

2016

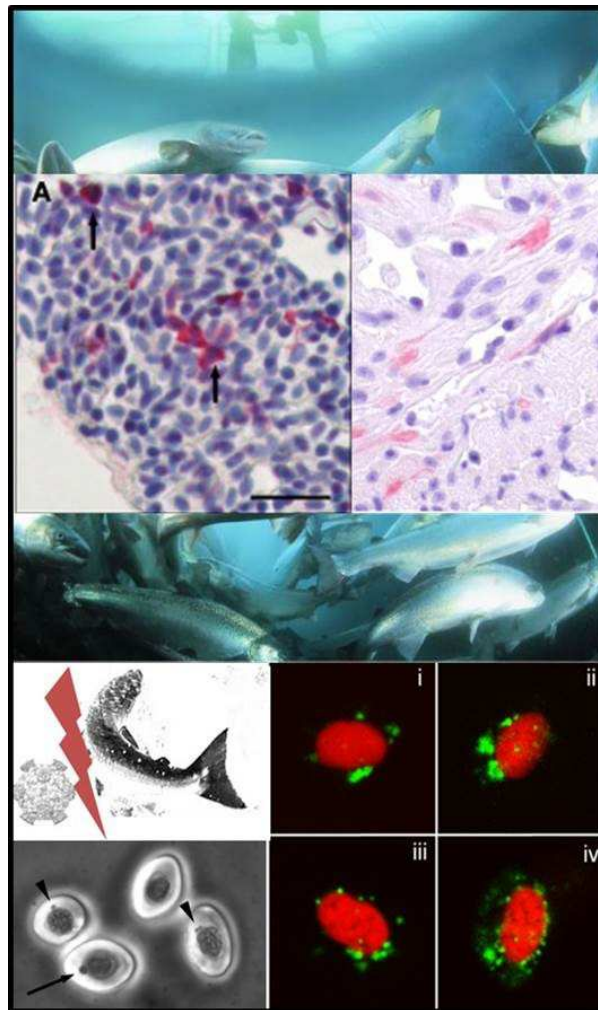


Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute



Sluttrapport

Maria K Dahle
Morten Lund
Sven Martin Jørgensen
Espen Rimstad
Vidar Aspehaug



Effekter av PRV-infeksjon på robusthet hos laks – mer enn HSMB?

Smitteforsøk for å avklare effekter av Piscine orthoreovirus-infeksjon i laksens røde blodceller på robusthet mot hypoksi, smoltifisering, stress og sekundærinfeksjoner

Innhold i sluttrapport

1. Sammendrag	2
1.1. Norsk Sammendrag	2
1.2. English summary	3
2. Innledning	4
2.1 Bakgrunn	4
2.2 Prosjektets omfang	6
2.3 Prosjektorganisering	7
3. Problemstilling og formål	8
3.1 Prosjektets effektmål	8
3.2 Prosjektets resultatmål	9
4. Prosjektgjennomføring	10
4.1 Analysemetoder	10
4.2 Tidsplan	14
5. Oppnådde resultater	15
5.1 Arbeidspakke 1- Smoltifisering	15
5.1.1 Hypoteser og forsøksoppsett	15
5.1.2 Prøver/tester/hendelser under forsøket	16
5.1.3 Forsøksresultater	17
5.1.4 Måloppnåelse	18
5.2 Arbeidspakke 2 – Oksygenstress	19
5.2.1 Hypoteser og forsøksoppsett	19
5.2.2 Prøver/tester/hendelser under forsøket	20
5.2.3 Forsøksresultater	21
5.2.4 Måloppnåelse	25
5.2.5 Konklusjon	26
5.2.6 Videre arbeid	26
5.3 Arbeidspakke 3 – PRV/SAV koinfeksjon	26
5.3.1 Hypoteser og forsøksoppsett	26
5.3.2 Prøver/tester/hendelser under forsøket	27
5.3.3 Forsøksresultater	27
5.3.4 Måloppnåelse	33
5.3.5 Konklusjon	33
5.3.6 Videre arbeid	34
5.4 Nytteverdi for næringen	35
6. Leveranser	36
6.1. Leveranseoversikt	36
6.2 Vitenskapelige arbeider	36
6.3 Presentasjoner	37
7. Kvalitetssikring	37
8. Referanser	38

1. Sammendrag

1.1 Norsk sammendrag

Hjerte og skjelettmuskelbetennelse er en av de mest utbredte virussykdommene i norsk fiskeoppdrett, og sykdommen er nylig også påvist i Canada og Chile. Viruset som er assosiert med sykdommen, *Piscine orthoreovirus* (PRV), infiserer hjertet forut for betennelsesreaksjonen som karakteriserer HSMB, og tidlig i infeksjonssyklus infiserer og replikerer PRV i laksens røde blodceller. Ved kartlegging av PRV i oppdrettsanlegg ble det gjort funn som kunne tyde på at PRV kunne være knyttet til andre problemstillinger enn HSMB. Det ble mistenkt en effekt av PRV på smoltifisering, sensitivitet for hypoksisk stress og følsomhet for koinfeksjoner.

Samlet dannet dette utgangspunktet for en hypotese om at den omfattende infeksjonen i blodceller kunne ha mange konsekvenser for fiskens helse og prestasjon i tillegg til utviklingen av HSMB. Det var mulig at primære funksjoner som oksygentransport og immunrespons kunne bli påvirket av virusproduksjonen, og at HSMB bare representerte «toppen av isberget» når det gjaldt kort- og langtidseffekter av PRV-infeksjon.

Prosjektet ble bygget opp rundt kohabitantsmitteforsøk med PRV som skulle avklare interaksjonen mellom PRV og følsomhet for hypoksisk stress og PRV og sekundær infeksjon med viruset som gir PD; salmonid alfavirus (SAV).

For å kartlegge effekten av PRV på toleransen for forhold med lav O₂-metning ble det utført to tester med kontrollert hypoksi. En 4 timers stresstest ved 40% O₂, og en letal hypoksisstresstest med en oksygenmetningsreduksjon ned til under 20%. I tillegg ble oksygenbindingsevnen målt med en Hgb-O₂ dissosiasjonskurve, og virusøkning og histopatologiske forandringer analysert. Forsøkene viste at PRV-smitte økte følsomheten for letalt hypoksisk stress (< 20% oksygenmetning), en effekt som ble svakere når fisken hadde gjennomgått tidligere perioder med hypoksisk tilvenning/prekondisjonering (40% oksygenmetning). Det var ingen tendens til at periodene med 40% O₂ hadde negative utslag på infeksjonen eller sykdommen.

For å finne ut hvordan en forutgående PRV-smitte påvirket en sekundærinfeksjon med SAV og pancreas disease (PD), ble det satt opp en PRV kohabitantsmitte der SAV sybtype 2 og 3 ble introdusert etter 4 uker (tidlig koinfeksjon under toppen av PRV-replikasjon i blod), og 10 uker (sen koinfeksjon under fasen med HSMB-forandringer i hjertet). PRV og SAV ble fulgt med RT-qPCR og histopatologiske forandringer for begge sykdommer ble vurdert. Forsøket viste at PRV reduserte opptak av SAV og utviklingen av PD i opp til 10 uker, noe som muligens kan forklares ved at PRV initierer en langvarig antiviral respons. Hva som skjer etter denne fasen er fremdeles uklart.

Konklusjonen er at man bør vise varsomhet med å utsette PRV-smittet fisk for hypoksiske forhold, mens det ikke er grunnlag for å forvente dramatiske følger av en sekundær SAV-infeksjon de første par månedene av en pågående PRV-infeksjon.

1.2 English summary

Heart- and skeletal muscle inflammation is one of the most prevalent viral diseases in Norwegian salmon aquaculture, and the disease is recently described also in Canada and Chile. The virus associated with the disease, *Piscine orthoreovirus* (PRV), infects the heart prior to the characteristic inflammation in the epicardium typical for the disease. Early in the infection cycle, PRV infects and replicates in red blood cells. Screening of PRV for aquaculture has indicated that PRV infection may be linked to other conditions besides HSMI. Links to secondary infections, stress sensitivity and smolt quality has been suspected, and this could partly be explained by a blood cell infection. Together, this forms the basis on which the hypotheses of the project have been built. The PRV- infection of up to 50% of the blood cells at the peak phase could potentially have many effects on the health and performance in addition to HSMI development. Primary functions like oxygen transport and immune response could potentially be affected, and HSMI may just represent the “tip of the iceberg” of short- and long-term effects of PRV-infection.

This project was built on cohabitant challenge experiments with PRV intended to clarify the interaction between PRV and the sensitivity to hypoxic stress, and the interaction between PRV and SAV.

To map the effect of PRV-infection on the tolerance to low O₂-saturation, two tests with controlled hypoxia were performed. A 4h stress test at 40% O₂-saturation, and a lethal hypoxia stress test with O₂-saturation reduced to below 20%. In addition, heart rate and Hgb-O₂ binding was measured, along with virus levels and histopathological changes in the heart. The experiments showed that PRV-challenge increased the sensitivity to lethal hypoxic stress (< 20% O₂-saturation), an effect that could be prevented by earlier short periods of hypoxic “training”/preconditioning (4 h of 40% O₂-saturation). There were no signs of effects of the periods of 40% hypoxic “training” on virus levels or disease.

To explore how a primary PRV infection affected a secondary infection by SAV and development of PD, fish which were PRV-challenged by cohabitation were exposed to a secondary challenge by SAV subtype 2 or 3 after 4 weeks (early coinfection when PRV peaked in blood), and after 10 weeks (late coinfection when HSMI changes were visible in the heart). PRV and SAV were assayed by RT-qPCR and histopathological changes typical of both HSMI and PD were evaluated. The experiment showed that PRV infection protected the fish from a secondary SAV infection for at least 10 weeks by both reducing uptake of SAV and the development of PD, effects which may be partly explained by a long-lasting antiviral response induced by PRV. The effect after this initial period is still unclear.

In conclusion, PRV –infected fish should be protected from hypoxic conditions, whereas there is no reason to expect that exposure to SAV will worsen disease during the first couple of months of an ongoing PRV infection.

2. Innledning

2.1 Bakgrunn

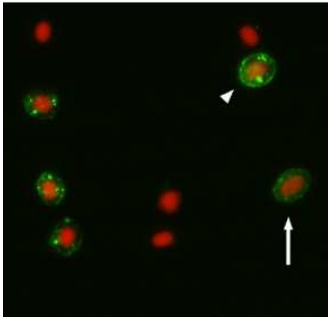
Utbrudd med Hjerter- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) ble først rapportert i Norge sent på 90-tallet, senere i Skottland, og nylig har det kommet fram at sykdommen også finnes i Canada og Chile(2-5). I 2010 ble det vist at Piscine orthoreovirus (PRV) var assosiert med sykdommen(6). Dette viruset har vist seg å være utbredt i oppdrettslaks over det meste av verden, og infiserer opp mot 90% av oppdrettslaksen i Norge (7). I 2015 ble det rapportert om HSMB- utbrudd på 129 matfisklokaliteter, tre settefiskanlegg og tre stamfiskanlegg (Fiskehelserapporten 2015), men siden sykdommen ikke lenger er meldepliktig, er nok dette en underrapportering.

Sykdommen karakteriseres ved at den starter som epikarditt og utvikler seg til massiv infiltrasjon av immunceller i det meste av hjertet (8, 9). De typiske histopatologiske forandringene, immunhostokjemisk farging av PRV i kardiomyocytter og genekspresjonsdata kan slå fast at det er snakk om HSMB og skille sykdommen fra andre sykdommer som gir hjerteforandring (10, 11). I tillegg til dette ser man ofte betennelse i rød muskulatur, sirkulasjonssvikt, gul lever, oppsvulmet milt, væske i bukhulen og punktblødninger i perivaskulært fett (8).

PRV hører til familien *Reoviridae*, og er nærmest beslektet med genus *Orthoreovirus* som før 2010 ikke var funnet i fisk, men kjent for å infisere fugl (avian orthoreovirus), og pattedyr (mammalian orthoreovirus)(12, 13). Nylig er det påvist tre andre orthoreovirus i fisk (14-16), hvorav to er assosiert med sykdom. Genus *Aquareovirus* er imidlertid funnet i mange fiskearter tidligere. Å kjenne virusets genus er viktig for å kunne forstå virusets patogenese og målorganer/celler.

Mammalsk reovirus (MRV) er som PRV også svært utbredt og lavpatogent i mennesker, MRV fester seg til røde blodceller via et reseptorbindende protein i ytre viruskappe som heter $\delta 1$ (17), og noen subtyper av MRV er vist å kunne infisere hjertet og gi myokarditt i mus(18).

PatoGen har utført en omfattende kartlegging av PRV i oppdrettsanlegg og nylig utviklet verktøy som tillater fylogenetiske analyser som kan gi informasjon om virusets opprinnelse og spredningsvei. Resultater fra tidligere screeningsprosjekter tyder på at det kan være en mulig sammenheng mellom PRV infeksjoner og kvalitet på smoltifisering, og at utbrudd av HSMB i smoltifiseringsfasen kan likne og noen tilfeller diagnostiseres som en annen sykdom, nemlig hemorragisk smoltsyndrom (19). Dette er det siden prosjektstart blitt oppmerksomhet rundt i diagnostikken, og man skiller nå disse to sykdommene bedre. PRV-infeksjon kan muligens også påvirke følsomhet for andre infeksjoner. PatoGen har gjort observasjoner i sjøanlegg som tyder på at utbrudd av pancreas disease (PD) skjer i etterkant av en PRV-topp med dødelighet. PD skyldes salmonid alphavirus (SAV), og noe kunne tyde på at virusinfeksjonene påvirket hverandre. Denne linken ble undersøkt nærmere i dette prosjektet.



Figur 1: PRV-infiserte erythrocytter fra laks, farget med primærantistoff mot PRV-proteinet $\delta 1$ som sitter i virusets ytre kapsid, og grønt sekundærantistoff (Alexa 455). Virusinkludjoner er synlige i cytoplasma. Kjernen er farget rød med propidiumjodid (1).

Prosjektets forskere fra NVI og NMBU har i perioden 2014-2015 rapportert at PRV kan infisere røde blodceller i laks, og at mer enn 50% av populasjonen i individuelle fisk kan være infisert ved toppfasen av infeksjonen(1). Endringene i de røde blodcellenes genuttrykk etter infeksjon tyder på at de bruker sin kapasitet til å mobilisere en antiviral respons ved siden av virusproduksjonen (20). Det er også vist uttrykk av gener som kan være knyttet til immunsuppresjon (20), og derfor kan en PRV infeksjon påvirke en sekundærinfeksjon på flere måter. PRV-infeksjonen antas også å kunne ha flere sekundæreffekter på fiskens helse og robusthet. Blant annet ved å påvirke blodcellenes normale funksjoner som oksygenbinding og oksygentransport til muskel og dermed gjøre fisken mer sensitiv for situasjoner som krever økt oksygenopptak (som stressende håndtering), lav tilgang på oksygen, eller for endringer under smoltifiseringsfasen. Dette kan igjen påvirke funksjonen til hjerte og skjelettmuskel og kan føre til en påkjenning som kommer i tillegg til selve virusinfeksjonen i hjertets myocytter og den immuncelleinfiltrasjonen i hjertet som er typisk for HSMB (9, 21).

Den nye informasjonen om PRV infeksjon er sentral for forståelsen av primære og sekundære effekter og utvikling av HSMB. Andre organer er også vist å være affisert ved en PRV infeksjon, inkludert lever, nyre og milt(8, 9), men det er uvisst hvordan sammenhengen er mellom PRV i blodceller og funksjonelle forandringer i disse organene. Genmarkører for cytotoxisk immunrespons øker når det er virus til stede i milt, og tyder på en målrettet respons mot infiserte blodceller(11, 22). For å kunne måle disse og andre effekter av PRV-infeksjon trenger man videre forskning.

Forskningsgruppen har også etablert et system for ex vivo produksjon av PRV i røde blodceller fra laks, noe som kan benyttes for å øke forståelsen for hva som stimulerer virusets replikasjon og for hvordan viruset påvirker cellenes funksjon (23).

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet var lagt opp rundt tre arbeidspakker som skulle klarlegge effekten av tre faktorer som var forventet å kunne gi utslag kombinert med PRV-smitte, hvor hver arbeidspakke var bygget rundt ett større smitteforsøk.

- AP1. PRV og smoltifisering
- AP2. PRV og oksygenstress
- AP3. PRV og kosmitte med SAV



Figur 2: Oversikt over arbeidspakker med opprinnelig tidsskjema Kilde:

[http://www.vetinst.no/Utvidet-prosjektbeskrivelse/Gaaten-HSMB/\(language\)/nor-NO](http://www.vetinst.no/Utvidet-prosjektbeskrivelse/Gaaten-HSMB/(language)/nor-NO)

Prosjektet ble startet opp 1. august 2014 og hadde planlagt prosjektslutt 1. april 2016 (20 mnd). Avslutningen ble senere utsatt til 1. Juli 2016 pga forsinkelse i gjennomføring av smitteforsøkene. Det ble bevilget 4,05 millioner til prosjektet fra FHF som skulle dekke smitteforsøkene og analysene i tillegg til noen forskertimer primært for Nofima og NMBU. I tillegg ble en NFR-finansiert stipendiatstilling ved Veterinærinstituttet og en 50% ingeniørstilling ved NMBU allokert til dette prosjektet i 20 mnd. PatoGen bevilget 50% rabatt på analyser av smitteforsøkene.

Partner	FHF 2014-2016	Egenandel
NVI	410 000	Stip 20 mnd
NVI-VESO	1 930 000	-
NMBU-Vet	500 000	50% ing. 20 mnd
PatoGen	350 000	350 000
Nofima	860 000	-
Total	4 050 000	

Tabell 1. Fordeling av midler fra FHF mellom partnerinstitusjonene og egenandel.

2.3 Prosjektorganisering

2.3.1 Prosjektgruppe

Prosjektleder **Maria K. Dahle** ved Veterinærinstituttet har vært ansvarlig for leveranser, styringsgruppemøter og rapporter på prosjektet. Partnerinstitusjonene har vært representert av **Espen Rimstad** (NMBU), **Vidar Aspehaug** (PatoGen) og **Sven Martin Jørgensen** (Nofima). Stipendiat **Morten Lund** har hatt det praktiske ansvaret for gjennomføringen av smittestudiene og nærmest fulltidsengasjert på prosjektet i 2 år.

2.3.2 Andre som har bidratt til prosjektet

VESO Vikan har utført alle smittestudiene og vært en fleksibel samarbeidspartner i forhold til de utradisjonelle forsøksoppsettene. Ansvarlige fra VESO: Anne Ramstad (AP1), Christan Wallace (AP2), Audur Thorisdottir (AP3).

Ingvild B. Nyman (NMBU/Rimstad-gruppen): har vært involvert i prøvebehandling og analyse på alle arbeidspakker.

Magnus Røsæg (Næringsstipendiat i SalMar) har jobbet tett sammen med Lund på arbeidspakke 3 PRV/SAV kosmitte.

Aleksei Krasnov (Nofima): har vært involvert i planlegging og analyser/bioinformatikk på arbeidspakke 3

Gerrit Timmerhaus (Nofima): har vært involvert i hjerteratemålinger og dataanalyse på arbeidspakke 2, og bidratt til analyser på arbeidspakke 3.

Mark Powell (NIVA/UiB): har vært involvert i planlegging og Hemoglobin-oksygenbindingsassay på arbeidspakke 2.

Hilde Sindre/Torunn Taksdal (Veterinærinstituttet): har bidratt med SAV smittemateriale, planlegging av smitte modellen, og SAV nøytraliseringsanalyser til arbeidspakke 3.

Marta Alarcón (Veterinærinstituttet) har stått for opplæring av Morten Lund i histopatologisk vurdering av HSMB.

2.3.3 Styringsgruppen for prosjektet

Arne Guttvik (SalMar)

Kari Lervik (Sinkaberg Hansen)

Olav Breck (Marine Harvest Aug 2014 – Juni 2015) erstattet av **Gordon Richie** (Juni – oktober 2015), erstattet av **Harald Takle** (Okt 2015-)

Merete Bjørgan Schrøder (Kontaktperson for prosjektet i FHF)

3. Problemstilling og formål

3.1 Prosjektets effektmål

HSMB er en svært utbredt infeksjonssykdom i norsk oppdrettslaks. Man finner nå PRV-infeksjon i det meste av oppdrettslaks i sjøfasen, og i økende grad i ferskvannsanlegg. Tap som følge av HSMB kan variere mye uten at man kjenner grunnlaget for hvorfor, og det kan også være PRV-relaterte tap som ikke kan diagnostiseres som HSMB. Forståelse for virusets patogenese og andre aspekter ved infeksjonsforløpet og sykdomsutviklingen kan lede til bedre kontroll på tap, med positiv økonomisk betydning for lakseoppdrettsnæringen.

Forståelse for hvordan laks takler infeksjonssykdom er viktig for å kunne håndtere infisert fisk på en forsvarlig måte. Sammenhengen mellom infeksjon, sykdom og håndtering trenger fokus, og dette prosjektet har som mål å utforske hvordan et så utbredt virus som PRV påvirker fiskens motstandsdyktighet. Blir fisken mer følsom for styrt smoltifisering, situasjoner med lavere tilgang på oksygen, eller for sekundærinfeksjoner? Prosjektet har fokus på en av de underliggende årsaker til tap og mortalitet i oppdrettsnæringen, bedrer vår forståelse for laksens respons på virussykdom og tillater en optimalisering av screeningsrutiner og håndteringsprosedyrer så man kan unngå unødig tap.

Kunnskapen er viktig for å enten kunne innrette seg slik at man unngår tap som følge av PRV-infisert fisk, men også for å kunne lette på bekymring i oppdrettsnæringen som kanskje er unødig hvis PRV-infisert fisk er mer robust enn vi tror.

3.2 Prosjektets resultatmål

Arbeidspakke 1: Smoltifisering

Klargjøre effekten av PRV-infeksjon på smoltifisering og effekten av smoltifisering på patologi og mortalitet i PRV-smittet fisk.

1. Finne svar på om PRV infeksjon før smoltifisering påvirker smoltkvalitet og prestasjon i sjøvann.
2. Klargjøre om PRV-infisert fisk utvikler HSMI når den infiseres i ferskvann.
3. Beskrive patologiske forandringer i PRV-infisert fisk gjennom smoltifiseringsfasen i lys av standard HSMB og HSS-patologi.
4. Klargjøre om smoltifisering trigger sykdom og mortalitet i PRV-infisert fisk.
5. Undersøke om smoltifisering påvirker PRV replikasjon og virusnivåer i blod, hjerte, muskel, milt og hodenyre.
6. Danne en basis for informasjon og forslag til håndtering av PRV-infisert fisk i ferskvannsfasen, og gi anbefalinger for PRV-monitorering før smoltifisering.

Arbeidspakke 2. Oksygenstress

Klargjøre effekten av PRV-infeksjon på fiskens følsomhet for stress pga redusert oksygenmetning

1. Studere hvordan fisk med PRV-infiserte erythrocytter tåler forhold med lav oksygentilgang sammenliknet med uinfisert fisk.
2. Analysere infiserte erythrocytters evne til oksygenopptak sammenliknet med uinfiserte erythrocytter.
3. Studere hvordan oksygenforholdene påvirker PRV infeksjonskinetikk.
4. Klargjøre om kombinasjonen av lav oksygenmetning, PRV-infeksjon og stress-induksjon kan ha en rolle i å styre inflammasjon og patologiutvikling i hjerte under PRV infeksjon.
5. Benytte ny kunnskap som en basis for å utvikle håndteringsprosedyrer og kontrollrutiner for å unngå oksygenstress-indusert tap av PRV infisert fisk.

Arbeidspakke 3. Koinfeksjon

Studere interaksjonen mellom PRV og en sekundær SAV-infeksjon i en HSMI/PD koinfeksjonsmodell

1. Studere om en etablert PRV infeksjon påvirker smittekinetikken til SAV3 og SAV2 (virus i blod og hjerte).
2. Undersøke hvorvidt en PRV/SAV koinfeksjon endrer sykdomsutvikling og patologi.
3. Studere forskjeller i effekten av SAV3-introduksjon tidlig og sent i en PRV infeksjonssyklus.
4. Se etter forskjeller mellom SAV2 og SAV3 under interaksjon med PRV

4. Prosjektgjennomføring

Smitteforsøkene i denne studien er «spesialkonstruert» i betydning av at de skulle kombinere en tradisjonell PRV kohabitantsmittemodell med en tilleggsfaktor som smoltifiseringsregime, oksygenstress og SAV kosmitte, noe som krevde et tett samarbeid med VESO Viken om detaljene rundt utførelsen. Viken har nå en stabil og fin smittemodell for PRV/HSMB takket være et nært samspill med NMBU (Wessel) om bruk av PRV-infisert blod som smittemateriale (1), og de har også en god modell for PD med både SAV2 og SAV3 utviklet i samspill med VI (Sindre/Taksdal)(24).

4.1 Analysemetoder

Analysemetodene som ble benyttet i alle smitteforsøk var RT-qPCR for virusanalyser og histopatologi. I arbeidspakke 2 ble det i tillegg utført fysiologiske tester som hjerteratetest og akutt hypoksi-stresstest/HCT, oksygenbindingsanalyser og hemoglobinmålinger. For arbeidspakke 3 ble det utført genanalyser i form av mikroarray og RT-qPCR. Det ble også utført utvidede analyser på prøvematerialet fra arbeidspakke 1, som proteinanalyser og antistoffanalyser, og utvidede analyser for AP 3 som antistoffsekvensering og SAV nøyktaliseringstest, men dette lå utenfor prosjektets målsetninger

RT-qPCR for PRV og SAV

PatoGen AS har utført RNA ekstraksjon og RT-qPCR-analyser for PRV and SAV i hjerte og blod ifølge ISO17025 standard. Elongeringsfaktor 1 α (EF1 α) ble analysert som internt

referansegen i alle prøver. Prøver med PRV eller SAV Ct lavere enn 37.0 ble regnet som positive.

Histopatologiske vurderinger

Formalinprøver (hjerte, pancreas) ble støpt i paraffinblokker, snittet og farget med hematoxilin-eosin, blindet og vurdert histopatologisk for forandringer typiske for HSMB og PD. Forandringene ble evaluert i forhold til en skala fra 0-3 (Tabell 2)

Histopathology score	Myocard	Epicard
0, no pathology	No pathological changes	No pathological changes
1, sparse	Focal inflammation reactions	Focal inflammation reactions
2, moderate	Multifocal inflammation reactions	Up to four layers of inflammations cells in most of epicard
3, extensive	Diffuse inflammation reactions in heart tissue, pancarditis	More than four layers of inflammation cell in most of epicard

Tabell 2. Histopatologisk evalueringsskala (Engelsk)

Hypoksisk stresstest (Hypoxia challenge test, HCT)

Dette er en test hvor fisken utsettes for gradvis økende hypoksiske forhold (reduert O₂ metning i vannet) inntil fisken mister likevekt, såkalt initiell letal oksygenmetning (ILOS). Formålet var å teste om PRV-smittet fisk hadde en lavere hypoksitoleranse ved ulike stadier av infeksjonen sammenliknet med usmittet fisk. Testen ble utført i et 'common-garden' forsøk i et separat kar, og 30 fisk fra hver forsøksgruppe ble overført til dette karet for akklimatisering i 20 timer før testen. Fisken var merket med PIT-tag og kunne dermed spores til opprinnelsesgruppe. Testen består av en relativt rask senkning av O₂-metningen ned til 25% i løpet av ca 1 time ved å tilføre N₂-gass, fulgt av en langsom reduksjon ved å boble inn nitrogen inntil fisken mister likevekt. Når det skjer scannes fiskens PIT-tag slik at gruppetilhørigheten kan knyttes til tid og O₂-metning hvor den individuelle fisken mistet likevekt (ILOS). I tillegg ble en andel fisk (10-20) per gruppe prøvetatt slik at virusnivå og patologiske forandringer kunne knyttes til data fra denne testen. Testen er utviklet av Guy Claireaux (25) og tilpasset av Sven Martin Jørgensen i samarbeid med prosjektdeltakerne. Fisk som hadde gjennomgått testen ble terminert og prøvetatt (Hjerte, gjelle blod).



7. Sven Martin Jørgensen utfører hypoksisk stresstest/HCT

Hjerteratetest

Formålet med testen var å finne ut om PRV-smittet fisk og/eller fisk med histopatologiske forandringer i hjertet hadde en endret maksimal hjerterate og optimal temperatur for aerob kapasitet sammenliknet med kontrollfisk. Hjerteratemålinger ble utført ved hjelp av «maximum heart rate methodology» (26). Testen utføres på sedert fisk som plasseres i et kammer med vann kontrollert ift oksygenmetning over gjellene. Elektroder innebygget i kammeret registrerer hjertekontraksjoner i en EKG. Etter 30 minutter akklimatisering økes vanntemperaturen gradvis mot en maksimaltemperatur på 22-24°C i løpet av 45 minutter. Fisk som hadde gjennomgått testen ble terminert og prøvetatt (Hjerte og blod).



8. Gerrit Timmerhaus overvåker hjerteratemålingene

Hgb-O₂ dissosiasjonskurve

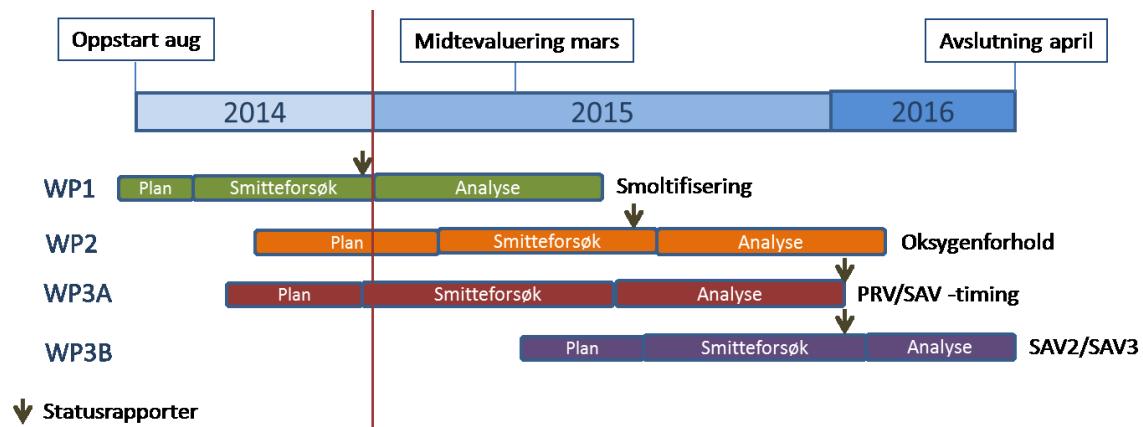
For å finne ut om PRV-infeksjon påvirket oksygenbindingsevnen til erythrocyttene ble det utført en oksygenbindingstest på heparinisert blod. Blodet ble umiddelbart tilsatt 10 μ M propranolol for å blokkere β -adrenoreceptorer som kan påvirke oksygenbindingsevnen. 2-2,5 ml blod ble overført til et roterende blod-tonometer ved 11-13°C og gasset med romluft. Deretter ble avgassingsraten studert ved gradvis tilføring av N₂ gass og måling av PO₂ vha Tucker-metoden ved 5-7 punkter underveis i prosedyren. Verdiene ble deretter korrigert for hemoglobinnivåer målt spektrofotometrisk ved hjelp av Drabkins løsning (omdanning til cyanmethemoglobin). Fra disse dataene ble en oksygendissosiasjonskurve tilpasset per blodprøve og PO₂ ved 50% oksygenmetning beregnet. Blodets ATP-konsentrasjon ble også beregnet vha et ATP kolorimetrisk/fluorometrisk assay kit (Sigma).



9. Mark Powell med sitt utstyr for Hgb-O₂-dissosiasjonsmålinger

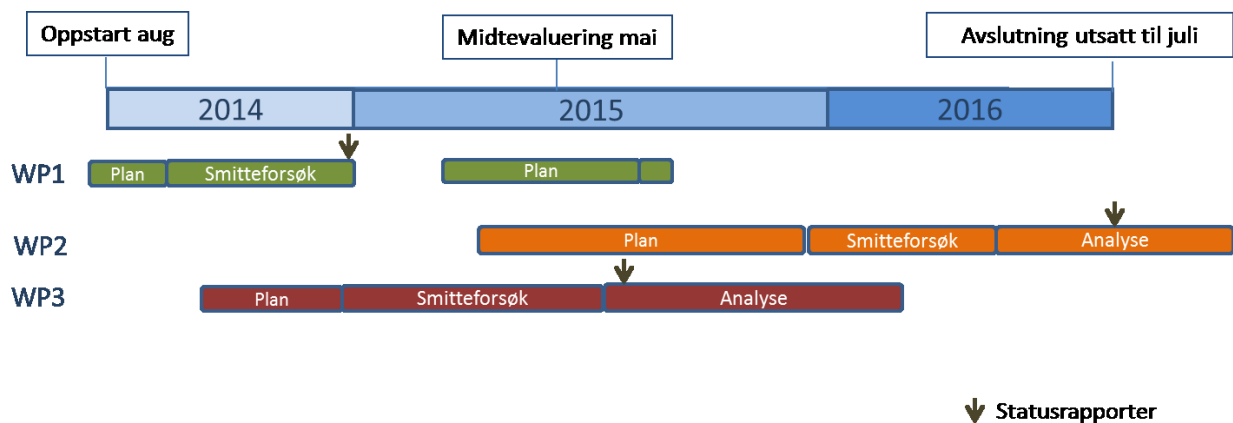
4.2 Tidsplan

Prosjektet ble lagt opp med varighet i underkant av 2 år, hvor opprinnelig plan hadde følgende tidslinje.



Figur 3. Initiell tidslinje fra 2014 for smittestudiene i «HSMImore»

Endelig tidslinje etter alle endringer og erfaringer underveis ble som følger:



Figur 4. Endelig tidslinje av 2016 for smittestudiene i «HSMImore»

5. Oppnådde resultater

5.1 Arbeidspakke 1 – smoltifisering

5.1.1 Hypoteser og forsøksoppsett

I denne arbeidspakken skulle vi utføre et smitteforsøk ved VESO Viken der PRV ble introdusert ved kohabitantsmitte i ferskvann under en tradisjonell lysstyrt smoltifiseringsprosess som besto av 6 uker «vinter» (12:12) og 6 uker «sommer» (24:0) fulgt av overføring til sjøvann.

Det var to hovedhypoteser som lå til grunn. Den ene hypotesen var at PRV-smitte kunne redusere smoltkvalitet og gi dårligere prestasjon i sjø, den andre var at PRV-smitte før og under smoltifiseringsfasen kunne gi et annet sykdomsbilde enn tradisjonell HSMB, og derfor kunne være vanskeligere å diagnostisere.

Det ble satt opp en standard kohabitantsmitte i to parallellkar der fisk som allerede hadde vært to uker ved 12:12 ble eksponert for shedderfisk som var injisert med PRV smitemateriale (Sheddere) preparert fra blodpellet i et 1:1 forhold. Smittematerialet har utgangspunkt i et norsk HSMB-utbrudd i sjø i 2012. Etter fire uker smitte ble fisken satt på 24 timer lys (Både sheddere og kohabianter) for de neste 6 ukene. Målet med tidsvalget var å treffe virusets tidlige replikasjonsfase med begynnelsen av lysbehandlingen. Deretter ble både sheddere og kohabitanter fulgt gjennom studien med uttak på 8 fisk per gruppe per kar pluss tilleggskisk til smolttimeranalyser.

Studien hadde to parallelle forsøkskar og to kontrollkar. Ett kontrollkar hvor fisken ble smoltifisert med samme regime, men uten introdusert smitte, og ett der fisken ble PRV-smittet men ikke smoltifisert. Under oppstartsmøtet til prosjektet i august 2014 var dette smitteforsøket et hovedfokus, og det var en en diskusjon om gruppen som ikke skulle smoltifisere skulle holdes ved lysforhold 12:12 eller 24:0 gjennom hele forsøket, men ble til slutt bestemt at gruppen skulle gå ved 24:0. Det ble også diskutert om man skulle introdusere en stresstest i forbindelse med overføring til sjø for å mimikere naturlig stress ved transport og sjøsetting, og om man skulle forlenge sjøfasen fra 2 til 6 uker, noe som ville øke kostnadene til studien ift budsjettet. Det ble lagt inn en respirometritest på fisken ved overføring til sjø som Sven Martin Jørgensen, Nofima, utførte uke 11-12. En forlenget sjøfase ble også bestemt, men ikke gjennomført (forklart senere).

5.1.2 Prøver/tester/hendelser under forsøket

Ved 4, 6, 8 og 10 uker etter forsøksstart ble det tatt ut 8 sheddere og 8 kohabitanter per kar pluss 8 kontrollfisk fra usmittet kar til full organsampling:

- RNALater til qPCR: milt, lever, hodenyre, hjerte, hjerne, muskel (rød og hvit), gjelle, midt-tarm
- Formalin: hjerte, muskel, hodenyre, milt, lever, gjelle, midttarm
- Blod på heparin
- Hematokrittmålinger

I tillegg ble det tatt kun SmoltTimer[®] prøver (gjelle på RNALater) og blod på til sammen 30 fisk per gruppe i uke 4-10.

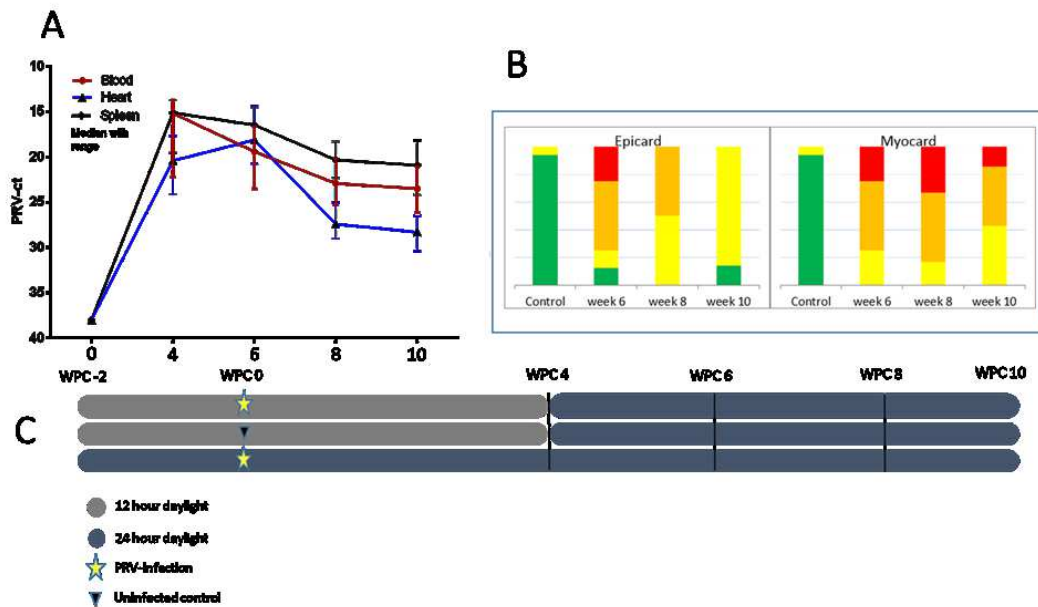
I uke 13 ble det imidlertid oppdaget en feil ved forsøket. Når morfologidata ble sammenstilt med smolttimer-analyser utført av PatoGen ble det oppdaget at forsøksfiskene var langt på vei smoltifisert allerede før forsøksstart. På en morfologiskala (parr-smolt, 0-4) viste fisken score 2,1 allerede før smitte, og usmoltifisert kontrollgruppe hadde en score på 3,5 ved eksperimentets uke 4 som var høyere enn gruppen som gikk med lysstyring. Vi slo da fast at vi hadde mistet kontrollgruppen og ikke kunne benytte studien til å nå målsetningene til arbeidspakken og den ble terminert. Dette ble nærmere forklart i statusrapporten med fokus på WP1 av 31.12.2014.

Det ble planlagt et nytt forsøk innenfor denne arbeidspakken året etter med oppstart høsten 2015. Denne gangen ble fisken analysert tidlig i forsøket. Fisken hadde smoltifiseringsscore 0 ved uke 0 og ble godkjent for forsøksstart, men etter 4 uker hadde usmoltifisert kontrollfisk nok en gang smoltifisert spontant i større grad enn forsøksfiskene, og forsøket ble igjen stoppet.

Det ble deretter bestemt i et møte i november 2015 at arbeidspakke 1 skulle tas ut av prosjektet siden at det bare var 5 mnd igjen av den opprinnelige prosjektperioden, og man ikke ville rekke gjennomføringen innenfor avsatt periode.

5.1.3 Forsøksresultater

Målsetningene kunne ikke nås for denne arbeidspakken med materialet fra studiene som ble delvis gjennomført. Men vi hadde gjennomført en vellykket smittestudie med PRV, og kunne studere viruskinetikk og HSMB-utvikling i ferskvann med innsamlet materiale (Figur 5). Resultatene kunne derfor benyttes til annen forskning på PRV patogenese og HSMB.



Figur 5. Resultater av HSMB smittestudie i AP1. Viruskinetikk gitt som Ct-verdier i blod, milt og hjerte (A) HSMB-utvikling scoret på en skala fra 0 (grønn, ingen inflammatoriske forandringer), score 1 (gul), score 2 (orange), til score 3 (rød, store inflammatoriske forandringer) (B) og en enkel versjon av det endelige forsøksoppsettet (C). Kun data fra ett parallellkar er vist, men det var ingen merkbare forskjeller mellom parallellene.

Bruk av materialet:

Materialet fra 2014 ble tilbudt stipendiat Lena H Teige som arbeidet med å utvikle et assay for spesifikk påvisning av PRV antistoff i plasma.

1. En studie av PRV-spesifikk antistoffproduksjon med et nyutviklet kulebasert assay ble derfor utført på materialet fra AP1-2014. Arbeidet foreligger som et manuskript:

Detection of Atlantic salmon antibodies against *Piscine orthoreovirus* (PRV) proteins by a bead based multiplex immunoassay Lena Hammerlund Teige, Morten Lund, Hanne Haatveit, Magnus Vikan Røsæg, Øystein Wessel, Maria K. Dahle, Anne K. Storset

2. Blod fra AP1-2015 ble tilbudt stipendiat Hanne Haatveit og benyttet til en studie på PRV proteinkinetikk. Dette arbeidet foreligger også som et manuskript:

Piscine orthoreovirus protein kinetics during infection of red blood cells in Atlantic Salmon Hanne Haatveit, Øystein Wessel, Ingvild Berg Nyman, Stine Braaen, Morten Lund, Turhan Markussen, Maria K Dahle, Espen Rimstad

5.1.4 Måloppnåelse

Problemstillingen i arbeidspakken ble møtt med tidligere samlet materiale i samarbeid med prosjektet «Multifactorial Diseases» #900658 ledet av Nofima (Lill-Heidi Johansen). Dette arbeidet ga et delvis svar på tre av arbeidspakkens målsetninger:

2. Klargjøre om PRV-infisert fisk utvikler HSMI når den infiseres i ferskvann.
Svar: Ja. Fisk i ferskvannsfasen utvikler også HSMB
4. Klargjøre om smoltifisering trigger sykdom og mortalitet i PRV-infisert fisk.
Svar: Det er en tendens til at perioden etter smoltifisering er preget av en annen immunrespons som muligens kan svekke fiskens virusforsvar.
5. Undersøke om smoltifisering påvirker PRV replikasjon og virusnivåer i blod, hjerte, muskel, milt og hodenyre.
Svar: Det er en tendens til at fisk som smittes i perioden rett etter smoltifisering har høyere virusnivåer i milt etter 10-12 uker, noe som kan tyde på mindre effektiv vertsbeskyttelse mot virus.

Denne samarbeidsstudien ble publisert i 2016 og er også tidligere rapportert inn som en del av prosjektet Multifactorial Diseases:

Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). Johansen LH, Dahle MK, Wessel Ø, Timmerhaus G, Løvoll M, Røsæg M, Jørgensen SM, Rimstad E, Krasnov A. *Mol Immunol.* 2016 Apr 18;73:138-150.

5.2 Arbeidspakke 2 – Oksygenstress

5.2.1 Hypoteser og forsøksoppsett

Dette forsøket hadde som mål å studere om PRV-smittet fisk hadde redusert toleranse for hypoksiske forhold, eller om hypoksi kunne være med på å forverre sykdomsbildet etter infeksjon med PRV.

Hypotesen bak forsøket var bygget på funnet av at opp til 50% av erythrocyttene kunne være infisert ved toppfasen av den systemiske PRV-infeksjonen. Det var sannsynlig at dette kunne ha en effekt på erythrocyttenes hovedfunksjon, evnen til oksygentransport. Det ville kunne føre til redusert levering av O₂ til indre organer som hjerte og muskel, slik at fisken tålte forhold med lav oksygenmetning dårligere.

Denne studien var utfordrende ift planlegging av fysiologiske tester som kunne avsløre fiskens hypoksitoleranse. Man ønsket også å treffe bestemte faser av infeksjonen med testene. Planleggingsfasen tok derfor lengre tid enn opprinnelig forutsett.

I denne studien ble en standard PRV kohabitantsmitte utført på sjøvannstilpasset Atlantisk laks (Standard SalmoBreed) utført ved VESO Viken i 2 kar med 1:1 forhold sheddere/kohabitanter og en usmittet kontrollgruppe i et tredje kar. Smittematerialet var lysert PRV-positiv blodpellet av samme opprinnelse som ved forsøket i AP1. All prøvetagning, tester og analyse i dette forsøket hadde fokus på kohabitantfisk. Alle kar hadde standard prøveuttak av 8 kohabitant/kontrollfisk uke 3, 4, 7, 10, 12 og 15 etter smitte. I det ene smittekaret (tank 1) ble fisken utsatt for en kontrollert hypoksiperiode på 4 timer ved 40% O₂-metning uke 4, 7 og 10, og prøvetatt før og direkte etter denne perioden. I de samme tre periodene ble også et større antall fisk tatt ut til forskjellige fysiologiske tester fra alle tre kar, terminert og prøvetatt.



Figur 6. Tidsskjema for hypoksi-smittestudien. Fysiologiske tester ble utført i avmerkede perioder uke 4, 7 og 10.

5.2.2 Prøver/tester/hendelser under forsøket

Vekt og lengde ble målt på all fisk som ble prøvetatt. Fulton's condition factor (k-factor) ble beregnet (k-factor = vekt i gram/lengde i cm⁻³ * 100).

Hjerte og gjelle ble prøvetatt på 10% bufret formalin for histopatologiske undersøkelser.

Hjerte og flere andre organer ble samlet på RNALater for RT-qPCR.

Heparinisert blod ble samlet for virusanalyser og hemoglobinanalyser.

WPC	0			4			7			10			12			15		
Group	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Routine sampling			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hypoxia challenge test				X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Heart rate measurement				X	X	X				X	X	X						
Hemoglobin oxygen dissociation curve			X	X		X				X		X						

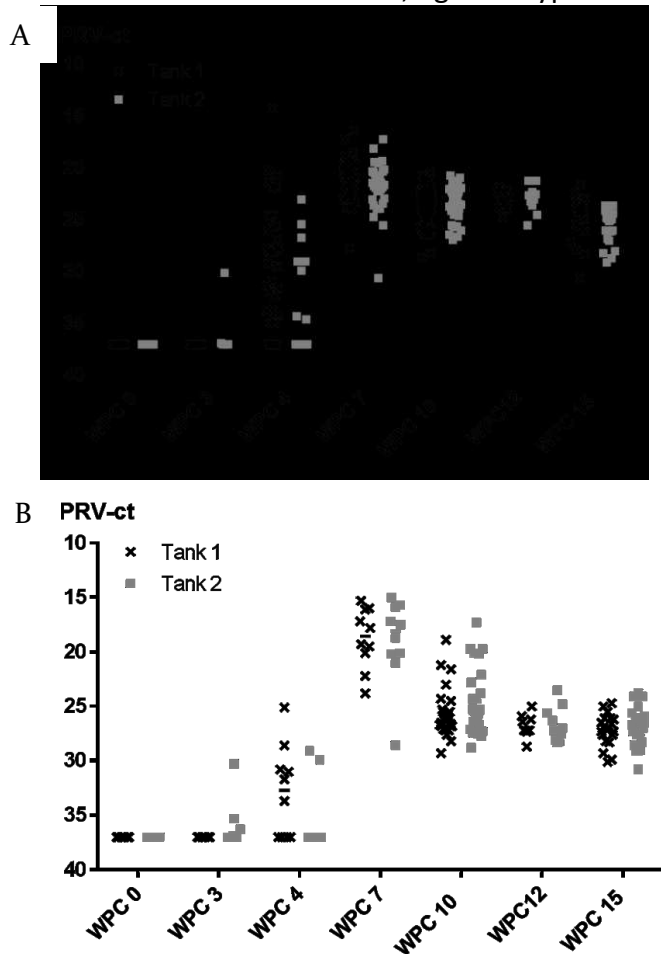
Tabell 5. Oversikt over prøvetagning i forsøket (engelsk)

40% Hypoksi-stresstest

Gruppe 1 i forsøket ble utsatt for en stresstest i uke 4, 7 og 10 der oksygenivået i tanken ble senket til ca 40% i 4 timer under overvåkning. Målinger av O₂-metning ble utført kontinuerlig med to oksygenprober. 10 fisk ble prøvetatt direkte etter avsluttet test, mens resterende fisk fortsatte i forsøket. Det var ingen mortalitet under eller etter denne behandlingen.

5.2.3 Forsøksresultater

Viruskinetikk (PRV) ble målt i blod og hjerte underveis i forsøket (Figur 10). Tank 1 og to er identisk smittet med PRV, og 40% hypoksitest ble utført i tank 1 uke 4, 7 og 10.

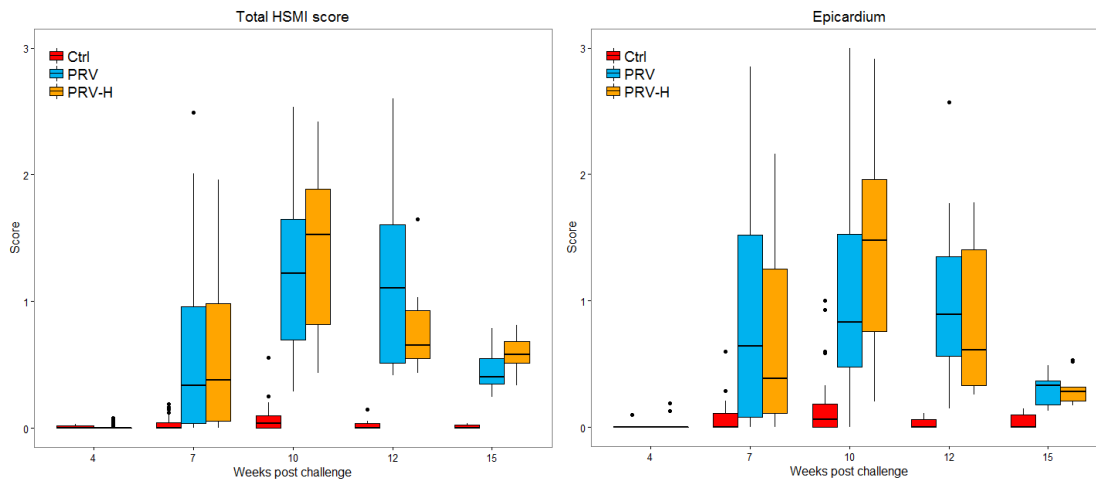


Figur 10. PRV Ct-verdier i blod (A) og hjerte (B) i kohabitantfisk fra tank 1 og 2

Målingene viste at virusreplikasjonen ikke var i gang uke 3, men var på vei opp i uke 4 da det fremdeles var mange virusnegative fisk i karet. På det tidspunktet var smittestatus svært variabel mellom individene. Fra og med uke 7 var smittestatus jevn i populasjonen og mellom kar 1 og 2. Det var ingen tendens til at 40% hypoksitesten utført i kar 1 hadde noen signifikant effekt på virusreplikasjon. Det er høyere virusnivåer i blod enn i hjerte helt fram til uke 15, noe som er typisk for PRV infeksjon i den tidlige fasen.

Histopatologiske analyser

Epikarditt og total hjertescore ble vurdert (Figur 11). Det var lik histopatologisk utvikling i kar 1 (PRV + 40% hypoksi) og 2 (PRV), med unntak av en tendens til forskjøvet forløp med mer forandringer uke 10 og mindre uke 12 for fisk utsatt for hypoksi (kar 1), som kan tyde på en kortere forløp av inflammasjonen i gruppen som har vært utsatt for hypoksi. Ingen av forskjellene var signifikante



Figur 11. Histopatologiske funn i hjerte (totalscore, epikarditt) i kohabitantfisk fra kar 1 (40% hypoksi, PRV-H, oransje), kar 2 (PRV, blå) og uinfisert kontrollfisk (Ctr, rød) i uke 4-15

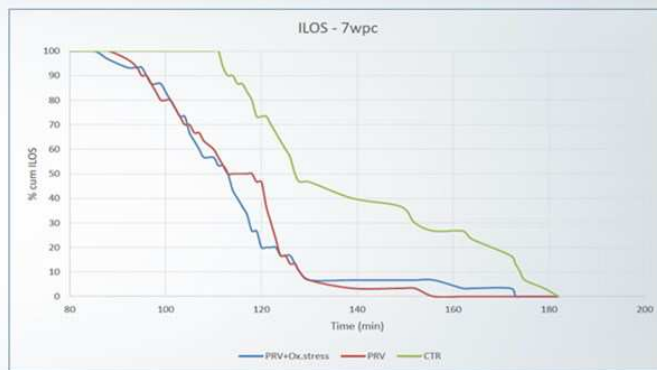
Resultatene fra hypoksisstresstesten (HCT) er vist som akkumulert ILOS som funksjon av tid/ O_2 -konsentrasjon (Figur 12). Det ble ikke funnet noen forskjeller mellom gruppene i uke 4 (ikke vist), men i uke 7 og 10 viste det seg at PRV-infisert gruppe hadde mindre toleranse for lav O_2 metning sammenliknet med kontrollgruppen. Et interessant funn var at den PRV-infiserte fisken som hadde vært utsatt for 40% hypoksi hadde noe høyere hypoksitoleranse enn PRV-infisert fisk som ikke hadde vært igjennom denne behandlingen i uke 10.

Siden det ikke var forskjeller i virusmengde og HSMB-utvikling i disse gruppene kan det tyde på at to omganger med 4 timers 40% oksygenstress kan ha hatt en prekondisjoneringseffekt/«høydetreningseffekt» som bedret tilpasningsevnen til akutt hypoksisk stress.

Hjerteratemålinger ved uke 4 og 10 (Figur 13) viste liten forskjell mellom gruppene mhp hjerterate opptil maksimal temperatur (20-22°C), men PRV-infisert gruppe slo ut signifikant forskjellig fra kontrollfisk og 40% O_2 -behandlet infisert gruppe. Beregning av optimal temperatur (T_{opt}) for aerobisk kapasitet (Arrhenius break point temperature) viste at infiserte grupper har lavere T_{opt} for aerobisk kapasitet sammenliknet med usmittet kontroll 10 uker etter infeksjon (ikke vist).

A

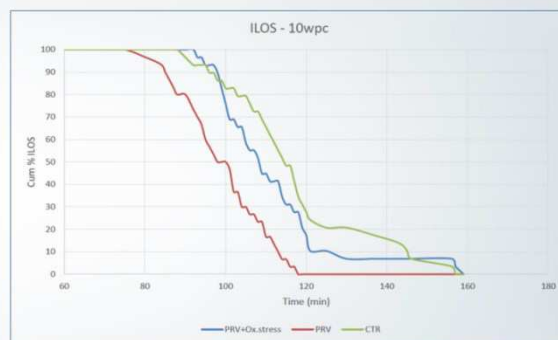
Cumulative % ILOS for HCT fish at 7 wpc:



PRV+Ox.stress group: underwent one 40% hypoxia stress at 4wpc

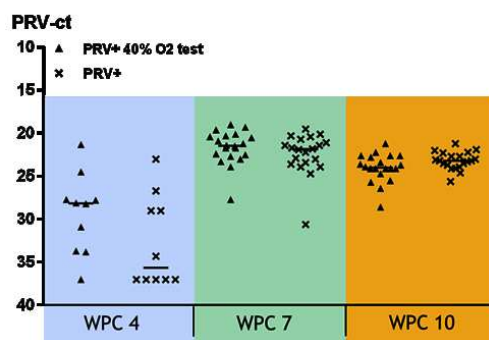
B

Cumulative % ILOS for HCT fish at 10 wpc:



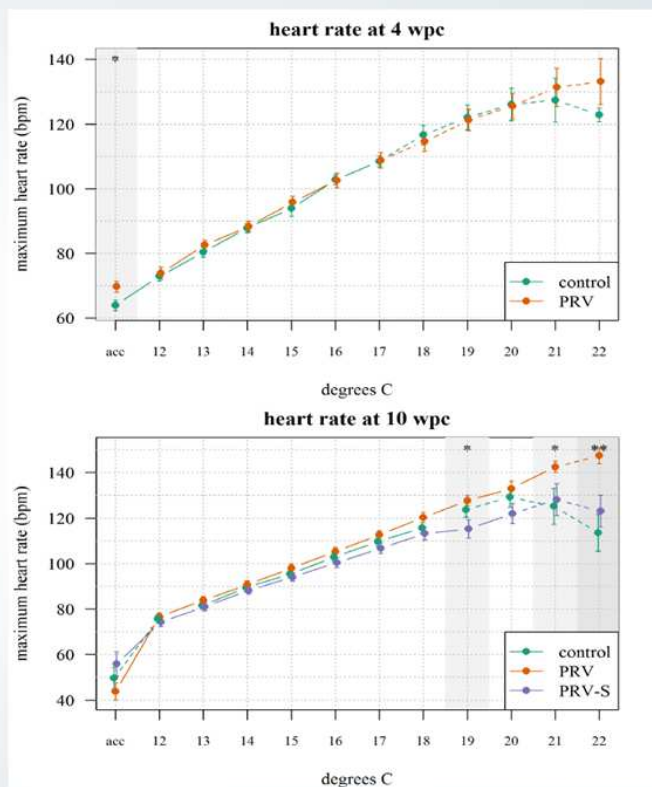
PRV+Ox.stress group: underwent 40% hypoxia stress at 4+7wpc

C



Figur 12. Resultat av HCT fra uke 7 (A) og uke 10 (B), og virusdata (C) som viser lik PRV-mengde i blod mellom kar 1 og 2 WPC 7 og 10.

Temperature-dependent heart rate, 4 + 10 wpc:



Groups:
 -Control
 -PRV: merged
 infected tank 1+2

Groups:
 -Control
 -PRV: w/o stress
 -PRV-S: with hypoxia
 stress 4+7wpc

Figur 13. Data fra hjerterate-analysene som viser at PRV-gruppen tilpasser hjerteraten dårligere til temperaturen enn den hypoksitrente gruppen og kontrollgruppen.

Et manuskript er under utarbeidelse fra dette forsøket (foreløpig forfatterliste) :

Piscine orthoreovirus infection decreases hypoxia tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Morten Lund, Maria K. Dahle, Gerrit Timmerhaus, Vidar Aspehaug, Espen Rimstad, Mark Powell, Sven Martin Jørgensen.

5.2.4 Måloppnåelse

1. Studere hvordan fisk med PRV-infiserte erythrocytter tåler forhold med lav oksygentilgang sammenliknet med uinfisert fisk.

Fisk med PRV-infiserte erythrocytter har noe lavere toleranse for hypoksiske forhold på letalt nivå (< 25% O₂-metning)

2. Analysere infiserte erythrocytters evne til oksygenopptak sammenliknet med uinfiserte erythrocytter.

Analysene viste ingen endringer, men det er ingen sikre konklusjoner.

3. Studere hvordan oksygenforholdene påvirker PRV infeksjonskinetikk.

PRV infeksjonskinetikk ser ikke ut til å bli påvirket av oksygenforholdene

4. Klargjøre om kombinasjonen av lav oksygenmetning, PRV-infeksjon og stress-induksjon kan ha en rolle i å styre inflammasjon og patologiutvikling i hjerte under PRV infeksjon.

Det er ikke tegn til at hypoksi (40% O₂-metning) forverrer inflammasjon og patologiutvikling, men muligens en tendens til at hjerteinflammasjonen får et raskere forløp.

5. Benytte ny kunnskap som en basis for å utvikle håndteringsprosedyrer og kontrollrutiner for å unngå oksygenstress-indusert tap av PRV infisert fisk.

Det kan være grunn til å advare mot å utsette PRV-infisert fisk mot forhold med lav O₂-metning, men kontrollert mildere grad av hypoksi ser ut til å kunne øke fiskens robusthet for senere episoder.

5.2.5 Konklusjon

Konklusjonen er at PRV-smitte ser ut til å ha en effekt på fiskens toleranse for svært lave nivåer av O₂-metning <20%, men at lettere hypoksisk «trening» (40% i 4 timer) ser ut til å kunne heve toleransegrensen for hypoksi. Hvorvidt dette gir noen utslag i anlegg er uvisst, men dette bør undersøkes nærmere.

5.2.6 Videre arbeid med prøvematerialet

Det er ikke utført genekspresjonsanalyse på materialet fra denne arbeidspakken, og vi kunne tenke oss å gå nærmere inn på hva som kan være en faktor som korrelerer med høy og lav hypoksitoleranse, og se nærmere på induksjon av genekspresjon etter 40% hypoksi. Vi er interessert i å se om behandlingen trigger erythropoiese, noe som kan være en slags forklaring på effekten.

5.3 Arbeidspakke 3 – PRV/SAV koinfeksjon

5.3.1. Hypoteser og forsøksoppsett

Målet med arbeidspakke 3 var å se nærmere på interaksjonen mellom PRV og smitte med salmonid alfavirus (SAV) subtype 2 og 3.

Den opprinnelige hypotesen var at PRV-infeksjon over lengre tid kunne føre til en immunsuppresjon som kunne forlenge og forverre en sekundær SAV-infeksjon. Men man så også for seg at PRV, som induserer en kraftig antiviral respons i blod og milt, kunne gi en beskyttelse på kortere sikt.

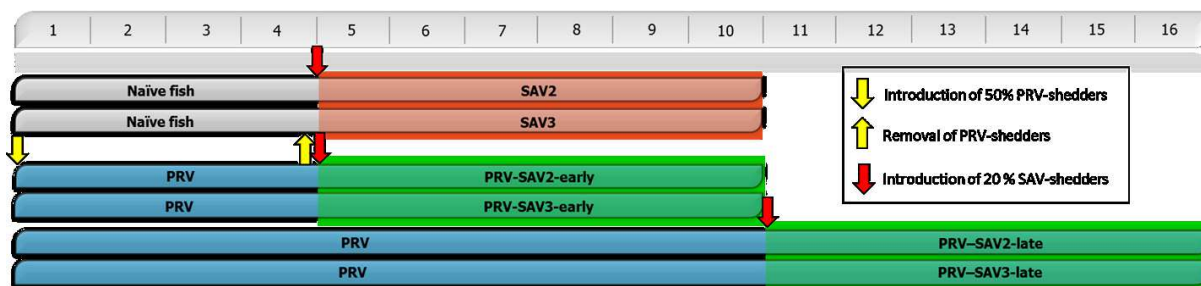
For å se på dette ble det bestemt at man skulle smitte fisken på vanlig måte med PRV, og innføre SAV kohabitanter på to forskjellige tidspunkt. Etter 4 uker når det er mye virus i blod og enda ikke histopatologiske forandringer i hjertet, og etter 10 uker når fisken har utviklet hjertepatologiske forandringer som kanskje er i ferd med å regenerere.

Vi lurte på om det kunne være noen forskjeller i hvordan PRV interagerer med SAV subtype 2 og subtype 3, og ønsket var derfor å innføre begge subtypene i forsøket. Den første planen var å utføre to smittestudier. En som skulle se på timingen for innføring av sekundær SAV-smitte. Da med kun SAV3, og en neste studie der fokus var på mulige forskjeller mellom SAV2 og SAV3. Dette viste seg dessverre ikke å la seg gjøre innenfor rammene i budsjettet, så i stedet ble det slått sammen til ett forsøk som likevel skulle forsøke å besvare alle målsetningene i arbeidspakken.

Studien ble også her utført på VESO Viken med sjøvannstilpasset smolt fra standard SalmoBreed-stamme. To uker etter overføring til sjø ble fisken smittet ved at 50% av fisken ble injisert i.p med 100µl lysert PRV-infisert blodcellepellet av samme opprinnelse som for AP1. Denne shedderfisken gikk sammen med kohabitanter i 4 uker og ble

deretter tatt ut av eksperimentet. På det tidspunktet var alle kohabitanter smittet og hadde virus i blod.

Etter 4 uker ble den PRV-smittede fisken fordelt på 4 kar. I to av dem ble det samme uke tilsatt 20% sheddere for SAV2 eller SAV3 (PRV-SAV-early), og i de to andre ble tilsvarende mengde SAV-sheddere tilsatt 10 uker etter forsøksstart (PRV-SAV-late). I ett kontrollkar ble naiv fisk tilsatt 20% SAV-sheddere på samme måte (Figur 15)



Figur 15. Forsøksoppsett for PRV-SAV kosmittestudien

5.3.2. Prøvetagning/tester/hendelser under forsøket

Prøver ble tatt med sikte på å følge PRV og SAV-kinetikk (genekspresjon i hjerte og blod), HSMB (hjerter og muskel til histopatologiske undersøkelser) og PD (Hjerte og pancreas/blindsekker til histopatologiske undersøkelser).

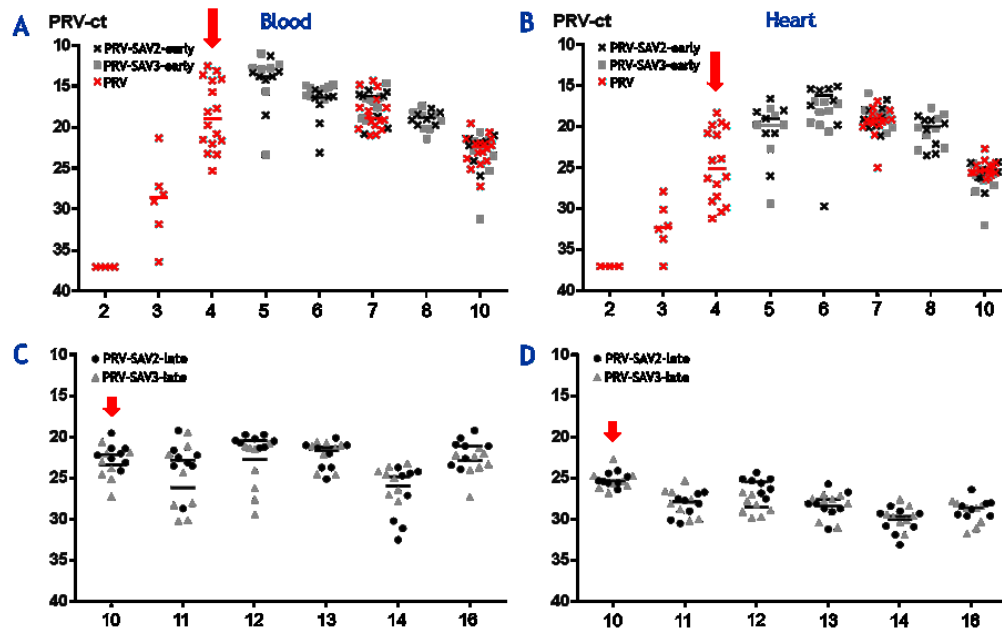
I tillegg til dette ble det samlet flere andre organer til RT-qPCR og histopatologiske undersøkelser (milt, hodenyre, gjelle, hjerne, tarm) pluss plasma. Milt og plasma blir benyttet til et andre vitenskapelig arbeid på smittestudien.

5.3.3 Forsøksresultater

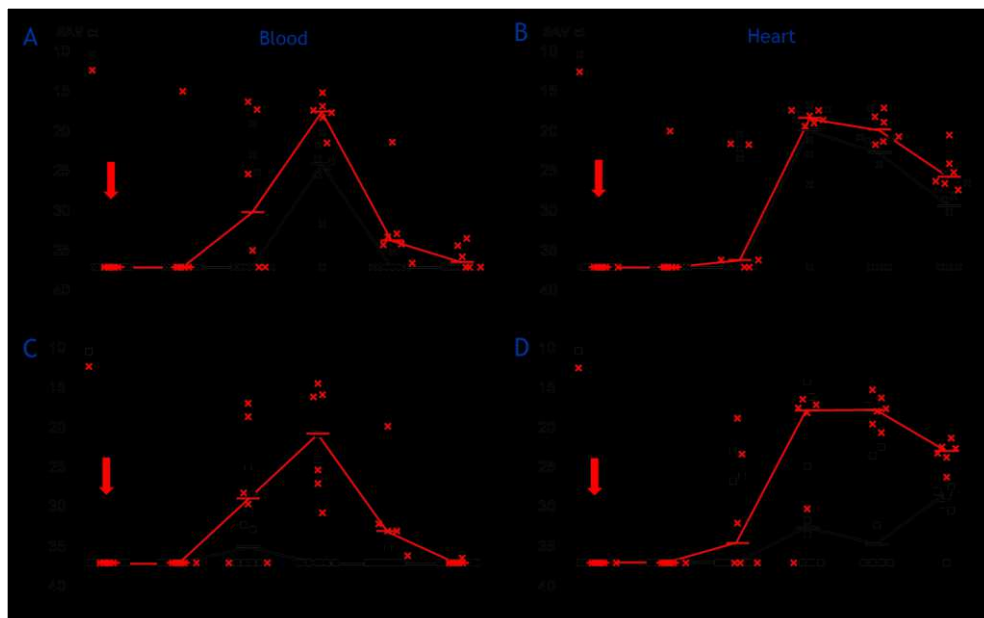
Utviklingen av PRV-smitte i kohabitanter underveis i studien (Figur 16) viser at samtlige fisk er PRV-positive 4 uker etter smitte når PRV-shedderfisken fjernes og den tidlige introduksjonen av 20% SAV-sheddere starter. Hvis man sammenlikner fisk som kun er smittet med PRV (punkt i rødt) med fisk som er kosmittet med PRV og SAV (grå og sorte punkter) er det ingenting som tyder på at introduksjonen av SAV har noen som helst effekt på PRV-kinetikk. Det er heller ingenting som tyder på at fisk kosmittet med SAV subtype 2 har annen effekt enn SAV subtype 3.

Når det gjelder kinetikken for SAV etter kosmitte dukker det opp noen forskjeller mellom tidlig og sen SAV-introduksjon, og mellom SAV2 og SAV3. Ved kosmitte

introdusert etter 4 uker (PRV-SAV-early, figur 17) er det for SAV2 (A,B) ikke så stor forskjell mellom kontrollgruppen (SAV2 alene, røde punkter) og kosmittegruppen (PRV-SAV2, sorte punkter), men likevel såvidt signifikant lavere smitte i gruppen som også har PRV. For SAV3 er forskjellen mye større. Det som er påfallende er det store antallet PRV-smittet fisk som er helt SAV-negativ, spesielt i SAV3-gruppen, noe som kan tyde på at PRV-smitte blokkerer virusopptak, og blokkerer SAV3 mer enn SAV2.

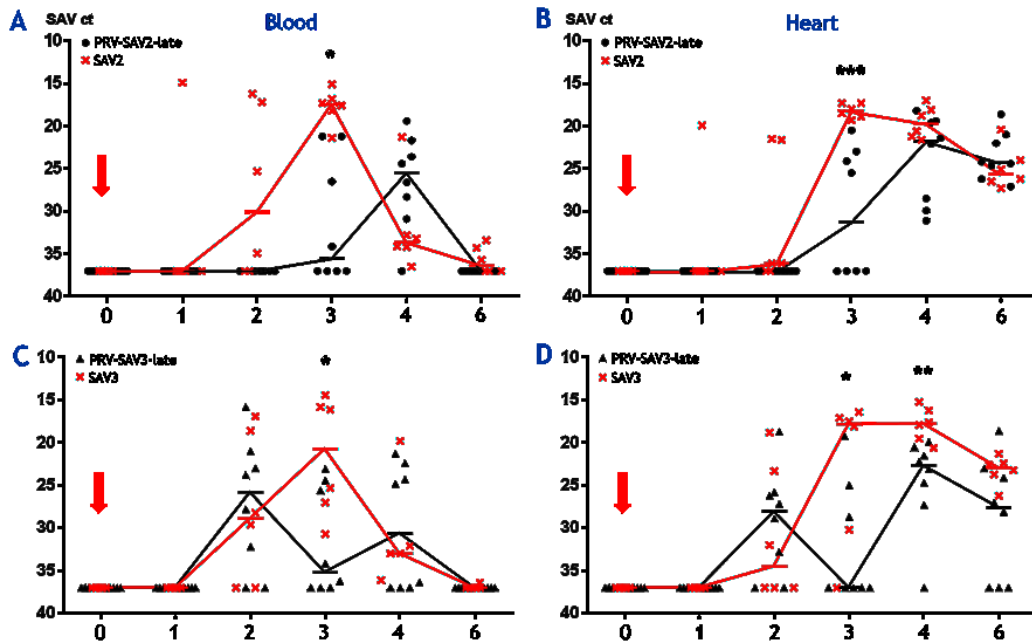


Figur 16. PRV-kinetikk



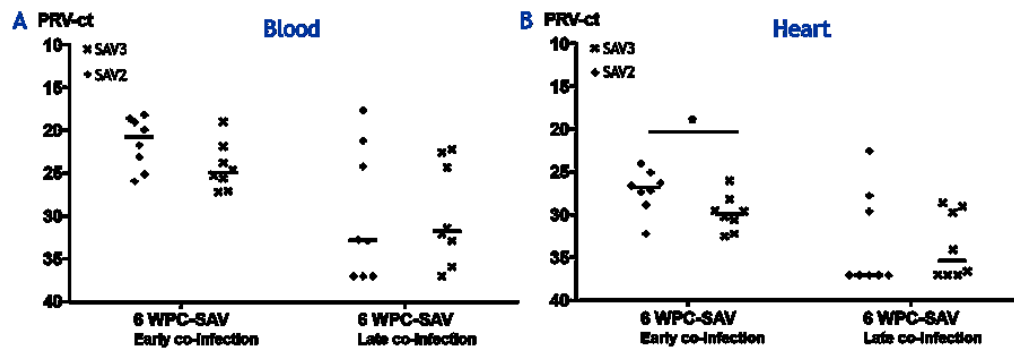
Figur 17. SAV2-kinetikk tidlig kosmitte

Ved SAV kosmitte introdusert 10 uker etter PRV-infeksjon (PRV-SAV-late, figur 18) er bildet liknende. Der er også her et større antall fisk som er SAV-negative sammenliknet med kontrollgruppen. Det som imidlertid skiller seg fra tidlig kosmitte er at forskjellen mellom SAV2 og SAV3 har utjevnet seg. Det er en noe kraftigere hemming av SAV2 kosmitte, men mindre markert for SAV3. For SAV2 ser det ut til å være en forskyvning av smittetidspunktet med en uke. Det er fremdeles tydelig to populasjoner i kosmittegruppen ved flere tidspunkt. En gruppe som har like mye virus som kontrollgruppen, og en som er omtrent negativ. Et slikt bilde tyder på at det er virusopptaket og ikke primært replikasjonen som er hemmet.



Figur 18. SAV-kinetikk – sen kosmitte

Et interessant funn er at SAV shedderfisk tar opp PRV i litt forskjellig grad om den er tidligere smittet med SAV2 enn med SAV3 (Figur 19). Dette gjelder spesielt ved tidlig kosmitte. Det ser ut til at SAV2-smittet fisk tar opp mer PRV enn SAV3-smittet fisk, og det er signifikante forskjeller for hjerte. Dette, sammen med øvrige data tyder på at koeksistensen av SAV2 med PRV fungerer bedre enn koeksistensen PRV/SAV3.



Figur 19. PRV-smitte av SAV-infisert shedderfisk



Figure 20. Pancreas disease (PD)-typisk histopathologisk score i ukene etter introduksjon av SAV-sheddere

Når man går videre og ser på utvikling av histopatologiske forandringer forenlig med PD, som pancreasskade og akutte nekroser i hjertet (Figur 20) så ser man for både SAV2 og SAV3 et betydelig lavere antall fisk med alvorlige histopatologiske forandringer hvis de har vært tidligere kosmittet med PRV. Interessant nok er effekten ved sen kosmitte aller størst. Det som er mest påfallende er at mens skadene i pancreas ikke regenererer i

kontrollene smittet med SAV alene, er det en klar reduksjon i histopatologiske forandringer uke 5 og 6 etter smitte sammenliknet med uke 3. Det er en liknende, men noe mindre markert effekt på nekroser i hjertet. Her er den beskyttende effekten ved sen kosmitte like høy som ved tidlig kosmitte.

Sykdomsmarkører for SAV-mediert hjerteskaade som ikke er regulert ved HSMB har tidligere blitt beskrevet (11). Vi ønsket å teste om disse markørene korrelerte med nekroser og betennelse i myokard, og om uttrykk av disse markørene ga det samme bildet som histopatologisk vurdering av hjertet. Tabell 6 viser korrelasjon med histopatologiske forandringer for 7 av de potensielle markørene. Den beste korrelasjonen med PD-typiske nekroser i hjertet finner man for IL1-reseptor accessory-like protein 2, neuropeptide Y-1, serum amyloid A-5 protein og arginase 2 – mitochondrial. De to sistnevnte korrelerer betydelig bedre med nekroser enn med betennelse.

Spearman's correlation				
	Inflammation myocard		Acute necrosis myocard	
	r_s	p-value	r_s	p-value
Matrix metalloproteinase 13	0.0301	0.8427	0.3573	0.0148
Calsequestrin	-0.5284	0.0002	-0.4372	0.0024
Interleukin 1-reseptor accessory protein-like 2	0.527	0.0002	0.7391	<0.0001
Neuropeptide Y-1	0.7049	<0.0001	0.6288	<0.0001
Serum amyloid A-5 protein	0.341	0.0204	0.7386	<0.0001
Arginase-2, mitochondrial	0.3798	0.0092	0.7135	<0.0001
Arginase-1	-0.6536	<0.0001	-0.4278	0.0030

Tabell 6. Korrelasjon mellom sykdomsmarkører og patologiske forandringer

En relativ sammenlikning av uttrykk av disse genene i hjertet for SAV3 kontroll og kosmittegruppene (Figur 22) viser signifikante forskjeller for kosmittegruppene ved enten 4 eller 6 dager for alle de utvalgte genene unntatt matrix metalloproteinase 13, som heller ikke er spesielt godt korrelert med hjertepatologi. Disse dataene tyder på at IL1-reseptor accessory-like protein 2 er den aller beste markøren for SAV-mediert hjertepatologi.

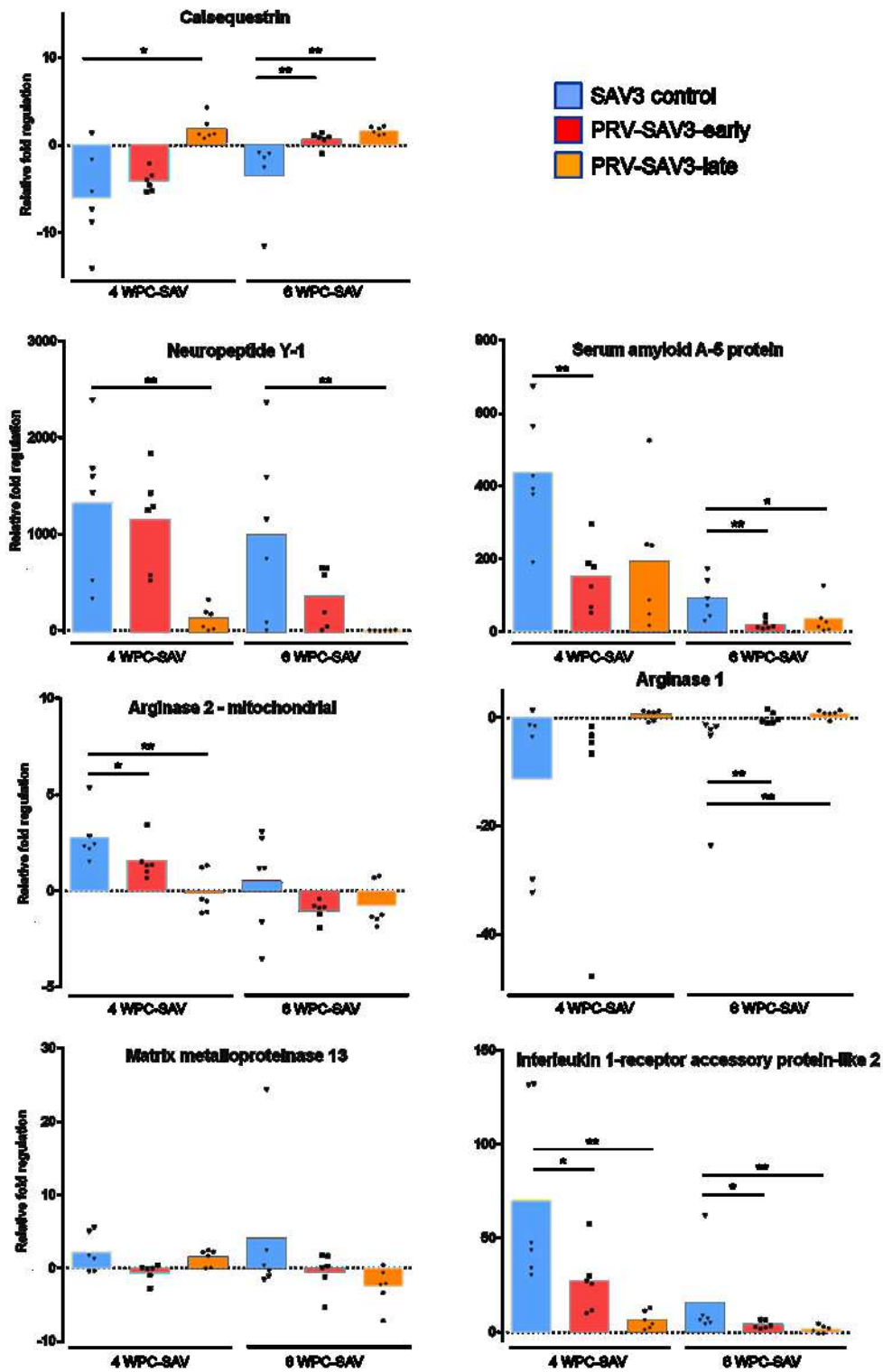


Figure 21. Ekspresjon av potensielle markørgener for SAV-mediert hjerteskaide, og effekt av kosmitte.

En artikkel er submittert til Veterinary Research basert på dataene presentert ovenfor. Den er i sin helhet vedlagt rapporten.

Experimental *Piscine orthoreovirus* infection mediates protection against pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) for at least 10 weeks. Morten Lund*, Magnus Vikan Røsæg*, Aleksei Krasnov, Gerrit Timmerhaus, Ingvild Berg Nyman, Vidar Aspehaug, Espen Rimstad, Maria K Dahle

5.3.4 Måloppnåelse

1. Studere om en etablert PRV infeksjon påvirker smittekinetikken til SAV3 og SAV2 (virus i blod og hjerte).
Svar: En etablert PRV-infeksjon hemmer smittekinetikken til SAV i minst 10 uker
2. Undersøke hvorvidt en PRV/SAV koinfeksjon endrer sykdomsutvikling og patologi.
PRV-mediert sykdomsutvikling (HSMB) påvirkes ikke av en introduksjon av SAV-smitte, mens PRV-smitte ser ut til å kunne beskytte mot en etterfølgende SAV-mediert PD-utvikling. Spesielt for SAV3.
3. Studere forskjeller i effekten av SAV3-introduksjon tidlig og sent i en PRV infeksjonssyklus.
PRV ser ut til å ha størst beskyttende effekt mot SAV3 ved tidlig kosmitte, men også noe effekt ved sen kosmitte mot både SAV2 og SAV3.
4. Se etter forskjeller mellom SAV2 og SAV3 under interaksjon med PRV
PRV ser ut til å motvirke SAV3-infeksjon noe mer enn SAV2- infeksjon.

5.3.5 Konklusjon

Vi viser i denne eksperimentelle studien at en forutgående PRV infeksjon gir en beskyttende effekt mot SAV-smitte og PD-relatert organskade både når SAV-smitten introduseres 4 uker og 10 uker etter PRV. Mens opptak av SAV i blod og hjerte ser ut til å hemmes mest i SAV3-smittet fisk ved tidlig kosmitte, så er beskyttelsen histopatologisk sterk for begge SAV subtyper og ved begge tidspunkt. Vi har studert noen genmarkører for SAV-mediert hjerteskaade, og finner flere som korrelerer godt med PD-typiske forandringer og endrer seg signifikant ved kosmitte med PRV.

5.3.6 Videre arbeid

Mer data genereres nå for å få til en publikasjon 2 på materialet. For dette neste arbeidet har vi satt oss fore å finne ut mer om mekanismene for kryssbeskyttelsen som ble observert i studien. Så langt er det gjort flere funn.

- Mulige nøytraliserende effekter av serum fra PRV-smittet fisk på SAV-infeksjon
- En mulig korrelasjon mellom PRV og SAV-funn i felt som kan tyde på at kryssbeskyttelse ikke alltid er tilfelle.
- PRV induserer en langvarig antiviral respons i blod og hjerte (Figur 22)

For sistnevnte har man gjort analyser av gener som har effekter på flere nivåer fra virus-sensing, replikasjonsregulering, og andre typer cellulær beskyttelse. Dataene tyder på at den antivirale responsen er svært høy i både blod og hjerte helt til 10 uker etter smitte, noe som godt kan forklare den beskyttende effekten man ser i smitteforsøket.

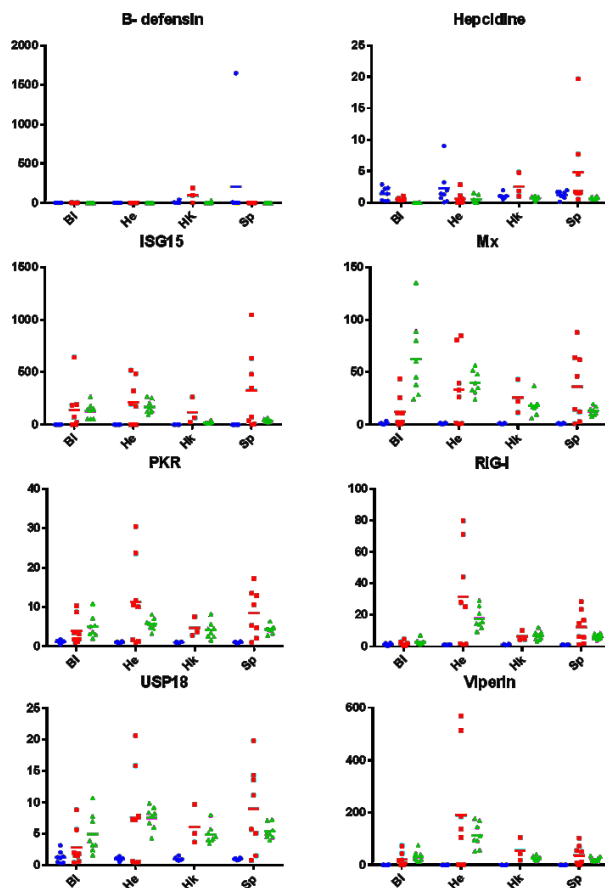


Figure 22. Antiviral genespresjon i organer fra uinfisert fisk (blå) og PRV-infisert fisk etter 4 ukers infeksjon (rød) og 10 ukers infeksjon (grønn)

5.4 Implementering/nytteverdi for næringen

PRV er et virus man finner overalt i sjø, og nå også i svært mange settefiskanlegg. I første omgang har det blitt et virus man må lære seg å leve med, inntil man kan utvikle resistent fisk eller en vaksine og veien dit kan fremdeles være lang. Den PRV-medierte sykdommen HSMB kan arte seg svært forskjellig. Under de rette forholdene kan tap reduseres til ubetydelig, og viruset være til å leve med, mens under andre forhold kan anleggene ha hyppige utbrudd av HSMB og kostbare tap. Hvis man kunne forstå hva som styrer hvor alvorlige følger infeksjonen har kunne man kanskje unngått sistnevnte situasjon.

Denne studiens mål har vært å forstå hvordan en PRV-infeksjon virker på laksens robusthet overfor situasjoner som er uunngåelige i felt: Smoltifisering, hypoksiske forhold og sekundærinfeksjoner: Smoltifiserer en PRV-infisert fisk like godt? Vil PRV-infiserte erythrocytter ha en redusert evne til oksygentransport, og hvordan påvirker dette toleransen mot hypoksiske forhold? Hvordan påvirker en PRV-infeksjon responsen på sekundære agens. Hemmes eller stimuleres immunforsvaret? Svar på slike spørsmål kan gi næringen et godt utgangspunkt for å planlegge håndtering av en PRV-smittet fisk slik at de reduserer unødige tap.

Våre funn tyder ikke på at en PRV-infisert fisk er så sårbar som vi kanskje fryktet initielt, i hvert fall ikke under smittestudiens kontrollerte forhold. I stedet har vi funnet at eksperimentelt PRV-infisert fisk er beskyttet mot sekundærinfeksjon med SAV2 og SAV3 opp til 10 uker etter PRV-smitte. Vi går videre med disse dataene for å prøve å forstå hvorfor fisken er beskyttet, for på den måten kan vi kanskje avdekke forhold hvor denne beskyttelsen ikke fungerer, eller klarlegge hvor lenge den varer. Vi kommer også til å forsøke å se om vi kan finne denne effekten eller en motsatt effekt i felt.

Et annet funn er at PRV-infisert fisk er mer sensitiv for hypoksiske forhold, men i våre forsøk kun når forholdene er ekstreme (<20% O₂-metning). Denne effekten kan vi godt tenke oss kan forsterkes i felt f.eks med effekten av stress, trengning og kjemisk behandling i kombinasjon, noe som er en naturlig oppfølger til vårt eksperiment. Det var også interessant at hypoksiske priming så ut til å ha en gunstig moteffekt.

Til slutt er det funnet små forskjeller mellom følgene av en PRV infeksjon i ferskvanns – og i sjøvannsfasen, med hensyn på forskjeller i immunrespons og kanskje av immunforsvarets virushåndtering i fisken. Dette burde studeres nærmere, og forsøket som ikke lot seg gjennomføre her, hvor effekten av PRV på smoltkvalitet skulle klarlegges, er også et forsøk som burde vært gjennomført.

Hvis næringen skal implementere data som de foreligger i dag, så må det primært være kunnskapen om at kombinasjonen PRV-infeksjon og hypoksi kan være en risiko. Å anbefale at PRV-smittet fisk ikke utsettes for forhold som kan fremkalle hypoksi før sykdomsperioden er over kan være en anbefaling, men det bør fremheves at dette er noe man bør studere nærmere under mer spesifikke forhold og med flere faktorer inne i bildet.

6. Leveranser

6.1 Leveranser

- Tre referater fra styringsmøter m/vedlegg
- To statusrapporter pluss sluttrapport
- En webside med prosjektpresentasjon [http://www.vetinst.no/Utvidet-prosjektbeskrivelse/Gaaten-HSMB/\(language\)/nor-NO](http://www.vetinst.no/Utvidet-prosjektbeskrivelse/Gaaten-HSMB/(language)/nor-NO)
- Dagsseminar om HSMB-viruset PRV - november 2015
- To vitenskapelige manuskript, pluss et delt manuskript (publisert)

6.2 Vitenskapelige arbeider:

Arbeidspakke 1:

Publisert artikkel i samarbeid med FHF# Multifactorial diseases.

Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). Johansen LH, Dahle MK, Wessel Ø, Timmerhaus G, Løvoll M, Røsæg M, Jørgensen SM, Rimstad E, Krasnov A. Mol Immunol. 2016 Apr 18;73:138-150.

Arbeidspakke 2:

Manuskript under utarbeidelse submitteres høsten 2016

Piscine orthoreovirus infection decreases hypoxia tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Morten Lund, Maria K. Dahle, Gerrit Timmerhaus, Vidar Aspehaug, Espen Rimstad, Mark Powell, Sven Martin Jørgensen. Manus ettersendes rapporten

Arbeidspakke 3:

Submittert artikkel Veterinary Research

Experimental *Piscine orthoreovirus* infection mediates protection against pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) for at least 10 weeks. Morten Lund*, Magnus Vikan Røsæg*, Aleksei Krasnov, Gerrit Timmerhaus, Ingvild Berg Nyman, Vidar Aspehaug, Espen Rimstad, Maria K Dahle. Manus vedlagt.

Artikkel 2 hvor man går nærmere inn på mekanismer er under utarbeidelse og planlagt submittert før jul 2016. Har ikke avklart tittel og forfatterliste.

6.3 Presentasjoner:

- Fiskeri- og havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) møte, Trondheim 27.10.14 (Dahle – foredrag om HSMImore)

- Åpent fiskehelseseminar Adamstuen, Oslo: 29.01.15 (Presentasjon Lund)
- Fagseminar Biomar Åre, Sverige: 05.02.15 (Presentasjon Lund)
- Frisk Fisk, Tromsø 05.03.2015 (Poster, Lund)
- Fish Immunology workshop, Wageningen, NL 27.04.15 (Poster, Lund)
- TriNation, Dublin, Irland 04.06.15 (Presentasjon, Lund)
- FHF's fiskehelsesamling, Bergen. 01.09.15 (Presentasjon Dahle)
- 17th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Gran Canaria, (Presentasjon, Lund)
- Fagseminar om lakseviruset PRV 26.11.15 (Presentasjoner Dahle, Lund)
- Havbrukskonferansen i Bodø 18.04.16 (Presentasjon, Lund)
- Nord-norsk fiskehelsesamling Tromsø 24.08.16 (Presentasjon, Lund)

7. Kvalitetssikring

- VESO Viken har sertifiserte kvalitetsrutiner for alle smitteforsøk. Smitteforsøkene er godkjent av Norsk forsøksdyrvalg ifølge FOR-1996-01-15-23 (Norge).
- PatoGen har sertifiserte kvalitetsrutiner (ISO17025 standard) for alle RT-qPCR-analyser for PRV og SAV
- Alle histopatologiske undersøkelser er utført blindet. Morten Lund er opplært av og et antall prøver er testet parallelt av erfaren patolog (Marta Alarcón, VI Harstad)
- RT-qPCR-data på genekspresjon er utført av erfaren ingeniør og kvalitetssikret av Rimstad og Dahle.
- Prosjektgruppen har arbeidet tett under skriving av vitenskapelige artikler og alle rådata har vært tilgjengelig for veilederne og alle prosjektpartnerne som har hatt medforfatterskap på de enkelte artiklene. To av prosjektpartnerne har professorkompetanse og lang publikasjonserfaring. Alle forfattere har lest og kvalitetssikret submittert artikkel.

8. Referanser

1. Finstad OW, Dahle MK, Lindholm TH, Nyman IB, Lovoll M, Wallace C, et al. Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Vet Res.* 2014;45:35.
2. Kongtorp RT, Kjerstad A, Taksdal T, Guttvik A, Falk K. Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a new infectious disease. *J Fish Dis.* 2004;27(6):351-8.
3. Kibenge MJ, Iwamoto T, Wang Y, Morton A, Godoy MG, Kibenge FS. Whole-genome analysis of piscine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family Reoviridae and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. *Virology.* 2013;10:230.
4. Ferguson HW, Kongtorp RT, Taksdal T, Graham D, Falk K. An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation in Scottish farmed salmon, *Salmo salar* L., with observations on myocardial regeneration. *J Fish Dis.* 2005;28(2):119-23.
5. Godoy MG, Kibenge MJ, Wang Y, Suarez R, Leiva C, Vallejos F, et al. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology.* 2016;13(1):98.
6. Palacios G, Lovoll M, Tengs T, Hornig M, Hutchison S, Hui J, et al. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One.* 2010;5(7):e11487.
7. Garseth AH, Fritsvold C, Opheim M, Skjerve E, Biering E. Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and sea-trout, *Salmo trutta* L., in Norway. *J Fish Dis.* 2013;36(5):483-93.
8. Kongtorp RT, Taksdal T, Lyngoy A. Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ.* 2004;59(3):217-24.
9. Mikalsen AB, Haugland O, Rode M, Solbakk IT, Evensen O. Atlantic Salmon Reovirus Infection Causes a CD8 T Cell Myocarditis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One.* 2012;7(6):e37269.
10. Finstad OW, Falk K, Lovoll M, Evensen O, Rimstad E. Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res.* 2012;43:27.
11. Johansen LH, Thim HL, Jorgensen SM, Afanasyev S, Strandkog G, Taksdal T, et al. Comparison of transcriptomic responses to pancreas disease (PD) and heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2015;46(2):612-23.
12. Markussen T, Dahle MK, Tengs T, Lovoll M, Finstad OW, Wiik-Nielsen CR, et al. Sequence analysis of the genome of piscine orthoreovirus (PRV) associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One.* 2013;8(7):e70075.
13. Key T, Read J, Nibert ML, Duncan R. Piscine reovirus encodes a cytotoxic, non-fusogenic, integral membrane protein and previously unrecognized virion outer-capsid proteins. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 5):1039-50.
14. Olsen AB, Hjortaas M, Tengs T, Hellberg H, Johansen R. First Description of a New Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) Similar to Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) and Detection of a Gene Sequence Related to Piscine Orthoreovirus (PRV). *PLoS One.* 2015;10(7):e0131638.
15. Godoy MG, Kibenge MJ, Wang Y, Suarez R, Leiva C, Vallejos F, et al. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology.* 2016;13:98.
16. Sibley SD, Finley MA, Baker BB, Puzach C, Armien AG, Giehlbrock D, et al. Novel reovirus associated with epidemic mortality in wild Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*). *J Gen Virol.* 2016.
17. Lee PW, Hayes EC, Joklik WK. Protein sigma 1 is the reovirus cell attachment protein. *Virology.* 1981;108(1):156-63.
18. Walters MN, Leak PJ, Joske RA, Stanley NF, Perret DH. Murine Infection with Reovirus. 3. Pathology of Infection with Types 1 and 2. *Br J Exp Pathol.* 1965;46:200-12.
19. Nylund A, Plarre H, Hodneland K, Devold M, Aspehaug V, Aarseth M, et al. Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. *Dis Aquat Organ.* 2003;54(1):15-27.
20. Dahle MK, Wessel O, Timmerhaus G, Nyman IB, Jorgensen SM, Rimstad E, et al. Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV). *Fish Shellfish Immunol.* 2015;45(2):780-90.

21. Finstad OW, Falk K, Lovoll M, Evensen O, Rimstad E. Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res.* 2012;43(1):27.
22. Johansen LH, Dahle MK, Wessel O, Timmerhaus G, Lovoll M, Rosaeg M, et al. Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). *Mol Immunol.* 2016;73:138-50.
23. Wessel O, Olsen CM, Rimstad E, Dahle MK. Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Vet Res.* 2015;46:26.
24. Taksdal T, Bang Jensen B, Bockerman I, McLoughlin MF, Hjortaas MJ, Ramstad A, et al. Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *J Fish Dis.* 2015;38(12):1047-61.
25. Roze T, Christen F, Amerand A, Claireaux G. Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. *Journal of Thermal Biology.* 2013;38(2):98-106.
26. Casselman MT, Anttila K, Farrell AP. Using maximum heart rate as a rapid screening tool to determine optimum temperature for aerobic scope in Pacific salmon *Oncorhynchus* spp. *J Fish Biol.* 2012;80(2):358-77.