


Figure 13 Gel-elektroferese av prøvene fra Reinheimen-Breheimen. 2 rekker med prøver. Ladder i første brønnene i hver rekke. Siste brønn på rekke 2 (brønn nr. 12) er NTC (non-template control).

Alle prøvene med unntak av prøvenummer 9103 (brønn 15, rekke 1, i Figure 13) ble tatt med videre og rensset. I vedlegg E vises DNA-konsentrasjonene i prøvene etter PCR og rensing. 23 prøver ble sendt inn til Eurofins Genomics, og vi mottok kromatogramfiler for 19 av dem. Translaterte sekvenser vises i Tabell 12.

Husom, Ingstad, Løland, Håkonsen - PRNP og reetableringen

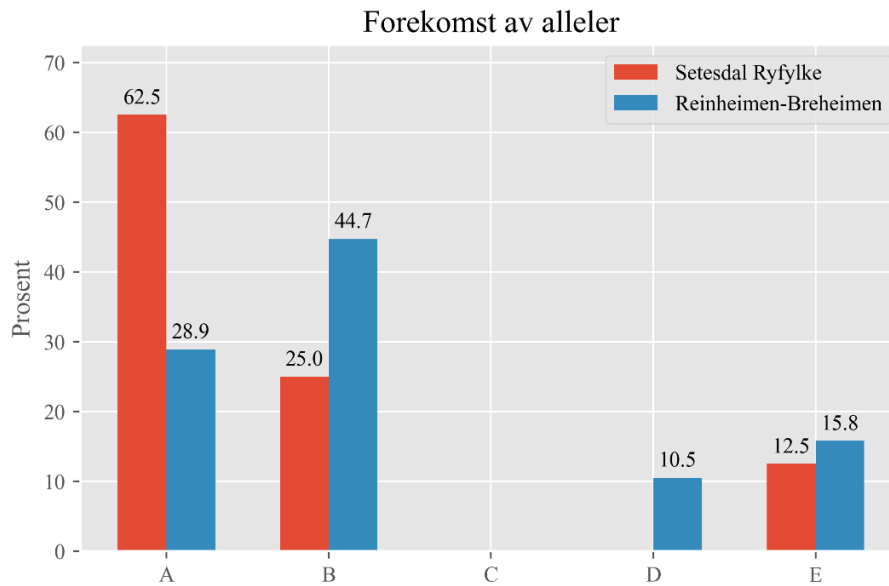
Tabell 12 Sekvensering, alleler og følsomhet i PRNP i de ulike prøvene fra Reinheimen-Breheimen. SF=Svært følsom, F=Følsom, MF=Mindre følsom. «Reindeer\_seq\_translation» er referansesekvens, og ikke en del av prøvemateriale.

Reinheimen-Breheimen										
Prøvenr.	C2	C129	C138	C169	C176	C207	C211	C225	Alleler	Følsomhet
9090	-	X	S	X	X	K	R	S	DE	MF
9091	-	X	S	X	N	K	R	X	BE	MF
9092	-	G	S	V	N	K	R	Y	BB	MF
9093	-	G	S	V	N	K	R	S	AA	SF
9094	-	G	S	V	X	K	R	S	AD	F
9095	-	X	S	X	N	K	R	X	BE	MF
9096	-	G	S	V	N	K	R	Y	BB	MF
9097	-	X	S	X	X	K	R	S	DE	MF
9098	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9099	-	G	S	V	N	K	R	S	AA	SF
9100	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9101	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9104	-	X	S	X	X	K	R	S	DE	MF
9105	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9107	-	X	S	X	N	K	R	X	BE	MF
9108	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9111	-	G	S	V	N	K	R	X	AB	F
9112	-	G	S	V	N	K	R	Y	BB	MF
9113	-	G	S	V	N	K	R	Y	BB	MF
reindeer_seq_translation	V	S	S	V	N	K	R	S	-	

Forekomst av de ulike allelene i PRNP-genet hos 19 villrein fra Reinheimen-Breheimen og 8 villrein fra Setesdal Ryfylke vises i Tabell 13 og Figur 14.

Tabell 13 Forekomst alleler i prøvene fra Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke.

Populasjon	Antall dyr	Forekomst av alleler %				
		A	B	C	D	E
Reinheimen-Breheimen	19	0,289	0,447	-	0,105	0,158
Setesdal Ryfylke	8	0,625	0,25	-	-	0,125



Figur 14 Forekomst av alleler i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen.

Allel A og allel C er forbundet med høy mottakelighet for CWD. Det ble ikke funnet noen dyr med allel C i de undersøkte prøvene.

Ved en sammenligning av forekomst av A og B allelene får vi en kontingenstabell som vist i Tabell 14. A og B allelene er interessante og sammenligne siden de begge er nokså frekvente og at det er tydelig vist at A øker følsomhet mens B reduserer følsomheten for CWD-smitte (Güere et al., 2020).

Tabell 14 Kontingenstabell for A -og B-alleler i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen

	Allel A	Allel B	Sum
Setesdal Ryfylke	17	11	28
Reinheimen-Breheimen	10	4	14
Sum	27	15	42

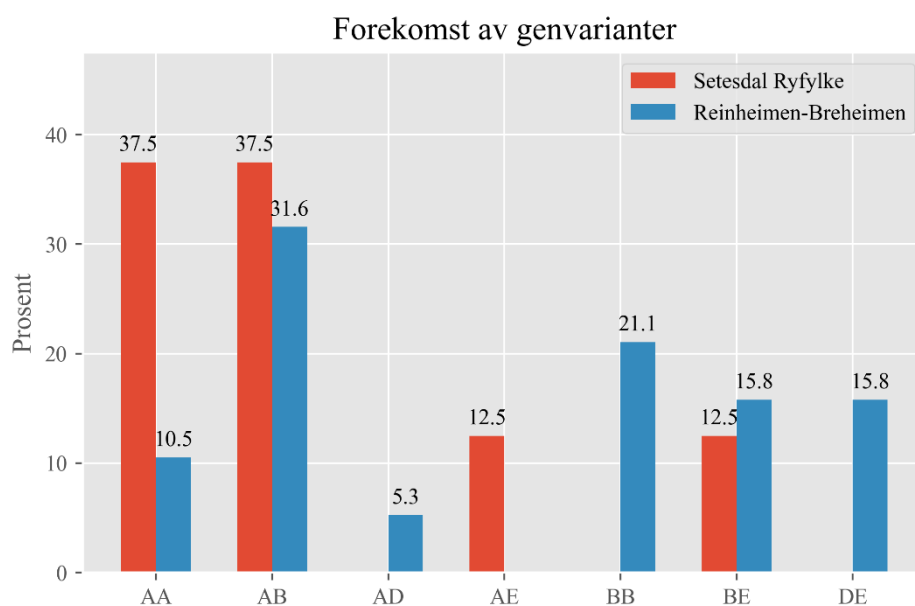
Ved bruk av Fisher's exact test ble testverdien 0,1001. Det ble altså ikke funnet en statistisk signifikant forskjell mellom forekomsten av A-allelet og B-allelet i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen.

I tillegg til å se på forekomst av enkelte alleler er det interessant å se på genotypene, se Tabell 15 og Figur 15 for oversikt over genotyper i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen. Det

har blitt funnet 14 ulike genotyper i PRNP hos reinsdyr. I vårt materiale ble det funnet til sammen 7 ulike genotyper. Seks genotyper ble funnet i Reinheimen-Breheimen og fire i Setesdal Ryfylke. AA, AB, BE og DE ble funnet i både Reinheimen-Breheimen og i Setesdal Ryfylke. I Reinheimen-Breheimen var også variantene AD og BB til stede, mens det i Setesdal Ryfylke også ble funnet variant AE.

Tabell 15 Forekomst av genotyper i prøvene fra Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke.

Populasjon	Antall dyr	Forekomst av genvarianter %						
		AA	AB	AD	AE	BB	BE	DE
Reinheimen-Breheimen	19	0,105	0,316	0,053	-	0,211	0,158	0,158
Setedal-Ryfylke	8	0,375	0,375	-	0,125	-	0,125	-



Figur 15 Antall genvarianter for PRNP i undersøkte villrein fra Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke.

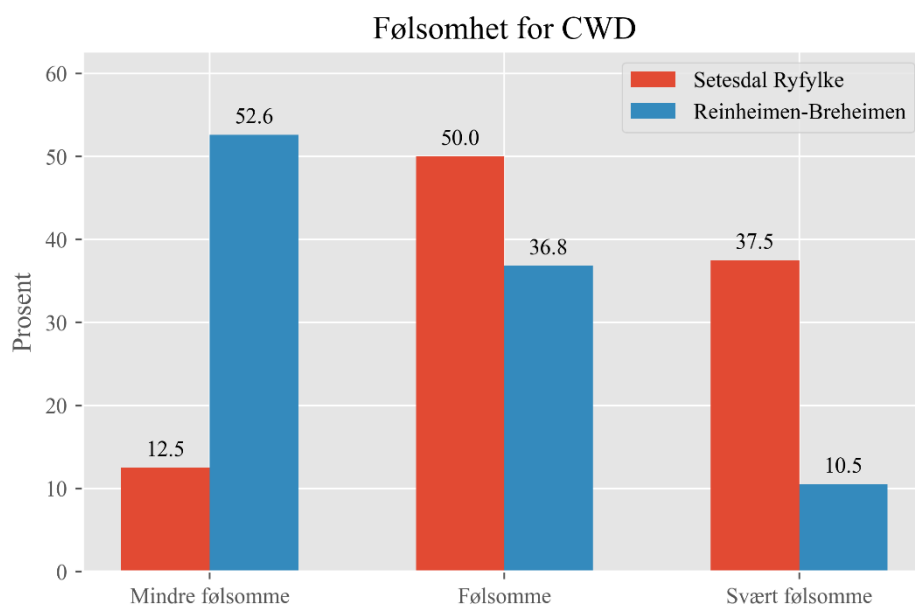
En mer generell inndeling av resultatene er å dele genotypene inn i grupper etter motstandsdyktighet mot CWD. En inndeling kjent fra tidligere (Ytrehus, 2021) er:

- 1) mindre følsomme: BB, BD, BE, DD, DE, EE
- 2) følsomme: AB, BC, AD, AE, CD, CE
- 3) svært følsomme: AA, AC, CC

Med de genotypene som er til stede i vårt datagrunnlag vil vi få tre genotyper i kategorien mindre følsomme (BB, BE, DE), tre i kategorien følsomme (AB, AD, AE) og én i kategorien svært følsomme (AA). Tabell 16 og Figur 16 viser gruppering etter motstandsdyktighet mot CWD

Tabell 16 Prosentvis forekomst av genvarianter gruppert etter følsomhet for CWD.

Populasjon	n	Forekomst av genvarianter gruppert etter følsomhet for CWD (%)		
		Mindre følsomme	Følsomme	Svært følsomme
Reinheimen-Breheimen	19	0,526	0,368	0,105
Setesdal Ryfylke	8	0,125	0,500	0,375



Figur 16 Genotyper gruppert etter motstandsdyktighet mot CWD.

Setter vi «mindre følsomme» varianter opp mot «følsomme» og «svært følsomme» varianter sett under ett, og sammenligner Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen får vi en kontingenstabell som vist i Tabell 17.

Tabell 17 Kontingenstabell for mindre følsomme varianter og følsomme/svært følsomme varianter i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen.

	Mindre følsomme varianter	Følsomme og svært følsomme varianter	Sum
Setesdal Ryfylke	10	9	19
Reinheimen-Breheimen	1	7	8
Sum	11	16	27

Fisher's exact test gir en testverdi på 0,0899. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom forekomst av mindre følsomme genvarianter i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen i vårt tallgrunnlag.

Det er interessant å se på Setesdal Ryfylke opp mot de andre bestandene i Langfjella. Dette er mulige kildebestander som har mye av det samme genetiske opphavet, som vist i Figur 10. Ved valg mellom disse bestandene til reetablering kan PRNP genetikkk bli betydningsfullt.

I Tabell 18 vises fordelingen av A- og B-alleler i Setesdal Ryfylke satt opp mot de andre områdene i Langfjella (tall hentet fra Güere et al. 2021).

Tabell 18 A -og B-alleler i Langfjella. Tall hentet fra Güere et al. 2021.

Populasjon	Antall alleler	A	B	Andre
Setesdal Ryfylke	16	0,625	0,25	0,125
Setesdal Austhei	16	0,375	0,375	0,25
Nordfjella	120	0,408	0,325	0,267
Hardangervidda	94	0,691	0,149	0,16

Tabell 19, Tabell 20 og Tabell 21 viser kontingenstabeller for Setesdal Ryfylke opp mot de andre områdene i Langfjella.

Tabell 19 Kontingenstabell for A -og B-alleler i Setesdal Ryfylke og Setesdal Austhei.

	A-alleler	B-alleler	Sum
Setesdal Ryfylke	10	4	14
Setesdal Austhei	6	6	12
Sum	16	10	26

Tabell 20 Kontingenstabell for A -og B-alleler i Setesdal Ryfylke og Nordfjella.

	A-alleler	B-alleler	Sum
Setesdal Ryfylke	10	4	14
Nordfjella	49	39	88
Sum	59	43	102

Tabell 21 Kontingenstabell for A -og B-alleler i Setesdal Ryfylke og Hardangervidda.

	A-alleler	B-alleler	Sum
Setesdal Ryfylke	10	4	14
Hardangervidda	65	14	79
Sum	75	18	93

Ved bruk av Fisher's exact test finner vi ingen statistisk signifikant forskjell på fordeling av A- og B-alleler mellom Setesdal Ryfylke og Setesdal Austhei (testverdi 0,422), Nordfjella (testverdi 0,384) og Hardangervidda (testverdi 0,461).



## Diskusjon

Det lave antallet dyr, spesielt fra Setesdal Ryfylke, er en vesentlig årsak til at beregning av statistiske verdier er av mindre verdi, siden tallgrunnlaget er usikkert. Det er 8 prøver fra totalt 3300 dyr (estimert) i Setesdal Ryfylke, noe som gir en feilmargin på 35 % ved et 95 % konfidensintervall (KI). Fra Reinheimen Breheimen er det 19 prøver fra totalt 2863 dyr (estimert), noe som gir en feilmargin på 23 % ved et 95 % KI. Det lave antallet prøver er en betydelig feilkilde, og det må tas i betraktning når man tolker resultatene.

Selv om det ikke ble funnet en statistisk signifikant forskjell mellom forekomsten av A-allelet og B-allelet i Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen ved bruk av Fisher's exact test, viser testverdien at det er 90 % sjans for at det faktisk er en forskjell i allelfrekvens mellom populasjonene. Tar vi i betraktning kunnskapen om forskjell i allelfrekvens mellom villrein og tamrein (Güere et al., 2021), og det genetiske opphavet til Reinheimen-Breheimen stammen, samt at resultatene er relativt nær statistisk forskjell selv med bare 8 dyr fra Setesdal Ryfylke, vil vi fortsatt anse det som en mulighet at det er en faktisk forskjell i forekomst. En slik forskjell vil i så fall være at A-allelet er på høyere nivå i Setesdal Ryfylke og B-allelet i Reinheimen-Breheimen, men dette blir spekulativt ut ifra de nåværende resultatene.

Når vi sammenligner forekomst av mindre følsomme genvarianter ser vi det samme som ved sammenligning av alleler. Det er ikke statistisk signifikante forskjeller. For å kunne si noe mer sikkert om forskjeller i allelfrekvens og genvarianter mellom Setesdal Ryfylke og Reinheimen-Breheimen må det et større prøvegrunnlag til.

Vi finner i vårt materiale ikke grunnlag for å si at det er en forskjell i frekvens av A- og B-alleler mellom stammene i Langfjella, men som nevnt er tallgrunnlaget usikkert. Ved eventuell bruk av en villreinstamme fra Langfjella til reetablering i Nordfjella kan andre forhold enn PRNP-genetikk være mer avgjørende for hvilken stamme man velger.

### **PRNP i reetableringsgruppen**

Når denne oppgaven leveres inn, skal reetableringsgruppen stadig avholde sitt siste møte før de skal skrive anbefalingen som skal leveres til Landbruks- og matdepartementet.

Kartleggingen av PRNP i Reinheimen-Breheimen, Setesdal Ryfylke og hos de andre reinsdyrflokkene, kan potensielt være av stor betydning for reetableringen.

Derfor skal oppgaven trekke fram hvordan kunnskapen om *PRNP* anvendes i den pågående prosessen som reetableringsgruppen er inne i. Når det skal gjeninnføres en reinsdyrflokk i et område det i verste fall finnes miljøsmitte i, vil det være viktig å bruke en kildebestand som har lav mottakelighet for CWD. Likevel kommer man ikke utenom at det er mange andre aspekter ved reetableringen som må tas hensyn til, og som kan veie tyngre enn *PRNP*. For å få et innblikk i betydningen av *PRNP* i forhold til de andre faktorene som vektlegges, legges diskusjonene som har oppstått på møtene til reetableringsgruppen fram. Det trekkes fram flere sider ved diskusjonen, også det som ikke omhandler *PRNP*, men som er betydningsfullt for å skape et helhetlig bilde av prosessen. Det er viktig for å skape forståelse for at *PRNP* er en liten del av et større puslespill.

### **Første samling**

Høsten 2021 var første samling for «Reetableringsgruppa CWD Nordfjella sone 1». Til stede på samlingen var medlemmer av reetableringsgruppen, som er representanter fra interesseorganisasjoner, utdannings- og forskningsinstitusjoner, samt aktører fra lokal -og regional forvaltning (Thomassen, 2021a). Etter AEAM-metoden, startet samlingen med at kunnskapsgrunnlaget ble lagt fram, før deltakerne begynte diskusjon i grupper rundt oppgaver som var laget på forhånd. To av oppgaveforfatterne var til stede som observatører.

### **Kunnskapsgrunnlag legges frem**

#### *Norges forvaltningsansvar for villrein*

Norges forvaltningsansvar for villrein ble presentert av Erik Lund fra Miljødirektoratet. Villrein er norsk ansvarsart (Lund, 2021). Med ansvarsart menes at arten har sin hovedutbredelse i Norge (Halleraker, 2021). Ansvarsart er ikke et juridisk begrep, og sågar ikke nevnt i lovtekst, men i naturmangfoldloven § 23, c, heter det: «*arten har en vesentlig andel av sin naturlige utbredelse eller genetiske særtrekk i Norge*» (Naturmangfoldloven, 2009). Formuleringen «vesentlig andel», betyr at >25% av den totale europeiske populasjonen befinner seg i Norge (Halleraker, 2021). Det er forpliktelser knyttet til at villrein er norsk ansvarsart, noe som legger føringer både på forvaltning av arten, men også artens leveområder. Forvaltningen preges av dette, og det overordnede målet er at arten og forskjellige delbestander er underlagt en forvaltning som tar hensyn til, og overholder internasjonale forpliktelser, samt nasjonale mål om en levedyktig bestand, som oppholder seg i områder som, sett fra et økologisk standpunkt, er fungerende (Kjørstad et al., 2017).

### *Bekjempelse av dyresykdommer, og Mattilsynets overordnede ansvar*

Julie Enebo Grimstad holdt et innlegg der hun informerte om skrantesyke og Mattilsynets samfunnsoppdrag. Mattilsynet skal håndtere alvorlige sykdommer hos tamme og ville dyr. Videre har Mattilsynet ansvar for bekjempelse og utryddelse av alvorlig dyresykdom. Når det gjelder sykdomshåndtering er det viktig med tilstrekkelig med kunnskap, samtidig som man må handle raskt. Et annet viktig prinsipp i sykdomshåndteringen er føre-var-prinsippet. Det uttalte målet er: «...å begrense og, om mulig, utrydde klassisk skrantesyke». Hun trakk fram flere tiltak som kan iverksettes for å bekjempe CWD, og at situasjonen er spesielt gunstig siden man har mulighet til å forsøke å utrydde sykdommen, og ikke «bare» begrense den.

### *Villreinen i Norge*

Olav Strand la fram fakta om villreinen i Norge. Det er omtrent 25.000 villrein i Norge. 10.000 av disse befinner seg på Hardangervidda som er den største bestanden i Norge. Det er 24 forskjellige forvaltningsenheter som forvalter villreinstammene i dag. Norge har også forvaltningsansvar på Svalbard. Avgrensningen til de forskjellige forvaltningsenhetene, skyldes både naturlige forutsetninger, infrastruktur og andre praktiske hensyn.

Man regner med at villreinen i Norge tidligere brukte fjellområder i hele landet, men på slutten av 1800-tallet begynte den å bruke mindre områder, hovedsakelig de sentrale delene av Langfjella og Dovre/Rondane. Årsaken til denne «sentraliseringen» var jakt og fangst på villreinen.

Også i dag er villreinens områder under press som følge av menneskelig arealbruk og infrastruktur. Som en følge av prosjektet «Villrein & Samfunn» fikk Norge ti nasjonale villreinområder og to europeiske villreinregioner.

### *Villrein og genetikk*

Knut Røed holdt en presentasjon hvor det ble gitt en innføring i genetikk og *PRNP*-genets betydning for motstandsdyktigheten mot CWD. Røed er nå emeritus, tidligere ansatt ved NMBU, og anses som Norges fremste forsker på reinsdyrgenetikk. Innledningsvis fortalte han om bruk av mikrosatellitter og mtDNA for å vurdere genetisk variasjon. Han viste til informasjon gjengitt i Figur . Han fortalte at bruk av rein med *PRNP* genotype AA eller AC til reetableringa vil øke sjansen for at CWD-smitten sprer seg. Reinen på Hardangervidda og ved Snøhetta viser seg eksempelvis å være svært mottakelige, og det ville vært uheldig å bruke disse i reetableringen. Hos tamreinen finner man derimot flere dyr som er lite mottakelige.

### *Status klassisk og atypisk skrantesyke*

Jørn Våge ved Veterinærinstituttet hadde en kort innføring i forskjellen på klassisk og atypisk skrantesyke. Her kom det fram at det kun er den klassiske som er smittsom, mens den atypiske oppstår spontant, og at det derfor er den klassiske varianter som er mest bekymringsverdig.

### *Prionundersøkelsene i jord og på salteplasser*

Kun dager før møtet ble avholdt, kom de nedslående nyhetene om at det var påvist prioner i jordprøver tatt fra både sone 1 og 2. Det var et forventet funn i sone 1, men urovekkende at det ble oppdaget i sone 2. Bjørnar Ytrehus står bak forskningen og fortalte om funnene under møtet. Han er veterinær, har tidligere jobbet for NINA, og er nå ansatt ved Sveriges landbruksuniversitet, SLU ("Vitenskapskomiteen for mat og miljø"). Jordprøvene var tatt ved ulike saltsteinplasser, og sendt til Canada for analyse i 2018. Forskerne Judd Aiken og Alsu Kuznetsova står bak analysene. Nye prøver ble samlet inn i 2021. Ytrehus fortalte om metoden som ble brukt for å påvise prionproteinene, og at det har vært vanskelig å få frem et resultat, da det fantes komponenter i jorda som forstyrret analysene. I tillegg viste det seg at den norske jorda bandt proteinene på en måte som gjorde de vanskelige å detektere. Han kunne også fortelle at selv om prøvene er positive for prioner, så vet man ikke hva slags typer prioner det er snakk om. I teorien kan det komme fra rein med atypisk skrantesyke, eller fra sau med skrapesyke.

De fleste prøvene måtte amplifiseres flere ganger for å vise positivt resultat. Det ble påpekt fra en i salen at dersom man amplifiserer nok ganger, vil man så å si alltid klare å få et positivt resultat. Dette svekker validiteten til prøvene. En annen sa at man må få en felles enighet om at resultatene er reelle dersom de skal vektlegges ved reetableringen, og at man må få et tydelig svar på hva slags prioner som er funnet. Dersom funnene er reelle, er det bekymringsverdig, og absolutt av betydning for reetableringen i Nordfjella.

### *Betydningen av villrein lokalt og forventninger*

Til slutt la Sigmund Tveitehagen, grunneier og medlem av villreirutvalet for Nordfjella, fram en beretning om betydningen av villreinen for de lokale. Han oppfordret til å ha det friskt i minne når store beslutninger skal tas. Det kom også fram at lokale hadde følt seg oversett og ekskludert da beslutningen om å ta ut flokken i sone 1 ble tatt i 2016, og han ønsket ikke at noe liknende skulle skje igjen. Han mente at det er viktig at de lokale får ta del i prosessen, og at de blir hørt når det skal tas avgjørelser som omfatter deres nærområder.

### *Manglende kunnskapsgrunnlag*

Selv om kunnskapsgrunnlaget ble lagt fram, ble det tydelig under samlingene at det fortsatt var kunnskapsmangel hos ulike parter under de forskjellige diskusjonene. For eksempel ble IUCN-kriteriene på et tidspunkt tatt inn i diskusjonen, hvilket få deltakere viste seg å være fortrolige med hva innebar. Det var også ulik forståelse rundt hvilke dyr som har vært prøvetatt og betydning av genetikk, for å nevne noe. At alle ikke har den samme forståelsen for et tema, gjør at det brukes mer tid til diskusjonen for å oppklare misforståelser og redegjøre for fakta. I slike tilfeller kom gruppens bredde til sin rett, da ulike personer innehar ulik kompetanse, og samlingene også fungerte som en arena for kunnskapsutveksling. Dette anses som viktig når så komplekse temaer som reetableringen diskuteres, og det kreves kunnskap fra flere ulike fagområder.

### **Gruppeoppgaver**

I det følgende fremlegges resultater fra gruppe- og plenumsarbeidet som ble gjort på møtet. Det er synspunkter, meninger og innspill som utdypes her.

*Hva ligger i en vellykket reetablering av villreinstammen i Nordfjella Sone 1? Hva er suksesskriteriene? Husk også å få med skala i tid og rom. Ranger suksesskriteriene.*

Det høyest rangerte suksesskriteriet var en livskraftig villreinstamme uten skrantesyke, som også forvaltes som en villreinstamme. Det var bred enighet i gruppen om dette kriteriet. Uttrykket «livskraftig villreinstamme» er en vid formulering, med rikelig tolkningsrom. Da er det spesielt viktig å ta i betraktning at reetableringsgruppen består av deltakere med ulik bakgrunn, utdanning og erfaringer. En av deltakerne med bakgrunn fra akademia foreslo at fravær av meldepliktig sykdom kunne være en indikasjon på livskraftig villreinstamme. Utover dette ble ikke betydningen av «livskraftig» diskutert i vesentlig grad. En mulig årsak til dette kan være at gruppens medlemmer mener dette henger nøye sammen med hvilken kildebestand man velger, da det er vesentlige forskjeller i kondisjon i de forskjellige bestandene (Kjørstad et al., 2017).

Neste suksesskriterium omhandlet prosessen. Viktigheten av bred deltakelse, og eierskap til prosessen ble poengtert og skapte stort engasjement. Det ble trukket fram at det er krevende å skape en følelse av eierskap. Den lokale deltakelsen anses som avgjørende, og derfor må

kunnskapsgrunnlaget være bredt og tilgjengelig for alle. Gjensidig respekt og forståelse innad i reetableringsgruppen var også viktig.

Når det gjaldt delaktighet, er det viktig at det er enighet om hva som menes med delaktighet. Aktøren påpekte videre at kunnskapsdelaktighet, og at nyttegjøring av kunnskap er viktig, men at man fortsatt ikke kan ta sikte på fullstendig enighet. Deltakeren brukte sone 1 Nordfjella som eksempel; det er fortsatt ikke enighet rundt vedtaket som ble fattet der. Det ble påpekt fra salen at dette møtet var en god start på å inkludere den lokale forvaltningen. Møtene gir også mulighet for evaluering underveis, og avslutningsvis; har forvaltningen og lokalbefolkning blitt hørt? For som deltakeren påpekte: man trenger ikke være enig om alt, men det er et ønske om å bli tatt hensyn til. Den lokale forvaltningen blir ansett som svært viktig, og en aktør la det frem på denne måten: «dersom den lokale forvaltningen legger inn årene, har ikke reetableringen vært en suksess».

De sterke meningene rundt delaktigheten til den lokale forvaltningen må sees i sammenheng med saneringen av Nordfjella sone 1, som fant sted vinteren 2017/2018. På bestilling fra Landbruks – og matdepartementet laget Mattilsynet en statusrapport. I statusrapporten kom det frem at motstanden primært finnes på lokalt, og ikke nasjonalt nivå. Videre kom det frem at Mattilsynet på bakgrunn av dette har prioritert å svare på debattinnlegg i lokalaviser med tilknytning til Nordfjella, samt å sentrere kommunikasjonsinnsatsen lokalt. Til tross for dette, konkluderes det med at det har vært store kommunikasjonsutfordringer (Mattilsynet, 2018). Samtaler med aktører fra den lokale forvaltningen underbygger rapportens meddelelser. Flere har et inntrykk, og en opplevelse, av at den lokale forvaltning ikke fikk ta del i beslutningene. Opplevelsen av å bli tilsidesatt uten reell påvirkningsmulighet er for mange i den lokale forvaltningen erfaringen de sitter igjen med. For å sitere en av deltakerne: «Det var mange tær som ikke bare var blå, men fullstendig knust etter at avgjørelsen om sanering av Nordfjella sone 1 var tatt».

Bevaring av villreinkulturen er suksesskriterium nummer 3. Deltakerne som lever og bor i områdene rundt Nordfjella, er veldig opptatt av kulturen rundt villreinen. Lokalbefolkningen ser på villreinen som en viktig del av deres kultur og identitet. Flere av aktørene fra den lokale forvaltning påpekte dyrenes status i bygdene, de er glade i reinen. Ønsket for deltakerne fra den lokale forvaltning var at befolkningen i omkringliggende bygder blir like glade i denne reinen, som det de var i den som ble sanert. Da må de føle eierskap til den. En annen utfordring med bevaring av villreinkulturen er at det kan være vanskelig å føre tradisjoner

videre når det ikke er villrein tilstede. For å ivareta den kulturelle dimensjonen kreves innsats. Spesielt fra deltakerne som tilhører akademia, ble det uttrykt skepsis til at kulturen skal overskygge CWD-aspektet. De var dog ikke samstemte, da andre mente kulturaspektet er en viktig del av det å være ansvarlige for en art.

Dyrevelferd ble også diskutert. Her var det noe uenighet om dette skal være et suksesskriterium, eller rammebetingelse, spesielt siden det er vanskelig å etterprøve dyrevelferd. Som diskutert ovenfor, er bevaring av kultur og befolkningens relasjon til reinen viktig. Det er verdt å nevne at disse elementene, i likhet med dyrevelferd, er vanskelig å etterprøve. En vesentlig del av diskusjonen gikk på prøvetaking for CWD. Dyrene må immobiliseres for testing, det er bedre dyrevelferd, da det er knyttet mindre stress til bedøvelse enn fiksering. Et spørsmål som ble diskutert, er hvor mye stress det er greit å utsette dyrene for, dersom reetableringen blir vellykket. Under diskusjonen omkring stress og håndtering, ble det også påpekt at man må ta hensyn til publikum. Selve operasjonen kommer høyst sannsynlig til å bli fulgt med "argusøyne", og håndteringen av dyrene bør gjennomføres på en måte som ikke skaper avsky hos befolkningen.

Et annet tema som ble diskutert var at en vellykket reetablering fordrer at reinen som introduseres, ikke forflytter seg derfra, for å hindre spredning av mulig smitte. Videre ble arealbruk diskutert. Vil den nye reinen benytte seg av de samme områdene som reinen som var der før? Kan reinen læres til å utnytte arealene bedre, altså bruke mer av det tilgjengelige arealet? Ideen om å lære reinen å bruke arealene, var det uenighet om. Noen mente dette er feil, da skillet mellom tam- og villrein viskes ut. Det er heller ønske om at når reinen settes ut, skal de være fri. Introduksjonen av rein til Nordfjella sone 1, blir en omfattende og langvarig prosess, hvor man må ha en viss kontroll på dyrene. Det vektlegges at dette er det «farligste» området å sette rein inn i, da det tross alt har vært syke dyr i området tidligere.

*Konkretisere mål og delmål for reetableringen NB! Mål og delmål må være etterprøvbare slik at de blir en styringsmekanisme. Identifisere tiltak som skal sikre målene.*

Det overordnede mål for reetableringen er som følger «Sikre fravær av skrantesyke, god dyrehelse og god dyrevelferd» Overordnede mål veier tungt, og i en beslutningsprosess kan ikke disse sidestilles med andre hensyn. Et uttalt mål om frihet fra skrantesyke er i tråd med reetableringsplanen utarbeidet av Mattilsynet og miljødirektoratet (Miljødirektoratet 2020). Et annet ledd i bekjempelsen av skrantesyke er utvikling av en plan for sanering av salteplasser. Salteplassene er en av stedene villrein i stor grad eksponeres for miljøsmitte,

samt at mange individer samles tett på et lite areal, hvilket kan føre til horisontal smitte (Ytrehus et al., 2021). Videre ønsker man å hindre utveksling av dyr, overvåke smittestatus og sikre at kildedirene ikke bærer med seg smitte. Det er nødvendig med omfattende overvåkning av dyrene, men det er viktig at belastningen er så liten som mulig. Dyrevelferd er tidligere omtalt, og denne problemstillingen vil være mest aktuell tidlig i prosessen, og kan være nokså utfordrende.

For å sikre reetablering med frihet fra skrantesyke, vil man sannsynliggjøre fravær av skrantesyke på bestandsnivå. Det er ønske om å individteste dyr som skal brukes i reetableringen. Det er vesentlig at brakkleggingstiden er lang nok, slik at dyr ikke infiseres fra miljøet. Dersom forskningen på jordprøvene viser seg å være pålitelig, vil det være formålstjenlig å bruke denne metoden for å undersøke om brakkleggingsperioden har vært lang nok, og om man kan reintrodusere reinen til området uten å stå i fare for å bli smittet av miljøet. Kadaver representerer en stor smitterisiko. Det er vist i en studie utført i Skottland under forhold som er liknende de vi har i Norge (Somerville et al., 2019). Studien viste også at prioner fra kadaveret kan spres til jorda, i tillegg ble det funnet prioner i avrenningsvann som stammer fra kadaveret.

*Vurdere og anbefale valg av kildebestander og individer fra kildebestander. Overordnede kriterier: Dyrehelse, dyrevelferd, bestandsforvaltning og atferdsøkologi.*

Under diskusjonene om hvilken kildebestand som skal brukes til reetableringa, var det naturlig for deltakerne å starte med de mest opplagte alternativene. Å bruke dyr fra sone 2 har lenge vært ønsket av flere. Det ville vært enkelt å gjennomføre i praksis, da man bare hadde kunnet rive ned gjerdene mellom sone 1 og 2, og latt det foregå en naturlig rekolonisering. Dessuten er reinsdyrene i sone 1 og 2 genetisk like. Men om denne bestanden kan brukes, vil avhenge av hva som skal til for å friskmelde den. Se teoridelen for å lese om friskmelding av bestander.

Etter funnet på Hardangervidda og de positive jordprøvene i sone 2, har usikkerheten til bruk av dyr fra sone 2 som kildebestand økt ytterligere. Det anses også som negativt at det er mye gevirgnaging hos dyrene i Nordfjella. Selv om man fortsatt er usikker på betydningen av dette, tyder det på at dyrene er i dårlig kondisjon. Man er også redd for at det kan være en smittevei for CWD, da prionsykdom tidligere har blitt drevet av rituell kannibalisme hos menneske. Av 238 undersøkte rein i Nordfjella i 2018, hadde 43,7 % stor grad av gevirgnaging (kun resterende stang på geviret, med takker kortere enn 2 cm eller fraværende),



og 24,4 % ekstrem grad (bare en stump av geviret var igjen) (Mysterud et al., 2020). Det er også en ulempe at det er en liten bestand med lite genetisk diversitet.

Et ønsket alternativ har lenge vært å bruke reinen på Hardangervidda som kildebestand, men etter funnet av CWD der i 2020, er det nå utelukket. Det vil ta for lang tid før bestanden friskmeldes, og dessuten er den i dårlig kondisjon (Næss, 2015). Dyrene vil lite tenkelig klare seg bedre i et nytt miljø, da maternal effekt og den negative spiralen er av stor betydning for kondisjonen, og vil gjøre at det vedvarer i et nytt miljø. Det er også høy forekomst av gevirgnaging hos denne reinen. Av 350 undersøkte rein på Hardangervidda i 2020, var 93,2 % utsatt for ekstrem gevirgnaging (Mysterud et al., 2020).

Videre gikk møtedeltakerne grundig til verks og vurderte alle flokkene i Langfjella som kan tas i bruk, men de fleste viste seg å være uegnet. De mente at bestanden man tar dyr fra burde være på minst 300 dyr, og da falt for eksempel flokken i Blefjell fra. Det er også uheldig å bruke dyr som beiter på Hardangervidda, og da kan man heller ikke ta dyr fra Setesdal Ryfylke. I Våmur Roan, Brattefjell-Vindeggen, Norefjell-Reinsjøfjell og Fjellheimen, er flokkene i grei kondisjon, men man har uavklart CWD-status. Det er altså mange ting som skal falle på plass for at en flokk skal passe som kildebestand.

Flokkene i Knutshø, Snøhetta, Rondane og Sølnekletten, anses som opprinnelig villrein, da den har liten innblanding av tamrein. Dette er svært positivt for dem som hovedsakelig er opptatt av bevaringsbiologi ved reetableringen. I tillegg er disse flokkene adskilt fra Langfjella, hvilket kan være positivt med tanke på CWD-status. Dessverre er det høy forekomst av følsomme *PRNP* genvarianter i disse flokkene.

Det er også et alternativ å bruke tamrein fra Lom, Vågå eller Filefjell tamreinlag. Dette er reinsdyr i særdeles god kondisjon, og det ville vært enkelt å transportere dem til Nordfjella på en lastebil. Man kunne relativt lett parasittbehandlet dem og testet for CWD og *PRNP*. Under all håndtering i forbindelse med reetableringen, er det en fordel at dyrene er noe domestiserte. Rettet avskyting vil også være enklere. I tillegg kan det være fordelaktig i tiden etter utsett, da menneskelig aktivitet og arealbruk stadig øker i fjellområdene, og legger økt press på villreinen. Tamrein vil være bedre rustet mot dette. Det vil altså være lettere å opprettholde god dyrevelferd ved bruk av tamrein.

Tamrein vil også være det beste alternativet dersom man av vesentlig karakter skal anvende kunnskap om *PRNP*-genetikk. En gunstig genetikk vil øke sjansene for en vellykket reetablering. Det påpekes at når man innehar denne kunnskapen om *PRNP*, er man forpliktet til å anvende den. Man vet ikke om CWD er noe man må leve med i fremtiden, eller om man klarer å få bukt med problemet, og derfor er det svært viktig med mindre følsomme dyr.

Et annet alternativ er å lage en kombinasjon av tamrein og villrein med avlsmessig tilpasning til situasjonen for å skape mindre følsomhet mot CWD. Siden det viser seg at tamrein generelt er mer motstandsdyktig mot CWD, mens det for enkelte anses som uholdbart å skulle sette ut tamrein framfor å bevare villreinen, kan dette muligens være et brukbart kompromiss. Da det ble sanert for skrapesyke i Norge på slutten av 90-tallet, innførte man en ny sauerase for å komme fram til mer motstandsdyktige dyr. Den indirekte bruken av genetikk ble i det tilfellet viktig for å oppnå en frisk bestand. Kanskje er det samme veien man burde gå for å bekjempe prionsykdommen man nå står ovenfor.

*Vurdere og anbefale praktisk gjennomføring av reetableringen, herunder metoder for overføring av rein.*

Dersom man ønsker rein fra sone 2, er det positivt for dyrevelferden, da man ved hjelp av helikopter eller drone enkelt kan drive dyrene over i sone 1. Gjentatt påflyvning vil likevel gi økt fluktrespons, så kanskje er det bedre å bruke et samlekv. Hvis kildepopulasjonen skal være av dyr som må fraktes lengre, vil det innebære at de må immobiliseres, merkes og transporteres med helikopter eller bil. De burde også undersøkes for *PRNP*-genetikk, da det finnes individer i denne flokken som er mindre følsomme. Testing og håndtering vil være krevende for dyrevelferden, men ved bruk av dyr fra sone 2 slipper man i det minste å immobilisere og frakte dyr over lange avstander.

Den praktiske gjennomføringen av reetableringen vil som nevnt tidligere være enklere med tamrein enn villrein. Ved innføring av tamrein betinger det oppsyn med dyrene de første årene. Spesielt ved bruk av rein fra Filefjell, vil det være fare for at den trekker tilbake til gamle trakter, og gjeting vil derfor være essensielt den første perioden.

Hvis man lager en kombinasjon med utgangspunkt i tamrein, kan man starte med en simleflokk med tamrein og bedekke den med bukker fra den villreinbestanden man ønsker (med riktig *PRNP*-genetikk). Dette kan man gjøre i en generasjon eller to, før dyrene settes ut i Nordfjella. Man kan lage en avlstsasjon, men det kan bli problematisk å gjerde inne vill

bukk. Kanskje det kan løses ved å introdusere bukkekalver istedenfor. Ellers er inseminering et alternativ som kan tas i bruk. Man også lage kombinasjonen med utgangspunkt i villrein.

Hvordan man praktisk skal gjennomføre reetableringen avhenger av hvilken kildebestand man velger å bruke. Allikevel vil man måtte sette dyrene i en beitehage for prøvetaking, og i påvente av prøvesvar, dersom man skal ta prøver av dyrene. Igjen peiles diskusjonen inn på den praktiske utførelsen av testingen. For å undersøke *PRNP*-genetikken til dyrene, kan man ta en blodprøve. Rektalbiopsi kan anvendes for å teste for CWD-smitte. Dyrene må m.a.o sederes/anestaseres og merkes. Dette vil kreve store ressurser og planlegging for ivaretagelse av dyrevelferd.

Videre diskuteres det når man evt. bør flytte dyrene og alder på bukkene. Bukkene bør ikke være eldre enn åringer, da disse vil være enklere å passe på. Man ønsker også at dyrene skal kalve i området, for at de skal få mer tilknytning til stedet. Det kan være risikabelt å flytte dyr på sommeren, da de ikke nødvendigvis tåler varmen så godt.

## **Andre samling**

Den andre samlingen til reetableringsgruppen fant sted vinteren 2022. Etter en oppsummering fra sist samling, fortsatte deltakerne med å vurdere alternativer for kildebestander, som de ikke ble ferdige med på sist møte. Videre fulgte nye oppgaver som skulle drøftes.

## **Gruppeoppgaver**

### *Alternativer til kildebestander*

Under diskusjonen på andre samling om bruk av kildebestander, ble IUCN-kriteriene trukket fram for første gang under reetableringsgruppens arbeid. Det ble også presisert at det er et grunnleggende prinsipp for bevaringsbiologer at man skal bruke opprinnelig, stedegen genetikk til reetablering så langt det er mulig. Om det er Langfjella-reinen eller rein fra Dovrefjell/Rondane (med stor grad av opprinnelig villreingener) som regnes som stedegen i dette tilfellet, er fortsatt uklart. For noen er det uansett et ønske om at bruk av tamrein til reetableringen skal utelukkes som et alternativ, selv om *PRNP* anses som svært viktig.

Etter de to første møtene er det seks alternativer til kildebestander som man står igjen med:

- Passiv flytting av dyr fra sone 2 til sone 1
- Aktiv flytting av dyr fra sone 2 til sone 1

- Som overnevnte punkter, men at man i tillegg flytter noen få bukker fra flokken i Dovrefjell/Rondane som har de «opprinnelige» villreingenene
- Aktiv flytting av dyr fra en av de andre villreinområdene
- Avle tamrein og villrein for å til slutt stå igjen med dyr som har 75 % villreingener
- Bruke tamrein

Etter første møtet ønsket deltakerne å få mer tid til å diskutere kildebestand. Derfor ble det lagt til en ekstraoppgave, som dreide seg om å vurdere alternativer for kildebestander.

Diskusjonen begynte med en samtale om hva som ligger i lokale hensyn. Det foreslås høstbar bestand og jaktkultur. Dette er viktig for grunneiere og lokalsamfunnet. En av deltakerne forteller at lokalbefolkningen føler at de mistet den reinen de hadde, brått og brutalt.

Vedkommende mener det er «bevaringsbiologi på sitt beste» dersom dyrene fra sone 2 vandrer over av seg selv. Jegerne kommer til å bli skuffet dersom ikke det blir «ekte» villrein som flyttes over.

Ved passiv overføring fra Nordfjella sone 2 til sone 1, har man ingen mulighet til å teste dyrene. Miljøsmitte er et usikkerhetsmoment, derfor bør man ha dyr som er minst mulig mottakelige. Det er også viktig å ha med seg at når man skal reetablere sone 1, kan det være at man må skille sonene i mange år fremover, for å forsikre seg om at mulig smitte fra sone 1 ikke spres videre.

Jordprøvene ble diskutert igjen. Dessverre er ikke denne forskningen kommet så langt at den er anvendbar (Thomassen, 2021a). Metoder for å teste dyr er også et tema som går igjen. Tonsillbiopsi er en bedre levendedyrtest enn rektalbiopsi. Dette fordi tonsiller i stor grad inneholder smitte, og dermed er denne metoden sikrere enn endetarm. Dette er ikke en metode man har anvendt på levende dyr i Norge, men i USA. I Norge er denne metoden kun anvendt på døde dyr.

Funnet av en positiv bukk på Hardangervidda høsten 2020, endrer spillereglene. Man kan ikke lenger se på Nordfjella isolert. Funnet, til tross for forholdsvis lang geografisk avstand, må sees i sammenheng, og håndteres deretter. Deltakeren argumenterer også for at det blir «falskt» å håndtere de positive isolert. Scenariet at vi må leve med CWD, som man tidligere ikke har diskutert i særlig grad, kommer til å påvirke all hjorteviltforvaltning i hele Norge.

*Utarbeide en tentativ tidsplan for reetableringens ulike faser*

I den tentative tidsplanen som ble laget på første samling, legges flere forutsetninger til grunn: friskmelding av Nordfjella sone 1, saltplasser og kadaver, i tillegg til annet som kan være en kilde til miljøsmitte. Kildebestanden skal være fri for CWD og andre sykdommer. Som kildebestand i denne tentative planen, har man satt flytting av villrein fra Nordfjella sone 2 til sone 1.

Første fase er friskmelding av Nordfjella sone 1. Deretter skal donordyrene testes slik at de med størst mulig sannsynlighet er fri for CWD. Testregimet er enda ikke klarlagt med tanke på utvalg av dyr, hvor, når og prøvetakingsfrekvens. Videre vektlegges oppbygging av flokken. Man ønsker at det i sone 2 er 600-800 dyr før de flyttes over. Dette punktet er naturligvis avhengig av når området kan friskmeldes. I området man skal hente donordyr fra, ønsker man å bygge en beitehage. Denne beitehagen skal brukes som et oppholdssted for dyrene hvor de kan prøvetas, selekteres og evt. være i karantene. Man åpner gjerdene og deretter flytter man dyr fra beitehagen på donorstedet til beitehagen i sone 1. Dyrene flyttes med aktiv driving mellom beitehagene. Når dyrene slippes ut fra beitehagen i sone 1, vil de i en periode kreve tett oppfølging og gjeting, i begynnelsen daglig. Deretter avtagende.

Den tentative tidsplanen er veldig vag fordi det er mange usikkerhetsmomenter, f.eks. friskmelding. Planen er laget på en slik måte at den kan tilpasses forholdene når man vet hvilken donorbestand man skal bruke, og når friskmelding foreligger

*Konkretisere lokal forankring av prosessen, herunder kommunikasjon*

Eierskap og lokal forankring har blitt diskutert mye i løpet av samlingene, spesielt siden man opplevde store kommunikasjonsutfordringer under saneringen (Mattilsynet, 2018). For at informasjonen skal nå ut til folk, er det aktuelt med arrangementer, slik at folk kan stille spørsmål. Her er det ønskelig at sentrale aktører fra f.eks. Miljødirektorat og utdanningsinstitusjoner stiller. Det er viktig at den usikkerheten, og de vurderingene som gjøres på komitemøtene, kommuniseres ut, spesielt de vurderingene som gjøres ift. kildebestand. Det stilles også spørsmål ved om representantene til lokal forvaltning kan forsøke å involvere de lokale mer, da det er de som har rollen som bindeledd. Det påpekes at når det gjelder CWD og håndtering av dette, er det et nasjonalt anliggende.

*Vurdere usikkerheter og kritiske avveininger for en vellykket reetablering*

Det er mange usikkerheter knyttet til reetablering, og kritiske avveininger som må tas. Hvor lenge miljøsmitten vedvarer er det ingen som vet, og det gjør usikkerheten stor rundt tidsperspektivet for reetableringen. Miljøsmitte er metodisk sett en kjempeutfordring. Det er forsøkt å etablere metoder for å detektere smitte i avføring, men det er ikke noe man har gått videre med. Jordprøver er diskutert tidligere. Det manes til forsiktighet rundt hva man forventer av disse prøvene.

Det ble poengtert at reetableringen ikke må ta for lang tid tross disse usikkerhetene. All den tiden sone 1 er fritt for villrein, er det en kamp for å bevare området slik det er. Det er ønsket om å åpne nye skiløyper, bygge ut en kraftstasjon i kalvingsområdet, samt ytterligere arealbrukskonflikter. Slikt er vanskelig å kjempe mot når det ikke er rein i området, men vil være enda vanskeligere å reversere hvis det først etableres. Jegerinteresse og kultur forsvinner også over tid, og vil være krevende å gjenoppta.

Det er også uvisst nøyaktig hvor mye *PRNP*-genetikken påvirker infeksjon eller opptak av miljøsmitte, som vil være av betydning for hvor tungt *PRNP* skal vektlegges i avgjørelsen om bruk av kildebestand.

Usikkerheten rundt CWD-status i Norge må tas med i betraktningen. Det uttrykkes fra Regjeringen at det er et ønske om å vente å se hvordan det utvikler seg på Hardangervidda, ettersom Mattilsynet og Miljødepartementet er samstemt i sin anbefaling om å ikke gå inn for ekstraordinært uttak av villrein på Hardangervidda (Regjeringen.no, 2021). Deltakeren viser til at det mest sannsynlig er 5 smittede dyr på Hardangervidda basert på modelleringer som er gjort. Forekomsten er såpass høy at man bør vurdere en annen strategi. Dog er det vanskelig å si noe om smittedynamikk når forekomsten er lav. Allikevel er det viktig at man har et begrep om rekkevidden av problematikken; det er viktig med et langsiktig perspektiv, hvor man må ta høyde for «worst case», nemlig at man må leve med CWD. Den største usikkerheten blir i så måte om en har CWD på Hardangervidda som ikke er håndterbar.

*Gi anbefalinger om kunnskapsinnhenting, avbøtende tiltak og overvåking før, under og etter reetablering.*

Oppgaveforfatterne var ikke til stede under denne delen av samlingen, men har blitt informert om at det var en rekke punkter som ble trukket fram. Ett ønske var økt kunnskap om hvilke

andre gener som er koblet med *PRNP*, slik at man kan forutsi noe om hvilke andre egenskaper som vil nedarves hvis man velger dyr basert på *PRNP*-genetikk (Thomassen, 2022).

## **Tredje samling**

Tredje samling for reetableringsgruppens avholdes etter at denne oppgaven er levert inn. Her skal alle trinnene med oppgaver som er gått igjennom på tidligere samlinger omtales i plenum, før det til slutt legges opp til en diskusjon rundt veien videre. Den endelige rapporten som skal utarbeides fra Villreinsenter sør, skal godkjennes av gruppen før den sendes til Miljødirektoratet og Mattilsynet.

## **I hvor stor grad er *PRNP* av betydning?**

### **Grunnlaget for inndeling av *PRNP* etter følsomhet**

Studiene om variasjon i *PRNP* på reinsdyr i Norge baserer seg på de 19 positive funnene i Nordfjella. Studiepopulasjonen er derfor liten, og det er naturlig å stille spørsmål til hvor tungt resultatene kan vektlegges. Grupperingen av de ulike genotypene som mindre følsom, følsom og svært følsom, er tentativ og bygger på flere antakelser om følsomheten til allelene. Genotypen på den CWD-positive bukken på Hardangervidda stemmer med antagelsene som er tatt (Ytrehus, 2021). Selv om 19 dyr er et lavt antall, så er resultatene statistisk signifikante (Güere et al., 2020).

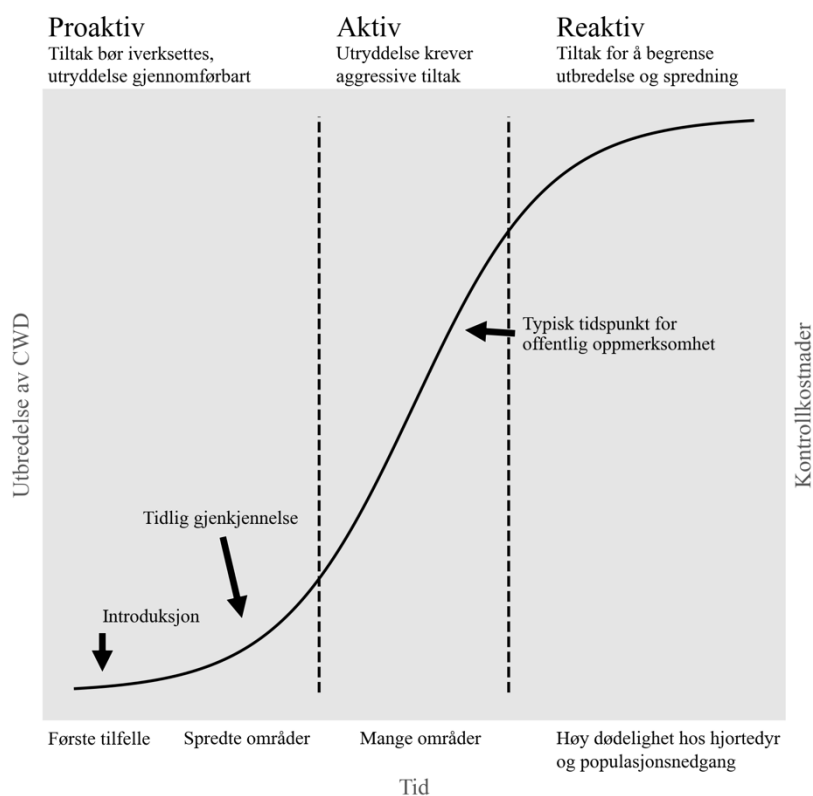
Det er også gjort studier knyttet til *PRNP* på andre arter i Norge, som viser liknende resultater som hos reinsdyr. Selv om genvariantene er forskjellige, ser man tendenser til liknende variasjon i *PRNP* hos arter som elg og hjort. Også ved sporadiske tilfeller av Creutzfeldt-Jakob er en genvariant predisponerende for å utvikle sykdom (Güere et al., 2021). Studier fra Storbritannia og Nord-Amerika gjort på ulike hjortedyr viser det samme (Robinson et al., 2019). Forsøk gjort der reinsdyr har fått prioner podet intrakranielt, stemmer også overens med resultatene fra Nordfjella (Moore et al., 2016).

Det er vanskelig å si nøyaktig i hvor stor grad *PRNP* er av betydning for motstandsdyktig mot CWD, men man er sikre på at det er av betydning. Det presiseres at det aldri er snakk om resistens mot CWD, men grad av motstandsdyktighet. I en situasjon der mye annet stadig er uavklart, som hvordan smitten kom til Norge, og hvor lenge det vedvarer i miljøet, vil det

være ekstra viktig å bygge opp en stamme i Nordfjella med robuste dyr. PRNP kan være et av de sterkeste kortene man har på hånda for å oppnå dette. Det kan bli av stor betydning hvis det fortsatt viser seg å være miljøsmitte igjen i området etter reetablering.

### Mulige kontrolltiltak

Det har hele tiden vært, og er fortsatt, mål om å utrydde CWD i Norge (Mattilsynet & Miljødirektoratet, 2017). Utryddelse vil kun være mulig dersom man befinner seg i en tidlig fase, men dersom sykdommen blir endemisk, er ikke dette lenger et alternativ (Williams E.S., 2002). Det er antatt at man i Norge befinner seg i en tidlig fase, og utryddelse er dermed en mulighet, slik Figur 17 viser. Dersom man ikke klarer å utrydde CWD, kan man forsøke å minske forekomsten samt prøve å kontrollere sykdommen (VKM, 2017b).



Figur 17 De ulike fasene i utbredelsen av CWD, og handlingsrommet i de ulike fasene. Figurene er bearbeidet fra (VKM, 2017b).

Utryddelse er en mulighet man bør gripe. Utryddelse er definert som handlinger man gjør i et gitt område i en gitt periode, for å permanent redusere forekomsten av et agens til null (VKM, 2017b). Erfaringer fra USA viser at det er mulig å utrydde CWD, men det er krevende. I



statene New York og Minnesota har man klart å utrydde CWD i åpne populasjoner ved å drive målrettet jakt, samt omfattende overvåkningsprogrammer i ettertid. Det er i tillegg flere eksempler på at man har klart å utrydde CWD hos hjort i fangenskap hvor man har sanert med brakklegging før man setter inn en ny populasjon (VKM, 2017b). En enorm fordel man har i Norge er at Nordfjella er et relativt isolert område, i motsetning til i Nord-Amerika hvor populasjonene er mer «åpne». Dessverre ble det påvist CWD på Hardangervidda, og smitten er ikke lenger kun på et nokså isolert og begrenset område som Nordfjella sone 1 er.

Dersom man ikke klarer å utrydde CWD, er det aktuelt å innføre kontrolltiltak, hvor man kan få sykdomsprevalensen ned på et akseptabelt nivå. Aktuelle kontrolltiltak vil vanligvis innebære behandling, fjerning av syke individer, reduksjon av vektorer og destruksjon av infeksjose agens, for å nevne noe. Når det gjelder CWD, ligger det i sakens natur at ingen av disse tiltakene er særlig aktuelle (VKM, 2017b). Fjerning av syke individer er for eksempel vanskelig siden dyrene viser kliniske tegn til sykdom i relativt kort tid, mens inkubasjonstiden er lang (forsøk viser minst 15 måneders inkubasjonstid) (Williams E.S., 2002). Samme studie viser dessuten at å fjerne dyr med kliniske tegn på CWD har begrenset effekt.

Et annet aktuelt kontrolltiltak vil være å hindre kontakt med populasjoner. Dette kan gjøres med gjerder, eller såkalte «bufferoner». På denne måten kan man hindre kontakt mellom mottakelige individer. I Norge er det allerede relativt spredte populasjoner med dyr, både på grunn av infrastruktur, men også geografi. Allikevel kan det i enkelte områder være aktuelt med tiltak, som overvåkning og gjeting (VKM, 2017b). Reduksjon av dyretetthet er et annet velkjent verktøy når det gjelder smittsomme sykdommer. Uttak av dyr har vist seg å være en effektiv metode for å opprettholde en lav sykdomsprevalens (Manjerovic et al., 2014).

Ovenfor er det skissert noen muligheter for håndtering av CWD. Felles for tiltakene er at de er omfattende, og vil kreve store ressurser. Det er heller ingen av tiltakene som kommer med garantier, og mange av dem er praktisk vanskelig gjennomførbare. Av den grunn vil riktig anvendelse av PRNP-genetikk være ekstra viktig, da det kan føre til et mindre behov for kontrolltiltak. Å satse på dyr som er motstandsdyktige vil være fordelaktig, uansett om man får til å utrydde CWD i Norge eller ikke. En gunstig PRNP-genetikk er en av få muligheter, til og med kanskje den eneste, til å gjøre dyrene mer motstandsdyktige mot CWD.

## **Konklusjon**

### **DNA-analysene**

Dataene fra analysene som er gjort av flokkene i Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke viste ikke statistisk signifikant forskjell mellom prevalens av A-alleler og B-alleler i de to stammene, og heller ikke mellom Setesdal Ryfylke og de andre bestandene i Langfjella. Det lave antallet prøver fra Setesdal Ryfylke gjør at vi ikke vil konkludere med noe ut ifra undersøkelsene vi har gjort.

### **Oppsummering av møtene**

Møtene i reetableringsgruppen har vært fruktbare. Fysiske møter mellom de forskjellige aktørene gir rom for diskusjon, samt oppklaring av misforståelser. Å begynne med en presentasjon av kunnskapsgrunnlaget i tråd med AEAM var lurt, for da kunne man på best mulig måte sørge for at alle har grunnleggende kunnskap om de forskjellige momentene som skal vurderes. Aktørene er ikke tilfeldig utvalgt, så en kan regne med at deltakerne på møtet har mer kjennskap til villrein enn den gjengse nordmann. Til tross for dette er det en del kompliserte og komplekse temaer som skal tas i betraktning, spesielt temaene som omhandler genetik. En gjennomgang av teorien, og de nyeste forskningsresultatene er både riktig og viktig. I løpet av møtene kom mange spørsmål hva angår prøvetaking, da flere av deltakerne var usikre på protokoller og hvordan man rent praktisk skal gjennomføre dette. Dette er et tema man kanskje burde vurdert å ha med da man gjennomgikk kunnskapsgrunnlaget.

I løpet av møtene ble det klart at det er en del ting man er enige om, som at dyrene som reetableres skal være friske og livskraftige, og selvfølgelig fri for CWD. Det er også bred enighet i gruppen om at lokal forvaltning og lokalsamfunn må stille seg bak avgjørelsene som tas. Etter saneringen av Nordfjella sone 1 var det mange som satt igjen med en følelse av å ha blitt fullstendig overkjørt av myndighetene i deres eget lokalmiljø. Det ble brukt god tid på å diskutere interessene til lokal forvaltning under møtene.

En av de store uenighetene dreide seg, ikke overraskende, om valg av kildebestand. Her er det til dels steile fronter. Forskning har vist at det ikke er tilfeldig om dyrene er mer eller mindre mottakelige for å bli smittet med CWD, dette er nemlig knyttet til gener. Tamrein har jevnt over en gunstigere genetik og er mer motstandsdyktige for CWD enn villrein. Dersom

genetikk hadde vært eneste kriterium for hvilke dyr man reetablerer med, hadde tamrein vært et soleklart valg. Dog er det mange andre aspekter som skal tas hensyn til.

At reinen er «stedegen» er et ønske for mange. Dersom man velger å reetablere med villrein fra Nordfjella sone 2, vil man i praksis få den samme reinen som var der før saneringen. Noen tar til orde for at den beste måten å reetablere på, er å åpne gjerdene og la reinen vandre over. Baksiden ved denne metoden er at man ikke har mulighet til å kontrollere og prøveta reinen, samt at man reetablerer med en reinstamme som er særdeles mottakelig for CWD, dersom det skulle være smitte i jorden, eller man ikke lykkes med å utrydde CWD. Som et forsøk på en gylden middelvei, er det lagt frem forslag om krysningsprosjekter hvor man bruker både tam- og villrein.

Til tross for at det drives forskning på CWD, både nasjonalt og internasjonalt, er det fortsatt mye man ikke vet om sykdommen. Denne uvissheten er det mange av deltakerne som finner det utfordrende å forholde seg til. Det påpekes at det må handles på bakgrunn av kunnskapen man har, og ikke kunnskapen man ikke har.

I slutten av mai skal reetableringsgruppen ha sitt siste møte før rapporten deres skal legges fram. Det er usikkert om gruppen kommer fram til konsensus, men mange viktige aspekter ved saken vil uansett bli belyst. Bred deltakelse fra mange ulike aktører har bidratt til dette. Rapporten kommer kun til å lede fram til en anbefaling til departementet. Det betyr at avgjørelsen ligger hos de folkevalgte. Når beslutninger fattes politisk, er det viktig å huske at det er enda flere momenter å ta hensyn til, i tillegg til det rapporten peker på. Budsjettering og tiltakenes popularitet hos velgerne er viktige aspekter. Det er ikke nødvendigvis slik at det som faglig sett er best å gjøre samsvarer med hva som er mest gunstig økonomisk.

Det er fortsatt stor usikkerhet til når reetableringen kan gjennomføres. Selv om fem år har gått, er ikke forutsetningene for reetableringen nådd så lenge flokken i sone 2 ikke er friskmeldt. Man vet heller ikke hvor lenge smitten vedvarer i miljøet, og det er vanskelig å få kartlagt fullstendig CWD-status i Norge. Slike usikkerhetsmomenter gjør det desto viktigere at flokken som bygges opp er robust, og helst så lite mottakelig for CWD som mulig. Det kan gjøre *PRNP* til en av de viktigste brikkene i det store puslespillet. Flokkene i Reinheimen-Breheimen og Setesdal Ryfylke kunne vært aktuelle for reetableringen dersom de hadde gunstig *PRNP*-genetikk, men det viste seg gjennom DNA-analysene som er gjort i oppgaven at det ikke er tilfellet. Valg av kildebestand kommer sannsynligvis til å falle på et annet

alternativ, og baserer seg forhåpentligvis på dyr med gunstig *PRNP*-genetikk. Det kan være av avgjørende betydning for om reetableringen blir vellykket eller ikke, hvilket det er store forventninger til at den blir. En vellykket reetablering vil være vel fortjent for alle parter, fra reetableringsgruppen som har jobbet iherdig med oppgaven, til alle fjellfanter der ute som tålmodig har ventet, og som gleder seg til å få se rein i Nordfjella igjen.

## **Takk til bidragsytere**

Takk til Michael A. Tranulis for god veiledning og stort engasjement, som gir inspirasjon.

Takk til Erik Magne K. Rasmussen for tett og god oppfølging på laben, og hjelp med metodedelen. Takk til Erik Johannes B. L. G. Husom for god hjelp med figurer, tabeller og gjennomlesing.

## Referanser

- "Center for Disease Control and Prevention". (2021). *CWD in animals*. I: Disease, N. C. f. E. a. Z. I. (red.). Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/prions/cwd/cwd-animals.html> (lest 02.05.22).
- "National Wildlife Health Center". (2022). *Expanding Distribution of Chronic Wasting Disease*. Tilgjengelig fra: <https://www.usgs.gov/centers/nwhc/science/expanding-distribution-chronic-wasting-disease> (lest 02.05.22).
- "Norsk Villreinsenter". ([u.å.] -a). *Reinheimen-Breheimen Villreinområde*: villrein.no. Tilgjengelig fra: <https://www.villrein.no/reinheimenbreheimen-2> (lest 19.04.22).
- "Norsk Villreinsenter". ([u.å.] -b). *Setesdal Ryfylke Villreinområde*. villrein.no. Tilgjengelig fra: <https://www.villrein.no/SetesdalRyfylke-2> (lest 19.04.22).
- "Reinheimen-Breheimen Villreinutvalg". (2021). *Bestandsplan for villrein i Reinheimen-Breheimen villreinområde*.
- "Vitenskapskomiteen for mat og miljø". *Bjørnar Ytrehus*. Tilgjengelig fra: <https://vkm.no/personsider/bjornarytrehus.4.773639b215c8657f2a495a2b.html> (lest 08.02.21).
- "Vitenskapskomiteen for mat og miljø". *VKM er en uavhengig og tverrfaglig vitenskapskomité*. Tilgjengelig fra: <https://vkm.no/vkm/omvkm/uavhengigogtverrfaglig.4.175083d415c86c573b57f712.html> (lest 22.03.22).
- «Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet». (2019). *Prioner*: UiO. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/prioner.html> (lest 01.03.22).
- A. Espenes, B. H., K.G. Gaustad, G. Skretting og I. Olsaker. (2000). Gener, genuttrykk og skrapesjuka. *Institutt for morfologi, genetikk og akvatisk biologi, Norges Veterinærhøgskole*.
- Acevedo, C. & Wille, H. (2014). The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models - Considerations and Pitfalls. *Viruses*, 6: 3875-3892. doi: 10.3390/v6103875.
- Artsdatabanken. (2021a). *Ansvarsarter – Rødlista i et europeisk perspektiv. Norsk rødliste for arter 2021*. Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/rodlisteforarter2021/fordypning/ansvarsarterrodlistaieteuropeiskperspektiv> (lest 25.01.22).
- Artsdatabanken. (2021b). *Utslagsgivende kriterier for truede arter*. Tilgjengelig fra: <https://artsdatabanken.no/rodlisteforarter2021/Resultater/Utslagsgivendekriterierfortruetearter> (lest 25.01.22).
- Aspøy, A. (2021). *Mattilsynet*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/Mattilsynet> (lest 19.02.22).
- Barmada, S., Piccardo, P., Yamaguchi, K., Ghetti, B. & Harris, D. A. (2004). GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 16 (3): 527-537. doi: 10.1016/j.nbd.2004.05.005.
- Bitustøyl, K. (u.å.). *Forvaltning - hvem er hvem?*. Tilgjengelig fra: <https://www.villrein.no/forvaltning-hvem-er-hvem> (lest 25.01.22).
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356 (6370): 577-82. doi: 10.1038/356577a0.
- Canada, G. o. (2020). Chronic wasting disease: what you need to know.
- Cannon, R. M. (2002). Demonstrating disease freedom—combining confidence levels. *Preventive Veterinary Medicine*.
- Carlson, C. M., Hopkins, M. C., Nguyen, N. T., Richards, B. J., Walsh, D. P. & Walter, W. D. (2017). *Chronic Wasting Disease: Status, Science, and Management*. Survey, U. S. G.
- Czub, S. (2017). *First evidence of intracranial and peroral transmission of Chronic Wasting disease (CWD) in Cynomolgus macaques: a work in progress*. Tilgjengelig fra: <https://www.youtube.com/embed/Vt1kAVDhDQ>.
- Devivo, M. T., Edmunds, D. R., Kauffman, M. J., Schumaker, B. A., Binfet, J., Kreeger, T. J., Richards, B. J., Schätzl, H. M. & Cornish, T. E. (2017). Endemic chronic wasting disease causes mule deer population decline in Wyoming. *PLOS ONE*, 12 (10): e0186512. doi: 10.1371/journal.pone.0186512.

- Edmunds, D. R., Kauffman, M. J., Schumaker, B. A., Lindzey, F. G., Cook, W. E., Kreeger, T. J., Grogan, R. G. & Cornish, T. E. (2016). Chronic Wasting Disease Drives Population Decline of White-Tailed Deer. *PLOS ONE*, 11 (8): e0161127. doi: 10.1371/journal.pone.0161127.
- Eldegard, K., Syvertsen, P. O., Bjørge, A., Kovacs, K., Støen, O.-G. & van der Kooij, J. (2021). *Pattedyr: Vurdering av rein Rangifer tarandus for Norge. Norsk rødliste for arter 2021.*: Artsdatabanken. Tilgjengelig fra: <https://www.artsdatabanken.no/lister/rodlisteforarter/2021/19057> (lest 17.03.22).
- Ersdal, C., Ulvund, M. J., Benestad, S. L. & Tranulis, M. A. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol*, 40 (2): 164-74.
- Folkehelseinstituttet. (2010). Creutzfeldt-Jakobs sykdom og andre prionsykdommer - veileder for helsepersonell
- Gelman, A. (2002). Prior distribution. *Encyclopedia of Environmetrics*, 3.
- Geremia, C., Miller, M. W., Hoeting, J. A., Antolin, M. F. & Hobbs, N. T. (2015). Bayesian Modeling of Prion Disease Dynamics in Mule Deer Using Population Monitoring and Capture-Recapture Data. *PLOS ONE*, 10 (10): e0140687. doi: 10.1371/journal.pone.0140687.
- Goldmann, M. B. a. W. (2004). The Genetics of Scrapie in Sheep and Goats. *Current Molecular Medicine*, 4.
- Güere, M., Våge, J., Tharaldsen, H., Kvie, K. & Bård-Jørgen Bårdsen, S. B., Turid Vikøren, Knut Madslie, Christer Rolandsen, Michael Tranulis, Knut Røed. (2021). Chronic wasting disease in Norway - a survey of prion protein gene variation among cervids.
- Güere, M. E., Våge, J., Tharaldsen, H., Benestad, S. L., Vikøren, T., Madslie, K., Hopp, P., Rolandsen, C. M., Røed, K. H. & Tranulis, M. A. (2020). Chronic wasting disease associated with prion protein gene (PRNP) variation in Norwegian wild reindeer (*Rangifer tarandus*). *Prion*, 14 (1): 1-10. doi: 10.1080/19336896.2019.1702446.
- Halleraker, J. H. (2021). *Ansvarsart*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/ansvarsart> (lest 07.01.22).
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Lie, K. I., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H. & Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, 81 (Pt 9): 2327-37. doi: 10.1099/0022-1317-81-9-2327.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schürmann, P., Windl, O., Brose, N. & Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*, 19 (20): 8866-75. doi: 10.1523/jneurosci.19-20-08866.1999.
- Hjortevilt. (2021). *Skrantesjuka (CWD) og hjortevilt*. Tilgjengelig fra: <https://www.hjortevilt.no/skrantesjuka/> (lest 26.05.22).
- Jerstad, K. & Stegarud, S., O.. (2019). *Setesdal Ryfylke Villreinområde Bestandsplan*.
- Keane, D. P., Barr, D. J., Bochsler, P. N., Hall, S. M., Gidlewski, T., O'Rourke, K. I., Spraker, T. R. & Samuel, M. D. (2008). Chronic wasting disease in a Wisconsin white-tailed deer farm. *J Vet Diagn Invest*, 20 (5): 698-703.
- Kjørstad, M., Bøthun, S. W., Gundersen, V., Holand, Ø., Madslie, K., Mysterud, A., Myren, I. N., Punsvik, T., Røed, K. H., Strand, O., et al. (2017). *Miljøkvalitetsnorm for villrein - forslag fra en ekspertgruppe*. Miljødirektoratet: Norsk Institutt for naturforskning.
- Lund, E. (2021). *Hvorfor ansvar for villreinen + hvem er vi*, Fausko: Miljødirektoratet.
- Manjerovic, M., Green, M., Mateus-Pinilla, N. & Novakofski, J. (2014). The importance of localized culling in stabilizing chronic wasting disease prevalence in white-tailed deer populations. *Preventive Veterinary Medicine*.
- Mattilsynet & Miljødirektoratet. (2017). *Reetableringsplan for villreinbestanden i Nordfjella sone 1*: Mattilsynet.
- Mattilsynet. (2018). *Skrantesjuka - Statusrapport for 2017 og veien videre*.
- Mattilsynet, M. (2017). *Reetableringsplan for villreinbestanden i Nordfjella sone 1*.
- Mead, S., Lloyd, S. & Collinge, J. (2019). Genetic Factors in Mammalian Prion Diseases. *Annual Review of Genetics*, 53 (1): 117-147. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092352.
- Miljødirektoratet. ([u.å.]). *Jakt*. Tilgjengelig fra: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/friluftsliv/jakt/> (lest 10.05.22).

- Miljødirektoratet, M. (2020). *Revisjon av reetableringsplan for villrein i Nordfjella sone 1*. Miljødirektoratet. Oslo: Miljødirektoratet.
- Miller, M. W., Swanson, H. M., Wolfe, L. L., Quartarone, F. G., Huwer, S. L., Southwick, C. H. & Lukacs, P. M. (2008). Lions and Prions and Deer Demise. *PLoS ONE*, 3 (12): e4019. doi: 10.1371/journal.pone.0004019.
- Moore, S. J., Kunkle, R., West, H., Nicholson, E., Richt, J., Hamir, A., Waters, W. R. & Greenlee, J. (2016). Horizontal transmission of chronic wasting disease in reindeer. *Emerging Infectious Diseases*
- Mysterud, A., Ytrefhus, B., Tranulis, M. A., Rauset, G. R., Rolandsen, C. M. & Strand, O. (2020). Antler cannibalism in reindeer. *Sci Rep*, 10 (1): 22168. doi: 10.1038/s41598-020-79050-2.
- Naturmangfoldloven. (2009). *Lov om forvaltning av naturens mangfold av 19. juni 2009 nr. 100*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-100> (lest 18.02.22).
- Needham, M., Vaske, J. & Manfredo, M. (2004). Hunters' Behavior and Acceptance of Management Actions Related to Chronic Wasting Disease in Eight States. *Human Dimensions of Wildlife*, Fall 2004: 211-231. doi: 10.1080/10871200490479990.
- Nesje, M. (2021). *Forvaltningsloven, innføring for veterinærstudenter*: NMBU. Upublisert manuskript.
- Nymo, I. H. (2021). Skrantesjuka kan true reindriften. *Nationen*.
- Næss, C. (2015). *Helseovervåking av villreinkalver og ungdyr på Hardangervidda*. Tilgjengelig fra: <https://www.hjortevilt.no/helseovervaking-av-villreinkalver-og-ungdyr-pa-hardangervidda/> (lest 07.02.22).
- O'Rourke, K. I., Spraker, T. R., Hamburg, L. K., Besser, T. E., Brayton, K. A. & Knowles, D. P. (2004). Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol*, 85 (Pt 5): 1339-46. doi: 10.1099/vir.0.79785-0.
- Race, B., Williams, K., Orru, C. D., Hughson, A. G., Lubke, L. & Chesebro, B. (2018). Lack of Transmission of Chronic Wasting Disease to Cynomolgus Macaques. *J Virol*, 92 (14). doi: 10.1128/JVI.00550-18.
- Race B, M.-W. K., Phillips K, Striebel J, Race R, Chesebro B. . (2014). Chronic Wasting Disease Agents in Nonhuman Primates. *Emerging infectious diseases*, 20 (5).
- Regjeringen.no. (2018). *Ansvarsområder og oppgaver i Landbruks- og matdepartementet*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/dep/lmd/om-departementet/id632/> (lest 03.04.22).
- Regjeringen.no. (2021). *Tilrår ikkje ekstraordinære uttak av villrein på Hardangervidda*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/tilrar-ikkje-ekstraordinare-uttak-av-villrein-pa-hardangervidda/id2889129/> (lest 24.04.21).
- Regjeringen.no. (2022). *Mattilsynet*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/dep/lmd/organisasjon/Etatar-og-verksemder/Underliggjande-etatar/mattilsynet/id85918/> (lest 03.04.22).
- Reiten, M. R. (2017). Non-neuronal functions of the prion protein: insights from a unique animal model.
- Robinson, A. L., Williamson, H., Guere, M. E., Tharaldsen, H., Baker, K., Smith, S. L., Perez-Espona, S., Krojerova-Prokesova, J., Pemberton, J. M., Goldmann, W., et al. (2019). Variation in the prion protein gene (PRNP) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. *Vet Res*, 50 (1): 59. doi: 10.1186/s13567-019-0675-6.
- Rongyan, Z., Xianglong, L., Lanhui, L., Xiangyun, L. & Fujun, F. (2008). Evolution and Differentiation of the Prion Protein Gene (PRNP) among Species. *Journal of Heredity*, 99 (6): 647-652. doi: 10.1093/jhered/esn073.
- Salès, N., Rodolfo, K., Hässig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. & Moya, K. L. (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci*, 10 (7): 2464-71. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00258.x.
- Salvesen, Ø., Reiten, M. R., Espenes, A., Bakkebø, M. K., Tranulis, M. A. & Ersdal, C. (2017). LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface. *Journal of Neuroinflammation*, 14 (1). doi: 10.1186/s12974-017-0879-5.



- Sigurdson, C. J., Williams, E. S., Miller, M. W., Spraker, T. R., O'Rourke, K. I. & Hoover, E. A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, 80 ( Pt 10): 2757-2764. doi: 10.1099/0022-1317-80-10-2757.
- Skedsmo, F. S., Espenes, A. & Tranulis, M. A. (2021). Prion protein in myelin maintenance: what does the goat say? *Neural Regeneration Research*, 16 (6): 1216-1217. doi: 10.4103/1673-5374.300444.
- Somerville, R., Fernie, K., Smith, A., Bishop, K., Maddison, B., Gough, K. & Hunter, N. (2019). BSE infectivity survives burial for five years with only limited spread. *Archives of Virology*.
- Sonnenberg, P., Drageset, O.-M. & Isdahl, T. (2020). Utvikling av Eidfjord resort. Analyse av virkninger for villrein.
- Strand, O., Jordhøy, P., Panzacchi, M. & Van Moorter, B. (2015). Veger og villrein. Oppsummering – overvåking av Rv7 over Hardangervidda. - NINA Rapport 1121. 47 s. + vedlegg
- Thomassen, J. (2021a). *Oppsummering fra 1. samling i reetableringsgruppa CWD Nordfjella sone 1*, Fausko Gjestegård NINA
- Thomassen, J. (2021b). *Reetablering av villrein i Nordfjella sone 1 - prosess og arbeidsform*: Norsk institutt for naturforskning.
- Thomassen, J. (2022). Reetablering av villrein i Nordfjella sone 1 - oppsummering fra to samlinger i reetableringsgruppa, Fausko oktober 2021 og Kringler februar 2022.
- Tranulis, M., Grahek-Ogden, D., Kapperud, G. & Pahnke, J. (2021). Oppdatert kunnskap om det zoonotiske potensialet av skrantesjuka ved håndtering av slakt og konsum av kjøtt. *VKM*.
- Tranulis, M. A., Gavier-Widén, D., Våge, J., Nöremark, M., Korpenfelt, S.-L., Hautaniemi, M., Pirisinu, L., Nonno, R. & Benestad, S. L. (2021). Chronic wasting disease in Europe: new strains on the horizon. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63 (1): 48. doi: 10.1186/s13028-021-00606-x.
- Veterinærinstituttet. (2022). *Skrantesjuka-statistikk*. Tilgjengelig fra: <http://apps.vetinst.no/skrantesykestatistikk/NO/#omrade>.
- Veterinærinstituttet. ([u.å.]). *Skrapesjuka*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/skrapesjuka> (lest 03.03.22).
- Veterinærinstituttet. ([u.å.]a). *CWD - Forskning på skrantesjuka*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/forskning-innovasjon/pagaende-forskningsprosjekter/cwd-forskning-pa-skrantesjuka-cwd> (lest 29.04.22).
- Veterinærinstituttet. ([u.å.]b). *Kugalskap (BSE)*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kugalskap-bse> (lest 04.04.22).
- Veterinærinstituttet. ([u.å.]c). *Skrantesjuka - Chronic Wasting Disease*. vetinst.no. Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/chronic-wasting-disease> (lest 27.02.22).
- Vikøren, T., Våge, J., Madslie, K. I., Røed, K. H., Rolandsen, C. M., Tran, L., Hopp, P., Veiberg, V., Heum, M., Moldal, T., et al. (2019). First Detection of Chronic Wasting Disease in a Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *J Wildl Dis*, 55 (4): 970-972.
- Viljugrein, H., Hopp, P., Benestad, S. L., Nilsen, E. B., Våge, J., Tavoranpanich, S., Rolandsen, C. M., Strand, O. & Mysterud, A. (2019). A method that accounts for differential detectability in mixed samples of long-term infections with applications to the case of chronic wasting disease in cervids. *Methods in Ecology and Evolution*, 10 (1): 134-145. doi: 10.1111/2041-210x.13088.
- VKM. (2017a). *CWD – update statement*, ISBN: 978-82-8259-283-3, Oslo, Norway. .
- VKM. (2017b). *CWD in Norway – a state of emergency for the future of cervids (Phase II)*. Opinion of the panel on Biological Hazards. 1-125.
- Våge, C. M. R. o. J. (2021). *Kartlegging og overvåking av skrantesjuka (Chronic Wasting Disease - CWD) 2020*.
- Våge, J., Madslie, K., Benestad, S. L. & Vikøren, T. (2019). Skrantesjuka (CWD) – en alvorlig sykdom med store konsekvenser - oppdaget ved god helseovervåking og samarbeid! *Veterinærtidsskriftet*, 9: 584-589.
- Wadsworth, J. D. F., Joiner, S., Linehan, J. M., Jack, K., Al-Doujaaily, H., Costa, H., Ingold, T., Taama, M., Zhang, F., Sandberg, M. K., et al. (2021). Humanized Transgenic Mice Are

- Resistant to Chronic Wasting Disease Prions From Norwegian Reindeer and Moose. *The Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1093/infdis/jiab033.
- Williams E.S., M. M. W., Kreeger T.J., Kahn R.H., Thorne E.T. (2002). Chronic wasting disease of deer and elk: a review with recommendations for management. *Journal of Wildlife Management*, 551-563.
- Ytrehus, B., Asmyhr, M., Hansen, H., Mysterud, A., Nilsen, E. B., Strand, O., Tranulis, M. A., Våge, J., Kapperud, G., Madslie, K., et al. (2021). Handlingsrommet etter påvisning av skrantesyke (Chronic Wasting Disease) på Hardangervidda – grunnlag for fremtidige forvaltningsstrategier.
- Ytrehus, B., Asmyhr, Maria G., Hansen, Hege., Nilsen, Erlend B., Mysterud, Atle., Strand, Olav., Tranulis, Michael A., Våge, Jørn. (2021). *Handlingsrommet etter påvisning av skrantesyke (Chronic Wasting Disease, CWD) på Hardangervidda – grunnlag for fremtidige forvaltningsstrategier*. Oslo.
- Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J.-D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.-T. & Liautard, J.-P. (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Veterinary Research*, 39 (4): 09. doi: 10.1051/vetres:2007048.
- Åmdal, S. (2018). Skrantesyke - behov for friskmelding av sone 2 og Hardangervidda.

## Vedlegg A

---

### Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)

This protocol is designed for purification of total DNA from animal tissues, including rodent tails.

#### Important points before starting

- If using the DNeasy Blood & Tissue Kit for the first time, read “Important Notes” (page 15).
- For fixed tissues, refer to the pretreatment protocols “Pretreatment for Paraffin Embedded Tissue”, page 46, and “Pretreatment for Formalin-Fixed Tissue”, page 48.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C) in a microcentrifuge.
- Vortexing should be performed by pulse-vortexing for 5–10 s.
- **Optional:** RNase A may be used to digest RNA during the procedure. RNase A is not provided in the DNeasy Blood & Tissue Kit (see “Copurification of RNA”, page 20).

#### Things to do before starting

- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C until the precipitates have fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath or rocking platform to 56°C for use in step 2. If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Avoid repeated thawing and freezing of samples, because this will lead to reduced DNA size.

## Procedure

1. Cut up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces, and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, place one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 µl Buffer ATL. Earmark the animal appropriately.

Ensure that the correct amount of starting material is used (see “Starting amounts of samples”, page 15). For tissues, such as spleen, with a very high number of cells for a given mass of tissue, no more than 10 mg starting material should be used.

We strongly recommend cutting the tissue into small pieces to enable more efficient lysis. If desired, lysis time can be reduced by grinding the sample in liquid nitrogen\* before addition of Buffer ATL and Proteinase K. Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted before Proteinase K digestion using a rotor–stator homogenizer, such as the TissueRuptor II, or a bead mill, such as the TissueLyser II (see ordering information starting on page 59). A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the TissueLyser II can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover). For rodent tails, a maximum of 1.2 cm (mouse) or 0.6 cm (rat) tail should be used. When purifying DNA from the tail of an adult mouse or rat, it is recommended to use only 0.4–0.6 cm.

2. Add 20 µl Proteinase K. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample or place in a thermomixer, shaking water bath or on a rocking platform.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. If it is more convenient, samples can be lysed overnight; this will not affect them adversely.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy Mini spin column. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 52, for recommendations.

\* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

**Optional:** If RNA-free genomic DNA is required, add 4 µl RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C) before continuing with step 3.

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or, if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is not necessary.

3. Vortex for 15 s. Add 200 µl Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.\*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 µl Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.\*

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500  $\mu$ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000  $\times g$  (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at 20,000  $\times g$  (14,000rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200  $\mu$ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) to elute.

Elution with 100  $\mu$ l (instead of 200  $\mu$ l) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 23).

8. **Recommended:** For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

**Note:** Do not elute more than 200  $\mu$ l into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

## Vedlegg B

### Protocol: MinElute PCR Purification Kit using a Microcentrifuge

This protocol is designed to purify double-stranded DNA fragments from PCR reactions resulting in high end-concentrations of DNA (see page 10). Fragments ranging from 70 bp to 4 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases and salts using MinElute spin columns in a microcentrifuge.

#### Important points before starting

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at  $17,900 \times g$  (13,000 rpm) in a conventional tabletop microcentrifuge at room temperature.
- Add 1:250 volume pH indicator I to Buffer PB (i.e., add 120  $\mu\text{l}$  pH indicator I to 30 ml Buffer PB or add 600  $\mu\text{l}$  pH indicator I to 150 ml Buffer PB). The yellow color of Buffer PB with pH indicator I indicates a pH of  $\leq 7.5$ .
- Add pH indicator I to entire buffer contents. Do not add pH indicator I to buffer aliquots.
- If the purified PCR product is to be used in sensitive microarray applications, it may be beneficial to use Buffer PB without the addition of pH indicator I.

#### Procedure

1. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR reaction and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.  
For example, add 250  $\mu\text{l}$  of Buffer PB to 50  $\mu\text{l}$  PCR reaction (not including oil).
2. If pH indicator I has been added to Buffer PB, check that the color of the mixture is yellow.  
If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu\text{l}$  of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.
3. Place a MinElute column in a provided 2 ml collection tube in a suitable rack.
4. To bind DNA, apply the sample to the MinElute column and centrifuge for 1 min.  
For maximum recovery, transfer all traces of sample to the column.
5. Discard flow-through. Place the MinElute column back into the same tube.
6. To wash, add 750  $\mu\text{l}$  Buffer PE to the MinElute column and centrifuge for 1 min.

7. Discard flow-through and place the MinElute column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min at maximum speed.

**IMPORTANT:** Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

8. Place the MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 10  $\mu$ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of the membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.

**IMPORTANT:** Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the center of the membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 9  $\mu$ l from 10  $\mu$ l elution buffer volume.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at  $-30^{\circ}\text{C}$  to  $-15^{\circ}\text{C}$  as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.

Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time.

Refer to Table 3 (page 7) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.



## Vedlegg C

Kildekode for utregning av Fisher's exact test.

```
#!/usr/bin/env python3
# -*- coding: utf-8 -*-
"""Calculate p-value with Fisher Exact Test.

Created:
    2022-04-02

"""
import pandas as pd
import scipy.stats

def fisher_exact_test(table):
    """Calculate p-value using Fisher Exact test.

    Args:
        table (array): 2x2 contingency table.

    Returns:
        p (float): P-value.

    """
    p = scipy.stats.fisher_exact(table)[1]
    print(p)

    return p

if __name__ == '__main__':
    # Read tables and calculate p-values.
    for i in range(5):
        table = pd.read_csv(f"table (Güere et al..csv)").to_numpy()
        fisher_exact_test(table)
```

## Vedlegg D

DNA-konsentrasjoner etter PCR og rensing (Setesdal Ryfylke).

Name	260/280	260/230	ng/ $\mu$ L	Mean	CV (%)
8983	1,93	1,845	80,318	80,154	0,29
	1,912	2,061	79,989		
8986	1,943	2,295	133,425	138,491	5,173
	1,933	2,206	143,557		
8987	1,909	1,377	93,888	88,345	8,873
	1,91	2,009	82,802		
8988	1,957	2,082	87,884	89,967	3,275
	1,941	2,158	92,05		
8992	1,936	2,075	70,598	70,684	0,172
	1,916	2,058	70,77		
8993	1,879	1,616	98,319	93,48	7,32
	1,908	2,019	88,641		
9007	1,907	1,578	110,358	101,012	13,084
	1,867	2,084	91,667		
9010	1,894	2,102	59,273	63,213	8,815
	1,924	1,863	67,154		
9011	1,86	1,878	74,945	75,274	0,618
	1,918	1,91	75,603		
9014	1,904	1,537	122,742	116,96	6,991
	1,917	1,856	111,178		

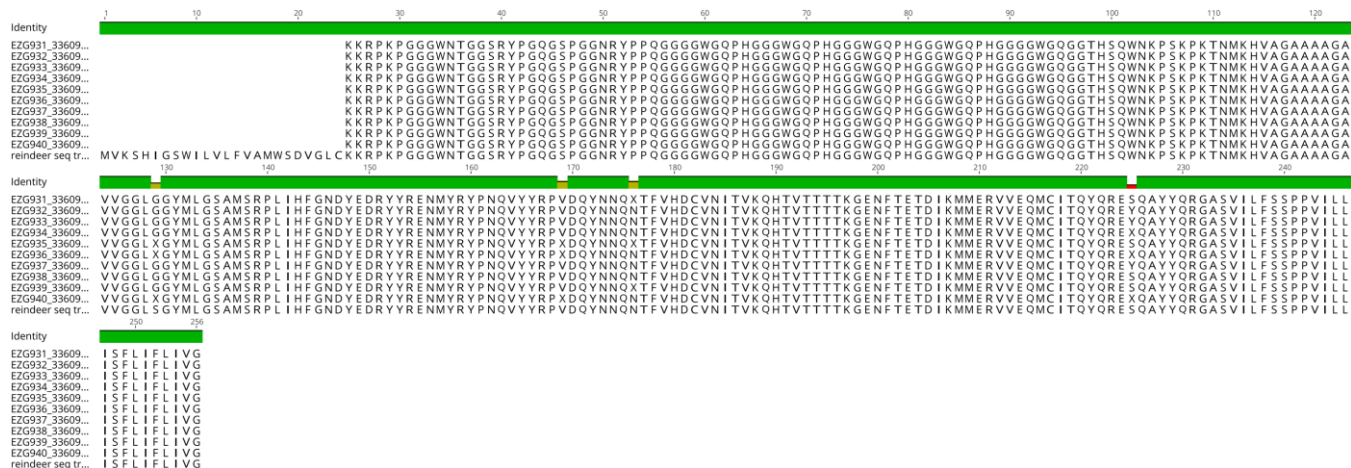
## Vedlegg E

DNA-konsentrasjoner etter PCR og rensing (Reinheimen-Breheimen).

Name	260/280	260/230	ng/ $\mu$ L	Mean	CV (%)
9090	1,946	2,179	101,891	106,168	5,696
	1,928	1,853	110,444		
9091	1,939	2,307	156,635	151,349	4,94
	1,946	2,25	146,063		
9092	1,898	2,143	144,301	139,472	4,896
	1,931	2,345	134,643		
9093	1,91	2,159	134,128	132,922	1,283
	1,933	2,269	131,716		
9094	1,924	2,067	117,853	115,61	2,744
	1,909	2,144	113,368		
9095	1,909	2,092	113,802	112,458	1,69
	1,92	2,154	111,114		
9096	1,957	2,232	136,144	130,397	6,233
	1,918	2,307	124,651		
9097	1,941	1,997	113,368	109,078	5,561
	1,923	2,218	104,789		
9098	1,942	1,959	124,479	129,084	5,045
	1,952	2,342	133,69		
9099	1,901	2,06	111,481	117,318	7,036
	1,926	2,19	123,155		
9100	1,919	2,162	122,054	131,865	10,522
	1,931	2,288	141,676		
9101	1,914	2,243	160,005	151,891	7,555
	1,933	2,162	143,777		
9102	1,922	2,19	104,158	104,804	0,872
	1,905	2,075	105,45		
9104	1,931	2,231	132,24	133,362	1,19
	1,868	2,057	134,484		
9105	1,967	1,983	125,949	131,214	5,674
	2,016	2,124	136,478		
9106	1,909	1,99	77,142	75,868	2,375
	1,912	2,22	74,594		
9107	1,934	1,805	124,589	138,405	14,117
	1,932	2,375	152,22		
9108	1,932	2,195	173,926	168,475	4,576
	1,921	2,208	163,023		
9109	1,936	2,163	85,16	82,209	5,076
	1,979	1,931	79,258		
9110	1,848	2,221	115,817	117,845	2,434
	1,93	2,329	119,874		
9111	1,956	2,083	90,245	87,869	3,823
	1,875	2,157	85,493		
9112	1,874	2,229	86,903	86,074	1,363
	1,869	2,094	85,245		
9113	1,928	2,317	109,68	109,262	0,541
	1,905	2,257	108,844		

# Vedlegg F

Eksempel på alignments fra programmet Geneious Prime, her vist ved sekvenser fra 10 individer fra Reinheimen-Breheimen.





Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)