



NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for basalfag og akvamedisin
Seksjon for akvamedisin og ernæring
Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2020, 20 stp

Akvamedisin

En studie av faktorer som kan påvirke forekomst av taperfisk i norsk oppdrettsnæring

A study of factors that might influence the prevalence of growth-stunted farmed salmon in Norway

Ottesen, Sofie Søli
Rostad Kristine
Soltvedt, Eiril Moen
Kull 2014

Evensen Øystein, Aunsmo Arnfinn og Asgeir Østvik

Innhold

Forord.....	6
Sammendrag	6
Definisjoner og forkortelser	7
Innledning	9
Oppdrettsnæringen i Norge.....	9
Taperfisk	9
Produksjonssyklus	11
Stamfisk	11
Rognfase og klekking	11
Vekstfase i ferskvann.....	12
Matfiskproduksjon i sjø	12
Faktorer som kan bidra til utvikling av taperfisk.....	13
Dårlig smoltifisering	13
Vannkvalitet.....	13
Infeksjoner	14
Tidlig kjønnsmodning.....	14
Stress	14
Evolusjon	15
Måsøval.....	15

Formålet med oppgaven.....	16
Materiale og metoder	17
Prøveuttak	19
Bakteriemorfologi.....	19
Sekundærutstryk og preservering	20
Gramfarging.....	20
Biokjemiske metoder	21
Molekylære metoder	22
Histologi.....	26
Virologiske undersøkelser	28
Resultater	29
Vannkvalitet.....	29
Dødelighet og destruksjon/avliving.....	30
Bivirkningskontroll.....	30
Laksens utvikling i merd 108, 109 og 110 (mai 2020).....	31
Makroskopisk vurdering av normal fisk og taperfisk.....	34
Kroppslengde	35
Bakteriemorfologi.....	36
Biokjemiske analyser	41
Molekylære analyser.....	42
Sekvenseringsresultater.....	44

Histologi.....	47
Gjeller	47
Hud (epidermis og dermis) og muskel.....	51
Hjerte.....	52
Lever	55
Tarm.....	58
Virusinfeksjon.....	61
Diskusjon	63
Klassifisering og registrering av taperfisk.....	63
Vannkvalitet.....	66
Smoltifisering.....	68
Stress	69
Infeksjoner	70
Arbeid med å redusere mengden taperfisk.....	71
Ulike oppfatninger i fagmiljøet.....	72
Er taperfisk en tapt fisk?	73
Begrensninger og generaliserbarhet.....	73
Konklusjon.....	75
Takk til bidragsyttere	76
Summary	77
Referanser	78

Vedlegg..... 84

Forord

Denne oppgaven ble valgt på bakgrunn av en stor interesse hos forfatterne for fiskevelferd og bærekraftig matproduksjon. Noen produsenter har tidvis store utfordringer knyttet til utviklingen av “taperfisk”. Vi ønsket å lære mer om denne problematikken, hva som forårsaker utviklingen og om det er mulig å redusere andelen taperfisk. En reduksjon i andel taperfisk vil kunne gi bedre fiskevelferd og en mer effektiv matproduksjon.

Sammendrag

Tittel: En studie av faktorer som kan påvirke forekomst av taperfisk i norsk oppdrettsnæring

Forfattere: Sofie Søli Ottesen, Kristine Rostad, Eiril Moen Soltvedt

Veiledere: Øystein Evensen, Arnfinn Aunsmo og Asgeir Østvik

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Fakultet for veterinærmedisin, Institutt for basalfag og akvamedisin

Utvikling av taperfisk koster oppdrettsnæringen penger hvert år, i tillegg til å representere en velferdsutfordring. Andel taperfisk som utvikles varierer mellom ulike lokalisasjoner, fiskegrupper og merder. Flere forskningsprosjekter har identifisert ulike faktorer som kan påvirke utviklingen av taperfisk. Dette tyder på en multifaktoriell årsakssammenheng.

Formålet med studien var å foreta en tverrsnittstudie med mål om å registrere faktorer i ferskvanns- og saltvannsmiljøet som kan disponere for utvikling av taperfisk, samt foreta en sammenligning av makroskopiske, histopatologiske og mikrobiologiske forhold hos taperfisk og normal fisk. Resultatene viste store forskjeller i lengdevekst (taperfiskene hadde vokst betydelig mindre i lengde sammenlignet med normal fisk fra samme fiskegruppe),

tilstedeværelse av subkutant fettvev (lite/ingenting hos taperfisk), høyere forekomst av ubikvitære bakterier i hodenyret hos taperfisk, samt forekomst av PRV og PMCV hos både taperfisk og normal fisk.

Definisjoner og forkortelser

Tapersyndrom: “Tapersyndrom er en betegnelse for en tilstand der fisken avmagres eller ikke vokser normalt og utvikler seg til tynne “tapere” eller “pinner”. Denne definisjon brukes primært for fisk i sjøen, men en kan også se taperfisk på settefiskanlegg” (1).

Øyerogn: Utviklingsstadium for rognen, hvor øynene tydelig kan observeres som to svarte prikker inni egget.

0-åring: Høstsmolt. Settes ut i merder i sjøen på høsten, mindre enn ett år gamle.

1-åring: Vårsmolt. Settes ut i sjøen på våren, over ett år gamle.

Smoltifisering: Prosessen hvor fisken gjennomgår en fysiologisk endring, slik at den skal kunne leve i saltvann.

Smolt: Det fisken kalles etter at den har gjennomgått smoltifisering.

Postsmolt: Stadiet når fisken blir satt i sjø etter gjennomgått smoltifisering.

PCR: Forkortelse for Polymerase Chain Reaction. Dette er en metode som benyttes for å masseprodusere DNA sekvenser. Når man bruker denne metoden får man oppkonsentrert den sekvensen man ønsker å undersøke videre (2).

Primer: En kort sekvens med nukleinsyrer som fungerer som en «søker» (probe) og er startpunktet for oppformeringen av DNA eller RNA. Brukes blant annet til PCR og qPCR (2).

Pinpoint bakteriekolonier: Punktformede bakteriekolonier med diameter < 1 mm.

Speilberg score: Score for å vurdere bivirkninger etter vaksiner. Graderes fra 1-6.

CMS: Kardiomyopatisyndrom, også kalthjertesprekk, er en alvorlig hjertesykdom som kan ramme oppdrettslaks i sjøen. Smittestoffet er piscint myokardittvirus (PMCV) (3).

HSMB: Hjerte og skjelettmuskelbetennelse er en smittsom virussykdom som kan ramme oppdrettslaks. Smittestoffet er Piscine orthoreovirus (PRV) (4).

Benzoak vet.

Anestetikum til fisk. Brukes også ved avliving gitt i overdose (5).

Innledning

Oppdrettsnæringen i Norge

Norsk oppdrettsnæring har siden pionerfasen på 60-tallet hatt en enorm vekst og er nå en av Norges viktigste eksportnæring. Verdien av norsk sjømateksport har aldri vært høyere enn den var i 2019. Tilsammen ble det eksportert 2,7 millioner tonn sjømat til en verdi av 107.3 milliarder NOK. Dette tilsvarer hele 36 millioner måltider hver eneste dag hele året eller 25 000 måltider per minutt. Laks er den største arten målt i volum og verdi, og er et særlig ettertraktet produkt verden over. Det ble i 2019 eksportert 1.2 millioner tonn laks til en verdi av 72.5 milliarder NOK (6).

Den store veksten til oppdrettsnæringen har ikke vært uten utfordringer, og velferden til fisken har den siste tiden fått mye oppmerksomhet i media (7). I 2019 gikk hele 59,3 millioner oppdrettslaks tapt, hvorav 52,8 millioner er kategorisert som “dødfisk” (1).

Taperfisk

“Taperfisk” er en type fisk som ofte klassifiseres som enten dødfisk, svinn eller ”destruert”. Veterinærinstituttet definerer i Fiskehelse rapporten 2019 taperfisk slik: «Tapersyndrom er en betegnelse for en tilstand der fisken avmagres eller ikke vokser normalt og utvikler seg til tynne ‘tapere’ eller ‘pinner’». Denne definisjon brukes primært for fisk i sjøen, men en kan også se denne definisjonen brukt på taperfisk i settefiskanlegg (1).



Figur 1. Sammenligning av fisk med forventet vekst (øverst) og en taperfisk (nederst). Foto: Kristine Rostad

Figur 1 illustrerer størrelsesforskjellen mellom en normal fisk og en taperfisk. Disse to fiskene kommer fra samme fiskegruppe og samme settefiskanlegg. De har stått i samme merd etter sjøsetting. Den normale fisken har vokst jevnt etter utsett, mens taperfisken har vokst lite etter utsett.

Taperfisk er typisk avmagret, med lite eller totalt fravær av fettvev rundt indre organer (perivisceralt fettvev). Nyret er også ofte mørkere enn normalt. Bakteriologiske og virologiske undersøkelser gir som regel negative funn (1).

Utviklingen av taperfisk koster næringen mye penger hvert år. Taperfisken vokser minimalt og vil derfor ikke kunne slaktes som normalt. Videre representerer utviklingen av taperfisk en velferdsutfordring, da denne fisketypen virker å ta til seg lite næring, er apatisk og potensielt kan fungere som reservoar for sykdommer.

Andel taperfisk som utvikles varierer mye mellom anlegg. Enkelte anlegg kan oppleve at 20-25% av populasjonen utvikler seg til taperfisk, mens andre anlegg ikke ser ut til å ha dette problemet i det hele tatt (8). Taperfiskproblematikken er kompleks og det er sannsynlig at flere faktorer spiller inn i utviklingen og forekomsten av taperfisk. Manglende systematiske registreringer gjør det utfordrende å kartlegge årsaksforhold. Det må tas hensyn til at typen fisk

som kategoriseres som “taperfisk” ikke er standardisert og at dette representerer en mulig feilkilde for variasjon i tallene.

Produksjonssyklus

Stamfisk

Produksjonssyklusen i oppdrettsnæringen starter ved at det strykes kjønnsmoden laks. Deretter blandes rogn og melke slik at eggene befruktes og utvikles videre til å bli yngel (9). Stamfisken selekteres på basis av ulike kriterier ut fra en liste med ønskede egenskaper som er viktig for en god produksjon og et sett av ulike egenskaper knyttet til sykdomsresistens. Det er mange forhold ut over den genetiske bakgrunn som bestemmer avkommets kvalitet, blant annet forhold i miljøet på settefiskanlegget.

Rognfase og klekking

Den befruktede rognen blir oppbevart i lystette beholdere. Det renner vann over eggene hele tiden. Temperaturen på vannet er lavere enn 8 °C. Etter ca. 220 døgngader utvikler rognen seg til øyerogn (9). Den tåler da noe mer håndtering og kan transporteres til settefiskanleggene. Det finnes flere store produsenter av rogn som leverer til oppdrettsselskapene, mens noen selskaper står for rognproduksjonen selv. Det genetiske arbeidet er viktig for å få rogn av god kvalitet. Arbeid til rognprodusent deles gjerne i 3: 1. avl for å bedre det genetiske potensialet, 2. arbeid for smittesikker rogn og 3. arbeid for god rognkvalitet med god overlevelse/ klekking, jevn rogn, godt sortert etc. (personlig meddelelse, A. Aunsmo, 10.05.20).

Etter ca. 500 døgngader klekker rognen til plommeseckyngel (9). I plommesekken er det næring som yngelen tar til seg, før de begynner å ta opp fôr.

Vekstfase i ferskvann

Yngelen vokser fra å være ca. 0,1 gram ved klekking til å bli en smolt på ca. 100 gram i løpet av et halvt år. Til sammenligning vil en laks i naturen bruke 2-5 år i elven før den smoltifiserer (9). Årsaken til den raske veksten hos oppdrettslaks skyldes optimal førtilgang, høyere temperaturer og styring av daglengden. Fisken sorteres etter størrelse flere ganger på settefiskanlegget.

På settefiskanlegget blir laksen vaksinert mot de vanligste bakterie- og virussykdommene. Det er vanlig med noe bivirkninger etter vaksinasjon. Noen fisk får større vaksineresaksjoner enn andre avhengig av hvilke vaksiner som brukes, om innstikkstedet ved vaksinasjon er korrekt etc. Immunreaksjon i etterkant av vaksinasjon medfører at fisken omdirigerer mye energi til betennelsesreaksjonen som har oppstått og etterfølgende immunrespons. Dette kan føre til redusert tilvekst.

Matfiskproduksjon i sjø

Laksen blir satt i sjø når den er ferdig smoltifisert. Framføringstiden i sjøen er mellom 14-22 måneder, litt avhengig av hvor i landet man er, vanntemperatur og lysforhold. Fisken slaktes når den har nådd en vekt på 4-6 kg (10).

Vekstfasen i sjø er den lengste fasen for oppdrettslaks. Overgangen fra ferskvann til sjøvann representerer et vesentlig stress for laks og det nye miljøet byr på ulike typer utfordringer. En laks som ikke er optimalt smoltifisert vil ha et dårlig utgangspunkt for å kunne tilpasse seg det nye miljøet. Fisken går fra å bli føret i et relativt lite kar hvor føret nærmest faller ned i hodet på dem, til å i større grad måtte jakte på maten i konkurranse med andre. Laks som av ulike grunner er stresset eller redusert, vil kunne tape kampen om føret. De vil havne sist i køen og svømme i utkanten for å få i seg rester etter at den store fisken er forsynt.

Faktorer som kan bidra til utvikling av taperfisk

Dårlig smoltifisering

På settefiskanlegget blir laksen sortert i ulike grupper etter størrelse. Fisken sorteres etter behov fram til vaksinerings i oktober, men blir ikke sortert ytterligere før den blir satt ut påfølgende vår. Størrelsesvariasjoner innad i fiskegruppen kan påvirke smoltifiseringen og føre til at fiskegruppen smoltifiseres i ujevnt tempo. Deler av fiskegruppen kan ha smoltifisert flere ganger før utsett, mens andre deler av fiskegruppen ikke har startet på sin smoltifisering enda. En slik spredning vil innebære at deler av fiskegruppen ikke nødvendigvis er optimalt smoltifisert for å settes i sjø. Slik fisk vil ha et dårligere utgangspunkt for å takle overgangen, og kan utvikle seg til en “smolttaper”. Smolttaperne vil man kunne observere kort tid etter at fisken er satt i sjø, da disse ofte sliter med ionereguleringen og ikke vil gå i matfatet. Dersom disse overlever kan de ha høyere risiko for å utvikle seg til taperfisk.

Vannkvalitet

God vannkvalitet er viktig i alle laksens utviklingsstadier og dårlig vannkvalitet kan potensielt påvirke laksens velferd og helse i negativ grad. I settefiskperioden går laksen enten i gjennomstrømningsanlegg eller resirkuleringsanlegg. De ulike anleggstypene har ulik utforming og ulike utfordringer når det kommer til vannkvalitet. Viktige indikatorer er blant annet pH, temperatur, gasser og metallinnhold. God råvannskilde er viktig, i tillegg til overvåking og oppfølging av vannkvaliteten (Rosseland, forelesning NMBU: Vannkvalitetens betydning for oppdrett av laksefisk: Aluminium, Oslo, 2020). Dårlig vannkvalitet i settefiskperioden kan være en risikofaktor for utvikling av taperfisk. I sjøfasen er det mindre regulering av vannkvaliteten, men det er viktig å ha kontroll på for eksempel oksygenivået i forbindelse med stressende håndteringssituasjoner, siden laksen bruker mer oksygen når den trenges.

Infeksjoner

Laksen kan utsettes for ulike agens (virus, sopp, bakterier og parasitter) både i ferskvann- og sjøvannsfasen. Det er krevende for fisken å håndtere en infeksjon, hvor store deler av energiomsetningen brukes til å håndtere sykdommen. Fisken spiser i tillegg mindre når den er syk og dette fører til nedsatt tilvekst. Veterinærinstituttets definisjon av tapersyndrom beskriver bakteriologiske og virologiske undersøkelser som negative, i de fleste tilfeller (1). Basert på dette mistenkes det ikke at infeksjoner i seg selv fører til utvikling av taperfisk. En kan likevel ikke utelukke at det kan være en medvirkende årsak, og særlig kan kroniske virusinfeksjoner spille en rolle.

Tidlig kjønnsmodning

Fisk i oppdrett er avlet for å få en sen kjønnsmodning. Nesten all laks er anadrom, og vandrer ut til havet (11). Hannlaks som blir kjønnsmodne uten å ha vært i havet kalles for dverghanner. Når unge hannlaks blir utsatt for kontinuerlig lys og høy temperatur på settefiskanlegget kan kjønnsmodningen starte (12). En kjønnsmoden laks har sitt naturlige opphold i ferskvann. I sjøvann vil den ha redusert fôrutnyttelse og redusert tilvekst (13). Den får vandreadferd, siden det naturlige for den vil være å vandre tilbake til elva for å gyte. Om kjønnsmodning har noe å si for utviklingen av taperfisk er usikkert.

Stress

I en studie utført i samarbeid med Faggruppen for dyrevelferd ved Havforskningsinstituttet ble det påvist økt serotoninaktivitet i hjernen og økt kortisolproduksjon hos taperfisk (14). Kortisol er stresshormonet som finnes hos fisk og andre dyr, mens serotonin er en signalsubstans i hjernen som har en viktig funksjon når det kommer til å regulere appetitt, humør og adferd. Det er normalt med en stressrespons ved endringer som for eksempel sortering, vaksinerings og transport. En stressrespons kan i slike tilfeller være gunstig og gjøre at fisken takler

håndteringen bedre. Dersom fisken utsettes for flere stressorer samtidig kan det ha en negativ virkning på både helse og tilvekst. En laks i en kunstig produksjonssyklus utsettes for et stort antall stressorer som den ikke nødvendigvis ville bli utsatt for i vill tilstand. Videre er dagens laks en relativt nylig domestisert art. Det er ikke utenkelig at laksen må takle stressorer den ikke er evolusjonsmessig utviklet for å måtte takle. Hva som fører til endringene i hjernekjemi og hormonproduksjon er ikke direkte kjent, men det kan indikere at taperfisk er kronisk stresset (15).

Evolusjon

En hunnlaks legger i naturen ca. 7600 egg på elvebunnen, som så blir fertilisert av hannene (Ian Mayer, forelesning NMBU: Fish reproduction, Oslo, 2018). Laksen har en reproduksjonsstrategi som innebærer at den legger et stort antall egg, som så blir overlatt til seg selv. En slik kvantitativ reproduksjonsstrategi, hvor det i utgangspunktet produseres et høyt antall avkom, vil innebære at noen individer statistiske sett er dårligere rustet for overlevelse enn andre. Kan det være slik at vi må regne med at noen individer med suboptimale, eller mindre tilpassede egenskaper, overlever lenger under oppdrettsforhold enn hva som er tilfelle i vill tilstand?

Måsøval

Denne oppgaven er skrevet i samarbeid med Måsøval Fiskeoppdrett, som holder til på Frøya i Trøndelag. Bedriften ble startet i 1973 og drev de første årene med oppdrett av regnbueørret. I 1977 startet de med oppdrett av laks, og er slik å regne blant pionérene i oppdrettsnæringen. Måsøval har totalt ni konsesjoner og har drift på syv lokaliteter for matfiskproduksjonen. Produksjonen skjer i kommunene Frøya, Kristiansund, Hemne og Aukra kommune (16). Prøveuttaket i oppgaven ble utført ved lokalitet Fjølvrøret på Frøya Nord og det er hentet data fra settefiskanlegget Laksåvika.

Formålet med oppgaven

Formålet med denne studien var å foreta en tverrsnittstudie, ved lokalitet Fjølvet (Måsøval), med mål om å registrere faktorer i miljøet i ferskvann og etter sjøsetting som kan ha betydning for utviklingen av taperfisk, samt å foreta en sammenligning av makroskopiske, histopatologiske og mikrobiologiske forhold hos taperfisk og normal fisk.

Materiale og metoder

Studiepopulasjonen er atlantisk laks (*Salmo salar* L.) med karakteristisk taperfiskfenotype, definert som: avmagrede, tynne fisk ("pinner"), med avvik i lengde og vekt, sammenlignet med normal fisk som er satt ut samtidig (1). Den normale fisken fungerer som kontrollgruppe. Laksen i undersøkelsen er fra matfiskanlegget Fjølåret. Anlegget er plassert i produksjonsområdet «Nordmøre og Sør-Trøndelag».

Det ble samlet inn informasjon om vannkvalitet, dødelighet/destruert fisk i settefiskanlegget, gjennomført bivirkningskontroll og informasjon om vekstutvikling, dødelighet, fôrøptak, og spesifikk vekstrate (SGR) i de utvalgte merdene hvor det ble foretatt prøveuttak (se nedenfor). Både studiepopulasjonen og kontrollgruppen har lik vaksinasjonsstatus og kommer fra settefiskanlegget Laksåvika.

Studieutvalget ble tatt ut fra utvalgte merder på lokalitet Fjølåret: merdene 108, 109 og 110. Valget av merder er basert på tallmateriale, tilsynsrapporter fra 2019 og observasjoner gjort av personale ved lokalitet Fjølåret.

Prøveuttaket ble gjennomført 6. november 2019. Utvalget av taperfisk i studien er basert på mengde taperfisk som var tilgjengelig på uttaksdato. Det ble høsten 2019 lagt ned et omfattende arbeid for å effektivisere opptak av taperfisk (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2019), med det resultat at majoriteten av taperfisken allerede var fjernet fra merdene da prøveuttaket skulle gjennomføres.

Taperfisken ble fanget inn manuelt med håv (figur 2). Normal fisk (kontrollgruppe) ble fanget inn ved å heise opp dødfiskhåven og «lokke» de inn i denne ved å kaste fôrpellets over den. Taperfisk og normal fisk ble avlivet i en bøtte med en overdose Benzoak Vet (200 mg/ml).

Det ble samlet inn 33 fisk totalt og hver enkelt fisk ble merket med lapp i munnen som viste merdnummer og nummer på fisken (figur 3). Tabell 1 viser antall fisk fra de respektive merdene.

Tabell 1: Tabellen viser antall taperfisk og normal fisk tatt opp fra merd 108, 109 og 110.

Antall	Merd 108	Merd 109	Merd 110	Totalt
Taperfisk	4	8	9	21
Normal fisk	2	5	5	12
Sum	6	13	14	33



Figur 2: Fangst av taperfisk fra merdkanten.

Foto: Kristine Rostad



Figur 3: Merking av fisk (lapp med nummer i munnen).

Foto: Kristine Rostad

Prøveuttak

Utstyr brukt til prøveuttak inkluderte skalpell, saks, pinsett, håv, formalinbeholdere, RNA-later, sterile podeøser, tommestokk, bakterieskåler med blodagar tilsatt 2% salt, målebånd, beholder for skarpt materiell, hansker, papir, blyant.

Før prøveuttak ble lengden for hver enkelt fisk registrert, for vurdering av eventuell vekst fra utsettkontroll og frem til dato for prøvetakning (6. november 2019). Følgende prøver ble tatt ut med sterile metoder til RNA-later: hjertespiess og hodenyre. Følgende vevsprøver ble fiksert i formalin: gjelleprøve fra andre gjellebue venstre side, hudsnitt inkludert rød og hvit muskulatur, lever, milt, pankreas med blindsekker, tarm, nyre (midtnyre) og hjerte. Vevsprøvene ble fiksert i prøveglass med 15-20 ml 10% bufret formalin. Prøvene fra hvert individ ble lagt i individuelle prøveglass, merket med tidspunkt, dato og individnummer.

Uttak for bakteriologisk undersøkelse (etter uttak av prøver til RNA-later, før uttak av vevsprøve): svaber fra hodenyret. Prøven ble sådd ut på blodagar tilsatt 2 % NaCl og fortynnet i tre omganger. Bakterieskålene fra samtlige fisk ble inkubert ved 15 °C i 4 døgn.

Bakteriemorfologi

Totalt ble det tatt bakterieprøver av 21 taperfisk og 12 normale fisk. Basert på bakteriekolonienes morfologi ble det gjort et utvalg for videre utstryk og preservering. Bakteriene ble vurdert på størrelse, form, farge og konsistens.

Sekundærutstryk og preservering

Basert på bakteriemorfologien ble det foretatt sekundærutstryk og preservering av de forskjellige typene av bakteriekolonier. Der bakteriemorfologien var lik ble det kun sådd ut én prøve for videre karakterisering. Målet var slik at alle bakterietypene var representert videre, uten at alle bakteriene ble karakterisert. Totalt ble 8 ulike bakteriekolonier sådd ut på marin agar. To av prøvene ble i tillegg til å bli sådd ut på blodagar (én med hemolyse og én uten hemolyse). Skålene ble inkubert ved 15 °C i 3 døgn.

Preserveringen ble utført ved å overføre bakteriekolonier i renkultur til 1 ml glycerol. Preserverte prøver ble lagret ved - 80 °C.

Gramfarging

Gramfarging er en teknikk som differensierer mellom to grupper bakterier, basert på sammensetning av celleveggen til bakteriene. Grampositive bakterier har et tykt peptidoglykanlag i celleveggen og vil farges lilla gjennom gramfargingsprosedyren. De gramnegative bakterienes cellevegg har et tynt peptidoglykanlag, samt en lite gjennomtrengelig yttermembran bestående av lipopolysakkarider. Disse vil miste lillafargen i løpet av prosedyren, og heller farges røde (17).

Reagenter:

Gram's crystal violet Solution

Gram's iodine Solution

Gram's Decolorizer Solution

Gram's safranin Solution

10 µl PBS ble plassert på et objektglass. Deretter ble én bakteriekoloni overført aseptisk og blandet med PBS. Blandingen ble spredd utover i en sirkel med en podenål. Så ble blandingen lufttørket og fiksert over flamme før prøven ble avkjølt.

Gram's crystal violet Solution ble helt over og holdt på prøven i 60 sekunder. Fargestoffet (krystallfiolett) binder seg til peptidoglykanlaget. Deretter ble fargen helt av og prøven skylt med springvann. Gram's iodine Solutuin ble så applisert og holdt på prøven i 60 sekunder. Denne løsningen forårsaker dannelse av et jodin-krystall-kompleks. Fargen ble deretter helt av og prøven skylt med springvann. Videre ble Gram's Decolorizer Solution (95 % etanol) påført i 10-15 sekunder. Denne vasker bort krystallfiolett-jodid fra de gramnegative bakterienes cellevegg. Prøven ble så skylt forsiktig under springvann. Til slutt ble Gram's safranin Solution påført i 60 sekunder. Safranin farger de gramnegative cellene røde. Løsningen ble deretter skylt av, og prøven lufttørket. Prøven ble så lest av ved direkte lysmikroskopi. Bakteriene ble vurdert på 100 x forstørrelse, med olje. Gramfarging og form ble vurdert.

Biokjemiske metoder

Katalase

Denne testen viser om bakteriene produserer enzymet katalase. To-tre bakteriekolonier ble blandet i 40 µl hydrogenperoksid (H₂O₂). Bobler/utvikling av gass indikerer positiv test. Ingen bobler/gassutvikling indikerer negativ test.

Oksidase

Formålet med testen er å se om bakteriene produserer cytokrom c oksidase, et enzym som er aktivt i elektrontransportkjeden. Dersom enzymet er til stede vil det oksidere reagenten (tetramethyl-p-phenylenediamine) på stripsen til indophenoler. Dette vil gi et blå/lilla

fargeomslag (positiv test). Dersom enzymet ikke er tilstede vil reagenten ikke bli oksidert, og stripsen forbli fargeløs (negativ test). Alle bakterier som er oksidase positive er aerobe eller fakultativ aerobe (18). To-tre bakteriekolonier ble overført til Cytokrom Oksidase-strips. Testen ble lest av etter 30 sekunder.

Molekylære metoder

DNA-ekstraksjon

DNA isoleres fra cellulært materiale og er grunnlaget for PCR reaksjonen. Overordnet består prosedyren av tre trinn: isolering av DNA, vasking/eliminering av annet cellulært materiale og utfelling av DNA.

Prøver: 10 stk bakteriekolonier i renkultur, dyrket på marin agar ved 15 grader.

DNAeasy Blood and Tissue Kit: Fra hver bakterieskål ble det overført bakteriekolonier til 200 µl PBS. Det ble så tilsatt 20 µl proteinase K og 200 µl buffer AL til hver beholder. Dette ble blandet ved å bruke en vortexer, deretter inkubert ved 56 °C i 10 min, med kontinuerlig bevegelse. Resultatet av disse stegene er cellelysis og frigjøring av DNAet. Videre ble det tilsatt 200 µl etanol (96 % etanol) til hver prøve, før blanding med vortexer.

Hver blanding ble deretter overført til hvert sitt minispinn-rør som ble plassert i et 2-ml samlerør. Dette ble sentrifugert på 8000 rpm (rounds per minute) i 1 min, før samlerøret ble kastet. Minispinn-røret ble overført til et nytt samlerør som ble tilsatt 500 µl buffer AW1, sentrifugert på 8000 rpm i 1 min. Samlerøret ble deretter kastet. Minispinn-røret ble videre overført til et nytt samlerør. Det ble tilsatt 500 µl buffer AW2, sentrifugert på 13 000 rpm i 3 min. Samlerøret ble deretter kastet. Minispinn-røret ble så overført til et nytt samlerør og sentrifugert igjen på 13 000 rpm i 3 min. Gjennom denne prosedyren festes DNA til membranen i minispinnrøret, mens resterende komponenter i cellen vaskes bort. Minispinn-røret ble overført

til et nytt samlerør. Det ble tilsatt 40 µl destillert vann for eluering av DNA. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur (15-20 °C) i 1 min, for så å bli sentrifugert i 1 min på 8000 rpm. Isolert DNA ble samlet i et eget samlerør.

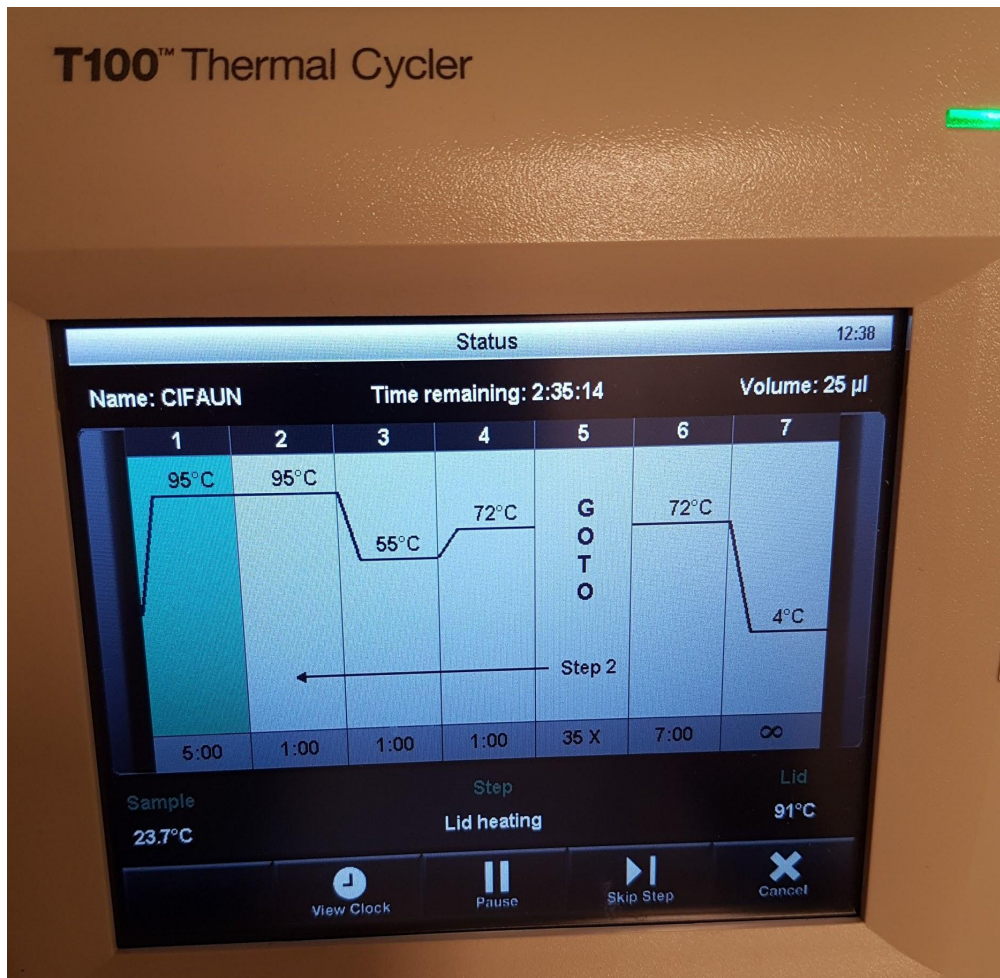
Måling av DNA-konsentrasjon

DNA-konsentrasjonen i prøvene ble målt ved hjelp av et Epoch Microplate Spectrophotometer. Denne maskinen sender elektromagnetiske stråler med en bestemt frekvens gjennom prøvene, og kan ut ifra absorpsjonsgraden estimere mengden DNA (19). Først ble maskinen kalibrert med destillert vann. Deretter ble 2 µl fra hver prøve overført til mikrovolumplaten for kvantifisering av DNA. Det ble tilsatt et større volum av prøvene, der konsentrasjonen var lav, for å gjøre konsentrasjonene så like som mulig.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for å amplifisere spesifikke DNA-sekvenser. Dette gjøres ved å tilsette DNA-polymerase, et enzym som syntetiserer polymerer av nukleotider, i tillegg til primere, Mastermix og destillert vann. Primerne som ble brukt var 16 CIFA Universal Forward (27F) og 16 CIFA Universal Reverse (1492R). Mastermixen består av nukleotider, Mg^{2+} , buffer og DNA-polymerase. Totalt ble 10 µl Mastermix, 11,5 µl destillert vann, 0,5 µl forward primer (konsentrasjon 100 pmol/µl) og 0,5 µl reverse primer (konsentrasjon: 100 pmol/µl) blandet sammen og overført til PCR-brønn. Deretter ble det tilsatt 2,5 µl DNA (templat). Totalt innhold i brønn var 25 µl.

Prøvene ble deretter satt inn i PCR-maskin (T100 Thermal Cycler) for videre prosessering (figur 4). Følgende program ble brukt: Steg 1: prøvene ble varmet til 95 °C i 5 minutter. Steg 2: 95 °C i 1 min. Steg 3: 55 °C i 1 min. Steg 4: 72 °C i 1 min. Steg 2-4 ble deretter repetert 35 ganger. Steg 6: 72 °C i 7 minutter. Deretter ble prøven avkjølt til 4 °C.



Figur 4: Program PCR, T100 Thermal Cycler. Foto: E. Soltvedt

Den høye temperaturen i steg 1 og 2 fører til at dobbeltrådene denaturerer (separeres) til enkelttråder. Temperatursenkningen i steg 3 gjør det mulig for primerne å feste seg til den komplementære sekvensen på DNAet. Temperaturøkningen i steg 4 fører deretter til at DNA-polymerasen danner en ny DNA-tråd, ut fra primere, med templat-DNAet som mal. I påfølgende sykluser vil de nye kopiene av DNA-trådene også fungere som templat for nye DNA-tråder, slik at man får en eksponentiell økning (20).

Gel-elektroforese

Gelelektroforese går ut på å skille DNA-segenter av ulik størrelse, i en agarosegel. Dette gjøres ved opprettelse av et elektrisk felt i gelen, og negative molekyler, som DNA, vil vandre

mot den positive polen. Vandringshastigheten vil være avhengig av størrelsen på molekylene og voltstyrken. Små molekyler vil vandre raskere gjennom gelen enn store molekyler. Agarose er et polysakkarid som muliggjør denne vandringen (21).

1.5%-agarosegel ble laget ved å tilsette 1.5 g agarosepulver (Sigma Aldrich) i 100 ml TAE-buffer, for så å bli varmet i mikrobølgeovn i 3 min. Deretter ble gelen kjølt ned til ca 50 °C.

100 ml flytende agarosegel ble tilsatt 10 µl SYBR safe DNA gel stain (binder seg til DNA og muliggjør visualisering vha. UV-lys) og blandet forsiktig. Blandingen ble så overført til form og brønner ble plassert i gelen. Etter 30 min var gelen fast. Den ble da overført til elektroforeseboksen. Før prøvematerialet ble overført til brønnene, ble det i hver prøve tilsatt 2 µl DNA Gel Loading Dye. Dette ble blandet forsiktig, for så å bli overført til brønnene i gelen. Brønn nr. 1 ble tilsatt 10 µl marker (1kb marker). Elektroforesen ble kjørt på 95 V, 400 mA og 45 min. Gelen ble deretter undersøkt i UV-lys.

Gel-ekstraksjon

Ekstraksjon av DNAet ble utført etter protokoll for QIAquick Gel Extracion Kit. Formålet med denne prosedyren er å fjerne gel, primere, enzymer mm., slik at man kun sitter igjen med DNA. Først ble gel med bånd kuttet under UV-lys, med skalpell (ca. 100 mg gel pr. bånd). Hver gel ble overført til en 2-ml eppendorftube. Videre ble det tilsatt 300 µl buffer QG til hver tube (forhold buffer: gel: 3:1). Dette ble inkubert på 50 °C i 10 min, under kontinuerlig bevegelse, for å løse opp gelen. Det ble så tilsatt 100 µl isopropanol til hver prøve. Isopropanol gjør DNAet klart for videre prosessering. Væsken ble så overført til et QIAquick spinnrør. Denne har en membran som binder DNA. QIAquick spinnrøret ble plassert i en 2-ml samletube og sentrifugert i 1 minutt ved hastighet 13000 rpm. Væsken som passerte membranen ble kastet. Videre ble det tilsatt 500 µl QG-buffer i hver prøve, før de ble sentrifugert i 1 minutt på 13000

rpm. Væsken som passerte membranen ble kastet. Deretter ble det tilsatt 750 µl PE-buffer, før prøvene ble sentrifugert i 1 min på 13000 rpm. QIAquick spinnrøret ble så plassert i en ny 2 ml samlerør og tilsatt 20 µl RNase-fritt vann. Videre ble det sentrifugert i 1 minutt på 13000 rpm. Renset DNA ble slik samlet i samlerøret.

DNA-konsentrasjonen ble målt før innsendelse til Eurofins Genomics for sekvensering. Der DNA-konsentrasjonen var høy ble det tilført destillert vann, slik at konsentrasjonene ble justert til å ligge innenfor 10-30 ng/µl.

Histologi

Preparering av histologiske snitt

Vevsprøvene ble lagt i formalinbeholdere merket med individnummer, merdnummer og organ. Videre ble det besluttet å lage snitt av gjeller, hjerte, hud og muskel, lever og tarm. Alle taperfiskene ble inkludert, i tillegg til to normale fisk fra hver merd. Totalt ble det sendt inn prøver fra 21 taperfisk og 6 normale fisk fordelt på de tre merdene (108,109, 110).

Formalinfiksert vev fra gjelle, hud/muskel, hjerte, lever og tarm ble dehydrert og innstøpt i parafin på vanlig måte. Snittene ble skåret ca. 3-4 µm tykke og farget med hematoxylin og eosin (H&E) etter standard prosedyre (Veterinærinstituttet).

Histologisk vurdering

Snittene ble først vurdert ved bruk av lysmikroskopi, for å få en oversikt over normalvariasjon og tilstedeværelse av patologiske forandringer. Videre ble det foretatt en subjektiv vurdering av patologiske forandringer og grad av forandringer i de ulike organene i alle snittene, som beskrevet nedenfor.

For gjeller, hud/muskel, tarm og hjerte ble eventuelle patologiske forandringer vurdert som følger:

Gjeller

Gjellesnitt ble undersøkt for fortykkelser i sekundærlameller, slimcellehyperplasi, Epiteliocystis, aneurismer, betennelsesceller og økt blodmengde.

Hud/muskel

Hudsnitt ble undersøkt for intakt epitel og epidermis, tilstedeværelse av normal rød og hvit muskulatur, betennelsesceller og nekrose.

Hjerte

Atrium, ventrikkel (stratum spongiosum og stratum compactum) og bulbus arteriosus har blitt vurdert med tanke på tilstedeværelse av betennelsesceller, nekrose, annen patologi. Epikard: tykkelse og type celler er vurdert.

Lever

Subjektiv scoring av intracellulær vesikkelstørrelse (mikrovesikler, intermediære/store vesikler i hepatocyttenes cytoplasma) og -utbredelse (sparsomt, moderat, moderat/mye, mye).

Tarm

Tarmsnitt ble undersøkt for intakt epitel med begerceller, eventuelle abnormaliteter i mucosa, tilstedeværelse av pankreas, bendelorm, fettinnhold og betennelsesceller.

Virologiske undersøkelser

RNA-isolering og real-time PCR-analyser

RNA-hjerteprøver preservert i RNAlater ble ekstrahert med en modifisering av TRIzol (Invitrogen, USA) metode. Total RNA ble rensset opp fra supernatanten ved bruk av RNeasy® Mini Kit ifølge produsentens protokoll (Qiagen, Hilden, Tyskland). Etter eluering ved bruk av RNase-fritt vann ble RNA kvantifisert ved bruk av Gen5 take3™ (BioTek®, USA). Genekspresjonsanalyse ble utført ved bruk av kvantitativ real time PCR (qRT-PCR) basert på kommersielle kit (Schweitzer Biotech Company, Taiwan). Kit'et inneholder alle reagenser for gjennomføring av PCR analyser og qRT-PCR-amplifisering ble utført i en 96 Light-Cycler®-maskin (Roche Applied Science). PCR betingelsene var som følger; 50 °C i 15 minutter for reverse transkribering, 95 °C i 5 min for enzym aktivering, 95 °C i 10 sekunder for denaturering. Totalt ble det kjørt 40 sykluser. Påvisning av amplicon ble gjort ved bruk av spesifikk probe for PMCV, PRV og IPNV genom. Positive prøver basert på plasmid med sekvenser som kodet for infeksiøs pankreas nekrose virus, orthoreovirus og piscint myocarditt virus ble brukt med 10^4 , 10^5 og 10^6 kopier som positive kontroller (22). Flere detaljer vedrørende inkubering og volumer brukt ved real-time PCR analysen er vist i appendix.

Resultater

Vannkvalitet

Laksåvika settefiskanlegg er et gjennomstrømningsanlegg med en overflatebasert råvannskilde, hvor det har vært settefiskproduksjon siden 1981. Anlegget kjøper inn ferdig befruktet rogn fra AquaGen. Gain-rogn er en avlslinje for bedre luseresistens, håndteringstoleranse og vekst (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020). Temperaturen i vannet varierer gjennom året og kan på det kaldeste være nede i 1-2 °C. Det er humus i vannet, og det er i perioder “kaffebrunt” i fargen. pH-verdien ligger i snitt mellom 6 og 6.5. Det er registrert perioder med høyt nivå av aluminium og av andre metaller finnes kobber og jern i vannet. Bufferkapasiteten (hardhet, alkalitet, ledningsevne, ANC) er lav. Det tilsettes silikat ved inntaksrøret som bidrar, sammen med humusen, til å binde metaller. Kalk tilsettes for å øke bufferkapasiteten (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020).

Vanntemperaturen i klekkeriet, A-hallen og B-hallen kan styres etter ønske. Før rognen klekker er det ca. 7 °C i vannet. Etter klekking skrus temperaturen gradvis opp til 9-10 °C. I A-hallen justeres temperaturen videre til 13-14 °C. B-hallen bruker i restvarme fra klekkeriet og A-hallen ligger gjerne et par grader under denne. Når råvannstemperaturen er over 10-12 °C stoppes varmejusteringen helt. C-hallen og utekar har kun råvannstemperatur, noe som innebærer at karene her har mellom 1-18 °C, avhengig av årstid. Informasjon vedrørende vannkvaliteten er basert på opplysninger fra oppdrettsselskapet som eier settefiskanlegget. (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020). Det er ikke utført egne vannanalyser i forbindelse med denne oppgaven.

Dødelighet og destruksjon/avliving

Klekking av rogn skjer på et eget klekkerirom. Etter at rognen er klekket og plommesekken absorbert (ca. 0.15-0.2 gram) blir yngelen flyttet til A-hallen, også kalt startfôringsavdelingen. Når fisken er rundt 6-7 gram flyttes fisken videre til B-hallen for videre vekst. Ved rundt 25 gram sorteres og flyttes fisken inn i C-hallen og til utekar. Her står fisken frem til den vaksineres ved ca. 40 gram. Etter dette blir fisken stående i de største karene, samt noen ganger i B-hallen, hvor det er mulighet for oppvarming av vann. Smoltifiseringen skjer her. Fisken settes ut ved ca. 120 gram (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020).

Registrering av dødelighet, Laksåvika: 6 % av dødeligheten er registrert fra innlegg av rogn til klekking, 31 % fra klekking til startfôring og 63 % fra startfôring til salg. Av destruksjon/avliving tas 30 % ut på klekkeriet. Dette er rogn som aldri har klekket. De resterende 70% er tatt ut i forbindelse med sortering/andre årsaker (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020)

Bivirkningskontroll

Det ble gjennomført bivirkningskontroll 04.04.19 av 2x20 fisk, før utsett i sjø. Den ene fiskegruppen fikk 1.38 på Speilberg score og den andre gruppen fikk 1.35, begge innenfor «normale» vaksinebivirkninger (score 1-2). Vaksinescore 1-2 kan gi kortvarig appetitt og veksttap noen uker etter vaksinerings med noen prosent lavere tilvekst, ved ellers optimale forhold for vekst (23).

Laksens utvikling i merd 108, 109 og 110 (mai 2020)

Tabell 2 viser mengde taperfisk registrert i de utvalgte merdene. Utgående fisk (registrert som taperfisk etter gjennomgang av dødfiskhåven) og destruert fisk (aktivt tiltak hvor fisken fanges med håv av velferdshensyn og avlives) er summert.

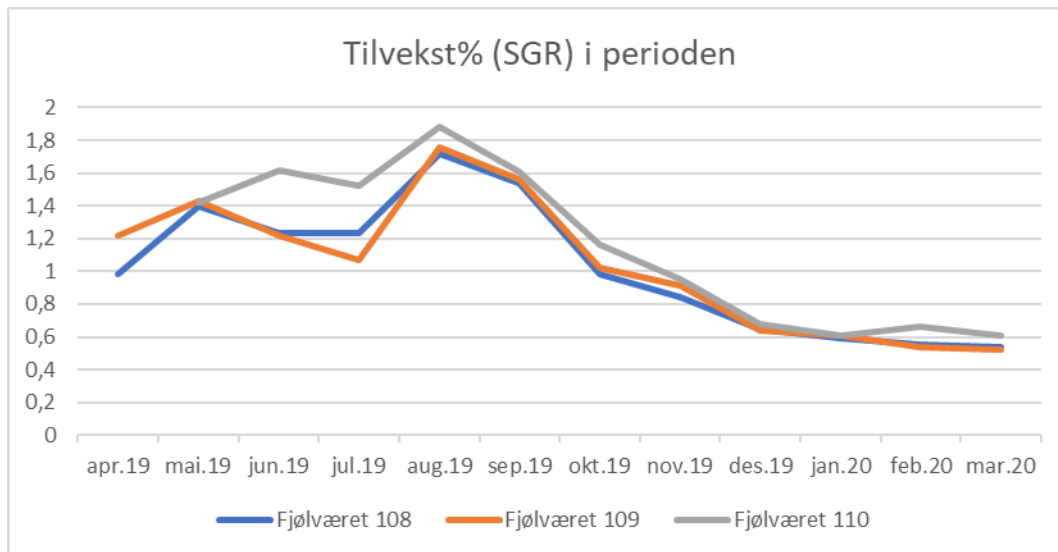
Tabell 2: Prosentandel taperfisk i merd 108, 109 og 110 (summert utgående fisk + destruert fisk). (Henny Førde, Dødelighet og destruksjon for Fjølvrøret per 03.10.19)

	Merd 108	Merd 109	Merd 110
Taperfisk %	4,76 %	4,55 %	4,78 %

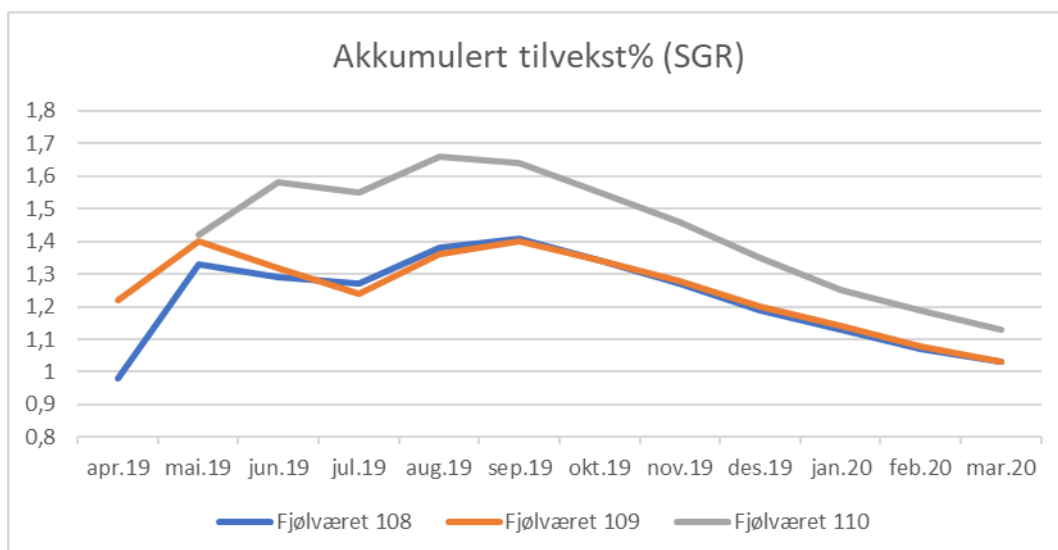
Etter at det ble tatt ut relativt store mengder taperfisk sensommeren 2019 har laksen i merd 108, 109 og 110 hatt en bedre tilvekst enn forventet (figur 5: tilvekst i prosent, figur 6: akkumulert tilvekst i prosent, figur 7: vekt, figur 8: akkumulert VF3). Det er ikke startet utslakting av disse fiskegruppene enda. Fisken i de øvrige merdene på Fjølvrøret og Langøya har også hatt en god tilvekst. Noe av årsaken til dette kan være at det ikke har vært forekomst av PD eller andre sykdommer som har forstyrret tilveksten. Det tas ut en og annen taperfisk fortsatt, men trolig ble det meste fisket ut tidlig (destruert). (Henny Førde, personlig meddelelse, Frøya 2020) Etter splitting av merd 108 økte dødeligheten noe i en periode. Sett bort i fra dette har fiskehelsen i all hovedsak vært god, med lav dødelighet og god tilvekst. Noe HSMB er registrert. Dette stemmer overens med våre funn på histologi av hjertet.

Alle merdene (101-110) er samlet avlusk totalt syv ganger med delta dødelighet mellom 0,18 % og 0,39 % (vurderes som relativt lavt) og effekt fra 85 % til 97 % (kjønnsmodne hunnlus + bevegelige stadier) (Andreas Skagøy, personlig meddelelse, Frøya 2019).

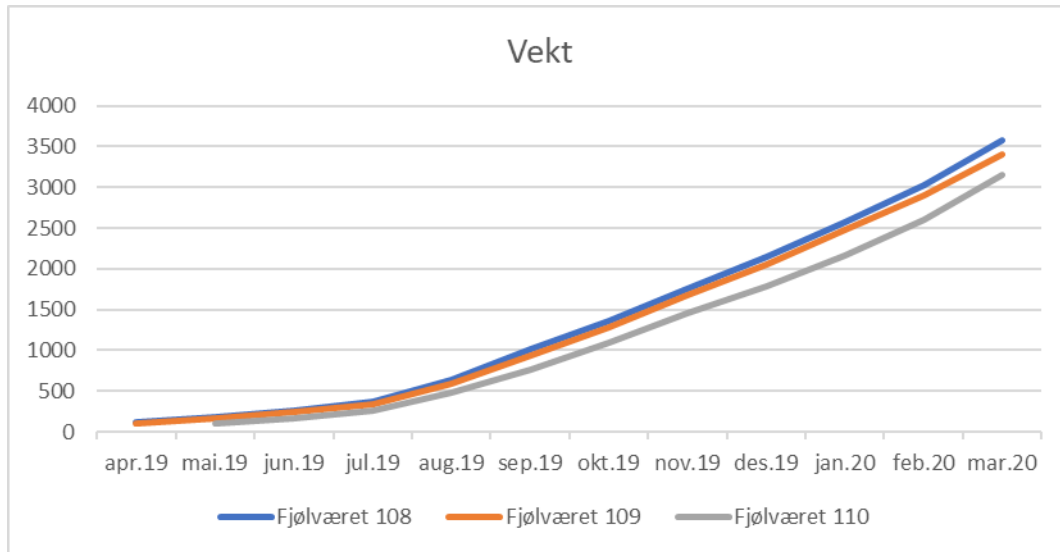
Det ble i august 2019 observert store mengder taperfisk i merd 108 og 110 (100-200 taperfisk pr. merd). Høsten 2019 hadde merd 108, 109 og 110 høyere andel taperfisk enn resterende merder i anlegget (totalt 12 merder) (Andreas Skagøy, Besøksrapporter Fjølvræret, feb. 19 – aug. 19).



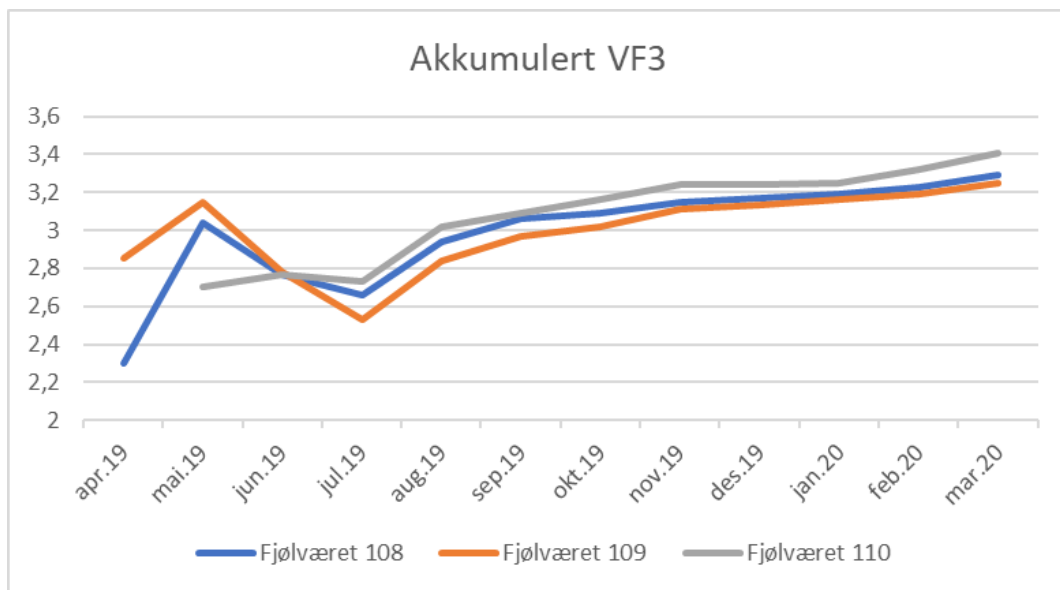
Figur 5: Tilvekst i % hos laks i merd 108, 109 og 110 i perioden april 19 til mars 20.



Figur 6: Akkumulert tilvekst i % hos laks i merd 108, 109 og 110 i perioden april 19 til mars 20.



Figur 7: Vekt (gram) hos laks i merd 108, 109 og 110 i perioden april 19 til mars 20.



Figur 8: Akkumulert VF3 hos laks i merd 108, 109 og 110 i perioden april 19 til mars 20.

Makroskopisk vurdering av normal fisk og taperfisk

Makroskopisk undersøkelse, ytre overflater: Det ble registrert sår på gatt- og bukfinne hos én normal fisk. Hos resterende fisk (både taperfisk og normale) ble det ikke observert sår eller skader i hud/skjell, med unntak av noe finneslitasje. Én normal fisk hadde én skottelus (*Caligus elongatus*) tilheftet. Det var ingen tegn til exophthalmos eller annen patologi.

Taperfisken var tydelig avmagret og betydelig mindre i størrelse enn den normale fisken. Den normale fisken hadde en lengde på i gjennomsnitt 50 cm og i godt hold. Én taperfisk manglet halve gjellebuen på venstre side, og representerte det eneste funnet av utvendige misdannelser/skader/forandringer. Taperfiskene var noe mørkere i fargen enn den normale fisken (figur 9).



Figur 9: Tilfeldig valgt normal fisk og taperfisk for makroskopisk sammenligning. Foto: Kristine Rostad

Makroskopisk undersøkelse, indre organer: Hos taperfisken var det totalt fravær av makroskopisk synlig, perivisceralt fettvev. Én taperfisk hadde unormal form på hjertet (nr. 24). Samtlige av de prøvetatte taperfiskene hadde fôrinnhold i tarmlumen. Det var ikke mulig å spesifisere makroskopisk om dette var fôrpellets eller annet organisk materiale.

Hos den normale fisken var det synlig perivisceralt fettvev. Det ble registrert sammenvoksinger i buken hos 8/12 normale fisk. Videre ble det registrert lever med gulaktig farge hos én fisk (nr. 2) samt væske i hjertesekken hos én fisk (nr. 4). Alle de normale fiskene hadde innhold i tarmen.

Kroppslengde

Ved prøveuttak ble det målt kroppslengde på samtlige fisk. Det var stor forskjell på taperfiskene og den normale fisken. Data fra Fjølvsjøen viser at den normale fisken i disse merdene har større tilvekst enn gjennomsnittet for anlegget.

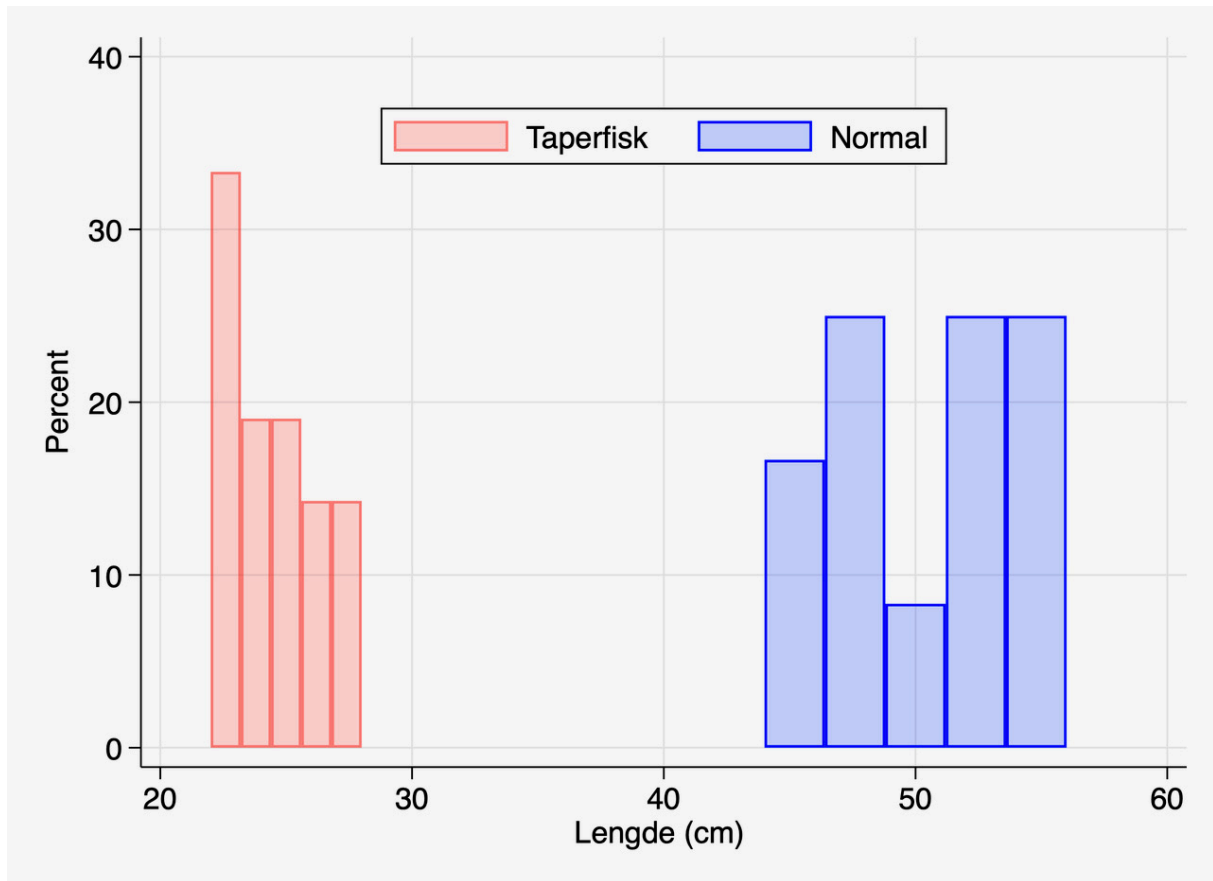


Figur 10: Taperfisken hadde ved prøveuttak 6. november en gjennomsnittslengde på 24,5 cm. Foto: Kristine Rostad

Fisken fra Laksåvika hadde en gjennomsnittslengde på 19,8 cm (variasjon fra 17-24,5 cm) ved sjøsetting i merd 108 og 109. Gjennomsnittsverdiene for merd 110 er ikke oppgitt.

Ved prøveuttaket 6. november 2019 hadde normalfisk en gjennomsnittslengde på 45,5 cm (variasjon fra 44 - 56 cm) 7 måneder etter utsett. Ved prøveuttak hadde taperfisken en

gjennomsnittslengde på 24,5 cm (variasjon fra 22 cm - 28 cm, figur 10). Dette representerer en økning i lengde på 130 % hos den normale fisken mot en økning i lengde på ca. 24 % hos taperfisken. Lengdemålene er illustrert i figur 11.



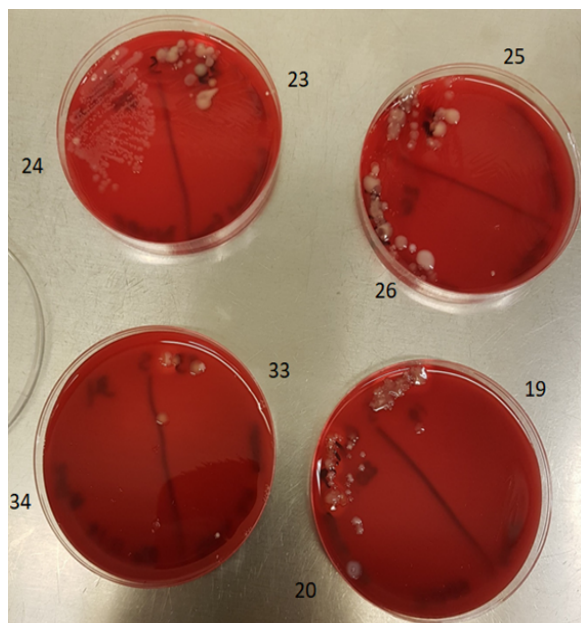
Figur 11: Lengdefordeling normal fisk og taperfisk. X-aksen angir lengde i cm og y-aksen angir prosentandel av gruppen.

Bakteriemorfologi

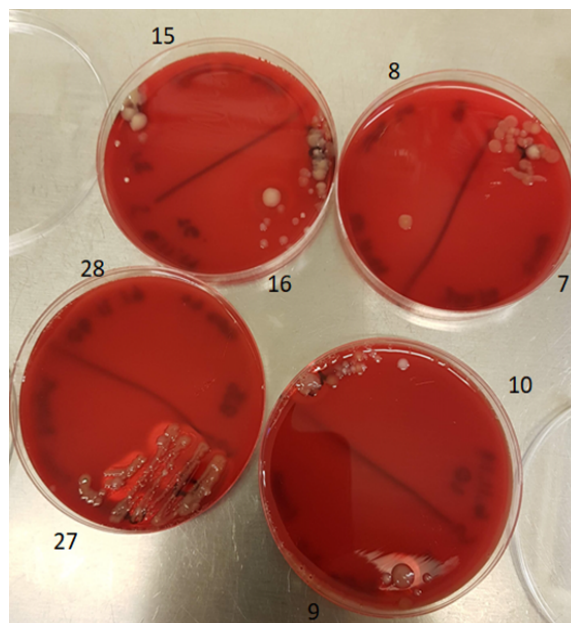
Det var bakterievekst på skåler fra 20/21 taperfisk og 3/12 normale fisk (Tabell 3, figur 12, figur 13, figur 14). Bakteriekoloniene ble vurdert morfologisk (Tabell 3), og én koloni av hver type ble preservert og sådd ut for videre artsbestemmelse.

Tabell 3. Resultater bakterievekst, alle prøver

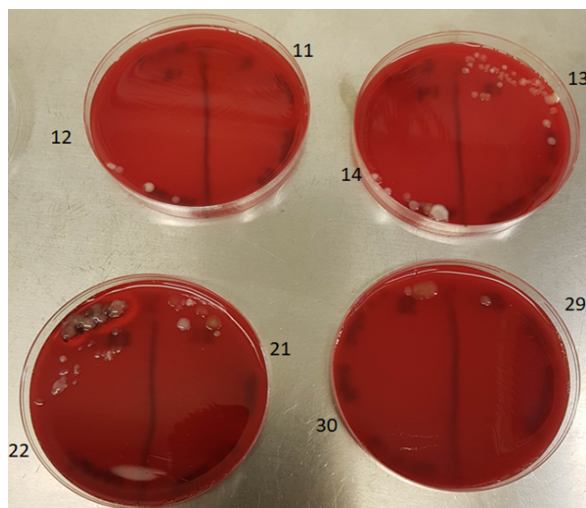
BAKTERIEVEKST							
Nr.	Merd	Normal /taper	Bakterievekst	Nr.	Merd	Normal /taper	Bakterievekst
1	109	N	Nei	19	110	T	Ja
2	109	N	Nei	20	110	T	Ja
3	109	N	Nei	21	110	T	Ja
4	109	N	Nei	22	110	T	Ja
5	109	N	Nei	23	110	T	Ja
6	109	T	Nei	24	108	T	Ja
7	109	T	Ja	25	110	T	Ja
8	109	T	Ja	26	110	T	Ja
9	109	T	Ja	27	110	T	Ja
10	109	T	Ja	28	110	N	Ja
11	109	T	Ja	29	110	N	Ja
12	109	T	Ja	30	110	N	Ja
13	109	T	Ja	31	110	N	Nei
14	108	T	Ja	32	110	N	Nei
15	108	T	Ja	33	110	T	Ja
16	108	T	Ja				
17	108	N	Nei				
18	108	N	Nei				



Figur 12: Bakterievekst primærutstryk (prøve 19, 20, 23, 24, 25, 26, 33).



Figur 13: Bakterievekst primærutstryk (prøve 7, 8, 9, 10, 15, 16, 27, 28).



Figur 14: Bakterievekst primærutstryk (prøve 11, 12, 13, 14, 21, 22, 29, 30).

Tabell 4. De ulike bakteriekoloniens morfologi etter fire dagers inkubering på 15 °C på blodagar tilsatt 2% salt.

BAKTERIEMORFOLOGI					
Prøvenr.	Form og størrelse	Farge	Elevasjon	Hemolyse	Annet
9	3-4 mm Sirkulære	Gulaktig	Hvelvet	Ja	
10	1-3 mm Sirkulære	Hvit	Hvelvet	Nei	
12	1-3 mm Sirkulære	Kremfarget	Hvelvet	Nei	
14	Pinpoint	Hvit		Nei	
15	Pinpoint	Hvit		Nei	
20	2-4 mm Sirkulære	Hvit	Flat	Nei	Tråd-trekkende
23	2-3 mm Sirkulære/ Irregulære	Kremfarget	Hvelvet	Nei	
24	1 mm Sirkulære	Hvit	Flat	Nei	
27	2-3 mm Sirkulære	Kremfarget	Hvelvet	Ja	
33	Pinpoint	Hvit		Delvis	

Gramfarging

Tabell 5. Resultat etter gramfarging

GRAMFARGING		
Prøvenr.	Form	Gram +/-Gram -
9	Staver	Negativ
10	Kokker	Negativ
12	Staver	Negativ
14	Kokkobaciller	Negativ
15	Kokker	Negativ
20	Staver	Positiv
23	Kokker	Negativ
24	Kokker	Negativ
27	Staver	Negativ
33	Kokker	Positiv



Figur 1: Gramfarging. T.v.: Gram negative kokker (Taperfisk nr.15) 100x forstørrelse. T. h.: Gram positive stave (Taperfisk nr. 20) 100x forstørrelse.

Biokjemiske analyser

Katalase

Tabell 6. Resultat katalasetest

KATALASE										
	9	10	12	14	15	20	23	24	27	33
Katalase	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos



Figur 16: Resultat fra katalasetest. Prøve 9 = positiv. Prøve 10 = negativ.

Oksidase

Tabell 7. Resultat oksidasetest

OKSIDASE										
	9	10	12	14	15	20	23	24	27	33
Oksidase	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos



Figur 17: Resultat fra oksidasetest. T.v.: prøve 20 (negativ). T.h.: prøve 12 (positiv).

Molekylære analyser

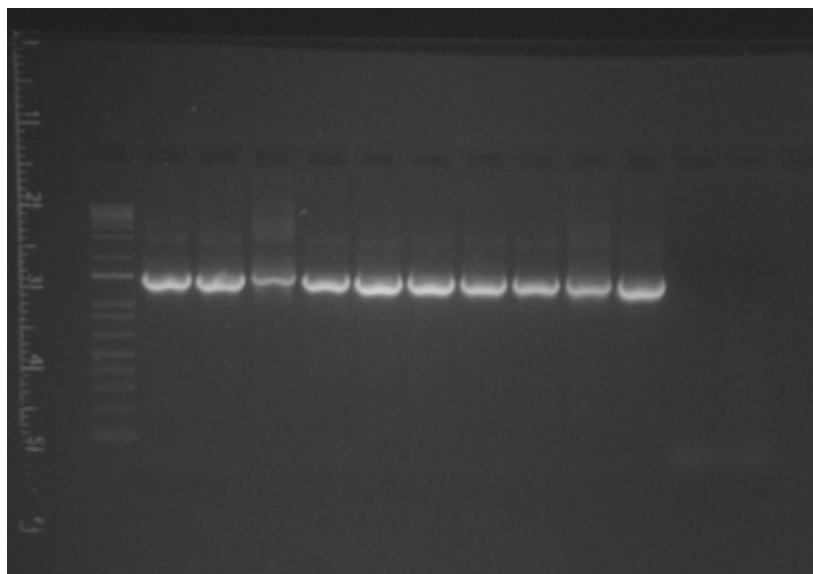
Måling av DNA-konsentrasjon

Tabell 8. DNA-konsentrasjon etter spektrofotometri av prøvene

DNA-KONSENTRASJON	
Prøvenr.	DNA-konsentrasjon (ng/μl)
9	355,80
10	167,69
12	64,81
14	144,97
15	170,56
20	28,13
23	89,92
24	211,29
27	94,55
33	79,18

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR viser at det er 16S ribosomalt RNA fra bakterier i alle 10 prøver.



Figur 18: PCR kjørt med primer 16S på alle bakterieprøver.

Gelekstraksjon

Tabell 9. Resultater DNA-konsentrasjon (ng/ μ l)

DNA-KONSENTRASJON	
Prøvenr.	DNA-konsentrasjon (ng/ μ l)
9	53,36
10	49,36
12	26,56
14	46,0
15	63,38
20	57,13
23	41,52
24	46,15
27	53,41
33	71,76

Ideell konsentrasjon av DNA for videre sekvensering er 10-30 ng/μg. Alle prøver, med unntak prøve nr. 12 som hadde ønsket konsentrasjon, ble fortynnet 1:2 og sendt til sekvensering i to duplikater.

Sekvenseringsresultater

Sekvenseringen ble utført av Eurofins Genomics. Resultatene ble videre bekreftet gjennom National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Prøve 9

Vibrio splendidus partial 16S rRNA gene, strain CECT 8433, med 96 % match.

Vibrio splendidus strain 7-31 ribosomal RNA gene, partial sequence, med 100 % match.

Prøve 10

Photobacterium phosphoreum strain 4T-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 99.76 % match

Ingen resultat

Prøve 12

Psychromonas sp. Spegb14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 98.73 % match

Prøve 14

Psychrobacter sp. AECF-17a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 99.29 % match

Psychrobacter sp. AECF-17a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 98.89 % match

Prøve 15

Psychrobacter nivimaris strain 16d-S31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 99.37

% match

Psychrobacter nivimaris strain W2D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 95.65 %

match

Prøve 20

Bacillus galliciensis strain BFLP-1 16R ribosomal RNA partial sequence, med 99.20 % match

Bacillus galliciensis strain BFLP-1 16R ribosomal RNA partial sequence, med 99.51 % match

Prøve 23

Aliivibrio sp. H1309/4.1 partial 16S rRNA gene, isolate H1309/4.1, med match 100 %.

Ingen resultat

Prøve 24

Aliivibrio sp. H130426_2 partial 16S rRNA gene, isolate H130426_2, med match 99.18%.

Aliivibrio sp. H1309/4.1 partial 16S rRNA gene, isolate H1309/4.1 med match 99.32%.

Prøve 27

Aliivibrio wodanis 06/09/160 chromosome 1 complete sequence, med match 94.42 %.

Aliivibrio salmonicida strain VS224 chromosome 1, complete sequence, match 94.42 %.

Prøve 33

Psychrobacter sp.strain BH36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 97.81% match.

Psychrobacter sp.strain BH36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, med 97,66% match.

Familie: *Vibrionaceae*

Familien *Vibrionacea* består av flere genus, bl.a. genus *Vibrio*, genus *Aliivibrio* og genus *Photobacterium*. Totalt er én av prøvene identifisert innenfor genus *Vibrio* (nr. 9), tre kolonier identifisert innenfor genus *Aliivibrio* (nr. 23, nr. 24 og nr. 27) og én koloni identifisert innenfor genus *Photobacterium* (nr. 10). Felles for disse er at de er gramnegative, rette eller bøyde staver. De er fakultativt anaerobe og mobile med flageller. Bakteriene er ubikvitære i det marine miljø (24).

Vibrio Spondidus: Ubikvitær i marint miljø

Aliivibrio salmonicida: Forårsaker kaldtvannsvibriose/Hitrasye hos atlantisk laks.

Aliivibrio wodanis: Isoleres fra sår fisk. Usikkert om strikt patogen eller mer ubikvitær opportunist.

Photobacterium Phosphoreum: Ubikvitær i marint miljø

Familie *Psychromonadaceae*, genus *Psychromonas* - *Psychromonas marina* strain – 1 prøve (nr. 12). Ubikvitær i det marine miljø (25).

Familie *Moraxellaceae*, genus *Psychrobacter* - *Psychrobacter* sp/*Psychrobacter nivimaris* – 2 prøver (nr. 15 og nr. 33): Gram-negative coccobaciller som finnes ubikvitært i det marine miljø (26)

Familie *Bacillaceae*, genus *Bacillus* - *Bacillus Galliciensis* – 1 prøve (nr. 20)

Karakteristisk for bakterier i genus *Bacillus* er at de er stavformede, gram-positive, aerobe eller anaerobe, og er ubikvitære i det marine miljø (27).

Histologi

Det ble totalt undersøkt histologiske snitt fra 21 taperfisk (alle) og to normale fisk fra hver merd (merd 108, 109 og 110), gjeller, hud/muskel, hjerte, lever og tarm.

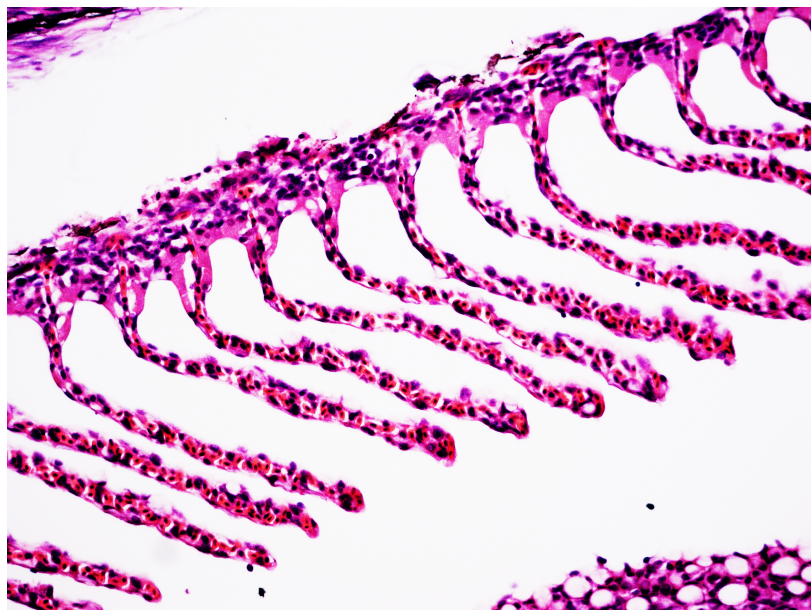
Gjeller

Fra merd 108 ble det tatt ut prøver fra 4 taperfisk og 2 normale fisk. Hos disse 6 fiskene ble det registrert noe fortykkede distale deler av sekundærlamellene, med slimcellehyperplasi og infiltrasjon med betennelsesceller. Forandringene er totalt å anse som milde. Epiteliocystis ble registrert hos 1/21 taperfisk (figur 20), og lav forekomst indikerer at dette ikke er et problem i anlegget. En normal fisk hadde et relativt høyt antall aneurismer (31 stk., figur 21, 22). De fleste var akutte, men noen få hadde et mer kroniske preg med bindevevsdrag omkring aneurismene. Det ble også registrert økt blodmengde i noen av lamellene (figur 23).

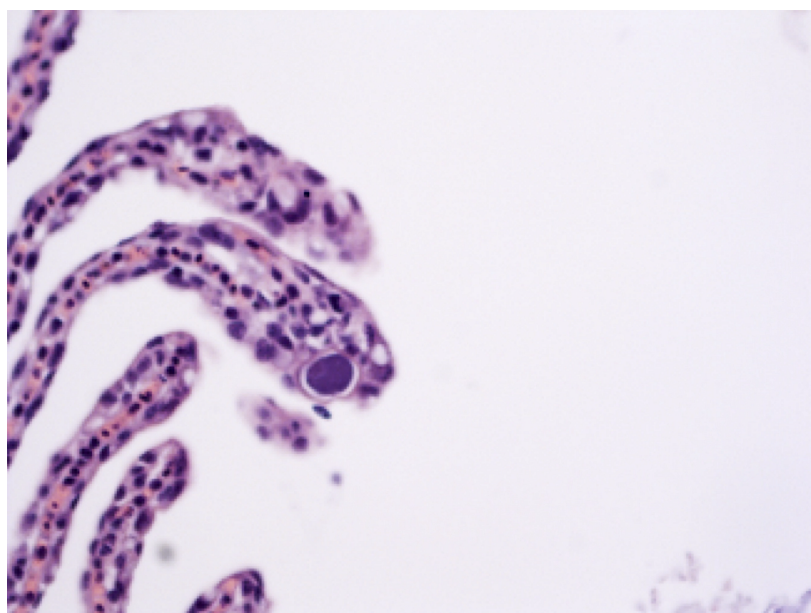
Fra merd 109 ble det tatt ut prøver fra 8 tapere og 2 normale fisk. Ett gjellesnitt lot seg ikke vurdere. Både taperfisk og normal fisk hadde noe fortykkede distale deler av sekundærlamellene og i disse områdene fantes infiltrater av betennelsesceller. Én taperfisk hadde i tillegg økt mengde blod mellom lamellene (sannsynlig blødning i forbindelse med prøveuttak). Forandringene vurderes som milde på samtlige fisk.

Fra merd 110 ble det tatt ut prøver fra 9 taperfisk og 2 normale fisk. Fire av gjellesnittene fra taperfisken var ikke mulig å vurdere (se feilkilde prøveuttak, postmortelle forandringer).

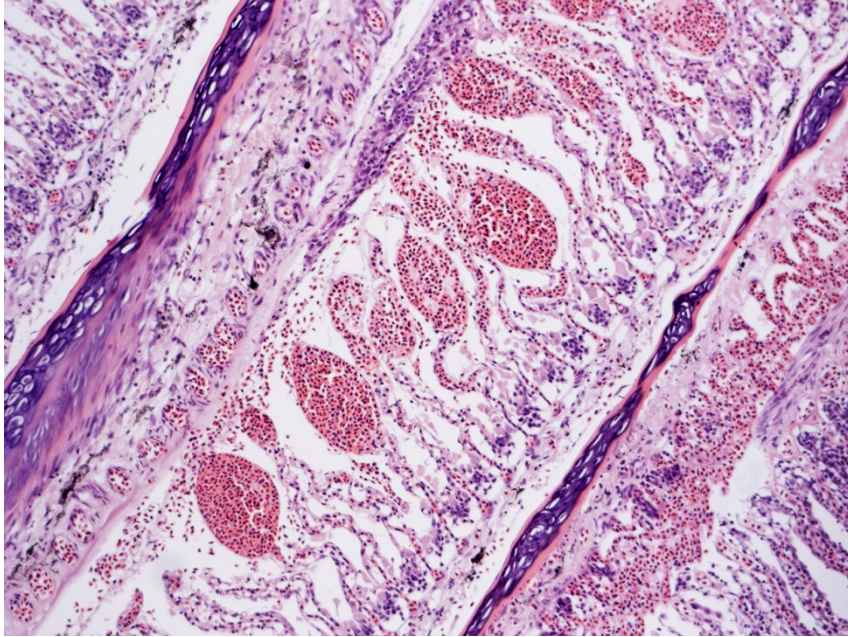
Oppsummert ble det registrert noe fortykkede distale deler av sekundærlamellene og noen betennelsescelleinfiltrater hos både taperfisk og normal fisk. Forandringene er å anse som milde. Det er ikke opplagte forskjeller mellom fisk i merd 108, 109 og 110.



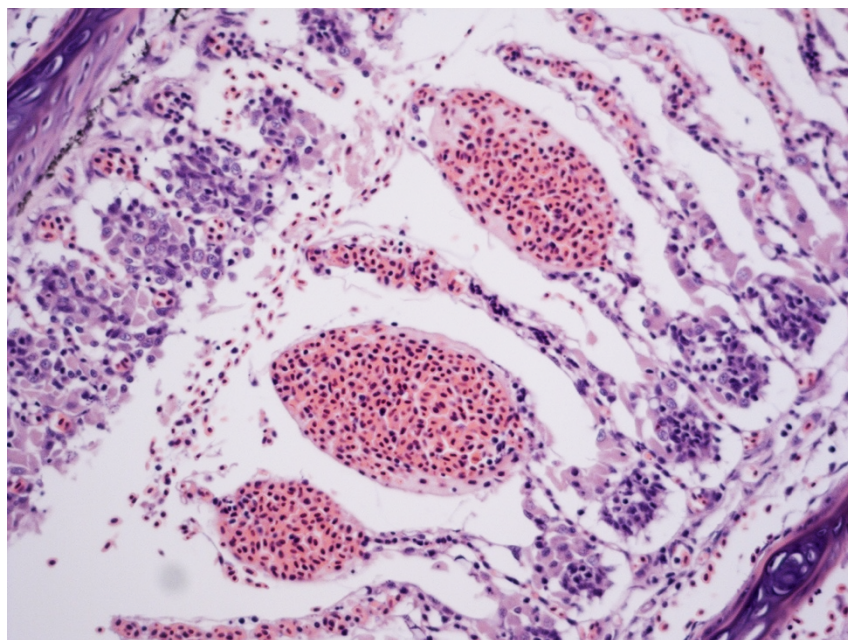
Figur 19. Taperfisk 5 gjelle, eksempel på normale sekundærlameller (20x forstørrelse).



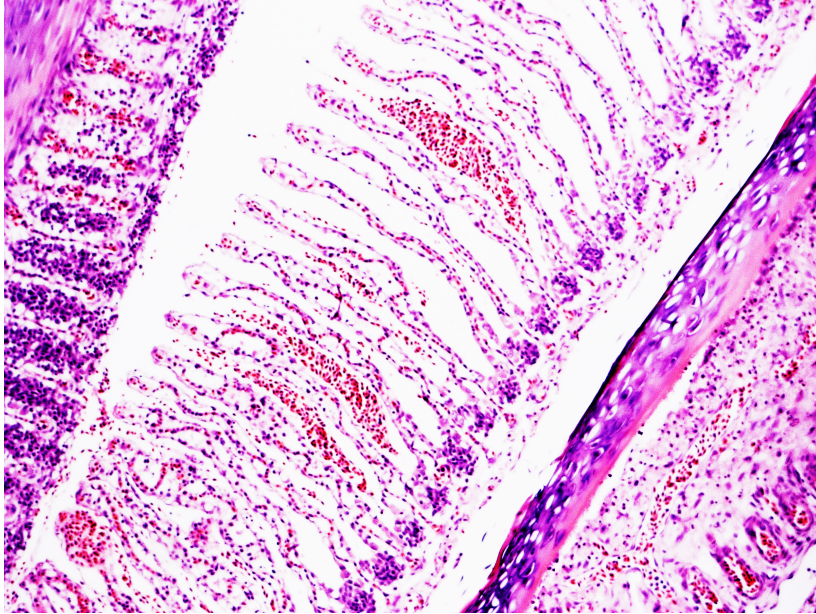
Figur 20: Taperfisk 14 med epitelicystis (40x forstørrelse).



Figur 21: Taperfisk 17 aneurismer (20x forstørrelse).



Figur 22: Taperfisk 17, aneurismer.



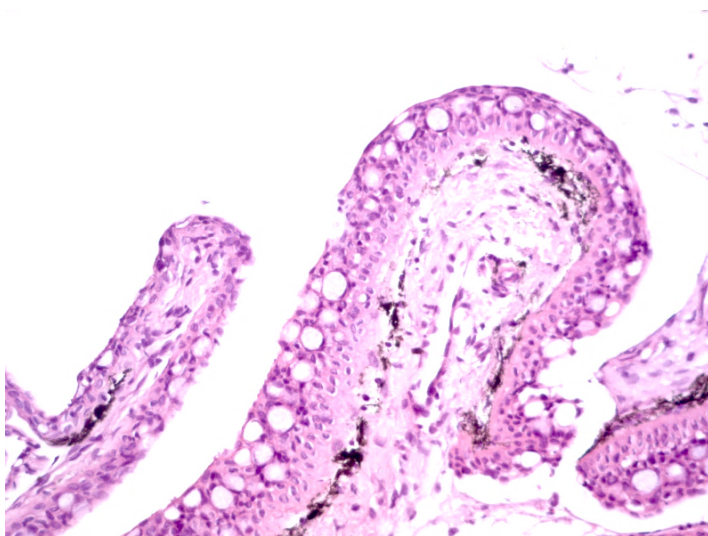
Figur 23: Taperfisk 17 med blødning mellom sekundærlamellene.

Hud (epidermis og dermis) og muskel

Gjennomgående var det hos taperfisken fravær av epidermis, med unntak av to snitt (nr. 11 og nr. 19). Dette skyldes sannsynlig suboptimal innsamling av prøver ved prøveuttak (se feilkilder). Hos den normale fisken var epidermis intakt hos samtlige individer. To snitt var ikke lesbare (nr. 23 og nr. 33).

Normal fisk

Epitelceller, begerceller, melanocytter og mengde fett ble vurdert som normalt (figur 23). Videre ble uttalt mengde fettceller registrert, både i overgangen epidermis/dermis og mellom rød og hvit muskulatur. Rød og hvit muskulatur var forøvrig velavgrenset og uten morfologiske forandringer.



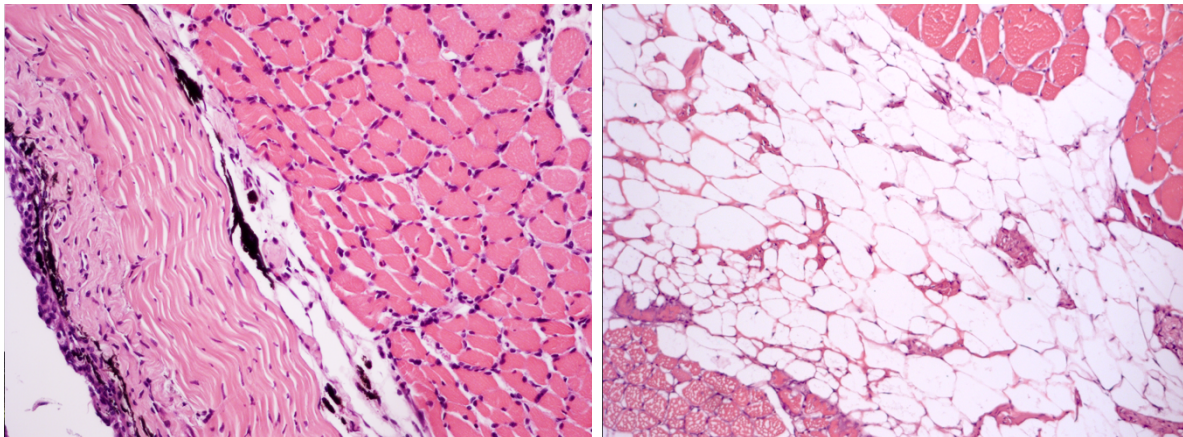
Figur 24. Epidermis med Goblet cells, melanocytter (normal fisk nr. 5).

Taperfisk

To snitt viste en begrenset del av epidermis. Her var epitelet intakt og det var normalt innhold av begerceller og melanocytter. Snittene var preget av fravær av fettceller, både mellom epidermis og dermis og mellom rød og hvit muskulatur. Det ble ikke påvist betennelse, blødninger eller andre patologiske forandringer. Én fisk (nr. 8) hadde betydelig blekere

muskelfarge enn resten. Ett snitt (nr. 13) var mer cellerikt enn de resterende snittene, men dette kan også være et resultat av uheldig preparering.

Normal fisk og taperfisk er forskjellige med tanke på mengde fettvev i subcutis og mellom rød og hvit muskulatur. Taperfisk har lite/fullstendig mangel på fett mens den normale fisken har rikelig (figur 25).



Figur 25: Hud uten fett (venstre) – taperfisk 19. Hud overgang mellom rød og hvit muskulatur med mye fett (høyre) (normal fisk).

Hjerte

Merd 108

Hjertet ble vurdert hos 4 taperfisk og 1 normal fisk. Taperfisken hadde ingen åpenbare patologiske forandringer i hjertet (figur 26). Hos den normale fisken ble det påvist infiltrasjon med betennelsesceller i epikard og ventrikkelens kompaktlag, forenlig med epikarditt og myocarditt (figur 27). Tykke bindevevsdrag rundt hjertet indikerer at dette er en eldre skade.

Merd 109

Hjertet vurdert histologisk hos 7 taperfisk og 2 normale fisk. Taperfisken hadde ingen åpenbare patologiske forandringer i hjertet. De normale fiskene hadde betydelig økt mengde betennelsesceller i epikard, forenlig med epikarditt.

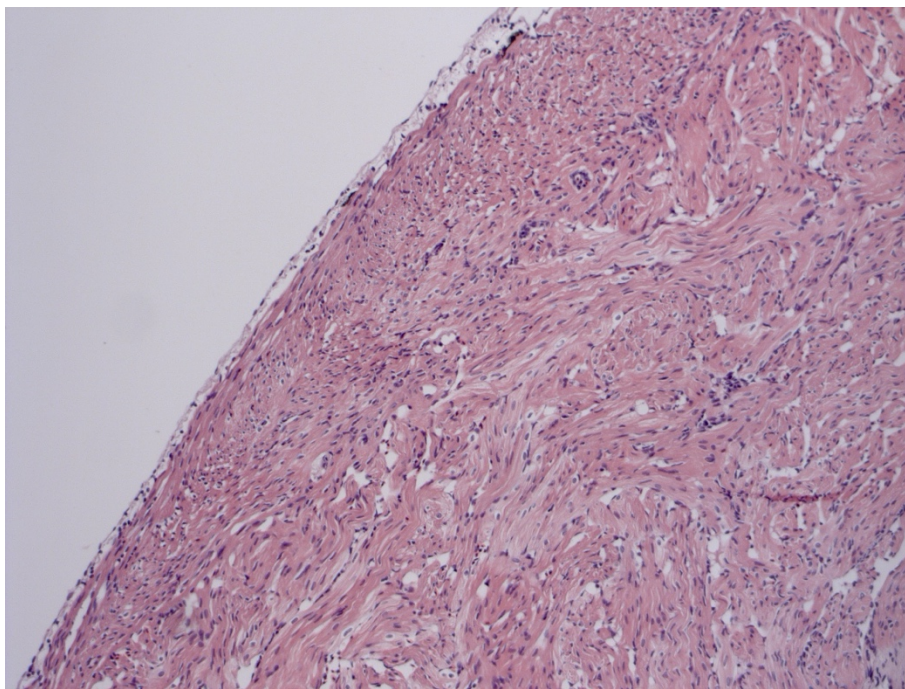
Merd 110

Hjertet vurdert histologisk hos 9 taperfisk og 2 normale fisk. Et snitt fra taperfisk var ikke mulig å vurdere. Resterende taperfisk hadde ingen åpenbare patologiske forandringer i hjertet. De to normale fiskene hadde økt mengde betennelsesceller i epikard, forenlig med epikarditt (figur 28).

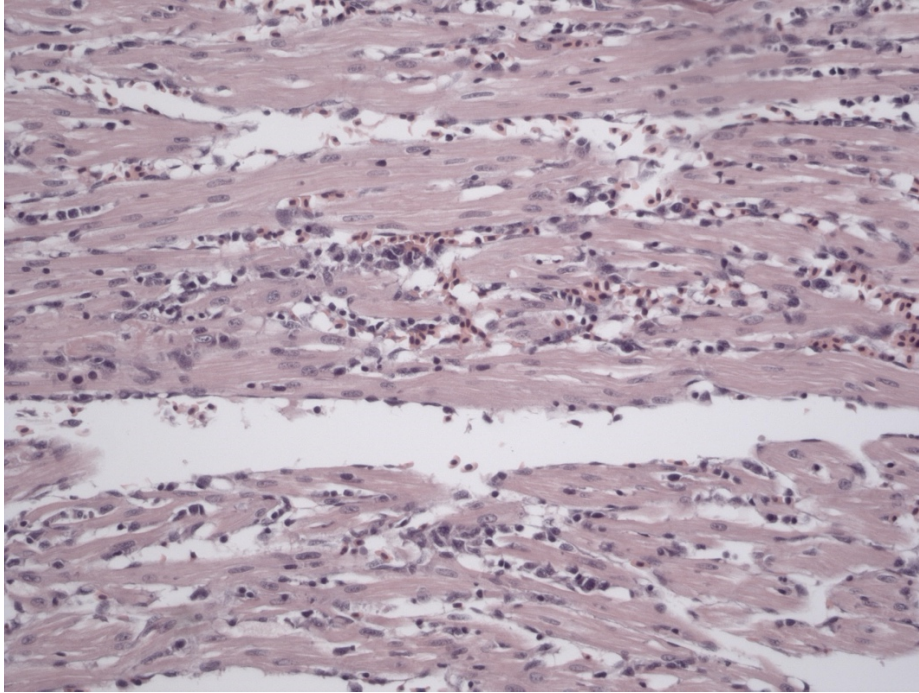
Samlet vurdering av hjertene histologisk

Taperfisk: ikke funn av patologiske forandringer i hjertet.

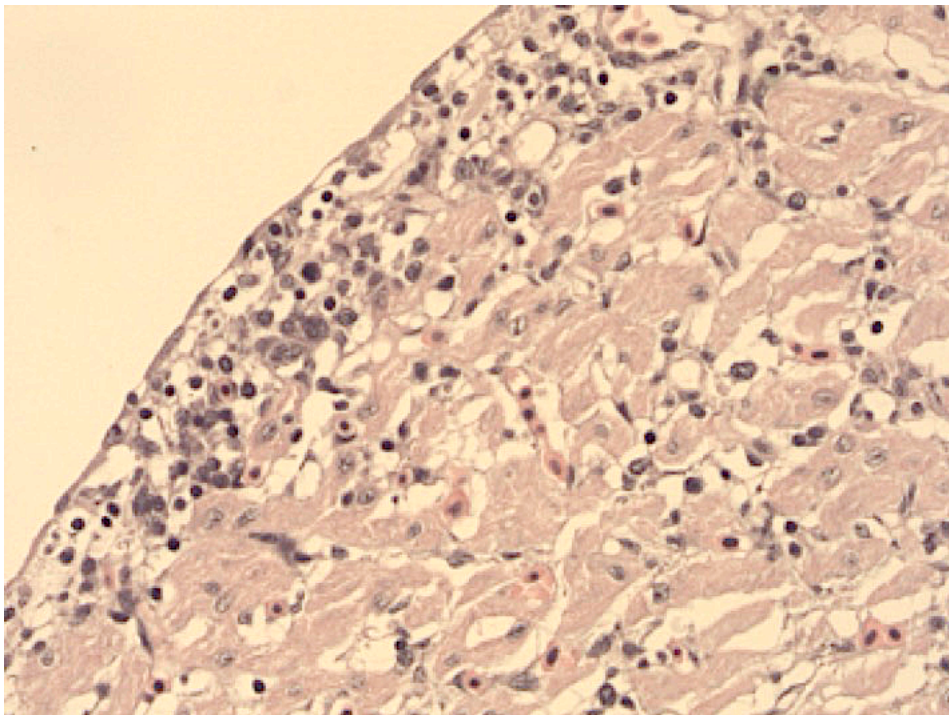
Normal fisk: Epikarditt, med funn sammenfallende med hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (piscine orthoreovirus-infeksjon, PRV). Differensialdiagnose: CMS (cardiomyopati-syndrom).



Figur 26: Hjerte taperfisk (nr.24), ingen spesifikke forandringer. 10x forstørrelse, H&E.



Figur 27: Hjerte normal fisk (nr. 17), moderate infiltrasjon med betennelsesceller subendotelialt og moderate hypertrofi av endotelceller. 20 x, H&E.



Figur 28: Hjerte normal fisk (nr. 31), H&E, epikarditt

Lever

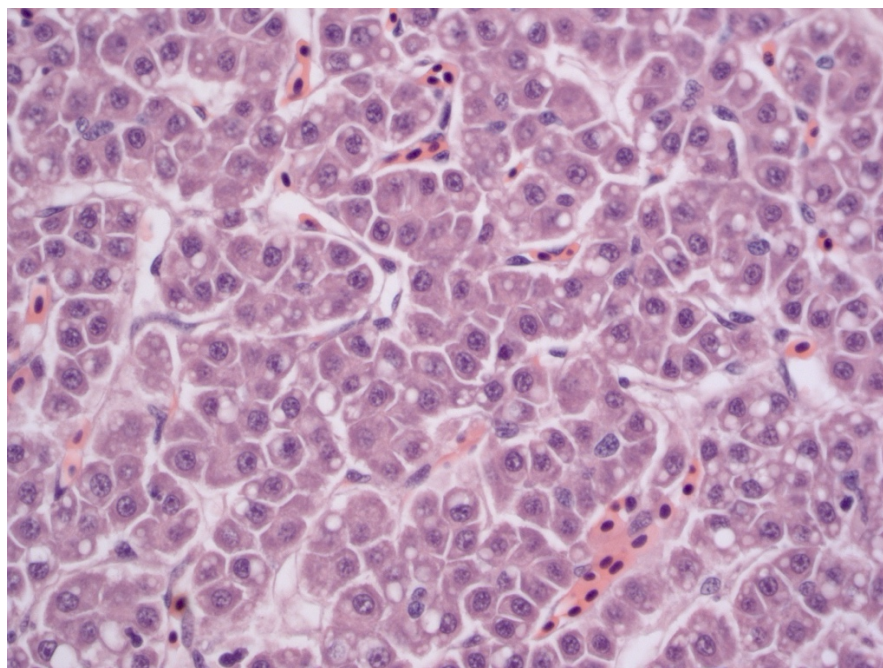
Det ble foretatt histologisk vurdering av lever fra 21 taperfisk og 6 normale fisk. 3 prøver fra merd 109 og 3 prøver fra 110 var ikke mulig å vurdere. Fordelingen av leverprøver fra taperfisk fra merd 108, 109 og 110 ble dermed henholdsvis 4, 5 og 6 stk. Fra hver av merdene er det tatt ut 2 normale fisk, totalt 6 stk. Forandringene i lever ble vurdert mht. inflammasjon og forekomst av intracellulære vakuoler.

Normal fisk

Hos den normale fisken var leverparenchymet karakterisert av tilstedeværelse av både mikrovesikler og vesikler av intermediær størrelse. Distribueringen av vesiklene i leveren var jevn. Mengden varierte fra moderat til mye og med en størrelse fra mikro- til intermediære vesikler (figur 29). Resultatene er oppsummert i tabell 10. Det ble i tillegg påvist noen betennelsesceller rundt galleganger hos samtlige normale fisk.

Tabell 10. Oppsummering av mikrovesikler og vesikler av intermediær størrelse hos normal fisk (normal) og taperfisk (taper).

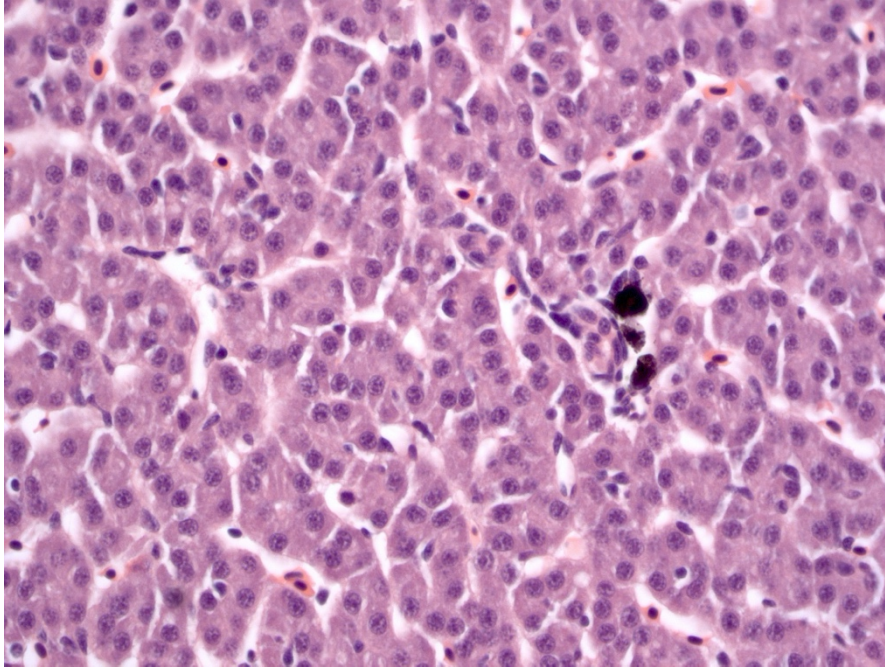
Score	Gruppe		Total
	normal	taper	
Fraværende/sparsomt	0	9	9
Moderat	3	5	8
Moderat/mye	2	1	3
Mye	1	0	1
Total	6	15	21



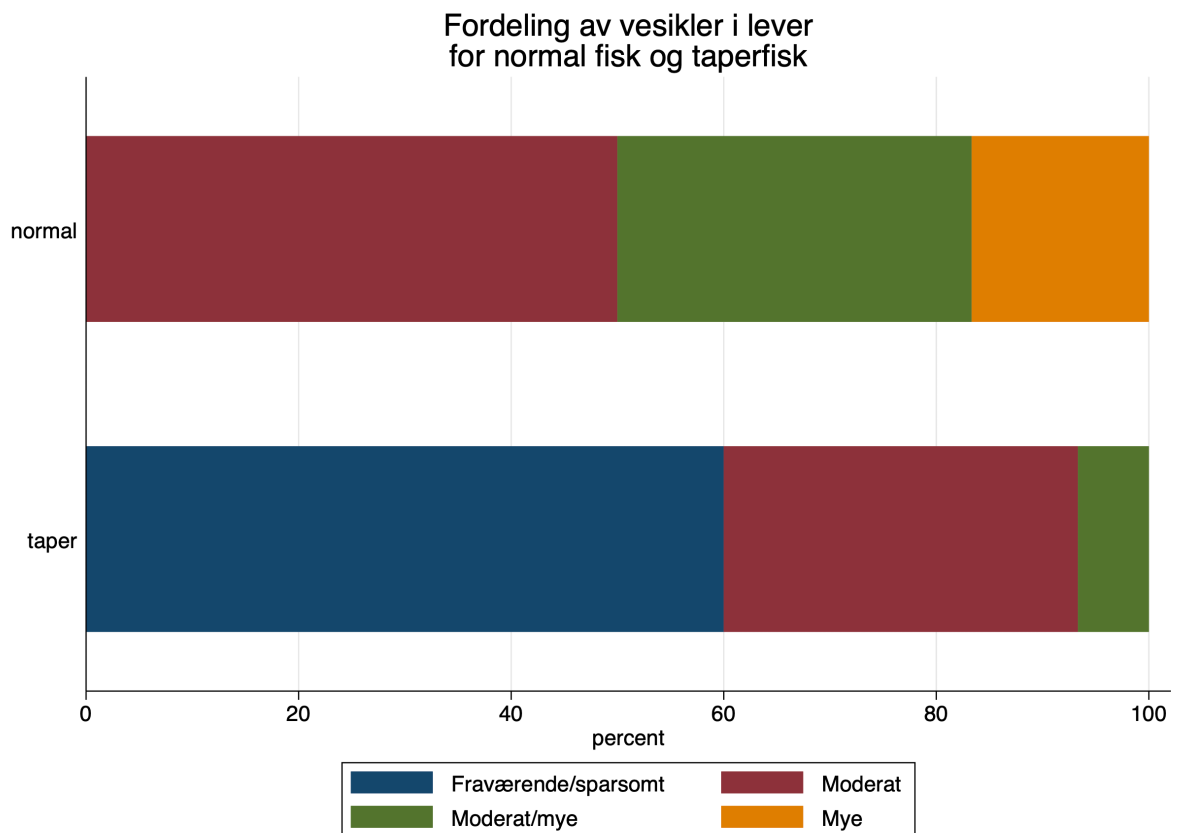
Figur 29: Lever, normal fisk (nr. 31), 40 x forstørrelse, H&E. Leverparenchymet er gjennomsett av moderat mengde intermediære vesikler.

Taperfisk

Hos taperfisk ble det registrert mikrovesikler og intermediære vesikler. Vesiklene var jevnt distribuert gjennom leveren. Mengden varierte fra fraværende/sparsomt (figur 30) til moderat. Hele 10 av 15 tapere hadde fravær av eller sparsom mengde mikrovesikler. Fordelingen er oppsummert i figur 31.



Figur 30: Lever, taperfisk (nr. 8), 40 x forstørrelse, H&E. Sparsomt med mikrovesikler



Figur 31: Fordelingen av vesikler i lever i de to gruppene av fisk.

Oppsummert har taperfisken et histologisk bilde preget av fraværende/sparsom mengde med mikrovesikler mens de normale har moderat til mye av både mikrovesikler og intermediære vesikler i lever.

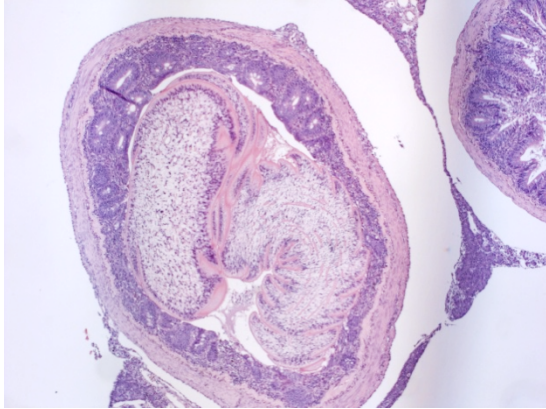
Tarm

Det ble foretatt histologisk vurdering av tarm av 21 taperfisk og 6 normale fisk. Eksokrin pankreas ble kun funnet hos et fåtall taperfisk, og det kan ikke utelukkes at det skyldes systematiske feil ved prøveuttak.

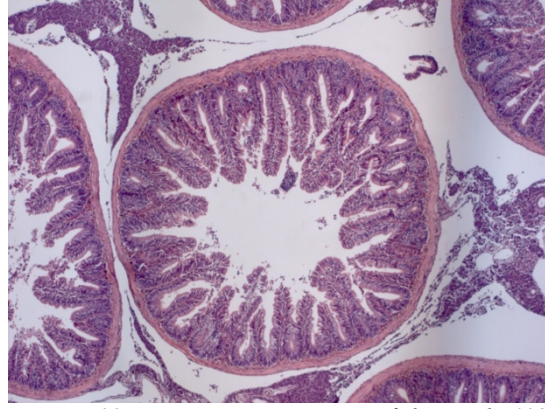
Merd 108

Det ble vurdert snitt fra 4 taperfisk og 1 normal fisk (1 snitt fra normal fisk mangler). I snittene fra taperfisken ble det registrert intakt tarmepitel med begerceller og intakt pankreas med svært lite fettvev. Bendelorm ble registrert hos én taperfisk (figur 32).

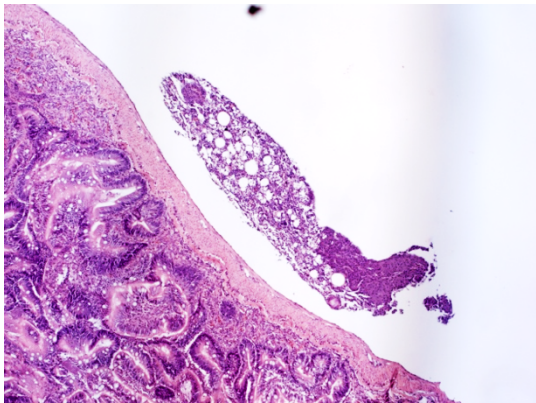
Den normale fisken hadde intakt tarmepitel og rikelig med innhold i tarmlumen. Tilstedeværelse av pankreas var ikke mulig å vurdere. Hos både normal fisk og taperfisk ble det registrert milde vaksineforandringer (figur 34).



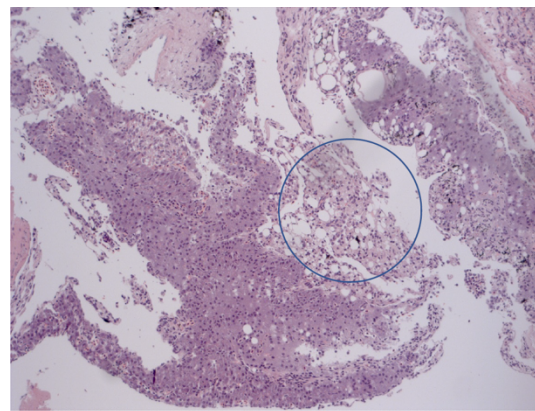
Figur 32: Tverrsnitt av bendelorm, taperfisk merd 108, 5x forstørrelse, H&E.



Figur 33: Tverrsnitt tarm, taperfisk merd 108 (5x forstørrelse).



Figur 34: Tarm, taperfisk nr. 14, 5 x forstørrelse, H&E. Vakuoler, indikasjon på vaksinerester.



Figur 35: Eksokrin pankreas, taperfisk nr. 10, 20x forstørrelse, H&E. Inflammasjon knyttet til rester av vaksine.

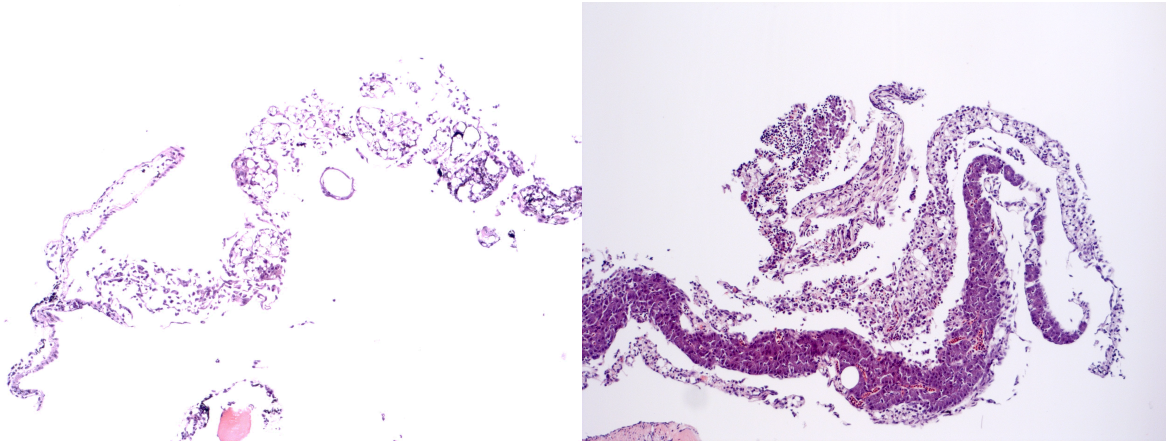
Merd 109

Det ble vurdert totalt 8 snitt fra taperfisk og 2 snitt fra normale fisk fra merd 109. Hos taperfisk ble det registrert intakt tarmepitel med begerceller (figur 33) og intakt pankreas med fravær av fettvev (figur 35). Bendelorm ble registrert hos én taperfisk. De to normale fiskene hadde fravær av patologi. Det ble registrert intakt mukosaepitel med begerceller. Tilstedeværelse av pankreas var ikke mulig å vurdere.

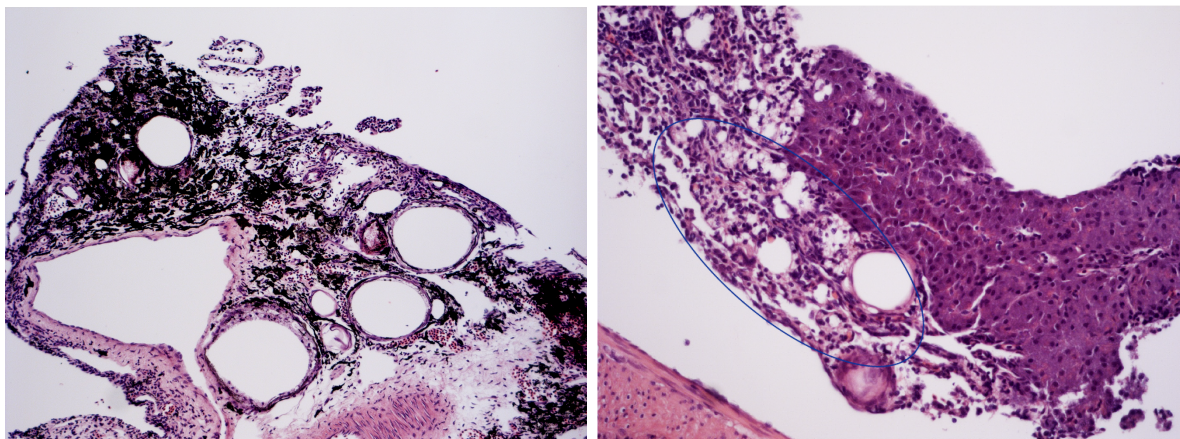
Merd 110

Det ble vurdert tarmsnitt fra 9 taperfisk og 2 normale fisk. Ett tarmsnitt fra taperfisk var ikke mulig å vurdere. Oppsummert ble det hos taperfisk registrert intakt tarmepitel med

begerceller og intakt pankreas med fravær av fettvev. To av taperfiskene hadde en del melanomakrofager i pankreas som kan indikere mer omfattende reaksjoner på vaksineforandringer (figur 36, figur 37). Tre taperfisk hadde i tillegg mild grad av vaksinereaksjon. Bendelorm ble registrert hos én taperfisk. De to normale fiskene hadde store mengder buk fett og intakt tarmepitel. Tilstedeværelse av pankreas var ikke mulig å vurdere.



Figur 36. Til venstre: Vaksineforandringer i buk hos taperfisk fra merd 110, 20 x forstørrelse, H&E. Til høyre: Intakt pankreas hos taperfisk fra merd 110, 20 x forstørrelse, H&E.



Figur 37: T.v.: Rikelig forekomst av melanomakrofager som en reaksjon på vaksine, 10x forstørrelse, H&E. T.h: vaksineforandringer i den ovale sirkelen, ellers normalt pankreasvev, H&E.

Oppsummert for merd 108, 109 og 110 ble det registrert store forskjeller mellom normal fisk og taperfisk i mengde fett rundt pankreas/tarm. Taperfisken hadde fravær av fett mens den

normale fisken hadde rikelig med fett. Det ble også registrert økt forekomst av bendelorm hos taperfisken i forhold til den normale fisken.

Virusingeksjon

Real-time PCR-analyser

Tabell 11: Resultater Real-time PCR

Fisk nr.	PMCV	PRV	IPNV	Normal-/taperfisk
H3	29.46	28.06	Negativ	N
H5	36.17	28.48	Negativ	N
H17	36	25.45	Negativ	N
H18	Negativ	29.54	Negativ	N
H28	Negativ	27.15	Negativ	N
H31	Negativ	Negativ	Negativ	N
H8	35.13	Negativ	Negativ	T
H9	36.36	Negativ	Negativ	T
H15	33.76	28.24	Negativ	T
H20	Negativ	31.77	Negativ	T
H24	Negativ	29.81	Negativ	T
H26	32.39	Negativ	Negativ	T
PC 10 ⁶ copies/μl	21.08	21.7	20.18	Pos kontroll
PC 10 ⁵ copies/μl	25.34	24.99	23.55	Pos kontroll
PC 10 ⁴ copies/μl	29.01	28.78	27.16	Pos kontroll
NC	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ kontroll

Fordelingen av positivt/negativt resultat for PMCV er vist i tabell 12 og for PRV i tabell 13 og det er ikke statistisk forskjell for antall pos/neg for PMCV eller PRV (chi-test).

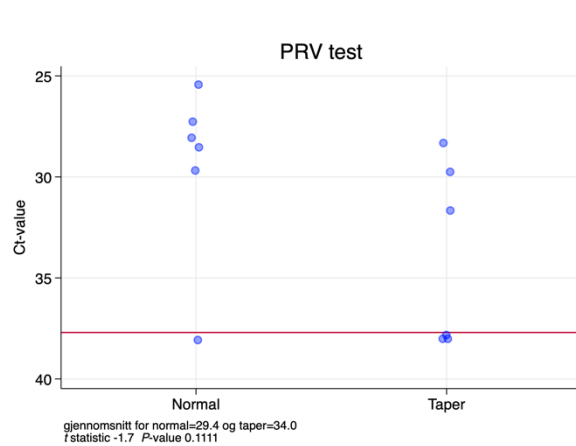
Tabell 12: Resultat PMCV

+/- resultat	Gruppe		Total
	normal	taper	
0	3	2	5
1	3	4	7
Total	6	6	12

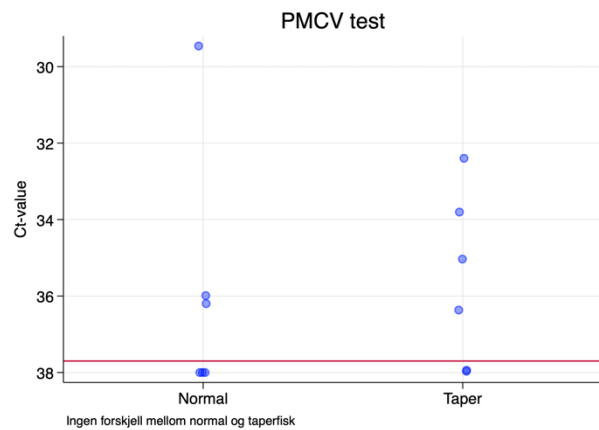
Tabell 13: Resultat PRV

+/- resultat	Gruppe		Total
	normal	taper	
0	1	3	4
1	5	3	8
Total	6	6	12

Sammenligning av nivå av virus (uttrykt som Ct) verdi, viser heller ingen forskjell mellom taperfisk og normal fisk for hverken PRV eller PMCV (Figur 38 og 39).



Figur 38: Resultat av påvisning av PRV (genom) med real-time PCR. Rød linje på y-aksen indikerer cut-off for negativt resultat der punkter under linje er negative.



Figur 39: Resultat av påvisning av PMCV (genom) med real-time PCR. Rød linje på y-aksen indikerer cut-off for negativt resultat, der punkter under linje er negative.

Diskusjon

Klassifisering og registrering av taperfisk

Begrepet “taperfisk” gir et inntrykk av at det er snakk om en fisk som er dårligere stilt enn normal fisk. De har et karakteristisk utseende og bærer preg av å ikke ha fulgt normal vekstkurve siden utsett. De beveger seg ofte mindre sammenlignet med normal fisk og kan stå og sture langs nota. Selv om de virker tilsynelatende apatiske kan de være vanskelig å få tak, siden de kan flykte raskt dersom det blir nødvendig.

Oppdrettsselskapene registrerer antall taperfisk. For at tallene skal være sammenlignbare forutsettes det at alle benytter den samme definisjonen av en taperfisk. “Svimere” er eksempel på fisk som feilaktig kan registreres som taperfisk. Slik feilregistrering representerer en feilkilde ved totalantallet. Siden det ikke er innført en standardisert definisjon på hva en taperfisk er, vil registreringen av andel (%) taperfisk kunne variere fra anlegg til anlegg. Videre er kategorien «svinn» en uspesifikk kategori som kan favne dødelighet som skyldes forskjellige årsaker. Taperfisk som havner i svinnkategorien, uten nærmere spesifisering, kan være med å bidra til at det totale antallet taperfisk underrapporteres.

I 2019 endret Måsøval rutinene sine for registrering av taperfisk. De tidligere årene har mye av det som nå registreres som taperfisk blitt kategorisert som “dødfisk”, uten nærmere spesifisering. Økt fokus på opplæring og en mer spesifisert registrering av dødfisk gir nå et mer informativt bilde av fisken som går tapt. Basert på tallene kan det virke som at andelen taperfisk har økt betraktelig, men realiteten er at innfangningen og registreringen har blitt bedre. Å sammenligne andel taperfisk fra tidligere år med dagens tall vil derfor ikke gi et riktig bilde av utviklingen av antall taperfisk. Dette representerer også en feilkilde når tall fra ulike

oppdrettsselskaper skal sammenlignes, i tillegg til å gjøre sammenligning av tall vanskelig innad i samme oppdrettsfirma.

Et forhold som er viktig for klassifiseringen av taperfisk, er forekomst av påvisbare patologiske forandringer, makro- eller mikroskopisk. Av de fiskene som ble tatt ut for videre undersøkelse ble det ikke påvist forskjeller mht. ytre overflater, gjeller eller indre organer mellom taperfisk og normal fisk. Når det gjelder de histopatologiske forandringene ble det påvist milde forandringer på gjellesnittene både hos taperfisken og den normale fisken. Dette er som forventet, da det ikke var mistanke om gjellesykdom på anlegget. Det er heller ingen indikasjon på at gjellehelsen er dårligere hos taperfisk enn normal fisk. Gjellehelse virker derfor ikke å skille taperfisk og normal fisk i denne studien, og en direkte årsakssammenheng mellom taperfisk og gjellehelse er heller ikke etablert.

Gjennomgående for hud/muskel-snittene var at lite hud var kommet med hos taperfisken (se feilkilder prøveuttak) og det var dermed ikke mulig å vurdere hvorvidt det var forskjeller mellom normal fisk og taperfisk. Hos den normale fisken hadde huden ingen patologiske funn. Intakt hud, skjell og slimlag utgjør en viktig barriere mot patogener i miljøet, og er også viktig for fiskens osmoregulering. Det ble registrert fravær av perivisceralt fettvev hos taperfisken. Dette er et forventet funn, siden det er kjent at fôropptaket hos taperfisk er redusert. Den har vokst lite og har også derfor ikke overskuddslager i form av fettvev. Dette støtter bildet av en avmagret fisk.

Taperfiskene hadde ingen påvisbare patologiske forandringer i hjertet. Basert på dette funnet er det her ikke mulig å trekke noen parallell mellom hjerteforandringer og utviklingen av taperfisk. Den normale fisken hadde forandringer forenlig med et tidlig stadium av HSMB eller HSMB/PMCV infeksjon, noe som også ble bekreftet ved real-time PCR analyser. Samtidig som prøveuttaket ble utført, ble resterende deler av anlegget avluset. Her var det stort tap av

tilsynelatende frisk og fin fisk. Det var mistanke om at CMS var årsaken til økt dødelighet under avlusning. PCR-analyser viser at fisken var infisert med både PRV og PMCV, og en dobbel-infeksjon kan være med å svekke fisken, selv om infeksjonen var lavgradig.

Den normale fisken hadde forventet mengde, størrelse og distribusjon av mikrovesikler i leveren, som indikerer lagret fett. Taperfisken hadde signifikant færre og mindre mikrovesikler enn den normale fisken. Dette kan tyde på at reservelageret av energi er betydelig mindre hos taperfisken. Dette funnet er som forventet og støtter fremstillingen av en taperfisk som et avmagret individ, som ikke har tatt til seg mye næring.

Hos kontrollgruppen med normal fisk var det rikelig med perivisceralt fettvev. Hos taperfisken var det fravær av fett i bukchulen. Fraværet av fett hos taperfisk er å forvente, og sammenfaller med andre histologiske funn som tyder på kronisk avmagring (fravær av fett i underhud, færre vesikler i lever). Det var funn av fôrrester i tarmlumen hos både taperfisk og normal fisk, men i større mengder hos normal fisken. Dette indikerer at taperfisken har spist noe, og at dermed at redusert tilvekst ikke alene kan skyldes at fisken ikke spiser.

Det ble påvist bendelorm (*Eubothrium* ssp.) hos 4 av 21 taperfisk (19%). Det kan likevel ikke utelukkes at det er bendelorm tilstede hos flere taperfisk, samt hos normal fisk, da kun et lite tarmavsnitt har blitt vurdert. Bendelorm er et vanlig funn hos oppdrettslaks i Norge, med noe varierende forekomst langs kysten. Oppdrettslaks kan fungere både som mellomvert og endeverter for bendelorm-arter (1). Eggene skilles ut i fiskens avføring, som videre blir spist av et planktonisk krepssdyr (copepod). Disse fungerer som mellomvert. I mellomverten utvikles det en proceroid. Oppdrettslaks får i seg denne parasitten enten ved å spise en mellomvert (raudåte eller dyreplankton) eller ved at mellomverten følger med sjøvannet når laksen drikker. Voksen bendelorm sitter ofte i pylorusblindsekkene. Bendelorminfestasjoner kan medføre et økt fôrforbruk hos fisken samtidig som en kan observere nedsatt tilvekst. Hvis fisken er hardt

angrepet vil opptaket av mikronæringsstoffer kunne reduseres. Dette kan gi en redusert helsetilstand generelt som kan gjøre fisken mer utsatt for andre infeksjoner (28).

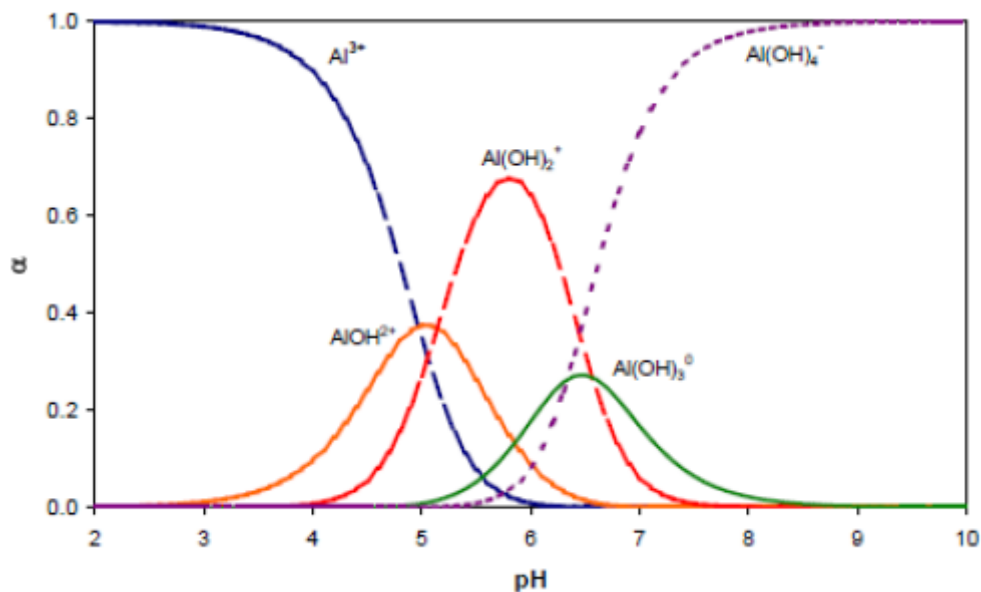
Ved bendelorm-kontroll av merd 108 i september 2019 ble det funnet en prevalens på 10%. Om bendelorminfestasjon disponerer for utvikling av taperfisk eller om taperfisksyndrom disponerer for bendelorminfestasjon er interessant, men uavklart. En teori er at taperfisk taper kampen om fôrpellet i merda og heller ender opp med å spise dyreplankton/raudåte. Denne teorien støttes av at det ved obduksjon av taperfisk er funnet raudåte i magesekken (personlig meddelelse, Asgeir Østvik 2020). Slik kan det tenkes at bendelorminfestasjon ikke er en årsak til at en fisk blir taper, men heller en konsekvens av det å være en taperfisk. Denne studien fant en prevalens av bendelorm hos taperfisk på 19 %. Dersom det var en direkte årsakssammenheng mellom bendelorminfestasjon og taperfisksyndrom ville en forventet at prevalensen var høyere.

Vannkvalitet

Settefiskanlegget er et gjennomstrømningsanlegg og kvaliteten på råvannet er derfor viktig. Temperaturen på vannet i settefiskanlegget kan styres etter ønske i klekkeri og i karene der fisken oppholder seg frem til den er ca. 25 gram. Når den har nådd denne størrelsen flyttes den til C-hallen, evt. utekar, hvor den blir stående frem til den har smoltifisert. I sistnevnte kar er det ingen mulighet for temperaturstyring av vannet, og temperaturen vil derfor være den samme som i inntaksvannet. Temperaturen kan her komme ned i 1-2 °C vinterstid. Lav temperatur fører til at alle prosesser går saktere - tilvekst, sårheling, smoltifisering mm. En kan derfor spekulere i om en lav temperatur i denne fasen kan gi fisken et dårligere utgangspunkt for videre vekst i sjøfasen.

Råvannet inneholder humus, noe som i hovedsak skyldes at nedbørsfeltet til vannkilden består av myr. Metaller som aluminium, jern og kobber er bundet opp i humusen (organisk karbon)

og kan frigjøres dersom pH-en endres eller sjøvann tilsettes. Løseligheten og giftigheten til metallene er derfor direkte knyttet til mengde humus og pH. I råvannet er både aluminium, jern og kobber tilstede i mengder som kan være giftige dersom forholdene ligger til rette for det (Rosseland, forelesning NMBU: Vannkvalitetens betydning for oppdrett av laksefisk: Aluminium, Oslo, 2020). Dersom pH endres kan metallene bli giftige, så pH-kontroll er ytterst viktig (figur 40). Settefiskanlegget har ved en tidligere anledning registrert økt dødelighet i forbindelse med økt innhold av aluminium, og generelt vil store avvik i vannkvalitet kunne få store konsekvenser for fisken senere i produksjonen. Ved små endringer trenger derimot ikke konsekvensene være like tydelige. Det kan ikke utelukkes at en fisk som har vært utsatt for suboptimal vannkvalitet vil ha et dårligere utgangspunkt i produksjonsfasen og slik ha en større risiko for å utvikle seg til en taperfisk. Betydningen av disse forhold er imidlertid ikke kjent.



Figur 40: Illustrasjon av hvordan pH påvirker forekomsten av ulike aluminiumforbindelser (bilde H. Førde, Måsøval).

Laksen i merd 108, 109 og 110 på Fjølværret har hatt samme vannkvalitet på settefiskanlegget. Hadde vannkvalitet vært en utløsende faktor for utvikling av taperfisk burde man forvente å

kunne se at en større andel av denne fiskegruppen hadde utviklet seg til taperfisk. Fisken som ikke ble taperfisk har i tillegg prestert svært bra (personlig meddelelse, A. Aunsmo, 11.05.20). Det er derfor nærliggende å tro at vannkvaliteten i dette tilfellet ikke alene har forårsaker taperfiskutvikling. Det kan imidlertid ikke utelukkes at andre forskjeller i fisegruppen har eksistert og at noen individer kan ha vært mer mottakelige for dårlig vannkvalitet enn andre.

Smoltifisering

Å lage smolt av god kvalitet er et av de største innsatsområdene i norsk oppdrettsnæring (29). Fisk som ikke er tilpasset livet i sjøvann vil bruke mye energi på denne omstillingen, og dermed kunne få en dårligere tilvekst, enn fisk som er godt tilpasset denne forandringen. Suboptimal smoltifisering kan gi større risiko for sykdom, samt dårligere velferd for fisken. Overføringen fra et landbasert settefiskanlegg til havmerder er en kritisk fase i produksjonen. Stress i forbindelse med flytting kan medføre økt dødelighet, svekket immunforsvar og redusert vekst og appetitt. I dagens lakseproduksjon er det antatt at postsmolt-stadiet er den mest kritiske perioden med tanke på overlevelse i sjø (29).

Det etterstrebes å sjøsette fiskegrupper som er jevnt smoltifisert, slik at dødeligheten ved sjøsett skal være så lav som mulig. Fisk som ikke takler overgangen til sjø kalles ofte for “smolttapere”. Det kan tenkes at smolttapere som overlever den første tiden, vil kunne få en redusert tilvekst og ha større sjanse for å utvikle seg til en taperfisk. Det vil være utfordrende for en påkjent, svekket fisk å ta igjen hovedgruppen som har forventet tilvekst, da de fort taper kampen i matfatet. På Laksåvika er det observert noe ujevn smoltifisering hos enkelte grupper. Det er gjort observasjoner med sølvblanke fisk i deler av gruppene en tid før utsett (Henny Førde,

personlig meddelelse, Frøya 2020). Dette kan indikere at settefisken når smoltvinduet noe tidlig, og andre deler av gruppen noe sent (30).

Laksåvika bruker presenninger til lysstyring. Dette gjøres for å hindre lyslekkasjer mellom grupper som skal settes ut til forskjellige tidspunkt. Fordelen med å bruke presenninger er at de er fleksible og lette å flytte på. Det er kun noen måneder i året det er nødvendig å ha de hengende nede, og en fast installasjon ville tatt mye plass og gjort hallen uoversiktlig. Presenningene er ikke festet helt inntil hverandre, så det slippes inn noe lys i den perioden det skal være mørkt. Igjen så er betydningen av disse forhold for kvaliteten på smolten er usikkert, og ikke minst i hvilken grad det påvirker utviklingen av taperfisk.

Stress

En studie utført i samarbeid med faggruppen for dyrevelferd ved Havforskningsinstituttet har tatt for seg forandringer i hjernekjemi og kortisolnivåer hos taperfisk, og stilt spørsmålet om dette er en tilpasningsmekanisme eller patologi. Det ble funnet økt serotoninaktivitet i hjernen og økt kortisolproduksjon hos taperfisken, sammenlignet med normal fisk. Dette vil kunne føre til “behavioral inhibition” og gi den klassiske adferdsfenotypen som taperfisk viser. Det vil også kunne påvirke nervernes plastisitet og føre til en ubalanse i energimetabolismen. Studien diskuterer om dette er en tilstand fisken går inn i for å redusere eksponering for ytterligere stressfaktorer. Evolusjonsmessig kan dette ha vært en bra strategi for overlevelse (14).

Studien kan ikke konkludere med noen direkte årsak til økt serotoninaktivitet hos taperfisk. Likevel kan en tenke seg at det kunstige oppdrettsmiljøet innebærer flere stressfaktorer som laksen ikke nødvendigvis hadde møtt i sitt naturlige miljø. I løpet av en produksjonssyklus må laksen bl.a. gjennom flere håndteringsoperasjoner. Eksempler er sortering, vaksinerings,

transport og sjøsetting. Disse vil kunne føre til et økt stressnivå. Dersom slike håndteringer kommer i tillegg til andre stressfaktorer, er det ikke utenkelig at det kan trigge en kronisk stresstilstand, som beskrevet i studien. Smoltifisering er, som nevnt tidligere, en tid hvor laksen er naturlig stresset.

Det er kun et utvalg laks som utvikler taperfenotyopen. Dette kan indikere at det er en forskjell i antall stressorer et individ utsettes for. En fisk som er på bunnen av hierarkiet i karet vil trolig har et høyere stressnivå enn en fisk på toppen av hierarkiet. En annen forklaring kan være at ulike individer er genetisk forskjellig med tanke på stresstoleranse. Slik vil noen kunne være mer utsatt for å bli stresset, og følgelig ha høyere risiko for å utvikle seg til en taperfisk.

Infeksjoner

Veterinærinstituttet skriver i Fiskehelsesrapporten for 2019 at bakteriologiske og virologiske undersøkelser som regel gir negative funn (1). I vår studie ble det dyrket bakterier fra 20/21 taperfisk og 3/12 normale fisk, og det ble hovedsakelig funnet bakterier som er ubikivtære i det marine miljø; *Vibrio splendidus* (9), *Photobacterium phosphoreum* (nr. 10), *Psychromonas* (nr. 12), *Psychrobacter* sp. (nr. 14, nr. 33), *Psychrobacter nivimaris* (nr. 15), *Bacillus galliciensis* (nr. 20), og *Aliivibrio* sp. (nr. 23). Funnene tyder derfor på at det er bakterievekst hos en større andel av taperne sammenlignet med den normale fisken. I tillegg ble det gjort funn forenlig med mer patogene arter innen genus *Aliivibrio*. Prøve 27 er den eneste prøven som indikerer en bakterietype av mer patogen karakter. På artsnivå var det ikke mulig å skille mellom *A. wodanis* og *A. salmonicida*. *A. salmonicida* forårsaker kaldtvannsvibriose hos laks, mens *A. wodanis* isoleres fra sårisk. Betydningen av sistnevnte er mer usikker da det er noe uenighet om den er strikt patogen eller opportunist. Én mulig forklaring på at det er positivt dyrkningssvar fra flere taperfisk sammenlignet med normal fisk, er at taperfisk lettere får infeksjoner med

opportunistiske bakterier enn normal fisk. De har høyere kortisolnivåer og er å betegne som “kronisk stresset”, og kan av den grunn være mer mottakelig for infeksjon med bakterier og virus. En annen teori er at fisk som får infeksjoner er mer utsatt for å utvikle seg til taperfisk. Et annet forhold å ta hensyn til er at taperfisk som blir stående i merda kan utgjøre et smittereservoar og dermed øke smittepresset generelt i merda. I og med at taperfisk er bærere av ubikvitære bakterier er det nærliggende å tro at de også kan infiseres lettere av mer patogene bakterier, uten at vi har påvist det. Om funn av ubikvitære bakterier har betydning for utvikling av tapersyndrom, eller om økt bakterieforekomst skyldes at fisken har tapersyndrom i utgangspunktet, er ikke noe vi kan konkludere med ut fra denne studien, bortsett fra at våre funn ikke samsvarer med hva som rapporteres i Veterinærinstituttets årlige rapport.

Funnene av PMCV og PRV tyder ikke på at det er noen forskjell på taperfisk og normal fisk hva angår mengde virus eller om fisken er infisert/ikke infisert. Det er derfor usannsynlig at virusene alene fører til utvikling av taperfisk. Påvisning av virusinfeksjon hos taperfisk samsvarer heller ikke med Veterinærinstituttets beskrivelse av en taperfisk.

Arbeid med å redusere mengden taperfisk

Utviklingen av taperfisk koster næringen penger, og representerer en betydelig velferdsutfordring. Innføring av tiltak som kan optimalisere produksjonen i alle ledd er derfor ønskelig. Å redusere stress hos fisken i kritiske deler av produksjonen som sortering, vaksinerings, sjøsetting etc. er viktige tiltak. Godt management er viktig i denne sammenheng. God daglig drift med kontroll på vannkvaliteten i alle ledd er også en viktig forutsetning, samt å ha kontroll på sykdomsfremkallende agens som finnes i karene. kunnskap

Dyrevelferdsmessig er det også viktig å fjerne de som utvikler seg til taperfisk så fort som mulig. Disse fiskene kan potensielt øke smittepresset i merda. På Fjølværet er det tatt i bruk en

egenprodusert modifisert håv som er effektiv med tanke på å fange inn taperfisk (figur 41). I perioder med stor andel taperfisk kunne hoven fange inn inntil 400 stk pr. drag. Det var gjort et omfattende arbeid med å ta ut taperfisk i høst.



Figur 41: Taperfiskgarn som blir dratt langs merdkanten for effektiv utplukking av taperfisk. Foto: Kristine Rostad

Ulike oppfatninger i fagmiljøet

I forbindelse med denne oppgaven har det blitt gjennomført samtaler med personer som innehar ulike roller i oppdrettsnæringen. “Taperfisk” og hva som fører til utvikling av taperfisk, er et tema som engasjerer. Forskningen på området gir oss ingen fasitsvar, men flere faktorer har blitt identifisert som mulige triggere. Det er interessant at personer som jobber i akvanæringen har delte meninger om temaet. Dette understreker kompleksiteten i problemstillingen, og at det i dag ikke er noe konsensus om årsakssammenheng. Vannkvalitet og dårlig smoltifisering er to av faktorene som har blitt trukket frem. Videre virker de fleste å mene at flere faktorer kan spille inn.

Er taperfisk en tapt fisk?

Veterinærinstituttet har definert taperfisk som en avmagret fisk som har redusert tilvekst (1). Denne oppgaven har gjort samsvarende funn hva angår lengdevekst. I og med at det registreres taperfisk såpass lenge etter utsett, og forskjellen i vekst hos taperfisk og den normale fisken er såpass stor, er det lite sannsynlig at denne fisken noen gang vil klare å ta igjen tilveksten til den normale fisken ved dagens produksjonsregime. I naturen bruker laksen 2-5 år på å gå fra ferskvann til saltvann, (31) mens det i oppdrettsnæringen går ca. to år fra rogn klekkes til fisken slaktes.

Ved å lage bedre rutiner rundt kategorisering av taperfisk på settefiskanlegget, ha jevn størrelse på fiskegruppene og sikre at fisken er tilstrekkelig smoltifisert før utsett kan potensielt andelen taperfisk reduseres. Det virker vanskelig, ved nåværende produksjonsregime, å få en fisk som har utviklet tapersyndrom til å nå slaktevekt.

Begrensninger og generaliserbarhet

Begrensninger ved utvalg

Den opprinnelige protokollen innebar å ta ut et representativt utvalg taperfisk fra merd 108 og 110, på 20 taperfisk og 10 normale fisk (totalt 60 stk.). Da Måsøval har fisket ut store deler av taperfisken denne høsten var det relativt lite taperfisk igjen i merdene på dato for prøveuttak (6. november). Merd 109 ble derfor inkludert i studien, da denne merda også har hatt høy andel taperfisk i høst.

Taperfisken ble stort sett fanget manuelt med håv. De ble tatt ut basert på fenotype og adferd. Det ble fanget så mange taperfisk som mulig, og de aller fleste som ble tatt opp ble inkludert i studien. All fisken som ble hentet opp ble ikke tatt prøver av grunnet tidsbegrensning. Et

tilfeldig antall fisk ble valgt fra hver merd. Om de som lot seg fange skilte seg fra de som ikke lot seg fange er uvisst, men representerer en mulig seleksjonsbias. Én taperfisk ble hentet opp av dødfiskhåven. Denne var tilsynelatende fersk. Det er uvisst om denne fisken er med i studien, da det ikke ble notert hvilken fisk dette var. Denne fisken er potensielt ikke-representativ som taperfisk, i og med at den allerede hadde vært død en viss tid.

Begrensninger ved prøveuttak

Alle tre forfatterne var delaktige under prøveuttaket. Dette er i seg selv en mulig feilkilde, da ulike personer kan ha ulik fremgangsmåte. I tillegg hadde alle relativt lite erfaring med prøveuttak. Dette viser seg eksempelvis ved at epidermis i stor grad mangler ved uttak hud/muskel.

Tiden som gikk fra fisken ble avlivet til prøveuttaket ble gjennomført varierte. Dette representerer en mulig feilkilde. Gjeller er særlig utsatt for å få postmortelle forandringer og siste prøveuttak ble gjennomført 6 timer etter avliving. Dette bør derfor tas med som en faktor ved vurderingen av histologiske snitt.

Begrensninger gramfarging

Tre prøver fikk et resultat ved gramfarging som ikke samsvarte med senere sekvenseringsresultater. Dette gjelder prøve 10 (*Photobacterium phosphoreum*), 23 (*Aliivibrio* sp.) og 24 (*Aliivibrio* sp.). Gramfargingen stemmer overens med sekvenseringsresultatene, men for alle prøvene er bakterieformen registrert som “kokker”, når de i realiteten er stavformede (kilde: “Bacteria in aquaculture - fish, Master Course in Aquamedicine, Infectious Diseases, Henning Sørum og Ane Mohn Bjelland, edited by Espen Brudal 2011, Ane Mohn Bjelland 2013-2015). Dette kan skyldes kontaminering under utsåing av bakteriekoloniene, feil under gramfargingsprosedyre, feil under avlesning etc. Bakterieskålene, med koloniene som ble brukt til gramfarging, ble i tillegg benyttet ved andre biokjemiske metoder. Prøver sendt for

sekvensering er hentet fra preserverte bakteriekolonier i renkultur. Det er derfor sannsynlig at sekvenseringsresultatene er korrekte.

Generaliserbarhet

Dette er en tverrsnittstudie utført 6. november 2019 ved lokalitet Fjølåret. Lokalitet og merder er valgt ut på grunnlag av tidligere taperfiskproblematikk. Studien sier noe om faktorer hos taperfisk og normal fisk i merd 108, 109 og 110. Utvalget er basert på tilgjengelig fisk på prøveuttaksdato, og dette kan representere en feilkilde mtp. hvor representativ fisken i studien er. Det antas at faktorer funnet i denne studien vil kunne forekomme ved andre lokaliteter. For økt generaliserbarhet bør et større utvalg taperfisk i ulike geografiske soner undersøkes.

Konklusjon

Utviklingen av taperfisk utgjør et betydelig velferdsproblem for oppdrettsnæringen, i tillegg til at det påfører næringen store økonomiske tap. Det er mange faktorer som kan påvirke fiskens vekst og føre til at den ikke utvikles som normalt. Risikoen for at det utvikles taperfisk antas kunne reduseres gjennom en optimalisering av vannkvalitet, stress, fôring, smoltifisering og genetik. Det er økonomisk sett gunstig med en intensiv produksjon, i tillegg til at kort tid i sjøen reduserer faren for infeksjoner og store lusepåslag. Det fremstår imidlertid som naturlig å anta at den intensive produksjonen innebærer en økning av faktorer som kan være ugunstige for utviklingen av taperfisk.

I denne studien ble det på histologiske snitt funnet at taperfisk hadde mindre subkutant fett enn normal fisk. Bakteriologisk dyrkning fra hodenyre viste høyere forekomst av miljøbakterier hos taperfisken, sammenlignet med normal fisk. Virologiske undersøkelser bekrefter forekomst av PMCV- og PRV-genom i hjertet hos normalfisk og taperfisk og det ble ikke funnet forskjeller

i forekomst av virus mellom taperfisk og normal fisk. Positive dyrkningsresultater for bakterier og virus er funn som ikke sammenfaller med definisjonen av taperfisk som Veterinærinstituttet benytter i sin Fiskehelse rapport (1). Resultatene i denne studien gir ikke grunnlag for konklusjoner om årsakssammenhenger innen forekomst og utvikling av taperfisk. Studien viser imidlertid at forskjellen i lengdevekst mellom taperfisk og normal fisk er betydelig, og at det derfor vil være usannsynlig at taperfisken noen gang kan ta igjen tilveksten den normale fisken har hatt, ved dagens produksjonsregime.

Taperfiskproblematikken er kompleks og utviklingen av taperfisk er sannsynlig påvirket av flere ulike faktorer. Det er vanskelig å få tilstrekkelig klarlagt hvilke forhold som forårsaker problemet, da antall taperfisk kan variere mye både i og mellom anlegg, samt mellom ulike utsett. Det registreres imidlertid en økende interesse for taperfiskproblematikken fra forskningsmiljøet og oppdrettsnæringen, og nye forskningsprosjekter om taperfisk skal igangsettes.

Takk til bidragsyttere

Vi ønsker å rette en stor takk til hovedveileder Øystein Evensen for interessante diskusjoner, konstruktive tilbakemeldinger og god veiledning underveis i oppgaveskrivingen. Vi vil takke medveileder Arnfinn Aunsmo og Måsøval for et godt samarbeid. Takk for at vi fikk være hos Måsøval og takk til alle vi møtte som bidro til gode diskusjoner rundt taperfiskproblematikken. Takk også til medveileder Asgeir Østvik for gode diskusjoner i startfasen av prosjektet. Vi ønsker å takke Henny Førde og Andreas Skagøy i Måsøval for god hjelp, tålmodighet og godt humør under vårt besøk på Frøya og i senere mailkorrespondanser.

Tusen takk til Saurabh Dubey for godt samarbeid, god opplæring og stort engasjement rundt lab-arbeidet. Takk også til Sandra Radunovic for veiledning på lab, Cheng Xu for utførelse av

Real-time PCR og Veterinærinstituttet for preparering av histologiske snitt. Til slutt vil vi takke ansatte ved NMBU Campus Adamstuens bibliotek for god opplæring i EndNote.

Summary

Title: A study of factors that might influence the prevalence of growth-stunted farmed salmon in Norway

Authors: Sofie Søli Ottesen, Kristine Rostad and Eiril Moen Soltvedt

Supervisor: Øystein Evensen¹, Arnfinn Aunsmo² og Asgeir Østvik³, ¹Institutt for parakliniske fag, ²Institutt for produksjonsdyrmedisin og ³Institutt for prekliniske fag og patologi.

The development of growth-stunted (GS) farmed Atlantic salmon is a contributor to a monetary loss for the aquaculture every year. It also represents a concern regarding the welfare of GS salmon. The prevalence varies between locations, fish stocks and cages. Various research projects have identified several factors that can impact the development of GS salmon. This suggest a multifactorial causation.

The purpose of the study was to perform a cross sectional study to register factors in freshwater and seawater that could affect the prevalence of growth-stunted farmed salmon, and comparing normal fish with GS fish regarding macroscopic, histopathologic and microbiological conditions. The results showed differences in acquired length growth (GS salmon having grown less than normal fish from the same fish group), presence of subcutaneous fat (none in the GS salmon), a higher incident of ubiquitous bacteria in the kidney of GS salmon and presence of PRV and PMCV in both GS fish and normal fish.

Referanser

1. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2019 s 90, 108 [internett]. Oslo: Veterinærinstituttet; 2020 [updated 23.03.2020]; cited internett 25.04.]. Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/fiskehelse rapporten-2019>
2. Information NCfB. Polymrease Chain Reaction (PCR) [Internett]. Bethesda National Center for Biotechnology Information u.å [updated 09.11.2017; cited 2020 05.05.2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
3. Veterinærinstituttet. Kardiomyopatisyndrom (CMS) [internett]. Oslo: Veterinærinstituttet; u.å [cited 2020 26.05.]. Available from: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kardiomyopatisyndrom-cms>
4. Veterinærinstituttet. Hjerte og skjelettmuskelbetennelse(HSMB) [internett]. Oslo: Veterinærinstituttet; u.å [cited 2020 26.05.]. Available from: ; <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/hjerte-og-skjelettmuskelbetennelse-hsmb>
5. Felleskatalogen. Benzoak vet. [internett]. Oslo: Felleskatalogen.no; u.å [updated 22.02.2016; cited 2020 20.04.]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/benzoak-vet-acd-pharmaceuticals-as-546770>

6. Sjømatråd N. Sjømateksport for 107,3 milliarder kroner i 2019 [internett]. Tromsø: Norges Sjømatråd; 2020 [updated 07.01.2020; cited 2020 15.04.]. Available from: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-1073-milliarder-kroner-i-2019/>
7. Moseng T. Overskriftene får oss til å akseptere det uakseptable Oslo: Dagens Næringsliv; 2020 [updated 14.02.2020; cited 2020 15.04.]. Available from: <https://www.dn.no/innlegg/dyrevelferd/oppdrett/havbruk/overskriftene-far-oss-til-a-akseptere-det-uakseptable/2-1-753679>
8. Vindas M. A. JIB FO, Hoglund E., Gorissen M., Flik G., Kristiansen T.S., Øverli Ø., Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. R Soc Open sci. 2016;3(5):4. Available from <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.160030>
9. Seafood E. Laksens livssyklus [internett]. Erko Seafood; u.å [cited 2020 15.04.]. Available from: <https://erkoseafood.no/laks/>
10. laks.no. Norsk laks fra fjord til bord [Internett]. laks.no; u.å [cited 2020 15.04.]. Available from: <https://laks.no/lakseproduksjon/>
11. Vøllestad A. Laks [internett]. Oslo: Store Norske Leksikon; u.å [updated 02.10.2019; cited 2020 28.01.]. Available from: <https://snl.no/laks>

12. Hoddevik B. Kjønnsmodning kan gi problemer i moderne smoltproduksjon [Internett]. Havforskningsinstituttet: Havforskningsinstituttet; 2018 [cited 2020 26.05]. Available from: <https://www.hi.no/hi/nyheter/2018/oktober/kjonnsmodning-smoltproduksjon>

13. Alne H. Tetradecylthioacetic acid (TTA) – A functional feed ingredient for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Growth, sexual maturation and health. Ås 2010. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/cab1/b4c2afbcf9d3f2e8931b42c4802146ce166b.pdf>

14. Vindas M. A. JIB FO, Hoglund E., Gorissen M., Flik G., Kristiansen T.S., Øverli Ø., Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. R Soc Open sci. 2016;3(5):2-7. Available from <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.160030>

15. Vindas M. A. JIB FO, Hoglund E., Gorissen M., Flik G., Kristiansen T.S., Øverli Ø., Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. R Soc Open sci. 2016;3(5):6-7. Available from <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.160030>

16. Måsøval. Historie [Internett]. Sistranda: Masoval.no; u.å [cited 2020 01.03.]. Available from: <http://masoval.no/om-bedriften/>

17. Monica Z. Bruckner. Gram Staining [Internett]. Northfield: Science Education Resource Center; U.å. [cited 2020 16.03.]. Available from: https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/gramstain.html

18. A. T. Oxidase test: Principle Procedure and oxidase positive organisms [Internett]. Microbe Online; 2012 [cited 2020 16.03]. Available from: <https://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms>

19. Inc BI. Epoch Microplate Spectrophotometer [Internett]. Winooski: Biotek Instruments Inc; u.å. [cited 2020 16.03]. Available from: <https://www.biotek.com/products/detection-microplate-readers/epoch-microplate-spectrophotometer>

20. Fossum S. DE. Polymerasekjedereaksjon [Internett]. Store Medisinske Leksikon; 2009 [updated 17.03.20; cited 2020 17.03]. Available from: <https://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>

21. E. J. Elektroforese [17.03]. Store Norske Leksikon; 2009 [updated 14.05.2019; cited 2020 17.03]. Available from: <https://snl.no/elektroforese>

22. Munang'andu HM FB, Fredriksen B.Ø, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen Ø. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary research* 2013, 44(1):7

23. Pharmaq. Resultater for sikkerhet og effekt etter vaksinasjon med ALPHA MARINE Vibject [Internett]. Pharmaq; 2007 [updated Jan. 2007 ; cited 2020 14.04.20]. Available from: <https://www.pharmaq.no/sfiles/35/8/file/data-alpha-marine-vibject-januar-07.pdf>

24. J.J. F. The Family Vobrionaceae. Springer, New York, NY Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes.; 2006 07.052020.

25. Miyazaki M. NY. The Family Psychromonadaceae. Springer, Berlin, Heidelberg Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes; 2014.

26. Teixeira L.M MVLC. Prokaryoter, The Family Moraxellaceae. Springer, Berlin, Heidelberg 2014

27. Encyclopædia Britannica i. Bacillus [Internett]. Chicago: Encyclopædia Britannica, inc. ; 2019 [cited 2020 13.03.20]. Available from: <https://www.britannica.com/science/bacillus-bacteria>

28. Jensen PM. Økt resistens hos bendelmark- mange dropper behandling [internett]. kyst.no; 2015 [updated 17.03.2018; cited 2020 19.02.2020]. Available from: <https://www.kyst.no/article/oslash-kt-resistens-hos-bendelmark-ndash-mange-dropper-behandling/>

29. Ellingsen B. Fôrbasert kontra lysstimulert smoltifisering av Atlantisk laks [Master]. Tromsø;UIT Norges Arktiske Universitet, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges Fiskerihøgskole; 2019

30. Petersen M. Laksen kan smoltifisere tre ganger før den går i sjøen [internett]. Kyst.no; 2016 [updated 17.03.2018; cited 2020 21.04.]. Available from:

<https://www.kyst.no/article/laksen-kan-smoltifisere-tre-ganger-foer-den-gaar-i-sjoen/>

31. Aadland C. Forskere skal finne ut om intensiv smoltproduksjon er årsaken til hjerteproblemer hos laks [internett]. Tekfisk; 2019 [updated 25.09.2019; cited 2020 21.04.].

Available from: <https://fiskeribladet.no/tekfisk/nyheter/?artikkel=69136>

Vedlegg

Vedlegg 1: Sekvenseringsresultater

Prøve 9

TGcnGTcgAGCGGAncGACaacattgcnntCTTCGgAgGanTTGTTGGgCGTCGAGCGGCGGAcGGGTGAGTaaT
GCctAgnAaattgcCTTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAA
AGAGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGtAATgnntcac

agGattTgtTGGGCGtcgagcGgcGgacGggtGannntGcccannnnnt

Prøve 10

CCTGATGTGGGGGATAACTATTGAAACGATAGCTAATACCGCATAATCTCTTCGGAGCAAAGAGGGGGACCTTC
GGGCCTCTCGCGTCAGGATTAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTccTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTTCAGTTGTGAGGAAGGCAGTTAAGTTAATAGCTTggCTGTTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGG
CGGTCTGTTAAGCAAGATGTGAAAGCCCGGgGCTCAACCTCGGAACAGCATTGTTGAACTGGCAGACTAGAGTCTT
GTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGATGCGAAAGCGTGgaGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACgC
CGTAAACGATGTCTACTTGAAGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTG
GGgAGTACGGTCGCaGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGgCCcGncAAGCGGtGGagcATGTGTTtAAT
tcgAtGCa

Ingen resultat

Prøve 12

agtggntttAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTTAGAGGATGACCAGC
CACACTGgaACTGAGACACGGTCCAGACTCaTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGTGGGGAGGAAAGGTTGTA
GTTAATAACTGCAATCTGTGACGTTACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

GGAGGGT GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTAATTAAGTCAGATGTGAAAGC
CCAGGGCTCAACCTTGgaACTGCATTTGanaCTGGTTAACTAGAGTTTTGTAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAgAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGGCGCCACCTGGACAAAGACTGACACTGnng
CgCGaAGGCGTGGGAGCAAaCnngATTAGATAcCCCCGtAGTCCACGCAGTAAACGATGTCTATTAgAGTTTG
TGGCTATATGccGTGGGTTTTCaAGCTAACGCATTAATAgACcGCCTGGGgAGTACGGCCGCAaggTTAAAAC
CAaaTgAATTGacGGggGCCcGCaGaaGnGGaGggag

Prøve 14

ggngccTTACAcATGCAaGTCGAGCGGAAACGATGGTAGCTTGCTACCAGGCGTCGAGCGGCGACGGgTGagTA
ATACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGGGGATAGCACGGGGAAACTCGTATTAATACCGCATAACGACCTACGGGAG
AAAGGGGCGAGTTTACTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCTAC
CATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTT
TTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCCGTGGTTAATACCCACGGACGATGACATTAGCTGCAGAA
TAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGGGAGCGTAGGTGGCTCAATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGT
TGAGCTAGAGTATGTGAGAGGAAGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
ATGGCGAAGGCAGCCTTCTGGCATAATACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGAttAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGnTCCCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAAT
AAGTAGACCGCCTGgngAgTAnGgCcGCAA

gnnGctTAcAcATGCAaGTCGAGCGGAAACGATGgTAGCTTGCTACCAGGCGTCGAGCGGCGACGGGTGAGTAA
TACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGGGGATAGCACGGGGAAACTCGTATTAATACCGCATAACGACCTACGGGAGA
AAGGGGCGAGTTTACTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCTACC
ATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTT
TGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCCGTGGTTAATACCCACGGACGATGACATTAGCTGCAGAA
AAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGGGAGCGTAGGTGGCTCAATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGTT
GAGCTAGAGTATGTGAGAGGAAGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGA
TGGCGAAGGCAGCCTTCTGGCATAATACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC

TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTTCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAATA
AGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTAAtnCGATGCAACGCGAagAACCTTACCTgnnCTtGannTATCTAGAATCCTGCAGaGATGCGGGA
GtnCCTTCgGgAAttngA

Prøve 15

gGGGgGccTTAnnaTGCAAGTCGAGCGGAAaCGATGGTAGCTTGCTACCAGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTgagT
AATACTTAGGAATCTACCTAGTAGTGGGGGATAGCACGGGGAAACTCGTATTAATACCGCATAACGACCTACGGGA
GAAAGGGGGCAGTTTACTGCTCTCGCTATTAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCATA
CCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT
TTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCnnnGGTTAATACCCgnngACGATGACATTAGCTGCAGA
ATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATCTGAAACTG
TTAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGGAAGTAGAATTTACGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACC
GATGGCGAAGGCAGCTTCTGGCATCATACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTTCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGACGCAGCTAACGCAA
TAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAaTGAATTGACGGGGCCCCGCaCAAGCGGTGG
AgCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAaGaaCCTTACCTGGTCTTGActtaTCTaGAATCCTGcaa

atactTaGGAatcTACCTAGtannnngGGatagcncGGGGaaactcGtATTaaTACCGCATAACGACCTACGGGAG
AAAGGGGGCAGTTtAcTGCTCTCGCTATTAGATGAGCctanntC

Prøve 20

TGCAaGTCGAGCGGAtCTTTGAGAGCTTGCTCTCanaGatTAGCGGCGGAcGGGTGaGTaaCACGTgggTaACCT
GCCTGTaaGATTGGGATAACTCCGGGAaACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATT
GaAAGGTGGCTTTTGTACTACACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGgtaaatGgCTCacaa
aGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCacACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTCGg
GTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCATGACGGTACCTAACCGAA

AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG
AACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTATTTcGnaGCAACGCGAAgaaCCTTACCAGGTCTTGACATCCCATGACAACCTCTAGAgAtanaGC
GTTCCCTTCGGGGacAtGGnnACAG

tGCCTatAnaTGCAaGTCGAGCGGATCTTTGAGAGCTTGCTCTCAaaGATTAGCGGCGGAcGGGTGAGTAACACG
TGGGTaACCTGCCTGTAAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATG
GTTGAAATTGAAAGGTGGCTTTTGTACTACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT
GGCTCACAAaGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCAAATAGGGCGGTACCATGACGGTAC
CTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGC
AAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AGCGGTGGaGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCATGACAACCTCTa
gagAtAGAGCGTTCCcnTTCGGGGGacATGgggAcAGgtgg

Prøve 23

gnngccTAcAcaTGCAaGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGAC
CAAAGAGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCT
CACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCC
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCATATCTTGACGTTAGCGACA

GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAACCGCATTTGAAAC
TGGTGAAGTAGAGTGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATA
CCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGACACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGC
GTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGt
GGAGCATGtggTTTTAATTCGATGCAACGCGAAgAACCTtaCCtACTCTTGAnntc

Ingen resultat

Prøve 24

GggGCCTacAcaTGCAaGTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGggTgAGT
AATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGAC
CAAAGAGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCT
CACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCATATCTTGACGTTAGCGACA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAACCGCATTTGAAAC
TGGTGAAGTAGAGTGTCTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATA
CCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGACACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGC
GTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAaTGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGT
gaAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCaaCGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGAcATCCACAGAAaAaGACCAannaT
GGACTT

cCTaanAcATGCaAGTCGAGCGGTAaCAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGggTgAGTAAT
GCCTGGGAATATGCCTTGATGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGACCAA
AGAGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCTCAC
CAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCTT

CGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCATATCTTGACGTTAGCGACAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAACCGCATTTGAAACTGG
TGAAGTAGAGTGCTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCA
GTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACAGACaCTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGaGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTtCGGAGCTAACGCGT
TAAGTATAcCGCCTGGGGAGTAcGGTCGCAAgatnAAAACTCAAATGattnGacGgng

Prøve 27

AGcGGtAAcaggaatTAgCTtGctanTTcgcTGAcGAGcGgnGGnnnnnnnnnnnnngncTGGGAAtATGcCttg
ntGTGGGGGATAACTATTGgAAACGATAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGACCAaAGAGGGGGATCtTCggAC
CTCTCGcGcnaaGATTAgCCCaGGtGAGATTAGCTAGtTGGTGAGGTAAGAGCTCACCAAGgcgaCgATCTCTAG
CTGGtCTGAGAGGATGATCAgcCACaCTGgAACTGAgACaCGGtCCagACTCCTACGGGAGGcagcaGTGgGgAA
TATTGcacaatGgGcGAAAGCCTGAtGCaGCCATGCCGCGtGtATGAAGAAgGcCTTCgggtTGtAAagtACTTT
CaGtCgnGAggaagGgnGT

cnTGCAGTCGAgcGGtaacaGnnatTagcTTGcgtaatTcgcTGACGAGCGGcGGAcGGGTGAgtnatGcctG

Prøve 33

cGtAttaataCcgCnTACGACCTACGGgaGAAaGGGGCaGtttactGCTCtCGCtaTtAgATGAGCCnngnTCn
nannnnnnnGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC
CGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCGTATC
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCttcGGTTAA
TACCCggaGACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGG
GCTTAACCTGGGAAGTGCATCTGAAACTGTTAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGGAAGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCTTCTTGGCATCATACTGACACTGAGGCTCGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGGTCC
TTGAGGACTTAgTGACGCAGCTAACGCAATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACTCAAAT

GAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGtgngtAAATTCGATGCAACgCGAagAaaCCTTACCTGGtC
TTGAcATATCTAgAATCCTGCAGAGATgnGGgAgtgCcTTcng

TaCcgCntaCgAcCtaCGGgaGaaaGGGGgcaGtttactGCTCtCGCTattagAtGAGCCnngnTCnnnnnnnnn
nGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACCCGGGACTG
AGACACGGCCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAAACCTGATCCAGCCATG
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGTGAAGAAGACTCttcGGTTAATACCCgga
GACGATGACATTAGCTGCAGAATAAGCACCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGAGCGTAGGTGGCTTGATAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACC
TGGGAACTGCATCTGAAACTGTTAGGCTAGAGTAGGTGAGAGGGAAGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCTTCCTGGCATCATACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGG
GTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTCGTTGGGTCCCTTGAGGAC
TTAGTGACGCAGCTAACGCAaTAAGTAGACCGCTGGggAGTACggCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACctGGTCTTGACTATC
TAGAATCCTGCAAnnaTGggggaGtGCCT

PCR-metode

Sample solution preparation (Nucleic acid extraction)

This RNA-based qPCR kit does not include reagents for nucleic acid extraction. Please extract nucleic acids from your samples using a method of your choice, such as a column or magnetic beads-based method prior to performing qPCR tests.

Reaction preparation (Nucleic acid amplification)

For instruments that don't require ROX dye

A: Preparation of dilution series for generation of a standard curve (Optional)

1. Make a 10 fold serial dilution of positive control from 10^6 copies/ μl to 10^1 copies / μl .
Pipette 100 μl of Positive Control reconstitution buffer into PC and mix well. (The concentration of PC in this tube is 10^6 copies/ μl .)
2. Pipette 45 μl of Dilution buffer into 5 tubes and label 5-1 (10^5 - 10^1 copies/ μl)
3. Pipette 5 μl of positive control DNA (from step 1) into tube 6
4. Vortex thoroughly
5. Change pipette tip and pipette 5 μl from tube 6 into tube 5
6. Vortex thoroughly
7. Repeat steps 5 and 6 to complete the dilution series

B: Preparation of qPCR reagents

1. For each unknown sample and/or positive or negative control prepare a reaction mix according to the table below:

Component	Volume
Reagent B Master Mix with stabilizer (w/o Rox)	11 μ l
Reagent C Primers & probe	39 μ l
Final volume	50 μ l

2. Pipette 50 μ l of the mix into individual wells, according to the real-time PCR experimental plate set up.
3. Pipette 5 μ l of each sample solution (see nucleic acid extraction) into the wells according to the qPCR experimental plate set up. The final volume in each unknown sample well is 55 μ l.
4. For negative control wells, use 5 μ l of Negative Control. The final volume in each negative well is 55 μ l.
5. If a standard curve is to be included for quantitative analysis, prepare a reaction mix according to the table above and pipette 5 μ l of standard template (standard curve dilution series) into each well for the standard curve according to your experimental plate set up. The final volume in each positive well is 55 μ l.
6. Always run at least one positive and one negative controls with the samples in each run.

C: Amplification conditions (thermal program)

50 °C	15 min	Reverse transcription	
95 °C	5 min	Enzyme activation	
95 °C	10 sec	Denaturation	40 cycles
60 °C	40 sec	Data collection*	

*Fluorogenic data should be collected during this step through the **FAM** channel.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no