



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Norges Fiskerihøgskole

Påvisning av melaninflekker i filet hos slakteklar Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

—

Ola Kvaal Brandshaug

Masteroppgave i Akvamedisin (60stp)

Mai 2016



Forord

Denne oppgaven ble utført som et samarbeidsprosjekt mellom Universitetet i Tromsø (UiT)-Norges arktiske universitet, Lerøy Aurora AS og Veterinærinstituttet i Harstad. Oppgaven ble utført ved fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, UiT og Lerøys slakteri på Skjervøy. Oppgaven ble påbegynt i Januar 2015 og avsluttet mai 2016.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder førsteamanuensis Tore Seternes for å bli med på dette prosjektet. Det har vært en veldig lærerik prosess, med mye hockeyprat, og til dels frustrerte perioder fra begge hold. Likevel var det betryggende å ha en engasjert veileder i ryggen som hadde stor tro på prosjektet. Jeg vil og takke mine bi-veiledere, forsker Muhammad Naveed Yousaf, fra Veterinærinstituttet, og fiskehelsebiolog Eirik Monsen, fra Lerøy Aurora AS. Muhammad, din kunnskap og ekspertise har vært gull verdt i innspurten av masteroppgaven, spesielt all hjelp med histologi. Eirik, takk for hjelpen med å sette i gang prosjektet og å skaffe penger til prosjektet. En stor takk rettes til Lerøy Aurora AS som finansierte hele masteroppgaven. En stor takk sendes til Kjersti Julin for opplæring i PCR og analysering av serumprøver. Månen til tålmodighet skal du lete lenge etter! Du er utrolig! Hadde det ikke vært for deg så hadde jeg aldri blitt ferdig på laboratoriet. Gutta boys på Skjervøy, Øystein Skallebø og Espen Figenschou Mikkelsen fortjener alle en takk for all hjelp med overnatting og tilgjengelighet på slakteriet.

Tusen takk til alle mine medstudenter, og ikke minst, gjengen på kontoret. Dere har gjort tiden på kontoret svært minnerik. En spesiell takk til Martin Rønbeck Lundberg, som fungerte som en av mine sikkerhetsventiler da jeg var som mest frustrert. Jeg kommer til å savne diskusjonene vi hadde angående masteroppgaven. En stor takk til bassegjengen i Tromsø. Jeg kommer til å savne all blakkinga på firern og håper det fortsettes å blakkes selv om jeg ikke er der. Sist, men ikke minst, vil jeg takke min familie for å et klapp på skuldra og oppmuntrende ord. Takk til pappa som har vært til stor hjelp med gjennomlesning og retting av grammatikken. Det har vært til ufattelig stor hjelp!

Tromsø 16. mai 2016

Ola Kvaal Brandshaug

Sammendrag

Melaninflekker i laksefileten er et stort kvalitetsproblem hos norsk oppdrettslaks. De brune pigmentflekkene i fileten forårsakes av et pigment, kalt melanin, som gjør at fileten blir nedklassifisert. Årlig taper norsk oppdrettsnæring rundt 1 milliard norske kroner som følge av dårlig kvalitet på fileten. Årsaken til melaninflekker har lenge vært ukjent. Tidligere fikk vaksiner mye av skylden, men nyere forskning viser at virus ser ut til å være viktig del av årsaken. Fisk som har melaninflekker i laksefileten har et normalt utseende og er umulig å skille fra fisk uten melaninflekker. Utvikling av en testmetode som kan skille fisk med melaninflekk fra fisk uten melaninflekk i laksefileten, uten å ta livet av fisken, vil derfor være ettertraktet hos oppdrettsnæringen.

I oppgaven ble oppdrettslaks fra Lerøy sitt slakteri på Skjervøy undersøkt for melaninflekker i laksefileten. Forsøket gikk over seks prøveuttak fra oktober til desember 2015 og totalt 135 fisk ble undersøkt for melaninflekker. Av disse hadde 36 fisk melaninflekker i laksefileten. Disse flekkene ble undersøkt histologisk, ved Real-Time kvantitativ PCR og blodkjemiske analyser av serum.

Resultatene fra disse undersøkelsene viste høyere forekomst av melaninflekker i vårt forsøk sammenlignet Lerøy sine registreringer. De histologiske undersøkelsene av melaninflekkene viste ingen forskjell i nekrotiske muskelceller, betennelse og betennelsesceller eller melaninholdige celler mellom små og store melaninflekker. Samtidig viste de histologiske undersøkelsene mindre betennelse og betennelsesceller i melaninflekken sammenlignet med både nekrotiske muskelceller og melaninholdige celler. Virus ble identifisert i melaninflekker, men det var ingen forskjell i virusmengden mellom melaninflekker, hjerte og muskulatur. Det var heller ingen forskjell i virusmengden mellom fisk med melaninflekk og fisk uten melaninflekk. Biomarkørene som ble brukt for å identifisere melaninflekkene viste ingen signifikant forskjell mellom fisk med melaninflekker og fisk uten melaninflekker. En interessant resultat var likevel at det var en økning i mengden kreatinkinase i serum hos fisk med stor melaninflekk i laksefileten sammenlignet med fisk uten melaninflekk.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	II
Forkortelser	V
1. Innledning	1
1.1. Bakgrunn	1
2. Introduksjon	1
2.1. Om melanin	1
2.1.1. Oppbygging av melanin	1
2.1.2. Melaninproduserende celler	3
2.1.3. Funksjonen til melanin	5
2.1.4. Regulering av melanin	6
2.2. Mulige årsaker til melanindannelse i laksefilet	7
2.2.1. Vaksinepåvirkning	8
2.2.5. Andre potensielle årsaker	11
2.3. Påvisning av melanin	12
2.3.1. Histologiske undersøkelser	12
2.3.3. Biomarkører	13
2.4. Problemstilling	19
3. Materialer og metoder	20
3.1. Innsamling av prøvemateriale	20
3.1.1. Blodprøver	20
3.1.2. Organer på formalin	20
3.1.3. Organer på RNAlater	21
3.4.1. Histologi	22
3.2.1. Dehydrering	22
3.2.2. Innstøpning i parafinblokk	23
3.2.3. Snitting av parafinblokk	23
3.2.4. Farging av snitt	24
3.2.5. Undersøkelse av histologiske snitt	26
3.2. Real Time revers transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	26
3.3.1. RNA-isolering	27
3.3.2. cDNA-syntese	28
3.3.3. Kvantitativ Real-Time PCR	29
3.3.4. Databehandling av PCR	30
3.3. Blodkjemi	31
3.4.1. Måling av Laktat Dehydrogenase (LDH)	31
3.4.2. Måling av Kreatinkinase (CK)	33
4. Resultater	35
4.1. Observasjoner fra slaktelinjen	35
4.1.1. Grunnlag for prøveuttak	35
4.1.2. Lokalisering av melaninflekk i laksefilet	36
4.1.3. Forekomst av melaninflekker funnet i slaktefisk	37
4.1.4. Størrelsesvariasjon på melaninflekk funnet i laksefilet	37
4.1.5. Illustrasjon av fire ulike melaninstørrelser funnet i laksefilet	38
4.2. Histologiske analyser	39
4.2.1. Histologisk gradering av melaninflekker	39
4.2.2. Histologisk gradering av fire ulike størrelser på melaninflekk	40
4.2.3. Histologisk fremstilling av fire ulike grader av nekrose	41
4.2.4. Differensialdiagnostikk	43

4.2.4.1	Differensialundersøkelse av Hjerte-Skjelett-Muskel-Betennelse (HSMB), Kardiomyopati (CMS) og Pancreas Disease (PD)	43
4.2.4.2	Histologiske undersøkelser av nyre og lever	43
4.3.	<i>Real-Time kvantitativ PCR</i>	44
4.3.1	Relative verdier av PRV-RNA for fisk uten melaninflekker i fileten	44
4.3.2.	Relative verdier for PRV-RNA for fisk med melaninflekker med lengde under 1 cm	44
4.3.3.	Relative verdier for PRV-RNA for fisk med melaninflekker med lengde over 2 cm	46
4.3.4.	Deteksjon av enolase	47
4.4.	<i>Blodkjemiske analyser</i>	47
4.4.1	Laktat dehydrogenase (LDH)	47
4.4.2	Kreatinkinase (CK)	48
5.	Diskusjon	50
5.1.	<i>Visuelle resultater</i>	50
5.2.	<i>Histologi</i>	52
5.3.	<i>Real-Time Kvantitativ PCR</i>	56
5.4.	<i>Blodkjemiske analyser</i>	59
5.5.	<i>Forslag til videre forskning</i>	60
6.	Konklusjon	62
Referanser		
Appendiks I		
<i>Reagenser</i>		
Appendiks II		
<i>Løsninger</i>		
Appendiks III		
<i>Histologi</i>		
Appendiks IV		
<i>Cq-verdier for RNA fra PRV målt i RT-qPCR</i>		
Appendiks V		
<i>Målinger av laktat dehydrogenase</i>		

Forkortelser

APC	Antigen-presenterende celler
CBZ	Karbamazipin
CK	Kreatinkinase
CMS	Kardiomyopati
DCE	Dopachrome convention enzyme
DHI	Dihydroksyindol
DHICA	Dihydroksyindol- karbokylsyre
DOPA	Dihydroxyphenulalanin
DTC	Dopachrome tautomerase
HSMB	Hjerte-Skjelett-Muskel-Betennelse
LDH	Laktat dehydrogenase
NFH	Norges Fiskerihøgskole
PCZ	Fungicidpropoconazol
PD	Pancrease Disease
PRV	Piscine orthoreovirus
PMCV	Piscine myocardittvirus
RT-qPCR	Real-Time kvantitativ Polymerase Chain Reaction
SAV	Salmonid alfavirus
SOD	Superoksid dismutase
Tyr	Tyrosinase
Tyr-1	Tyrosinase-lignende protein 1
Tyr-2	Tyrosinase-lignende protein 2

1. Innledning

1.1. Bakgrunn

Aldri har Norge eksportert sjømat for større verdier enn i 2015. Norsk sjømat eksporterte i fjor for 74,5 milliarder kroner, noe som ga en økning i eksporten på 8% (5,8 milliarder kroner) fra rekordåret året før [1]. Dette gjør Norge til verdens nest største eksportland av sjømat, kun slått av Kina. Sjømaten som ble eksportert i fjor gikk til 143 land, der Polen var det landet som importerte mest sjømat til en verdi av 6,9 milliarder norske kroner [2]. Totalt ble det i fjor ble det produsert 1234200 tonn laks (*Salmo salar*) hvorav 1035000 tonn ble eksportert [1, 3]. Mesteparten av dette blir eksportert som rundlaks som er hel, fersk laks. Dette kan gi utfordringer til norsk sjømatnæring som har gjennom flere år opparbeidet seg et godt rykte på at norsk sjømat er et kvalitetsprodukt. Ettersom laksen (*S. salar*) blir sendt hel til kjøperen, mister selgeren muligheten til å kontrollere kvaliteten før den sendes. Rundlaks med dårlig laksekvalitet kan ha et normalt utseende, noe som gjør det vanskelig for kjøperen å oppdage før laksen (*S. salar*) blir solgt. I 2010 ble 74% av all oppdrettslaks produsert i Norge eksportert som rundlaks [4].

Til tross for rekorder i sjømateksporten taper likevel oppdrettsnæringen store verdier som følge av nedklassifisering av laksefilet. Hvor mye oppdrettsselskapene taper på dette er usikkert, men i 2010 ble det estimert et tap på rundt 500 millioner kroner [5]. Med en økende eksport og høye laksepriser har dette tapet økt jevnt, og i 2015 ble dette tapet estimert til å være rundt 1 milliard norske kroner, hvorav den største årsaken skyldes brune pigmentflekker i laksefileten [4, 6]. Disse brune flekkene kan være blodflekker fisken har pådratt seg i merden, bindevev som følge av gjengrodde sår eller pigmentering av melanin. Melaninflekker har siden 2012 økt betraktelig. De forekommer over hele laksefileten, men hyppigheten og størrelsen ser ut til å variere. Melaninflekker med lengde under 3 cm er mest observert, oftest i bukhalen bak bukhinnen. Melaninflekker med lengde over 3 cm oppstår, i hovedsak, i hvit muskel i loins over laterallinjen, men ikke like hyppig som melaninflekker med lengde under 3 cm [5]. Forekomsten av melanin ser ut til å variere noe avhengig av hvor i landet oppdrettslaksen (*S. salar*) blir produsert. Forekomsten av melanin har blitt registrert av Nofima siden 2011. I 2011 var forekomsten av melanin i laks på 13% på landsbasis. Siden har forekomsten økt jevnlig

Innledning

frem til 2015 hvor forekomsten lå på 19%. Oppdrettslaks i Sør- og Vest-Norge (22%) har større forekomst av melaninflekker enn Midt-Norge (15%) og Nord-Norge (12%) [4, 5].

Lerøy Aurora AS er et datterselskap i Lerøy Seafoods Group ASA. Dette selskapet har 350 ansatte og har sitt hovedkontor i Tromsø. Selskapet har totalt 26 konsesjoner, et eget slakteri på Skjervøy og et eget smoltanlegg i Lebesby kommune i Finnmark. Matfiskanleggene i Troms ligger i kommunene Tromsø, Karlsøy, Lyngen, Kåfjord og Skjervøy. I tillegg har Lerøy Aurora matfiskanlegg i Sør-Varanger kommune i Finnmark [Pers. med. Eirik Monsen]. Siden lanseringen i 2007 har Lerøy Aurora produserer laks som går under merkenavnet Aurora Salmon. Dette er laks som er spesialisert for sushimarkedet i Japan. Laksen er kjent for å ha et høyt fettinnhold, mørk oransjefarget filet med tydelige fettstriper [7]. Melaninflekker i laksefileten kan derfor få store konsekvenser for Lerøys salg av oppdrettslaks til Japan.

2. Introduksjon

2.1. Om melanin

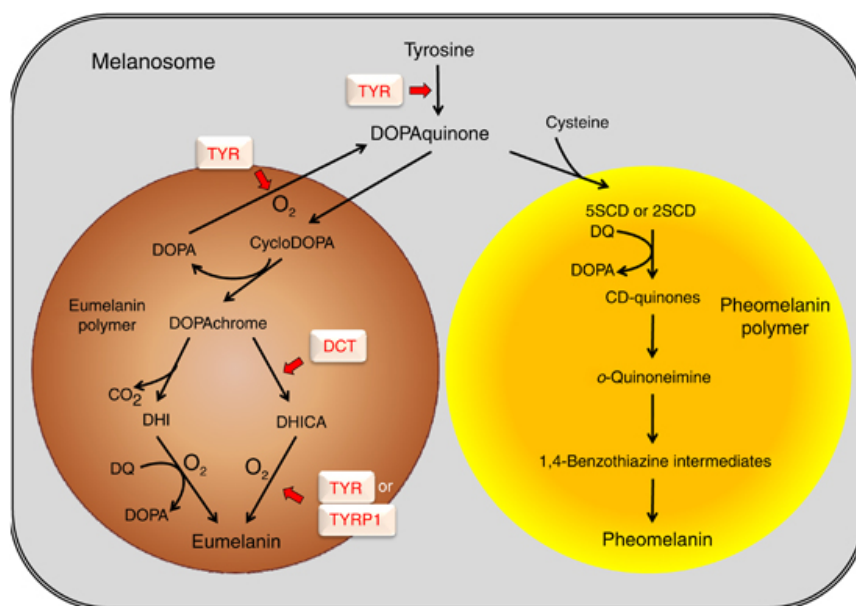
De første beskrivelsene av brune pigmentflekker i laksefileten ble gjort for mer enn 20 år siden, men det var ikke før et røkeri i 2003 begynte å føre statistikk at forekomsten av de brune flekkene ble grundigere beskrevet. De brune flekkene i laksefileten var et stort problem for røkeriindustrien siden flekkene forsvant ikke gjennom røkingsprosessen, men ble desto mer synlige [4]. Disse brune flekkene i laksefileten som røkeriindustrien sliter med forårsakes av et mørkebrunt pigment kalt melanin (eumelanin) [5]. Hos vertebrater som pattedyr og fugler er det i hovedsak melanin som blir produsert av pigmentcellene. I fisk er det beskrevet seks forskjellige chromatoforer, pigmentcelletyper. Disse chromatoforene blir kalt melanoforer, xantoforer, erythroforer, iridiforer, leucoforer og cyanoforer som gir fisken hver sin karakteristiske farge [8]. I denne oppgaven blir det fokusert på melaninoforene som er pigmentcelletypen som produserer det brunaktige, svarte pigmentet melanin. Dette pigmentet finnes naturlig i de fleste planter og dyr hvor det fungerer som antioksidanter, immunceller, og beskytter mot skadelig UV-stråling. I vertebrater finnes det tre forskjellige typer melanin. Disse typene er eumelanin, pheomelanin og neuromelanin.

2.1.1. Oppbygging av melanin

Det finnes tre forskjellige typer melanin. Disse typene er eumelanin, pheomelanin og neuromelani. Eumelanin skiller seg fra pheomelanin med å være et brunaktig-svart pigment sammenlignet med pheomelanin som er et mer rødaktig, brunt pigment. Hos høyerestående vertebrater finnes alle tre melanintypene, men så langt er kun eumelanin som er blitt beskrevet hos teleoster [8]. Både pheomelanin og eumelanin blir syntetisert gjennom en syntetiseringsprosess, kalt melanogenesen (figur 1), hvor phenylalanin blir hydrolysert til tyrosin og videre til DOPAquinoner ved hjelp av enzymet tyrosinase. Her skilles derimot syntetiseringsprosessen av pheomelanin og eumelanin der tyrosinase syntetiserer DOPAquinoner til dihydroxyphenylalanin (DOPA) som videre blir eumelanin, mens cystein syntetiserer DOPAquinoner til 5-S-cysteinyldopa eller 2-S-cysteinyldopa som senere blir pheomelanin [9],[10]. I syntetiseringen av eumelanin blir flere transformasjonsteg involvert som til slutt fører til syntetisering av dihydroksyindol

Introduksjon

(DHI) og dihydroxyindol- karboksylsyre (DHICA). Strukturen på dette makromolekylet er ikke helt kartlagt, der usikkerheten ligger i hvordan DHI og DHICA er bundet til hverandre. Det har lenge vært trodd at bindingen mellom DHI og DHICA befinner seg i andre eller fjerde karbonmolekyl på DHI (Figur 2), men en binding i tredje og syvende karbonmolekyl er heller ikke usannsynlig. Spesielt binding mellom fjerde og syvende karbonmolekyl ser ut til å gi molekylet god oksideringsmulighet [11].

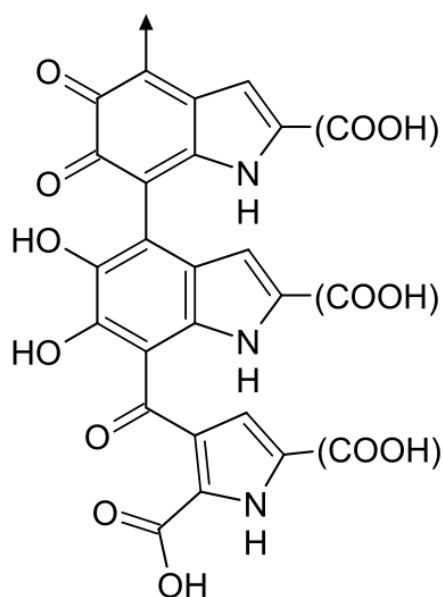


Figur 1: Eumelanogenesen og pheomelanogenesen. Skjemaet viser hvordan tyrosin blir syntetisert til eumelanin og pheomelanin i melanosomene. Figur er hentet fra Kondo & Hearing, 2011 [10].

I insekter starter syntetiseringen av melanin ved at phenylalanin blir hydrolysert til aminosyren tyrosin ved hjelp av phenylalanin hydroxylase. Tyrosin blir dannet til DOPA ved hjelp phenoloxidase (PO) som katalyserer hydrolyseringen. DOPA blir deretter oksidert og danner DOPAquinone ved hjelp av tyrosinase [12]. Strukturen til DOPAquinone kan omorganiseres slik at de danner DHI. DHI kan oksideres til indolequinone, som er en aromatisk heterosyklisk komponent bestående av to ketongrupper. Indolequinone kan tilbakedannes til DHI ved hjelp av Dopachrome Convention Enzyme (DCE). DHI kan igjen bli polymerisert og danner tilslutt et brunt-svart heteropolymer, eumelanin [13]. Syntetiseringen av eumelanin hos vertebrater skiller seg fra insektenes der dopachrome omgjort til DHICA ved hjelp av enzymene dopachrome tautomerase(DTC) og DHICA oksidase. Dette er en tregere reaksjon enn dannelsen av DHI i insekter som har enzymet DCE som akselererer reaksjonen [13]. For vertebratene sin

Introduksjon

del er DTC et viktig enzym i den forstand at den reduserer mengden oksidative mellomprodukter som potensielt kunne skadet verten [14].



Figur 2: Kjemisk fremstilling av eumelanin. Polymerkjeden til eumelanin hvor dihydroxyindol (DHI) og dihydroxyindol-karboksytsyre (DHICA) er koblet sammen. Hentet fra Wikipedia 17.2.2016

2.1.2. Melaninproduserende celler

Pigmentcellene som produserer melanin blir omtalt som melanocytter. Hos mennesker befinner disse cellene seg i nedre del av epidermis i huden. Melanocytterne har melanosomer som produserer melanin. Disse melanosomene som transporteres ut av melanocytterne og over i keratinocytter i epidermis [15]. Melanocytterne dannes i neural crest i ektoderm hvor de utvikles først som umodne melanocytter kalt melanoblaster. Disse melanoblastene migrerer til mukøs og hud hvor de modnes og blir til melanocytter [16]. Melanosomene i melanocytterne utvikler seg gjennom fire steg. I det første steget som omtalt som forstadiet til melanosomene (premelanosomer) blir de umodne melanosomene transportert gjennom vesikler fra endoplasmatiske reticulum (ER) til trans-Golgi-apparatet. I trans-Golgi-apparatet blir strukturen til melanosomene formet i det andre steget. I det tredje steget av utviklingen av melanosomene lages melanin ved at tyrosinase hydroxylerer tyrosinase til DOPA. Det siste steget er melanosomene fullt utviklet og klar til å forlate melanocytterne til fordel for keratinocytterne [15].

Introduksjon

Amfibier har melanocytter på som fungerer på samme måte som beskrevet hos mennesker. I tillegg til dette har amfibier melaninproduserende celler i milt, nyrer og lever. Disse cellene inngår i et ekstra pigmentsystem ofte referert til det indre pigmentsystem. Pigmentcellene som inngår i dette systemet kalles Kupfferceller oppkalt etter Von Kupffer, som var den første til å beskrive cellene. Dette er celler som kan fagocyttere partikler større en $10\mu\text{m}$. Unge Kupffercellene befinner seg i endotelveggen i hepatiske sinusoider, mens eldre Kupfferceller klynger seg mer sammen. Melaninpigmentet i Kupffercellene kan gjøre det vanskelig å gjenkjenne cellene og har blitt forvekslet melanocytter og andre pigmentceller i flere studier [17, 18]. Syntetiseringen av melanin i Kupffercellene skjer også i melanosomer, som befinner seg i cytoplasma. Pattedyrs Kupfferceller er lokalisert i leveren og har ikke melanosomer i cytoplasma, noe som gjør at de ikke kan syntetisere melanin, og dermed skiller seg fra Kupfferceller til amfibier [17, 18].

Melanocytter finnes også hos fisk. Disse melanocyttene må ikke forveksles med Kupfferceller som ikke eksiterer i teleoster [19]. En studie gjort på Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) har vist at melanin produsert av melanocyttene forårsaker mørke striper langs blodårer i muskulaturen [20]. Atlantisk laks (*S. salar*) har i tillegg til melanocyttene spesifikke makrofager, kalt melanomakrofager [21, 22]. Det har vært diskutert om melanomakrofagene har melaninproduserende egenskaper, eller om de fagocytterer melanosomer produsert av andre celler [23, 24]. Disse makrofagene befinner seg i hovedsak i retikuloendoteliale matrix av haemopetisk vev i miltens stroma og i nyrene [25]. Her kan de befinne seg som frie celler eller samlet i nodulære grupper i nær kontakt med vaskulære kanaler [26]. De nodulære gruppene i sentre som kan minne om forløperen til lymfeknuter [21]. Sentrene har vist seg å øke i volum og utbredelse i eldre fisk. Til sammenligning med bruskfisker og mer primitive beinfisker har salmonider en høyere andel mørkt pigment, spredt over et større område i organene [21]. Analyser av melanomakrofagene har vist at melanomakrofager inneholder forskjellige typer pigmenteringer. De forskjellige pigmenteringene er lipofiscin og haemodisin, i tillegg til melanin. Av disse pigmenteringene er lipofiscin som forekommer mest, etterfulgt av melanin. Haemosidin er til stede ved spesielle helsetilstander som blant annet

Introduksjon

haemolytisk anemi. Lipofiscin dannes i fisk med høyt innhold av umettede fettsyrer og et lavt nivå av vitamin E [21, 27].

2.1.3. Funksjonen til melanin

Melanin ser ut til å ha flere forskjellige funksjoner. Ulike teorier om funksjonen har blitt foreslått, blant annet at melanin nøytraliserer frie radikaler som dannes ved katabolisme av fettsyrer fra fagocytose [21]. Andre teorier er beskyttelse mot ultrafiolett (UV)-stråling [15] og at melanin fungerer som en del av det medfødte immunsystemet [23]. Hovedfunksjonen til melanin hos mennesker har lenge vært diskutert. Diskusjonen handler om melanin brukes i forsvar mot UV-stråling eller om det er en del av det medfødte immunsystem. Studie gjort av Slominski et al. [15] viser til beskyttelse mot skadelig UV-stråling ved å fungere som en antioksidant. Melanin er et komplekst polymer som har mulighet til å absorbere og nøytralisere frie radikaler som superoksiderte anioner (O_2^-), hydroxylradikaler ($\bullet OH$) og singlet oksygen (O^*) [28]. I tillegg nøytraliserer melanin kationer og andre potensielt farlige agens som kommer fra fagocyttert cellulært materiale [21, 28, 29]. Melanomakrofager kan potensielt ta skade av superoksidende anioner som den har fagocyttert. For å at melanomakrofagen skal unngå å bli skadet av superoksidende anioner blir disse anionene dismutert til hydrogenperoksid (H_2O_2) og oksygen (O_2) av enzymet superoksid dismutase (SOD). På denne måten blir konsentrasjonen av superoksidende anioner holdt på et lavt nivå i cellen og cellen vil fungere som en antioksidant for resten av organismen [28]. Scalia et al. demonstrerte i 1990 at melanin reduserer mengden lipidradikaler, som ofte dannes fra flerumettede fettsyrer. Studien til Scalia et al. viste at pigmentert vev inneholdt mer flerumettede fettsyrer enn upigmentert vev. Det kan derfor tenkes melanin er et viktig polymer for å unngå lipidradikaler [30].

For insekter som ikke har det adaptive immunforsvaret som vertebrater har, så vil syntetiseringen av melanin være viktig. Noen av mellomproduktene som blir produsert i melanogenesen har en cytotoxisk effekt ved at produktene binder kovalent til cellulære komponenter på cellemembranen hos bakterier og parasitter [13]. I slekten *Drosophila* brukes melanin som en del av det innate immunforsvaret hvor det aktivt dreper bakterier

Introduksjon

og parasitter. I tillegg gjør dannelsen av melanin i insektene til at andre deler av immunsystemet blir aktivert og at sår og skader blir leget [5, 31].

Andre studier peker i retning av en immunrespons fra det innate immunforsvaret [23]. Dette argumenteres med at melanosomene i melanocytene hos pattedyr deler mange av de antimikrobielle egenskapene som lysosomene har [23]. Melanocytene i mennesker fungerer i tillegg som antigen-presenterende celler (APC) som kan fagocyttere mikroorganismer og fremstille antigener som fungerer som mål for T-celler i det adaptive immunsystemet [23, 32]. Mackintosh argumenterte at melanin brukes som en del av immunsystemet siden melanomakrofager er frie celler som kan vandre rundt i organismen, i motsetning til melanocytene som normalt er faste celler i epidermis [23].

Hvor vidt laks bruker melanin som en del av immunsystemet har det vært delte meninger om. Men flere og flere studier tyder på at melanin har en immunologisk effekt, men trolig da gjennom melanomakrofager og ikke fritt melanin [5].

2.1.4. Regulering av melanin

Det har lenge vært diskutert hvordan reguleringen av melanin foregår. En studie gjort i froskearten, *Rana esculenta*, viste en annerledes biokjemisk syntese av melanin enn den som foregår i melanocytter. Syntesen av melanin hos denne frosken tyder på at det er enzymet peroxidase som i større grad regulerer syntetiseringen av melanin [21]. I syntetiseringen av DHICA eumelanin er tyrosinase (Tyr) et viktig enzym og flere studier gjort på flere forskjellige arter viser at tyrosinase er det viktigste reguleringsenzymet ved å regulere både eumelanin og pheomelanin [10, 12, 20, 33]. Allerede i steg I i utviklingen av melanosomene er tyrosinase aktivert og innvirker på melaninsyntetiseringen [15]. Tyrosinase er et kobberenzym som katalyserer hydrolyseringen av tyrosin til DOPA ved å oksidere DOPAquinoner [12, 13]. Hos atlantisk laks er det tre gener som inngår i det som betegnes som tyrosinase genfamilien. Disse genene koder for tyrosinase, tyrosinase-lignende protein-1 (Tyr-1) og Tyrosinase-lignende protein-2, kalt Dopachrome tautomerase (DTC). DTC har vist seg som en nyttig markør for melanoblaster, de umodne melanocytene [25]. Fylogenetiske undersøkelser har vist at tyrosinase genfamilien har eksistert i mer enn 450 millioner år i en felles slektning til både teleostene og pattedyr [34]. En sammenligning mellom regnbueørret og forskjellige teleostarter viste liten variasjon i tyrosinase molekylene Tyr-1 og Tyr-2. Forskjellen er minst mellom

Introduksjon

regnbueørret og artene Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) og zebrafish (*Danio rerio*) [35]. Den fylogenetiske sammenhengen kan også sees i amfibiske Kupfferceller. Genomet til de amfibiske Kupffercellene inneholder både tyrosingener, som koder for tyrosinase hos pattedyr, og andre tyrosinasegener, som koder for tyrosinase i amfibier. Tyrosingenene i Kupffercellene som pattedyr også har er ikke aktiverte gener [36]. Til tross for at amfibier og pattedyr ikke uttrykker samme gener for tyrosinase finner man likevel funnet inaktiverede gener for amfibisk tyrosinase i Kupffercellene til pattedyr.

Temperatur ser ut til å kunne påvirke reguleringen av tyrosinase og DTC [25, 33, 37]. Hos mennesker har normalt huden lavere temperatur enn kroppstemperaturen. Temperaturer 3 til 6°C under kroppstemperaturen ser ut til ha negativ effekt i reguleringen av tyrosinase [37]. Temperaturen ser ut til å kunne påvirke reguleringen hos tyrosinase og dopachome tautomerase også hos fisk. En studie gjort av Larsen et al. ble laks utsatt for temperaturer på 10°C, 15°C og 20°C. Studien viste at tyrosinase ikke ble oppregulert ved 10°C, men ble oppregulert ved 15°C og 20°C [33]. Tyrosinase-reguleringen blir ikke bare påvirket av temperatur. Studie gjort av Cooper og Midling viste at tyrosinaseaktiviteten i hvit muskulatur hos torsk økte ved tilsetning av kobber i fôret [20].

2.2. Mulige årsaker til melanindannelse i laksefilet

Ulike teorier om hva som forårsaker melanin i fileten er blitt foreslått. En teori er stress, som har vist seg å gi laks et mørkere utseende enn laks ikke var utsatt for stress [5, 29]. En annen teori, som har vist å gi melaninavleiringer i bukhulen, er vaksiner [38]. En tredje teori er ulike virus, som har vist seg å tiltrekke seg melaninholdige celler i hjerte og muskulatur [39, 40]. Siden 2003 har antall utbrudd av fisesykdommen HSMB økt [3, 5]. Omtrent på samme tid skjedde det i tillegg store forandringer i innholdet i fôret hvor mer rapsolje ble tilsatt. Det har dermed vært spekulert om endringene i fôrkomponentene kan ha hatt en negativ innvirkning på melaninforekomsten [5]. Andre faktorer som kan ha hatt innvirkning på melaninforekomsten er temperatur, vannkvalitet og klemskader [5].

Introduksjon

2.2.1. Vaksinepåvirkning

Norge stiller strenge krav til at all oppdrettslaks skal være vaksinert med en multikomponent-vaksine før fisken blir overført til sjøvann. Vaksinen blir gitt til fisken, vanligvis i form av en stikkvaksine, for å bekjempe bakterielle og virale sykdommer som økte i omfang [41]. Til tross for at vaksiner gir mange fordeler, blant annet med redusert antall sykdomsutbrudd og redusert bruk av antibiotika, har vaksiner også noen negative bieffekter. En av bieffektene er redusert appetitt hos fisken, noe som igjen vil gå utover veksten [42]. En annen bieffekt sammenvoksinger og melanindeponering i indre organer [38, 42-44]. Det har lenge vært spekulert i om vaksiner er årsaken til melaninflekker i laksefilet og flere studier er gjort på området. I kommersielle vaksiner brukes det adjuvanser for å skape en deponeringseffekt og dermed øke varigheten på vaksinen. Den vanligste adjuvansen som brukes kommersielt består av mineralolje [45]. Ved bruk av en oljebasert adjuvans oppstår en immunreaksjon som tiltrekker melanomakrofager som danner synlige svarte prikker i bukhinnen. Bukhinnen fjernes normalt fra fileten ved slaktelinjen og svarte prikker i bukhinnen vil derfor ikke være et stort problem for laksekvaliteten [44, 46]. Et feilstikk av vaksinen har vist seg å ha negative konsekvenser for laksefileten ved økt melanindeponering i både muskulatur og indre organer [5]. Svakheten med denne teorien er at den forklarer ikke hvorfor uvaksinerte fisk også får melanin [38, 43, 47]. Melaninflekkene forekommer i større grad hos voksen fisk sammenlignet med mindre fisk. Dette betyr at brune pigmentflekker like gjerne kan oppstå senere i laksens livssyklus [5].

2.2.2. *Piscine orthoreovirus (PRV)*

Piscine orthoreovirus (PRV) er først og fremst kjent som agens til fiske sykdommen Hjerte-skjelett-muskel betennelse (HSMB). Denne sykdommen var ukjent langs norskekysten frem til 1999, da det først ble rapportert inn forøket dødelighet [48]. Utbruddene har økt jevnt frem til i 2015 da den hadde en foreløpig topp på 135 registrerte utbrudd fra Rogaland i sør til Vest-Finnmark i nord [3]. PRV er et virus i familien *Reoviridae* (taksonomi; 2007.138V.04) og består av i alt 10 dobbelt-trådige RNA-segmenter [49-51]. Fylogenetisk inneholder denne familien flere virus som går på fugl, pattedyr og reptiler, noe som betyr at PRV er en fylogenetisk avgreining fra de terrestriske virusene [51]. Viruset, som har erytrocyttene som sitt primærmål, finnes normalt ved lave mengder også i frisk laks [52, 53]. Det betyr at viruset nødvendigvis ikke er infeksiøs.

Introduksjon

Deteksjon av viruset blir gjort ved real time kvantitativ PCR -analyser av hjertet og erytrocytter [52]. Kliniske utbrudd oppstår mellom 5 og 9 måneder etter at fisken er blitt overført til sjøen [48, 50]. Fisk med unormal svømmeadferd synes å være mørkere i skinnen og ha mindre svømmeaktivitet. Økt dødelighet kan forekomme, hvor 20% forøket dødelighet har blitt registrert [54]. Andre ytre kliniske tegn på HSMB ved merdekanten er redusert fôropptak og unormal svømmeadferd [50]. Indre kliniske forandringer på organene er et blekt hjerte, ascites-dannelse i bukhulen, petechier i fettvevet rundt blindsekkene. Leveren kan synes å være blekt eller gulaktig med et fibrinlag på overflaten [54]. Det er observert oppsvulmet milt, men dette forekommer ikke i like stor grad som de andre symptomene. Ved histologiske undersøkelser er det i hovedsak hjertet, muskulatur og pankreas som blir undersøkt for fiskesykdommen. Dette fordi disse organene blir affisert i ulik grad ved fiskesykdommene HSMB, Kardiomyopatisyndrom (CMS) og Pancreas Disease (PD). Rød muskel viser myocytisk degenerering og inflammasjonsceller [55]. I hjertet er både kompakt og spongiøst myocardium infisert, hovedsakelig med både neutrofiler og makrofager ved lesjoner spredt gjennom hele myocardium og danner panmyocarditt [48].

En studie gjort av Bjørgen et al. i 2015 viste at PRV har stor innvirkning om Atlantisk laks (*S. salar*) utvikler melaninflekker eller ikke [39]. Studien påviste PRV-antigener i melanomakrofager i områder med melaninflekker i laksefileten.

2.2.3. *Salmonid alfavirus (SAV)*

Salmonid alfavirus (SAV) er agens for fiskesykdommen Pancreas Disease (PD). Den ble først oppdaget i Skottland i 1976, før den senere ble oppdaget i Irland, Norge og Frankrike. Viruset tilhører slekten alfavirus i familien *Togaviridae*. Til nå er det registrert seks subtyper av viruset der SAV 2 og SAV 3 er de som forårsaker sykdom i Norge [50]. I 2015 ble det registrert 137 tilfeller av sykdommen langs norskekysten [3]. Sykdommen er listeført (Liste 3) som betyr at utbrudd av sykdommen skal innrapporteres til myndighetene [3]. De første kliniske tegnene på sykdommen er at fisken mister appetitten. Andre kliniske tegn er tap av vekt, økt mortalitet, slapphet og endret svømmeadferd [50].

Introduksjon

Histologiske forandringer skjer først og fremst i pankreas, hjerte og skjelettmuskulatur. I pankreas oppstår det en akutt fase der de første lesjonene affiserer acinarcellene med varierende grad av inflammasjon[56]. Den endokrine delen av pankreas blir ikke affisert av sykdommen. I hjertet oppstår en alvorlig degenerasjon med multifokal cardiomyocytisk nekrose i både spongiøst og kompakt del av ventrikkelen[50, 56].

I skjelettmuskulatur blir både rød og hvit muskel affisert[56]. Skaden karakteriseres gjennom en hyalin degenerasjon av myofibre med oppsvulmet og fragmentert sarcoplasma. Hvit muskulatur er vanligvis ikke like affisert som rød muskel, men begge viser migrasjon av nukleus inn mot sentrum av fibre [50].

2.2.4. *Piscine Myokarditt virus (PMCV)*

Piscine Myocarditt virus (PMCV) er agens for fiskeesykdommen Kardiomyopatisyndrom (CMS). Sykdommen hadde 105 utbrudd i 2015, spredt fra Sogn og Fjordane (13 tilfeller) til Finnmark (14 tilfeller) i nord [3]. Viruset ble først beskrevet i 2010 og tilhører familien *Togoviridae* [57]. Sykdommen utvikles som en kronisk betennelse over flere måneder med økt dødelighet mellom 12 og 18 måneder etter sjøutsett [50, 58] Senere registreringer gjort av Veterinærinstituttet har vist en økt forekomst av fisk mellom 200 og 300 gram med diagnosen [3]. Sykdommen affiserer både atlantisk oppdrettslaks og villaks, men er ikke diagnostisert hos andre salmonider [50]. Kliniske symptomer er haemoperikardium forårsaket av mindre eller større rupturer i atrium eller sinus venosus. Hjertets atrium blir ofte forstørret som følge av blodpropp [58]. Ascites, fibrinlag på lever og blødninger i bukhulen er og vanlige symptomer [50].

Histologisk undersøkelse av atrium affisert av CMS viser lesjoner med pleomorfe nukleus. Epikarditt forekommer i stor grad med enten fokal, multifokal eller diffus degenerering av trabekulær myokardium. En kraftig økning av lymfocytter og plasmaceller rundt koronararterien kan og observeres [50].

Introduksjon

CMS skiller seg fra både PD og HSMB ved å ikke affisere muskulatur i fisk, og derfor trolig ikke årsak til melaninflekker i laksefileten. Likevel er det observert rikelige mengder melanin i lesjoner i hjerte hos fisk med påvist CMS [40]. Kvantitativ real-time PCR undersøkelser av nyre viste kraftig oppregulering av tyrosinase, hvilket tydet på melaninproduksjon fra melanomakrofager [40].

2.2.5. Andre potensielle årsaker

En studie utført av Nofima har sett på andre potensielle faktorer som kan forårsake melaninflekker i laksefileten. Dette er faktorer som fôr, stresspåvirkning, temperatur, vannkvalitet og trenging eller klemskader. Siden et røkeri begynte å registrere forekomsten av melaninflekker har endringen i fôrsammensetningen vært stor. I dag har vegetabiliske oljer erstattet mye av fiskeoljer som ble brukt i større grad før [5]. Nofima viste i sin studie at ved tilsetning av antioksidanter i fôret ble forekomsten av melanin redusert. En interessant bemerkning er at reduksjonen i melaninforekomst var dobbelt så stor hos nullåringen som for ettåringen. Forekomsten av melanin økte derimot ved tilsetning av kobber i fôret. Dette samsvarer med Cooper og Midlings studie på Atlantisk torsk (*G. morhua*) hvor melaninforekomsten langs blodårene økte [20].

I studien til Nofima ble det i tillegg undersøkt hvilken effekt temperatur har på melaninforekomst i laksefileten. Studien utsatte laks på ulike temperaturer i ferskvannsfasen før laksen ble overført til sjøvann. Fra tidligere er det kjent at temperatur har en effekt på tyrosinase-reguleringen hos både mennesker og fisk [33, 37]. Resultatet fra studien viste en 30% reduksjon i melaninforekomst hos laks ved 16°C sammenlignet med laks ved 8°C. Reduksjonen av melaninforekomsten var i hovedsak i organer og filet [5].

Lavt oksygenivå ble testet som en annen potensiell årsak til økt forekomst av melanin. Ved å holde laks i en tank uten tilførsel av nytt sjøvann sank oksygenivået i tanken ned til 5 mg/l. To måneder etter at laksen ble tatt ut fra karet ble den undersøkt for melaninflekker. Resultatene viste en fordobling av melaninflekker hos laks utsatt for oksygendropp sammenlignet med laks fra kontrollgruppen [5].

Oppdrettslaks gjennomgår røff behandling gjennom produksjonsfasen. Det har lenge vært spekulert om dette kan gi laksen skader som igjen fører til melaninflekker i laksefileten. Resultatene fra en studie gjort av Nofima viste at klemskader som gir fisken langvarige skader kan føre til melaninflekker i laksefileten. Hvor lang tid det tar før blødningene utvikler seg til å bli melaninflekker er uklart [5].

2.3. Påvisning av melanin

For å opprettholde det gode ryktet norsk oppdrettslaks har opparbeidet seg globalt, har det blitt et større fokus på fiskehelse. Slik fiskehelsen praktiseres i dag blir fisk, ved mistanke om sykdom, avlivet og undersøkt for kliniske symptomer som eventuelt blir sendt inn for grundigere undersøkelser ved bruk av histologi og PCR. Om disse undersøkelsene gir positivt utslag for sykdom blir den resterende fisken på lokaliteten behandlet for denne sykdommen [41].

2.3.1. Histologiske undersøkelser

Histologiske undersøkelser av melaninflekker viser betennelse med melanomakrofager, heling og arrdannelse. Heling og arrdannelse er karakteristikk på en kronisk betennelse [5]. Den kroniske betennelsene i melaninflekkene viser interstitielle betennelser med økt bindevevsdannelse, fibrose, og melanomakrofager i og rundt muskelfibrene. En interessant observasjon i Nofimas studie er at den kroniske betennelsen, er dominert av melanomakrofager og fibrocytter. I melaninflekker over 0,5 cm kunne også observeres enkelttilfeller med granulomer omringet av melanomakrofager. Disse granulomene var stort sett fraværende i melaninflekker under 0,5 cm. Granulomatøs betennelse kunne likevel observeres med fibrocytter og melanomakrofager. Det akutte betennelsesområdet var dominert av nekrotiske myocytter eosinofile tverrbånd. Melanomakrofager var stort sett fraværende i en akutt betennelse, men det kan likevel observeres makrofag-lignende celler i betennelsen. Studien konkluderte med at årsaken til melaninflekkene i laksefileten må finnes i årsakene som forårsaker muskelskaden[5].

Histologiske observasjoner gjort av Larsen et al. viste også rikelig med melanomakrofager ved og rundt granulomer i kroniske betennelser [59]. I den samme studien ble det observert varierende størrelser på vakuoler som var dannet i affisert område. Interessant

Introduksjon

observasjon var at store mengder melanomakrofager lagde en barriere mellom vakuolen og vevet rundt. Immunologiske undersøkelser viste anti-MHC class II aktivitet på melanomakrofagenes overflate i områder med stor infiltrasjon av leukocytter [59].

2.3.3. Biomarkører

Per dags dato finnes det lite kunnskap om bruk av biomarkører ved behandling av syk oppdrettslaks (*S. salar*) [60]. Ved sykdomsbekjempelse hos mennesker er bruken av biomarkører godt etablert [61]. Prinsippet med bruk av biomarkører er å registrere forskjell i konsentrasjon av en bestemt protein eller enzymer i ekstracellulære væsker eller serum. Konsentrasjonen av spesifikke enzymer vil holde seg på et konstant nivå i ekstracellulære væsker og serum ved intakte cellemembraner. En økning av spesifikke enzymer kan dermed tyde på skade på cellemembranen [62]. Hvor lang tid det tar før enzymer slippes ut i serum er avhengig av molekylstørrelse og hvor molekylet er lokalisert. Et større molekyl vil bruke lengre tid på å slippes gjennom cellemembranen og ut i serum, mens et molekyl i cytoplasma vil bruke kortere tid på å havne i serum enn strukturproteiner [63]. Dette kan være avgjørende på om et molekyl er en god markør eller ikke. For at molekyler skal fungere som gode biomarkører er det viktig at molekylene har en høy spesifitet, der det finnes rikelig med molekylet i et organ, men vil være fraværende i andre organer. Andre egenskaper en biomarkør bør ha er å være vanskelig å måle ved fravær av sykdom, lang halveringstid i blod for å lettere stille diagnose og nøyaktige og kostnadseffektive analyser [63].

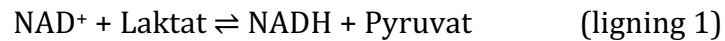
Utvikling av et system som benytter biomarkører vil være nyttig for akvakulturindustrien på den måten at ulike sykdomsforløp blir oppdaget i en tidligere fase. Dette gjør at forebyggende tiltak kan iverksettes ved et tidligere og mer optimalt tidspunkt [60, 63].

2.3.4.1. Laktat dehydrogenase (LDH)

Laktat dehydrogenase (LDH) er et enzym som finnes i planter, diverse mikroorganismer, invertebrater og vertebrater [64]. Det er et viktig enzym i glykolysen der LDH katalyserer NADH og pyruvat til laktat og NAD⁺ vist i ligning 1. Denne prosessen er et viktig steg i metabolismen ved at prosessen lar organismen overkomme perioder med lite oksygen

Introduksjon

ved å akkumulere laktat. Når oksygen blir tilgjengelig igjen blir laktat omdannet tilbake til pyruvat igjen og transporters videre inn i sitronsyresyklusen [65].



LDH har lenge vært etablert som biomarkører i humanmedisin, men trenden er at sykehus i både USA og Europa i mindre grad benytter LDH som biomarkør. Årsaken til det er at LDH er mindre spesifikk for deteksjon av hjertesykdommer enn nye og bedre biomarkører [61]. Ved en hjerteskaade kan økt mengde LDH i plasma først registreres mellom 8 og 12 timer etter at skaden har oppstått. Mengden LDH øker i plasma frem til 2 til 3 døgn etter skade hvor den har sin topp. Deretter synker mengden LDH, men når ikke sitt normale utgangsnivå før mellom 7 og 10 døgn etter at skaden oppsto [63].

Flere ulike studier er gjort for å undersøke om LDH er en god biomarkør i fisk. I Niltilapia (*Oreochromis niloticus*) som ble utsatt for oksidative stressresponser gjennom kadmium-påvirkning sank LDH-verdiene [66]. I en annen tilapiaart (*Oreochromis mossambicus*) ble reguleringen av LDH undersøkt under påvirkning av salinitetsforandringer. Resultatet fra studien viste at en spesifikk LDH-isoform, LDH1, blir mer uttrykt enn de andre isoformene [67]. I en studie gjort av Gosz et al. på baltisk piggvar (*Scophthalmus maximus*) ble LDH brukt som biomarkør ved påvirkning av bunnsnøringsmiddelet tributylin. Studien viste økt LDH i piggvarens sædceller hos fisk utsatt for tributylin sammenlignet med kontrollgruppene [68]. Tributylin ble undersøkt for påvirkning på skjelettmuskulatur hos sild (*Clupea harengus*). Studien viste at tributylin inhiberer LDH aktiviteten i skjelettmuskulaturen [69]. Atlantisk laks (*S. salar*) har og blitt brukt som forsøksdyr ved påvirkning av tributylin. Resultatet fra studien viste at tributylin økte aktiviteten av LDH. Økningen ga imidlertid ikke signifikant forskjell mellom testgruppen og kontrollgruppen [70]. LDH har også blitt kartlagt som biomarkør hos Rød løvefisk (*Pterois volitans*) uten påvirkning av ytre faktorer. Her viste resultatene moderate til høye verdier av LDH i muskel og hjerte sammenlignet med andre organer [71]. I en studie gjort av Vieira et al. ble LDH brukt som en av biomarkørene for å se om kobber og kvikksølv kunne påvirke svømmeadferden til Leirkutling (*Pomatoschistus microps*). Studien viste at ved lave konsentrasjoner av kobber og kvikksølv ble enzymaktiviteten til LDH redusert. Ved moderat konsentrasjon av kobber og kvikksølv var det ingen signifikant forskjell, mens

Introduksjon

ved høy konsentrasjon ble det målt signifikant økning i LDH [72]. I studier gjort av Osman et al. på afrikansk malle (*Clarias gariepinus*) ble LDH brukt som biomarkør ved vannforurensning og ved påvirkning av blynitrat. Resultatene fra studiene viste en signifikant økning i LDH-aktivitet i lever og muskel hos malle ved økt vannforurensning. Ved påvirkning av blynitrat var det en signifikant senkning i LDH-aktivitet [73, 74]

I salmonide arter har LDH blitt testet som biomarkør mot en rekke påvirkninger. Regnbueørret (*O. mykiss*) som ble utsatt for karbamazipin (CBZ) viste signifikant høyere LDH verdier i plasma enn kontrollgruppene [75]. En fôrstudie gjort av Banaee et al. i 2010 på Regnbueørret (*O. mykiss*) viste at tilsetning av Silymarin hadde ingen større påvirkning på LDH-reguleringen. Silymarin så ut til å stabilisere cellemembranen og regulerte LDH nivåene ved tilsetning av 400mg i 1 kg fôr [76].

Resultatene fra Yousaf og Powells studie fra 2012 viste en signifikant økning av LDH i atlantisk laks (*S. salar*) med HSMB, i motsetning til laks med CMS hvor det var ingen signifikant økning av LDH [77]. Siden fiskesykdommen HSMB forårsaker skade i muskulatur og hjerte, i tillegg til at melaninflekker forårsakes av PRV, vil det være interessant å undersøke om LDH fungerer som en biomarkør for identifisering av melanin i laksefilet [39, 40, 50].

2.3.4.2. Kreatinkinase (CK)

Kreatinkinase (CK) er et enzym som katalyserer en fosforylgruppe fra fosfokreatin (PCr) til adenosindifosfat (ADP) og danner kreatin og energimolekylet adenosintrifosfat (ATP) vist i ligning 2 [78].



Denne prosessen skjer igjennom CK/PCr systemet som har tre forskjellige fysiologiske funksjoner, som en midlertidig energibuffer, en intracellulært transportsystem og en metabolsk regulator [79]. CK finnes i alle celler i kroppen, men i tre forskjellige isoformer. Disse isoformene er kodet fra separate gener i genomet for CK-MM, CK-MB og CK-BB [79]

Introduksjon

CK-MM er den vanligste isoformen og forekommer mest av i tverrstripet muskulatur, mens CK-MB og CK-BB forekommer mest i henholdsvis glatt muskulatur og hjerne [63].

Tidlig på 60-tallet ble CK etablert som biomarkør for innen humanmedisinen. I en studie gjort at Apple i 2001 viste det seg at over 50% av sykehus i USA og i Europa brukte CK som en biomarkør for hjerteskode [61]. På grunn av liten vevsspesifitet blir nå CK-MB i mindre og mindre grad brukt til å diagnostisere hjertepasienter [63]. Likevel blir CK-MB ansett som en mer spesifikk biomarkør enn CK siden mengden CK i serum kan påvirkes av skade i skjelettmuskulatur. Ved hjerteskode øker mengden CK i serum mellom 4 og 6 timer etter skade. Mengden CK i serum ser ut til å øke frem til mellom 12 og 24 timer før CK returnerer til sitt normalnivå et sted mellom 48 og 72 timer etter oppstått skade [63]. Målbare nivåer av CK i serum ser ut til å kunne variere stort mellom arter. En studie gjort på wobbegong-hai (*Orectolobus ornatus*) ble gjennomsnittsnivået av CK målt til 49 units per liter [80]. Dette er et lavere nivå sammenlignet med CK-verdier gjort på Kanadarøye (*Salvelinus namaycush*), der normale CK-verdier blir målt til mellom 1000 og 3000 units per liter [81]. Hos atlantisk laks (*S. salar*) viser undersøkelser gjort av Yousaf og Powells i 2012 at CK-verdier hos frisk laks lå mellom 4200 og 10000 units per liter [77].

Flere ulike studier er gjort for å undersøke hvordan CK fungerer som biomarkør ved ulike påvirkninger hos fisk. I baltisk piggvar (*S. maximus*) ble CK testet som biomarkør ved påvirkning av Tributylin. Studien viste økt CK aktivitet spesielt i leveren hos piggvaren [68]. I en studie gjort av Li et al. ble CK testet som biomarkør i regnbueørret (*O. mykiss*) som hadde blitt utsatt for fungicidpropoconazol (PCZ), som er et ugressmiddel tidligere brukt i jordbruk. Studien viste at CK-verdiene var signifikant høyere i alle tre testgruppene behandlet med PCZ enn kontrollgruppene [82]. Regnbueørret (*O. mykiss*) utsatt for (CBZ), legemiddel som blant annet brukes til behandling av epilepsi, viste signifikant høyere CK-verdier enn kontrollgruppen [75]. Almeida et al. utsatte Niltilapia (*O. niloticus*) for oksidativt stressresponser ved å utsette fisken for kadmiumkontaminasjon. Resultatene viste økte CK-verdier i rød muskulatur hos fisk utsatt for kadmium. Interessant nok økte ikke CK-verdiene i hvit muskulatur hos samme fisk [66].

Introduksjon

CK har også blitt testet som biomarkør i atlantisk laks (*S. salar*) som hadde påvist fiskeesykdommene HSMB og CMS. Denne studien viste at CK-verdiene i alle testgruppene for HSMB hadde signifikant høyere verdier enn kontrollgruppene. Samme studie konkluderte med at CK ikke viste signifikant forskjell mellom testgruppene for CMS og kontrollgruppene, hvilket betyr at CK ikke er en like god biomarkør for identifisering av CMS [77].

Siden fiskeesykdommen HSMB forårsaker skade i både muskulatur og hjerte hos fisk [48], og at melaninflekker i laksefileten forårsakes av fiskeesykdommens agens (PRV) [39], vil det være interessant å undersøke om CK fungerer som en god biomarkør for å identifisere melanin[39, 50].

2.3.4.3. *Enolase*

I vertebrater finnes det tre forskjellige subtyper av enolase. Alfa-enolase finnes i stort sett alle vev i vertebratene, Beta-enolase som finnes nesten bare i muskulatur og gamma-enolase som finnes i neuroner og neuroendokrint vev [83]. Enolase er lokalisert i cytosol og på overflaten av cellemembranen hos vertebrater. Dette er et viktig enzym i nest siste steget av glykolysen hvor omdannelse av 2- fosfoglyserat til fosfoenolpyruvat foregår [83, 84]. Alfa-enolase er også aktiv ved glykoneogenesen ved den reversible reaksjonen hvor fosfoenolpyruvat blir omdannet til 2- fosfoglyserat [85].

Innen humanmedisin brukes beta-enolase som en biomarkør mot flere forskjellige sykdommer, blant annet hjerneslag [60], men også som en biomarkør ved fiskeallergi [86]. Enolase er og blitt undersøkt som biomarkør for fisk i en rekke studier. Sanchez et al. undersøkte flere forskjellige biomarkører på Lakseabbor (*Micropterus salmonides*) og deres aktivitet ved påvirkning av miljøforurensning. En av biomarkørene som ble brukt var alfa-enolase som ble mindre uttrykt i leveren til Lakseabboren (*M. salmonides*) [87]. Braceland et al. 2015 sammenlignet serum enolase med myopati forårsaket av fiskeesykdommen, Pancreas Disease. Deres resultater viste en signifikant sammenheng, noe som indikerte at serum enolase er en nyttig biomarkør [60] I en studie gjort av Wozny et al. ble genuttrykking av alfa-enolase brukt som biomarkør i lever og eggstøkkene hos

Introduksjon

regnbueørret (*O. mykiss*) som ble utsatt for zearalenone, som er et mycotoksisk substans produsert av forskjellige typer sopp innen slekten *Fusarium*. Resultatene fra studien viste en økning i mRNA uttrykking av alfa-enolase i testgruppen som ble utsatt for zearalenone [85].

Enolase har blitt brukt som biomarkør hos Atlantisk laks (*S. salar*) ved tidligere studier. I en studie av Atlantisk laks (*S. Salar*) ble det foretatt trenging av fisken før plasmaprøver ble tatt av fisken. Resultatene fra denne studien viste at plasmaprøvene inneholdt mer enolase enn kontrollgruppene. En økning av enolase i plasma tyder på at fisken trenger mer energi og glykolysen blir oppregulert [88].

2.4. Problemstilling

Melaninflekker i laksefileten er et stort kvalitetsproblem hos norsk oppdrettslaks. De brune pigmentflekkene i fileten forårsakes av et pigment, kalt melanin, som gjør at fileten blir nedklassifisert. Årlig taper norsk oppdrettsnæring rundt 1 milliard norske kroner som følge av dårlig kvalitet på fileten. Årsaken til melaninflekker har lenge vært ukjent. Tidligere fikk vaksiner mye av skylden, men nyere forskning viser at virus ser ut til å være viktig del av årsaken. Fisk som har melaninflekker i laksefileten har et normalt utseende og er umulig å skille fra fisk uten melaninflekker. I denne oppgaven ønsker vi å sammenligne blodkjemi med eksisterende og kjente metoder for påvisning. Med det mål å gjøre påvisning av melaninflekker lettere.

Oppgavens delmål

- 1) Registrere forekomst og størrelse på melaninflekker i laksefileter og sammenligne registreringene med forekomst og størrelse fra nasjonale registreringer.
- 2) Undersøke melaninflekker histologisk med henhold til nekrose, inflammasjon og melaninholdige celler og sammenligne disse med størrelsen på melaninflekkene.
- 3) Sammenligne mengden PRV i melaninflekker, hjerter, rød og hvit muskulatur fra fileter med og uten melaninflekker ved bruk av Real-Time kvantitativ PCR.
- 4) Måle og sammenligne laktat dehydrogenase (LDH) og kreatinkinase (CK) fra serum mot størrelsen på melaninflekkene.
- 5) Teste primer(e) for beta-enolase til bruk som biomarkør for påvisning av melaninflekker i atlantisk laks.

3. Materialer og metoder

3.1. Innsamling av prøvemateriale

All fisk som ble brukt i dette forsøket var av arten atlantisk laks *Salmo salar*, og ble produsert ved Lerøy Aurora AS sine lokaliteter rundt Tromsø. Innsamlingen av prøvemateriale foregikk over 6 forskjellige prøveuttak ved Lerøys slakteri på Skjervøy (70°01'52"N, 20°58'17"Ø). Analyseringen av prøvene ble gjennomført ved Norges Fiskerihøgskole (NFH) ved Universitetet i Tromsø- Norges arktiske universitet. Serumanalyser ble i tillegg gjennomført ved Sentrallaboratoriet ved Veterinærhøgskolen i Oslo for kontroll. Prøveinnsamlingen skjedde i tidsperioden oktober til desember 2015.

3.1.1. Blodprøver

Fisken ble avlivet med et slag mot hodet før den ble undersøkt for tegn på sykdom. Eventuelle funn ble notert ned med prøvenummer på fisk. Blod blir samlet opp i vakuumbør (Belliver industrial Estate) ved et stikk i halevenen, *Vena cava*, bak på spolen, 0,5 cm under laterallinjen. Vakuumbør med blod ble vendt opp ned et par ganger og plassert på is. Vakuumbør ble oppbevart på is frem til de ble lagret i kjøleskap ved 4°C i 24 timer. Prøvene ble sentrifugert i 13 minutter ved 2000 rpm ved 4°C. 200 µl serum ble pipettert over til 2ml eppendorfrør (Brand), og lagret i en separat kryoboks ved -80°C frem til analysering. Det resterende serumet i vakuumbør ble fordelt på to egne eppendorfrør og lagret ved -80°C. 10 av prøvene fra fisk med størst melaninflekk og 10 prøver fra fisk uten melanin ble plukket ut og sendt til Sentrallaboratoriet i Oslo for kontroll.

3.1.2. Organer på formalin

Etter blodtaking ble laksen filetert. Bukhinnen ble forsiktig skåret bort og fileten ble nøye undersøkt for synlige melaninflekker. Skiveformede organprøver av lever, blindsekkene og nyre ble skåret ut og overført til et 50 ml rør med formalin. Størrelsen på organeneprøvene var 0,4 cm x 1cm x 1cm etter anbefaling fra Veterinærinstituttet [89].

Hjertet ble fjernet ved et snitt gjennom sinus transversum og over *bulbus arteriosus*, og overført til innsiden av en sterilt skalpellpakning for prøvetaking til RNAlater (Ambion).

Materialer og metoder

Etter at biten til RNAlater var skåret bort ble hjertet delt i to på langs og halvparten ble lagt i samme 50 ml formalinrør som de andre organene. Den andre siden av laksen ble filetert med samme metode som beskrevet ovenfor. Fileten ble nøye undersøkt for synlige melaninflekker.

Ved synlige melaninflekker ble det tatt én ekstra formalin- og RNAlater-prøve. Rørene for samme fisk ble merket med samme nummer. Formalinrørene var på forhånd fylt med 30 ml formalin-løsning.

3.1.3. Organer på RNAlater

En liten del av hjertet ble skåret av med et sterilt skalpellblad. Biten ble deretter finskåret til en størrelse som tilsvarte et fyrstikkhode. Denne biten ble igjen delt i to før begge bitene ble overført til lokket på et 2 ml rør med RNAlater. Samme skalpellblad ble brukt til å skjære ut nyre. Nyren på RNAlater ble ikke snittet ut fra samme område som nyren til formalinrøret. Her ble nyren skåret opp i tilsvarende størrelse, som biten fra hjertet, før nyren ble overført til et eget rør. Etter at begge sidene på laksen var filetert og undersøkt for melanin, ble både rød og hvit muskulatur skåret ut og overført til skalpellpakningen. Både den røde og hvite muskulaturen ble skåret i tilsvarende størrelse som nyren og hjertet. Lokket ble skrudd fast på røret, merket med riktig nummer og organ før et kraftig rykk sørget for at organene havnet i løsningen. Rørene ble oppbevart på is gjennom hele transporten tilbake til NFH, og ble deretter oppbevart i 24 timer ved 4°C før de ble langtidslagring på -80°C.

Materialer og metoder

3.4.1. Histologi

En velkjent metode for diagnostisere fisk er bruk av lysmikroskopi gjennom histologiske undersøkelser. Før den mikroskopiske eksamineringen må vevene farges. I dette tilfellet med Hematoxylin (Thermo Fischer Scientific) og Eosin (Thermo Fischer Scientific) som farger cellekjernen henholdsvis lilla og cytoplasma rosa.

3.2.1. Dehydrering

Organene ble fiksert på formalin i 48 timer før de ble tatt ut og mindre organbiter skjært ut etter ønsket snittretning som var tverrsnitt. Organbitene ble deretter overført til histologikassetter som ble merket med blyant. Kassetten ble lagret på 70% etanol frem til fremføring av vevsprøvene. Program A på fremføringsmaskinen (Shandon citadel 2000) støpte voks inn i organene (se tabell 1).

Tabell 1: Program A på Shandon Citadel 2000. Oversikt over hvilke kjemikalier i hvert av karene som ble brukt til prepareringen av histologisnittene og hvor lang tid snittene ble holdt i karene.

Kar nr.	Tid (h)	Kjemikalie
1	2	96% Etanol
2	2	96% Etanol
3	2	100% Etanol
4	2	100% Etanol
5	1	100%Etanol+ HistoClear (1:1)
6	1	HistoClear
7	1	HistoClear
8	1	HistoClear
9	1	HistoClear+ Parafinvoks (1:1)
10	3	Parafinvoks

3.2.2. Innstøpning i parafinblokk

Kassetten ble samlet opp og lagt i venstre kammer på innstøpingsmaskinen Leica EG1150H (Leica Microsystems) til parafinvoksen hadde smeltet bort fra kassetten. En innstøpingsform ble plassert under tappekranen, og fylt med parafinvoks (Histolab products AB). Kassetten med organet ble åpnet og klargjort til overføring til innstøpingsformen. Innstøpingsformen ble dratt over til en kjøleplate der organbiten ble overført og orientert i ønsket snittretning. Bunnen av kassetten ble plassert på toppen av innstøpingsformen og etterfylt med voks. Innstøpingsformen ble deretter avkjølt på en kjøleplate (Axel Johnson Lab System). Etter at voksen hadde stivnet, ble innstøpingsformen fjernet og parafinblokken nøye undersøkt for sprekker eller gassbobler. Ved funn av gassbobler eller sprekk, ble parafinblokken lagt tilbake i innstøpingsformen og smeltet om. Overflødig parafinvoks langs kantene av kassetten ble skrapet vekk. Parafinblokkene ble oppbevart i romtemperatur frem til snitting.

3.2.3. Snitting av parafinblokk

De ønskede parafinblokkene ble nedkjølt på is, mens et vannbad ble fylt med kranvann og varmet opp til 42°C. Gassboblene, som ble dannet i oppvarmingen, ble fjernet ved å dra to fingre langs kanten og bunnen av vannbadet. Dette ble gjort med jevnlig mellomrom for å være sikker på at ingen bobler festet seg på snittene. Et knivblad (Leica Microsystems) ble montert fast i stativet, og mikrotomen ble stilt inn på 5µm snittykkelse. Ønsket parafinblokk ble montert fast til mikrotomen, og prøvenavn ble notert ned på et objektglass med skrivefelt. Mikrotomen og knivbladet ble justert slik at knivbladet var i kontakt med parafinblokken. Kniven hadde tre punkter på bladet som ble benyttet til snitting, hvor et bestemt punkt ble brukt til å trimme bort parafinvoks slik at organet kom fram. Deretter ble kniven flyttet slik at et av de to andre punktene snittet de ønskede snittene. Disse snittene ble overført til vannbadet ved hjelp av et objektglass dyppet i 50% etanol. Om knivbladet skar skjevt på parafinblokken ble dette justert ved å endre posisjonen til mikrotomen. De ferdige snittene tørket på kanten av vannbadet før de ble overført til et varmeskap i 60°C i 30 minutter.

3.2.4. Farging av snitt

Farging av snitt ble utført med Leica ST4020 (Leica Microsystems) fargemaskin. Maskinen består av flere kar fylt med forskjellige kjemikalier (se tabell 2). Fire snitt ble plassert i en gummiholder og lagt i et eget kar med HistoClear (National Diagnostics). Dette karet hadde totalt plass til i alt fire gummibeholdere. Etter 4,5 minutt ble en gummibeholder hengt fast i stativet på fargemaskinen. Fargemaskinen var automatisert og overførte gummibeholderen til neste kar etter 90 sekunder. Rekkefølgen på samlebandet var to gummibeholdere, deretter et mellomrom, før to nye gummibeholdere. Dette for å sikre nok tid til å feste 24 x 60 mm dekkglass på snittene. Dekkglassene ble festet ved et par dråper Eukitt (Fluka Analytical) på snittene. Snittene ble tørket i avtrekkskap fram til undersøkning i mikroskop.

Materialer og metoder

Tabell 2: Fargingsprogram for Leica ST4020. Oversikt over rekkefølgen, kjemikalie og tid programmet til fargingsmaskinen benyttet. I hvert kar var det plass til fire snitt.

Karnummer	Kjemikalie	Tid (s)
Eget kar	HistoClear	Min 270
1	HistoClear	90
2	100% Etanol	90
3	96% Etanol	90
4	96% Etanol	90
5	Vann	90
6	Hematoxylin	90
7	Hematoxylin	90
8	Vann	90
9	Vann	90
10	Eosin	90
11	96% Etanol	90
12	96% Etanol	90
13	100% Etanol	90
14	100% Etanol	90
15	HistoClear	90
Eget kar	HistoClear	

3.2.5. Undersøkelse av histologiske snitt

Snittene ble undersøkt på to forskjellige måter. Snitt med melaninflekk ble undersøkt med et graderingssystem for nekrose hentet fra McLoughlin et al. (2006) [90]. For å redusere risikoen for forventingsskjevhet ble snittene "blindet" ved å skjule prøvenummer. Snittene ble vurdert sammen med fagpersonell fra Veterinærinstituttet i Harstad.

Tabell 3: Scoringssystem for nekrose. Nekrose blir bestemt ut fra antall døde celler i snittet og graderes fra 0 til 3, hvor score 1 er sparsom grad (<50 døde celler), score 2 er moderat grad og score 3 er alvorlig grad av nekrose (>100 døde celler). Score 0 er normalt vev. Scoringssystemet er hentet fra McLoughlin et al. (2006)[90].

Score	Gradering	Beskrivelse
0	Normal	Normalt vev
1	Sparsom	Fokal myocytisk nekrose (<50 døde celler)
2	Moderat	Multifokal myocytisk nekrose (50-100 døde celler)
3	Alvorlig	Alvorlig myocytisk nekrose (>100 døde celler)

Snitt med hjerte, pankreas, nyre og lever ble undersøkt for differensialdiagnosene CMS, PD og HSMB. Her ble det ikke tatt hensyn til graden av betennelse, men kun om organet var betent eller ikke.

Snittene ble analysert med et DM6000 B (Leica Microsystems) lysmikroskop, og bildene ble tatt med et Leica DFC 320 (Leica Microsystems) digitalkamera. Bildene ble integrert med bruk av Leica Application Suite V3 (software) programvare.

3.2. Real Time revers transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR er en metode der man bruker enzymet revers transkriptase til å omdanne RNA til cDNA. Metoden består av de tre hovedstegene RNA-isolering, cDNA-syntese og kvantitativ Real-Time PCR [91]. Amplifiseringssyklusen består av tre steg; denaturering, amplifisering og ekstensjon. Ved denaturering blir dobbeltrådig DNA (dsDNA) delt til enkeltrådig DNA (ssDNA) ved 95°C før temperaturen senkes og spesifikke primere, og komplementære baser, fester seg til DNA-tråden. DNA-polymerase syntetiserer så en ny

DNA-tråd i ekstensjonsfasen før amplifiseringssyklusen begynner på en ny runde. For å detektere de ønskede gensekvensene benyttes et fluoriserende fargestoff. Dette fargestoffet måles etter hver syklisk amplifiseringssyklus i analysen [91]. Det fluoriserende fargestoffet som ble benyttet var SYBR® Green. Dette fargestoffet fester seg til alle primerpar og binder seg til dsDNA. Dette kan potensielt gi uspesifikke resultater og viktigheten av rent RNA er derfor høy. For å kontrollere om det har oppstått uspesifikk binding benyttes et smeltekurveprogram. Denne smeltekurven gir en grafisk framstilling på endring i fluorescens når SYBR®Green binder seg til dsDNA idét dsDNA blir omdannet til ssDNA [91]. Den uspesifikke bindingen vil ha en annen smeltekurve enn de andre prøvene. Det vil alltid være litt bakgrunnssignal i prøven og dette kalles for baseline. Elongeringsfaktor, ET-1a, ble brukt som referansegen [92].

3.3.1. RNA-isolering

Isoleringen av RNA fra de ulike vevstypene foregikk i henhold til protokollen til RNeasy® mini kit (Qiagen). Ti prøver ble isolert for RNA om gangen for å unngå for lang ventetid for hver prøve. I alt ble ti prøver av hvert organ tatt ut til analyse. Ved melaninpositiv fisk ble totalt ti prøver fra fisk med størst melaninflekk, i tillegg til ti prøver fra fisk med melaninflekk under 1 cm, valgt ut til analyse (se tabell 4).

Tabell 4: Prioriterte PCR-prøver. Ti hjerte- og muskelprøver fra fisk uten melaninflekk.

	Hjerte	Melaninflekk	Muskel
Negativ	10	-	10
Positiv > 3 cm	10	10	10
Positiv < 1 cm	10	10	10

Tre kuler ble plassert i hvert sitt 2 ml rør. Buffer-løsningen RLT (Qiagen) ble blandet ut med 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) i blandingsforhold 1:10, før 600 µl ble overført i hvert rør. Organet ble overført ved hjelp av et sterilt skalpellblad før organet ble homogenisert ved en Precellys 24 (Bervert Bertin technologies) tissue homogenizer.

Materialer og metoder

Løsningen ble sentrifugert ned og pipettert over i eppendorfrør med 600µl 70% etanol. Løsningen ble mikset godt ved gjentatte pipetteringer.

600 µl av løsningen ble, i to omganger, overført til RNeasy mini kolonner og sentrifugert ved 8000 g i 20 sekunder. Væsken som ble samlet opp ble kastet. Deretter ble 700 µl av vaskebufferen, RW1 (Qiagen), overført og på nytt sentrifugert ved 8000 g i 20 sekunder. Oppsamlet væske ble kastet før 75 µl DNase (Qiagen) ble tilsatt og inkubert ved 20°C i 15 minutter. 500 µl RPE-buffer (Qiagen) ble tilsatt i to omganger der første runden ble sentrifugert i 20 sekunder ved 8000 g, mens runde to ble sentrifugert i 2 minutter. Tilslutt ble spinkolonnen overført til et nytt eppendorfrør og 30 µl RNase-fritt vann (Qiagen) ble tilsatt og sentrifugert i 1 minutt ved 8000 g. For å sikre høy konsentrasjon av RNA ble det siste steget gjentatt på nytt, men denne gang ble utfallsvæsken overført til spinkolonnen. RNA-konsentrasjonen ble målt ved hjelp av et NanoDrop-1000 spectrophotometer (Saveen Werner).

3.3.2. cDNA-syntese

Syntetiseringen av cDNA foregikk i henhold til protokollen til QuantiTech® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Denne metoden er todelt, hvor den første delen fjerner resterende genomisk-DNA mens den andre delen består av selve cDNA-syntesen hvor Revers Transkriptase blir tilsatt.

Etter RNA-isoleringen inneholdt prøvene ulik mengde med RNA. For at prøvene skal sammenlignes må RNA-konsentrasjonen være lik. RNA-konsentrasjonen i hver enkelt prøve ble bestemt til å være 250 ng/µl. Den totale mengden vann og RNA var 12 µl hvor Ultra Pure Water ble brukt for å få riktig blandingsforhold. Ved bruk av et Excel-regneark (Microsoft) ble dette blandingsforholdet regnet ut. Riktig vannmengde ble tilsatt i PCR-stripsene før 2µl gDNA Wipeout Buffer (Qiagen) ble tilsatt hver enkelt brønn. Tilslutt ble riktig RNA-mengde tilsatt brønnene. En negativ kontroll ble lagd ved tilsetning av vann i stedet for RNA i en ekstra brønn. PCR-stripsene ble inkubert i en 2720 Thermal cycler (Applied biosystems) i 42°C i 2 minutter. Stripsene ble deretter avkjølt på is i minimum 1 minutt. Til cDNA-syntesen ble en mastermix bestående av Quantiscipt Reverse

Materialer og metoder

Transcriptase (Qiagen), Quantiscript RT buffer og RT primer mix (Qiagen) blandet ut med blandingsforhold 1:4:1, der Quantiscript Reverse Transcriptase ble tilsatt til slutt. Fra denne mastermixen ble 6 µl tilsatt hver enkelt brønn, pipettert til en homogen-løsning, og spunnet ned.

PCR-stripsene ble deretter kjørt i en forhåndsprogrammert 2720 Thermal Cycler. Prøvene ble først kjørt på 42°C i 15 minutter, deretter 95°C i 3 minutter. Ved langtidslagring av cDNA ble stripsene oppbevart i fryser ved -20°C. For korttidslagring ble stripsene oppbevart i kjøleskap ved 4°C.

3.3.3. Kvantitativ Real-Time PCR

Metoden nedenfor ble gjennomført på samme måte for elongeringsfaktor (EF-1a), PRV og enolase.

En mastermix bestående av 0,9 µl RNase-fritt vann, 7,5 µl Fast SYBR® Green Master mix (Applied biosystems) og 0,8 µl av hver av primere (tabell 5). Disse ble ganget opp i forhold til antall prøver som ble kjørt. Miksen ble blandet godt ved bruk av en Vortex og sentrifugert før 10µl ble overført til et MicroAmp® Fast Optical 96-brønners brett (Applied biosystems). Deretter ble 5 µl cDNA overført til hver av brønnene slik at totalt volum i brønnene var 15 µl. Platen ble lukket med gjennomsiktig teip før platen ble blandet godt med bruk av Vortex og sentrifugert. Tilslutt ble platen avlest i en 7500 Fast Real-Time PCR maskin (Applied biosystems).

En primertest ble gjort på de tre ulike enolase primerne. seks ulike prøver, tre hjerteprøver og tre melaninprøver, ble valgt ut. Kriteriene for disse prøvene var høy RNA-konsentrasjon og resultatene fra elongeringsfaktor (EF-1a). Både primeren til elongeringsfaktor, EF-1a, og PRV ble testet ut ved en fortyningstest.

Materialer og metoder

Tabell 5: Primersekvenser. Oversikt over de ulike primersekvensene til PRV, beta-enolase og elongeringsfaktor 1a som ble benyttet og antall baser i hver gensekvens.

Gen	Sekvens (5-3')	Basepar
PRV F	TCAGTGCGGGGAACTCTAGTGGCA	24
PRV R	GACGACCTTGAACGCACGAGCGTG	24
Beta-enolase 2 F	TGCTGAAGGAAGCCATTGG	19
Beta-enolase 2 R	AAGATCGTGATCGGCATGG	19
Beta-enolase 3 F	CAAGTTCGCAGGAAGGACTAC	21
Beta-enolase 3 R	TAAACCCTCCATCACGGCTG	20
Beta-enolase 4 F	GCCCCGCCTTCAATGTG	17
Beta-enolase 4 R	GAACAAGCTGGCCATGCAG	19
EF1a F	CACCACGGCCATCTGATCTACAA	24
EF1a R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC	24

3.3.4. Databehandling av PCR

For behandling av rådata ble programvaren qBase v1.3,5 (qBase) benyttet. Dette programmet benytter en Ct- relativ kvanifiseringsmodell, vist i ligning 3, som korrigerer for PCR-effektivitet og mulighet for normalisere flere referansegener [93].

$$\text{NRQ} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (\text{ligning 3})$$

3.3. Blodkjemi

3.4.1. Måling av Laktat Dehydrogenase (LDH)

For måling av Laktat dehydrogenase ble det benyttet et Lactate dehydrogenase Activity Assay kit (Sigma-Aldrich) hvor fremføringen ble gjort i henhold til protokollen til dette kitet [94]. Bestemmelse av mengden laktat dehydrogenase tilstede i serum blir gjort ved måling av redusering av NAD⁺ til NADH over en bestemt periode. Laktat dehydrogenase katalyserer omdannelsen av pyruvat og laktat ved å redusere NAD⁺ til NADH. Denne omdannelsen måles med et spektrofotometer. For utregning av LDH aktivitet brukes formel 1 der B er mengden NADH som blir dannet mellom første og siste måling. Denne blir funnet ved hjelp av standardkurven.

$$LDH \text{ aktivitet} = \frac{B \times \text{Fortynnet prøve faktor}}{(\text{Reaksjonstid}) \times \text{Volum}(ml)}$$

Formel 1: LDH aktivitet. B er mengden NADH utregnet ved hjelp av standardkurve. Fortynnet prøve faktor er fortynningsgraden av serumprøvene. Reaksjonstiden er differansen i tid mellom siste måling og første måling. Enheten for LDH aktivitet er units per liter (U/L). Formel er hentet fra protokoll fra LDH Activity Assay Kit [94].

LDH-kitet besto av fire forskjellige komponenter, hvorav LDH Assay Buffer (Sigma-Aldrich) ble oppvarmet til romtemperatur (20°C) ved overføring av kroppsvarme. Den positive kontrollen, en annen komponent, ble lagd ved å fortynne 1,0 ml LDH Positive Control (Sigma-Aldrich) i 9,0 ml LDH Assay Buffer (Sigma-Aldrich) i et eppendorfrør. LDH substrat miksen ble tilsatt 1 ml Ultra Pure Water (Biochrom AG). 400µl Ultra Pure Water ble overført til NADH standard miksen. Dette ga en 1.25mM NADH standard løsning. Alle løsningene ble pipettert godt og plassert på is før bruk.

Master reaksjonsmiksen besto av 48µl LDH Assay Buffer (Sigma-Aldrich) og 2µl LDH substrat miksen (Sigma-Aldrich). Denne ble blandet ut i eppendorfrør og pakket inn i aluminiumsfolie før løsningen ble blandet godt ved bruk av en Vortex. Løsningen ble blandet godt ved bruk av en Vortex én gang rett før bruk for å sikre god blanding.

Materialer og metoder

Fryste serumprøver ble overført til is og tint opp til flytende form. For å finne riktig mengde til analysen ble det utført en test hvor 5 μ l og 30 μ l serum ble overført til hver brønn. Resultatene fra denne testen viste at begge mengdene overskred standardkurven. Protokollen fra LDH Activity Assay kit [94] anbefalte en prøvemengde mellom 2 og 50 μ l. Om prøvene oversteg standardkurven etter få målinger anbefalte protokollen å fortynne ut prøvene. Serumprøvene ble da fortynnet 1:10 (1 μ l serum i 9 μ l PBS) i egne eppendorfrør og plassert på is.

40 μ l LDH Assay Buffer (Sigma-Aldrich) ble overført til hver enkelt brønn i et 96- brønners brett (Nunc). 10 μ l av den fortynnende serumet ble deretter pipettert over i brønnene. Det ble lagd duplikate prøver. Løsningen i brønnene ble pipettert minst 3 ganger for å få en homogen løsning. Pipettespissen ble byttet for hver prøve. Et stykke aluminiumsfolie, nok til å dekke 96- brønners brettet, ble gjort klart før 50 μ l master reaksjonsmiks ble overført til hver enkelt brønn, som igjen ble pipettert minst 3 ganger. Aluminiumsfolien ble holdt over de brønnene som var tilsatt master reaksjonsmiks for å unngå at prøvene ble utsatt for lys. Etter at alle brønnene var pipettert ferdig ble hele brettet pakket godt inn i aluminiumsfolie og avlest i et VersaMax- spektrofotometer (Molecular Devices). Brettet ble forsiktig ristet inne i maskinen og avlest etter 2 minutter ved 450nm. Etter avlesningen ble brettet på nytt pakket godt inn i aluminiumsfolie og inkubert i 37°C i 5 minutter før en ny avlesning. Denne prosedyren ble gjentatt frem til den mest aktive prøven oversteg verdien til den høyeste standardverdien. For utregning av aktiviteten for Laktat dehydrogenase ble formel 1 benyttet.

3.4.2. Måling av Kreatinkinase (CK)

For måling av kreatinkinase (CK) ble det benyttet Creatine Kinase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich) [95]. CK spalter en fosfatgruppe fra fosfokreatin og danner kreatin og ATP. Creatine Kinase Activity Assay Kit bruker en koblet enzymreaksjon som involverer hexokinase ved å fosforylere glukose til glukose-6-fosfat. Glukose-6-fosfat blir oksidert av NADP og danner NADPH. Mengden NADPH som dannes er proporsjonal med mengden Kreatinkinase.

$$CK \text{ aktivitet} = \frac{(A340)_{final} - (A340)_{initial}}{(A340)_{calibrator} - (A340)_{blank}} \times 600$$

Formel 2: Kreatinkinase aktivitet. Absorbansen fra første måling ble trukket fra absorbansen fra siste måling. Ved calibrator og blank ble verdien fra siste måling brukt. Enheten for CK aktivitet var units per liter (U/L). Hentet fra protokoll som fulgte med CK Activity Assay Kit[95].

Alle komponentene i kitet ble tint opp til romtemperatur (20°C) før bruk. En Reconstituted Reagent bestående av Assay Buffer, Substrate Solution og Enzyme mix (Qiagen) ble lagd med blandingsforhold 100:10:1. 100 µl reconstituted reagent ble tilsatt hver brønn før 10 µl serumprøve ble tilsatt de ulike brønnene. I en av brønnene ble 110µl Ultra Pure Water tilsatt som en blank-prøve. 100µl Ultra Pure Water og 10 µl Calibrator ble tilsatt i en annen brønn. Tilslutt ble 10 µl serum tilsatt i brønnene med reconstituted reagent. 96-brønnersbrettet ble inkubert i 20 minutter ved 20°C før første avlesing i et SpectraMax i3 (Molecular Devices) spektrofotometer. Absorbansen ble målt ved 340 nm. Etter måling ble brettene inkubert i romtemperatur i 5 minutter før ny avlesning. For utregning av CK-aktiviteten ble formel 2 benyttet [95].

Materialer og metoder

Totalt 20 serumprøver fra fileter med melaninflekker og uten melaninflekker ble sendt til Sentrallaboratoriet ved Veterinærhøgskolen (NMBU) i Oslo for analyser av CK og LDH. Ti av prøvene var fra fileter uten melaninflekk og ble satt som kontroll. Av de resterende ti serumprøvene var fra fileter med de største melaninflekkene. Serumprøvene ble analysert i en AVIDA 1800 (Simens).

4. Resultater

4.1. Observasjoner fra slaktelinjen

4.1.1. Grunnlag for prøveuttak

Prevalens for melaninflekker fra Lerøy er basert på 100 stikkprøver som blir tatt hver produksjonsdag. Snittvekk og prevalens for melaninflekker i laksefileter ved de samme datoene som våre prøveuttak mellom oktober og desember 2015 er vist i tabell 6. Data er hentet fra Lerøy sine registreringer ved slakteriet. Påvisning av HSMB i produksjonssyklusen er også vist i tabellen.

Tabell 6: Prevalens for melanin. Prevalens for melanin (%) og snittvekt (kg) ved seks datoer fra oktober til desember i 2015. Data fra Lerøy Aurora sine egne registreringer. Prevalensen ga utgangspunkt for prøveuttakene i 2015. Påvist HSMB-utbrudd gjennom produksjonssyklusen vises i tabellen.

2015				
Uttak	Lokalitet	Snittvekt (kg)	Prevalens melanin (%)	Påvist HSMB i produksjonssyklus
1	A	4,84	4	÷
2	A	5,27	3-4	÷
3	A	4,40	7	÷
4	B	5,86	6-10	÷
5	B	5,58	10	÷
6	B	4,65	6-9	+
Gjennomsnitt		5,1	7	

Det ble slaktet fra to ulike lokaliteter over de seks ulike prøveuttakene og resultatene er vist i tabell 6. Prevalensen for melaninflekker over de seks datoene viste en gjennomsnittlig prevalens for melanin på 7 %. Lokalitet A hadde lavere prevalens for melaninflekker i laksefileten enn lokalitet B. Gjennomsnittsvekten på fisk fra disse to lokalitetene ved slakt var 5,1 kg. Hos lokalitet B ble det påvist HSMB i én merde. Det var ingen økt dødelighet eller andre tegn på HSMB-utbrudd i merden. Det ble slaktet fisk fra denne merden ved prøveuttak 6. Prevalensen for melaninflekker i laksefileten var ikke høyere for denne datoen sammenlignet med de øvrige fem datoene.

Resultater

4.1.2. Lokalisering av melaninflekk i laksefilet

Melaninflekker kan oppstå i ulike deler av laksefileten. Lokalisering av melaninflekkene i laksefiletene observert ved slaktelinjen på slakteriet er vist i figur 3. Størrelsen på melaninflekkene er bestemt ut fra største lengden på melaninflekken. Melaninflekker med lengde over 3 cm ble observert som lange, smale melaninflekker i loins, muskulatur dorsalt for laterallinjen. Melaninflekker med lengde under 3 cm ble observert under laterallinjen, bak bukhinne



Figur 3: Lokalisering av melaninflekk i laksefilet. Melaninflekker over 3 cm ble observert dorsalt i loins, ryggmuskulatur over laterallinjen. Melaninflekker under 3 cm ble observert under laterallinjen, bak bukhinnen.

Melaninflekk til de 36 fiskene hadde en mørk, brunaktig farge. Fisk med annen farge på flekken ble ikke registrert som melaninflekk. I de fleste observasjoner hadde fiskene kun én melaninflekk som ble observert i høyre filet vist i figur 3. Kun én fisk hadde to melaninflekker i fileten fordelt på hver filet.

Resultater

4.1.3. Forekomst av melaninflekker funnet i slaktefisk

Forekomsten av melaninflekker har økt betydelig de senere årene. I løpet av forsøksperioden ble det foretatt seks prøveuttak fra oktober til desember 2015. I alt ble 135 fisk undersøkt for melaninflekker i laksefileten. Av de 135 fisk hadde 36 synlig melaninflekk i fileten, som ga en prevalens på 26,7%.

4.1.4. Størrelsesvariasjon på melaninflekk funnet i laksefilet

Størrelsen på melaninflekker kan ha negative konsekvenser for salget av laksefileten. Trettiseks fisk fordelt på fire ulike grupper basert på ulik størrelse på melaninflekken er vist i tabell 7. Disse ble gruppert inn i fire ulike grupper ut fra størst lengde på melaninflekken. Melaninflekkene ble fordelt i gruppene: mindre enn 1 cm (<1cm), mellom 1 og 2 cm (1-2 cm), mellom 2 og 3 cm (2-3 cm) og over 3 cm (>3 cm).

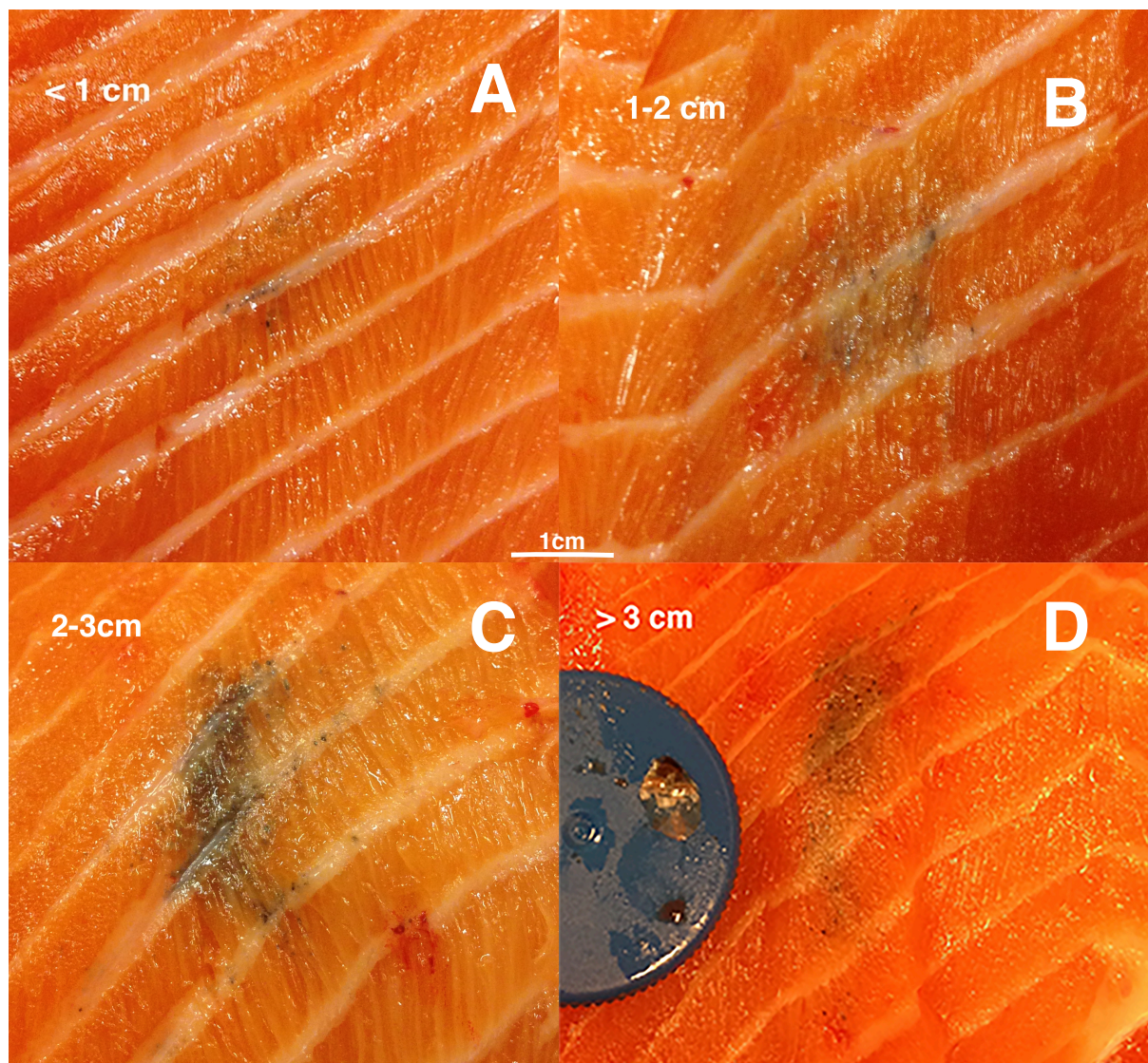
Tabell 7: Antall fisk gruppert etter størrelse på melaninflekk. Totalt 36 fisk ble fordelt på fire ulike grupper etter melaninstørrelse. Melaninflekker under 1 cm (n=15), melaninflekker mellom 1 og 2 cm (n=11), melaninflekk mellom 2 og 3 cm (n=6) og melaninflekk over 3 cm (n=4).

Størrelse på melaninflekk	Antall fisk
< 1cm	15
1-2 cm	11
2-3 cm	6
>3cm	4

De 36 fiskene med melaninflekk i laksefileten, tatt ut i perioden oktober til desember 2015, fordelt etter ulik størrelse på melaninflekken er vist i tabell 7. Av de 36 fiskene med melaninflekker i laksefileten hadde 15 av melaninflekkene en lengde under 1 cm. Det ble observert melaninflekker med en lengde mellom 1 og 2 cm hos 11 fisk. Hos seks av fiskene var lengden melaninflekken mellom 2 og 3 cm, mens fire av fiskene hadde en melaninflekk med lengde over 3 cm.

Resultater

4.1.5. Illustrasjon av fire ulike melaninstørrelser funnet i laksefilet
En typisk melaninflekk fra hver av de ulike gruppene for melaninflekk fra tabell 7 er vist i figur 4. Øverst til venstre er melaninflekk med lengde under 1 cm (A). Øverst til høyre er melaninflekk med lengde mellom 1 og 2 cm (B). Nederst til venstre er melaninflekk med lengde mellom 2 og 3 cm (C), mens nederst til høyre er melaninflekk over 3 cm (D). Den blå korken er 3,4 cm i diameter. Den hvite målestokken er 1 cm.



Figur 4: Bilde av melaninflekker med ulik størrelser. A) melaninflekk med lengde under 1 cm. B) melaninflekk med lengde mellom 1 og 2 cm. C) melaninflekk med lengde mellom 2 og 3 cm. D) melaninflekker over 3 cm. Blå kork er 3,4 cm i diameter. Målestokk: 1 cm.

Resultater

Melaninflekkene i de to gruppene med kortest lengde på melaninflekken ble oppdaget bak bukhinnen, mens melaninflekkene i de to andre gruppene forekom oftest i ryggmuskel over laterallinjen. Dette fremkommer ikke i figur 4. Ved melaninflekkene med en lengde under 1 cm befant hele eller store deler seg i myosepta, fettvevet mellom muskelfibrene. Melaninflekker med lengde over 1 cm var like ofte utbredt i muskel som i fettvev.

4.2. Histologiske analyser

4.2.1 Histologisk gradering av melaninflekker

Trettiseks fisk med melaninflekker ble tatt ut i perioden oktober til desember 2015. Melaninflekkene ble gradert på tre ulike måter etter døde muskelceller (Nekrose), betennelse og betennelsesceller (Inflammasjon) og melaninholdige celler (Melanin) vist i tabell 8. Melaninflekkene er gradert fra 0 til 3 der 0 er normalt, friskt vev uten melaninholdige celler eller betennelse og betennelsesceller, og 3 som er alvorlig grad av nekrotiske muskelceller, melaninholdige celler eller betennelse og betennelsesceller. Melaninflekkene fra tabell 6 ble tatt ut og preparert for histologi. Det ble tatt ut én prøve per melaninflekk. Melaninflekkene ble forsøkt snittet midt i flekken, og orientert slik at muskelfibrene ble skåret på tvers. Graderingssystemet er hentet fra McLoughlin et al. 2006 og ble brukt til å gradere nekrose, inflammasjon og melanin.

Tabell 8: Histologiske resultater. Synlige melaninflekker i laksefilet analysert histologisk for nekrose, inflammasjon og melaninholdige celler. Av 36 prøver hadde 26 nekrotiske muskelceller av sparsom, moderat eller alvorlig grad. Ni hadde inflammasjon, mens 32 hadde melaninholdige celler. Score 0 er normalt vev.

Score	0	1	2	3	Antall prøver
Nekrose	11	16	6	3	36
Inflammasjon	27	8	1	0	36
Melanin	4	21	11	0	36

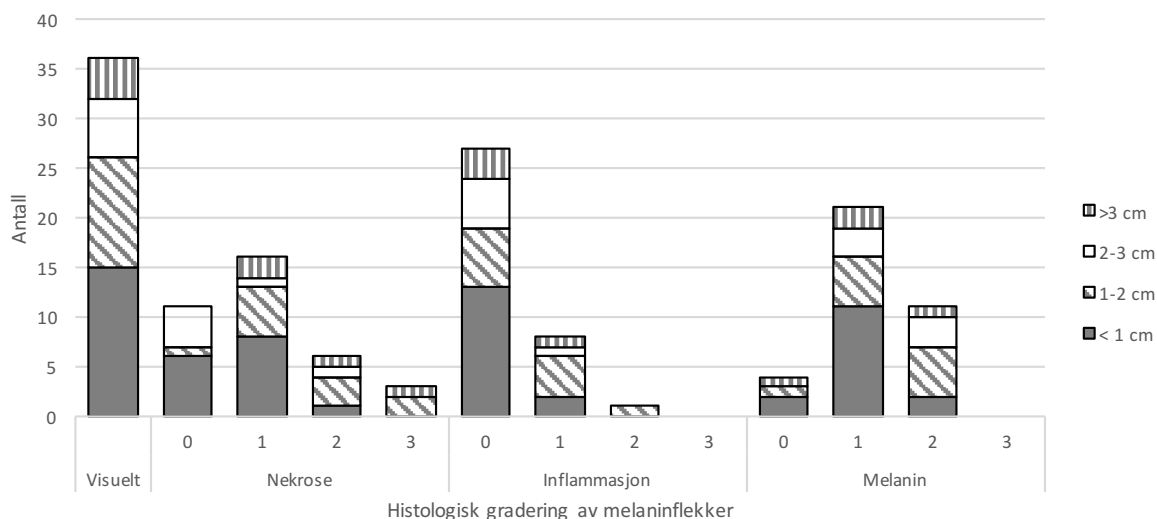
Resultatene for de 36 melaninflekker som ble gradert histologisk, hadde 26 prøver ulik grad av nekrotiske muskelceller i melaninflekken, ni prøver hadde ulik grad av betennelse og betennelsesceller, mens 32 prøver inneholdt ulik grad av melaninholdige celler. Av 26

Resultater

prøver med nekrotiske muskelceller, hadde 16 av prøvene en sparsom grad av nekrotiske muskelceller. Videre hadde åtte av 26 prøver en moderat grad av nekrotiske muskelceller, mens to av 26 prøver ble gradert til alvorlig. Av ni prøver med inflammasjon hadde åtte av prøvene en sparsom grad av betennelser og betennelsesceller. Kun én prøve hadde moderat grad av betennelse og betennelsesceller, mens ingen av prøvene hadde en alvorlig grad av betennelse. Av de totalt 32 prøvene som inneholdt melaninholdige celler hadde 21 av prøvene sparsom grad av melaninholdige celler. Videre hadde 11 av de 32 prøvene en moderat grad av melaninholdige celler i melaninflekken.

4.2.2 Histologisk gradering av fire ulike størrelser på melaninflekk

De 36 melaninflekkene som ble observert ved slaktelinjen, ble gradert etter nekrotiske muskelceller (Nekrose), betennelse og betennelsesceller (Inflammasjon) og melaninholdige celler (Melanin). Resultatet fra denne graderingen ble sammenlignet med de fire ulike melaninstørrelsene observert fra slaktelinjen. Sammenhengen mellom de histologiske resultatene fra graderingen og de fire ulike melaninstørrelsene er vist i figur 5.



Figur 5: Histologiske resultater av melaninflekker. 36 melaninflekker av ulik størrelse undersøkt histologisk for nekrotiske muskelceller (Nekrose), betennelse og betennelsesceller (Inflammasjon) og melaninholdige celler (Melanin).

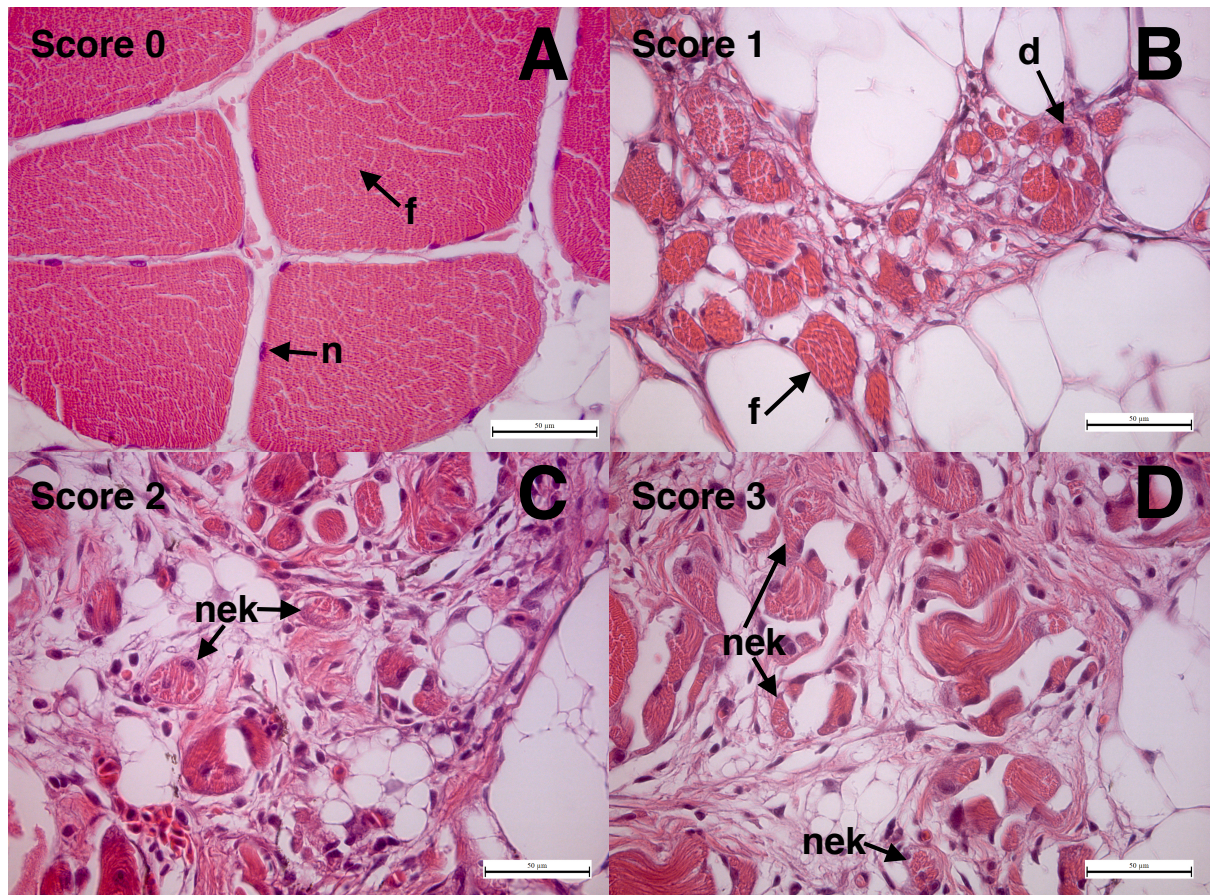
Resultater

Resultatene for melaninflekker med en lengde under 1 cm, hadde åtte av melaninflekkene sparsom grad av nekrotiske muskelceller (score 1). Hos de 11 melaninflekkene med en lengde mellom 1 og 2 cm hadde fire en sparsom grad av nekrotiske muskelceller. Det ble observert normalt vev hos fire av de seks melaninflekkene med en lengde mellom 2 og 3 cm, mens to melaninflekker med lengde over 3 cm hadde sparsom grad av nekrotiske muskelceller. Hos de 15 melaninflekkene under med lengde 1 cm hadde 13 av melaninflekkene ingen betennelse og betennelsesceller. Det ble observert normalt vev hos seks av melaninflekkene med en lengde mellom 1 og 2 cm. Av de seks melaninflekkene med en lengde mellom 2 og 3 cm hadde fem av melaninflekkene ingen betennelse og betennelsesceller, mens av de fire melaninflekkene med lengde over 3 cm hadde tre av melaninflekkene ingen betennelse og betennelsesceller. Hos de 15 melaninflekkene med lengde under 1 cm hadde 11 av melaninflekkene sparsom grad av melaninholdige celler i melaninflekken. Av de 11 melaninflekkene hadde fem av melaninflekkene sparsom grad av melaninholdige celler i melaninflekken. Det ble observert sparsom grad av melaninholdige celler hos tre av melaninflekkene med en lengde mellom 2 og 3 cm, mens to av melaninflekkene med lengde over 3 cm hadde sparsom grad av melaninholdige celler i melaninflekken.

4.2.3 Histologisk fremstilling av fire ulike grader av nekrose

Fire ulike grader av nekrose ble observert hos de 36 melaninflekkene vist histologisk i figur 6. Et tverrsnitt av fire ulike graderingene av nekrotiske muskelcellene er vist. Øverst til venstre vises normalt intakt vev(A). Øverst til høyre vises sparsom grad av nekrotiske muskelceller (B). Nederst til venstre vises moderat grad (C), mens nederst til høyre vises alvorlig grad av nekrotiske muskelceller (D). Målestokk: 50µm

Resultater



Figur 6: Bilde av fire ulike grader av nekrotiske muskelfiber ved tverrsnitt. A) normalt vev hvor muskelfiber (f) og nukleus (n) er intakt. B) sparsom grad av nekrotiske muskelfiber hvor muskelfiber (f) og degenerasjon av muskelfiber (d) kan observeres. C) Moderat grad av nekrotiske muskelfiber hvor nekrose (nek) er tydelig tilstede. D) Alvorlig grad av nekrotiske muskelfiber hvor tydelige nekroser av muskelfiber (nek) kan observeres. Målestokk: 50 µm.

Resultatet for nekrotiske muskelfiber (nek) i melaninflekker fra laksefileter viste totalt 11 melaninflekker med normale intakte muskelfiber (f) med nukleus (n) plassert langs kanten av muskelfiberen. Av de melaninflekkene med lengde under 1 cm og for melaninflekker med lengde mellom 2 og 3 cm ble det kun observert sparsom grad og moderat grad av nekrotiske muskelfiber (nek). Hos melaninflekker med lengde mellom 1 og 2 cm og for melaninflekker med lengde over 3 cm ble både sparsom og moderat grad av nekrotiske muskelfiber (nek) observert i tillegg til alvorlig grad.

Resultater

4.2.4 Differensialdiagnostikk

4.2.4.1 Differensialundersøkelse av Hjerte-Skjelett-Muskel-Betennelse (HSMB), Kardiomyopati (CMS) og Pancreas Disease (PD)

Antall nekroser og inflammasjon i de ulike organene ga grunnlag for differensialdiagnostisering av fiske sykdommene HSMB, CMS og PD. Ingen nekroser eller inflammasjon ble observert i hjerte, muskel eller pancreas. Det ble observert sparsom grad av myokarditt i stratum spongiosum, og sparsom grad av epikarditt, i enkelte hjerter som kunne tyde på HSMB, men ble ikke ansett som alvorlig nok til å diagnostisere fisken for noen av fiske sykdommene. Det ble ikke observert nekroser eller inflammasjon i rød og hvit muskulatur. Pankreas hadde intakte acinarceller i eksokrin pankreas. Produksjonsdataene fra Lerøy Aurora viste en påvisning av HSMB hos én merde fra Sessøya. Til tross for påvisning av HSMB i merden ble det ikke observert økt dødelighet eller andre symptomer fra Lerøy Auroras fagpersonell som indikerte et HSMB-utbrudd. Det ble tatt prøver fra denne merden ved det siste prøveuttaket, men det var ingen forskjell mellom prøvene fra dette prøveuttaket og prøver fra andre prøveuttak.

4.2.4.2 Histologiske undersøkelser av nyre og lever

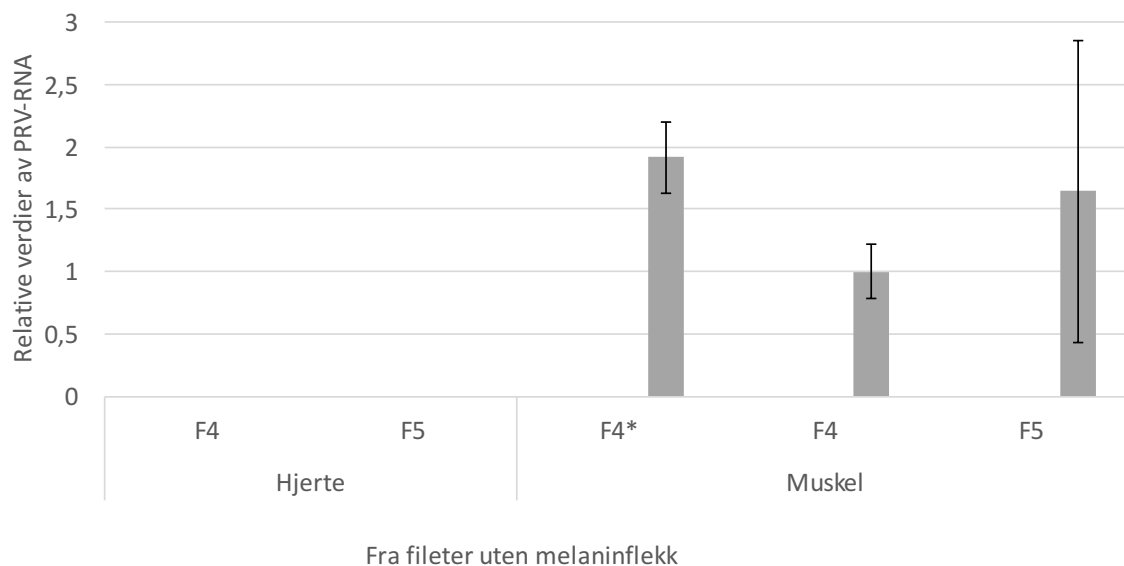
Histologiske undersøkelser av nyre viste ingen forandringer i vev. De fleste snittene hadde stuvninger i glomerulus som trolig skyldes avlivingsmetoden ved slakteriet. Disse stuvningene ble observert like stor grad i nyren hos fisk med melaninflekk som hos fisk uten melaninflekk i laksefileten. De fleste observasjonene av lever viste normalt vev, men ved enkelte observasjoner hadde leveren granulomatøs betennelse. Det var ingen forskjell på lever fra fisk med melanin i laksefileten og fisk uten melanin i laksefileten med tanke på granulomatøs betennelse. Det ble dermed konkludert at granulomatøs betennelse var forårsaket av vaksine.

Resultater

4.3. Real-Time kvantitativ PCR

4.3.1 Relative verdier av PRV-RNA for fisk uten melaninflekker i fileten

I figur 7 vises relative verdier av PRV RNA detektert i hjerte og muskel fra fileter uten melaninflekker ved bruk av RT-qPCR. Totalt ble 19 prøver fra fileter uten melaninflekker analysert, hvorav ni var fra hjerte og ti var fra muskel.



Figur 7: Relative verdier av PRV-RNA for hjerte og muskel fra fisk uten melaninflekk. Relative verdier av PRV RNA identifisert ved RT-qPCR fra henholdsvis hjerte, muskulatur fra filet uten melaninflekk samt melaninflekker. Muskelprøve 4 hadde lavest mengde av PRV RNA og ble satt som kalibrator. Søylene viser relative verdier av PRV-RNA ± standardavvik.

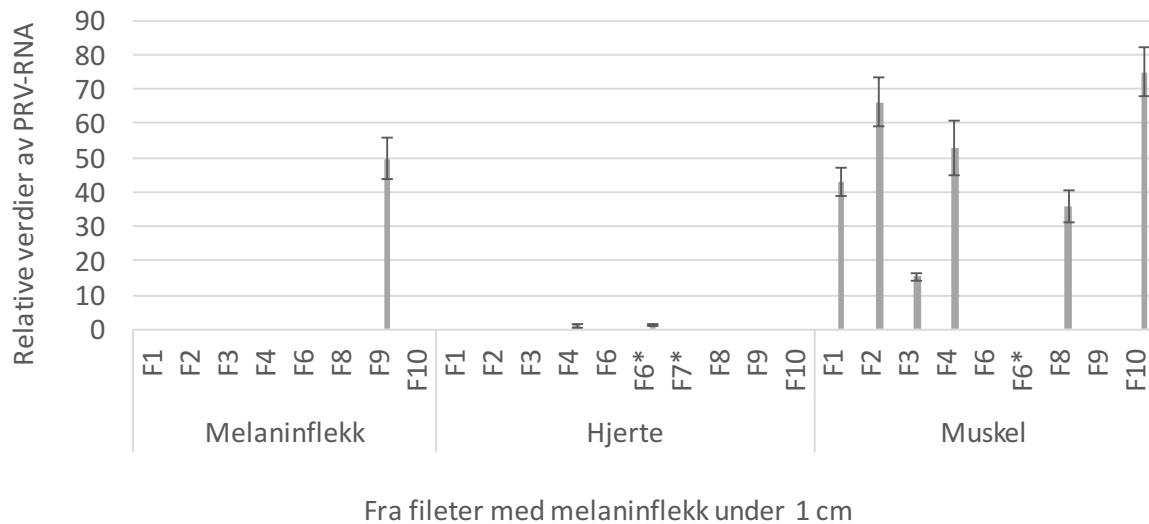
Resultatene fra tre av ti muskelprøver er vist i figur 7. I prøvene ble det detektert RNA fra PRV. F4* og F4 er fra samme filet, men med ulik mengde templat-DNA tilsatt i i prøven. Prøve F4 inneholder riktig mengde templat-DNA. Av de ni prøvene fra hjerte som ble analysert, inneholdt ingen av prøvene RNA fra PRV. Ingen av syv andre muskelprøvene inneholdt RNA fra PRV. Én av muskelprøvene hadde stort standardavvik, noe som skyldes dårlige paralleller mellom Cq-verdiene.

4.3.2. Relative verdier for PRV-RNA for fisk med melaninflekker med lengde under 1 cm

Fra fileter med melaninflekker med lengde under 1 cm ble én prøver fra henholdsvis melaninflekk, hjerte og muskel analysert for RNA fra PRV. Totalt ti fileter med

Resultater

melaninflekk med lengde under 1 cm ble analysert ved bruk av RT-qPCR. Relative verdier av PRV-RNA funnet i prøvene er vist i figur 8. Prøve med hjerte fra fisk nummer 4 inneholdt minst RNA fra PRV og ble satt som kalibrator.



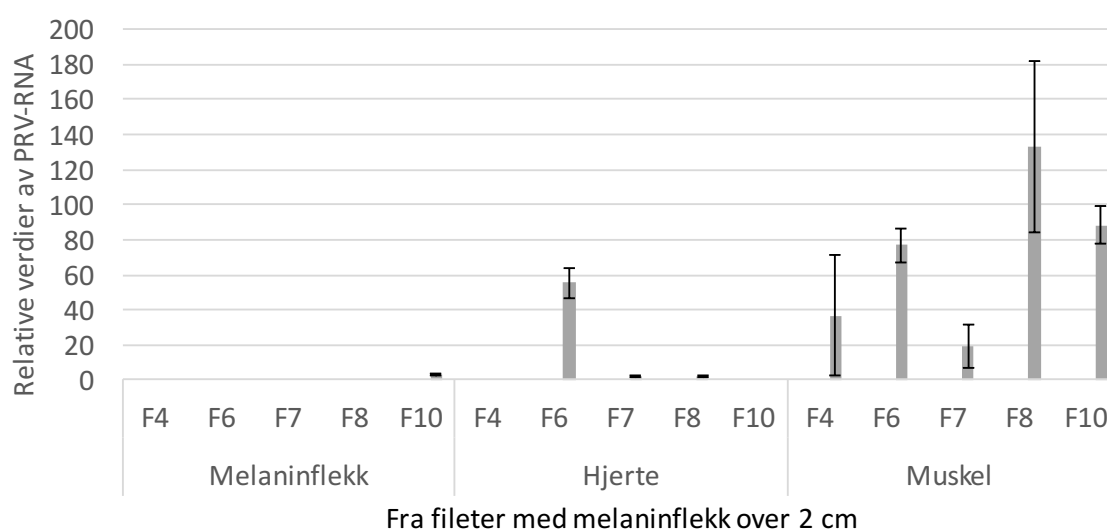
Figur 8: Relative verdier av PRV-RNA for melaninflekk, hjerte og muskel fra fisk med melaninflekk under 1 cm. Relative verdier av PRV-RNA identifisert ved RT-qPCR fra henholdsvis melaninflekk, hjerte og rød og hvit muskulatur fra fileter med melaninflekk med lengde under 1 cm. Hjerteprøve 4 hadde lavest mengde virus og ble satt som kalibrator. Søylene viser relative verdier av PRV-RNA \pm standardavvik.

RNA fra PRV ble detektert i kun én melaninflekk, mens to hjerteprøver inneholdt RNA fra PRV som vist i figur 8. RNA fra PRV ble ikke detektert i hjerte eller muskel hos fisken som hadde RNA fra PRV i melaninflekken. Flest prøver som inneholdt RNA fra PRV var muskelprøver hvor seks av ti prøver var positive for RNA fra PRV. Av de seks muskelprøvene hvor RNA fra PRV ble detektert, var det kun én hjerteprøve fra samme filet som hadde RNA fra PRV (F5).

Resultater

4.3.3. Relative verdier for PRV-RNA for fisk med melaninflekker med lengde over 2 cm

Totalt ti fileter hadde en melaninflekk i laksefileten over 2 cm, hvorav seks fisk hadde en melaninflekk med lengde mellom 2 og 3 cm og fire fisk hadde en melaninflekk med lengde over 3 cm. Fra disse fiskene ble melaninflekk, hjerte og muskel analysert for RNA fra PRV ved bruk av RT-qPCR. Relative verdier av PRV-RNA funnet i prøvene er vist i figur 9. Prøven med hjerte fra fisk nummer 4 i figur 11 hadde minst RNA fra PRV av alle prøvene fra fisk med melaninflekk i fileten og ble satt som kalibrator.



Figur 9: Relative verdier av PRV-RNA for melaninflekk, hjerte og muskel fra fisk med melaninflekk over 2 cm. Relative verdier av PRV-RNA identifisert ved RT-qPCR fra henholdsvis melaninflekk, hjerte og rød og hvit muskulatur fra fileter med melaninflekk med lengde over 2cm. Hjerterprøve 4 fra figur 11 hadde minst virus og ble satt som kalibrator. Søylene viser relative verdier av PRV-RNA ± standardavvik.

Resultatene fra totalt ni prøver hvor RNA fra PRV ble detektert er vist i figur 9. RNA fra PRV ble detektert kun i én melaninflekk, mens tre hjerterprøver var positive for RNA fra PRV. Flest prøver som inneholdt RNA fra PRV var muskel hvor fem av ti muskelprøver var positive. Fra de ni prøvene som inneholdt RNA fra PRV var kun melaninflekk- og muskelprøve fra filet med melaninflekk med lengde over 3 cm (F10). De resterende prøvene som inneholdt RNA fra PRV var fra fileter med melaninflekk med lengde mellom 2 og 3 cm. Av de fem muskelprøvene som var positiv for RNA fra PRV, var kun én av prøvene fra en filet med melaninflekk med lengde over 3 cm. Totalt fire av de fem filetene som hadde RNA fra PRV i muskel hadde også RNA fra PRV i andre prøver. To av de

Resultater

positive muskelprøvene har et stort standardavvik, noe som skyldes dårlige paralleller mellom Cq-verdiene.

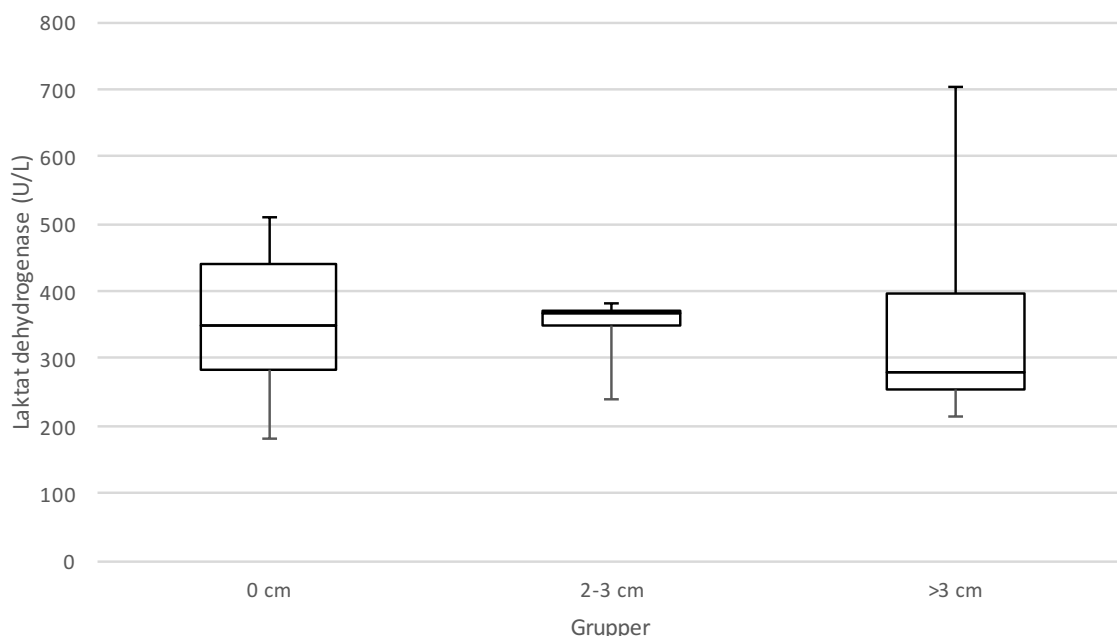
4.3.4. Deteksjon av enolase

Deteksjon av enolase ble gjort med RT-qPCR ved NFH. Ved en primertest ble seks cDNA-prøver fra ulike organer med høyt RNA-innhold valgt ut. Ingen av de seks prøvene som ble brukt i primertesten viste målinger av enolase i PCR-målingene. Videre analyser av ble derfor ikke gjennomført

4.4. Blodkjemiske analyser

4.4.1 Laktat dehydrogenase (LDH)

Laktatdehydrogenase (LDH) ble testet som biomakrør for melaninflekker i laksefilet. Målt LDH i serumprøver fra fisker uten melaninflekker (n=10), fra fisker med melaninflekker med lengde mellom 2 og 3 cm (n=6) og fra fisker med melaninflekker med lengde over 3 cm (n=4) er vist i figur 10. En Unit for LDH (U/L) genererer 1,0 mol NADH per minutt ved 37°C ved å katalysere omdannelsen av laktat til pyruvat. Målingene er gjort på Sentrallaboratoriet ved Veterinærhøgskolen i Oslo



Figur 10: LDH verdier for tre ulike melaningrupper. Serumprøver uten melaninflekker (n=10) hadde en median på 350 U/L. Melaninflekker på 2-3 cm (n=6) hadde en median på 366 U/L. Melaninflekker over 3 cm (n=4) hadde en median på 280 U/L. Maksverdi for 0 cm var 509 U/L. Maksverdi for 2-3 cm var 383 U/L.

Resultater

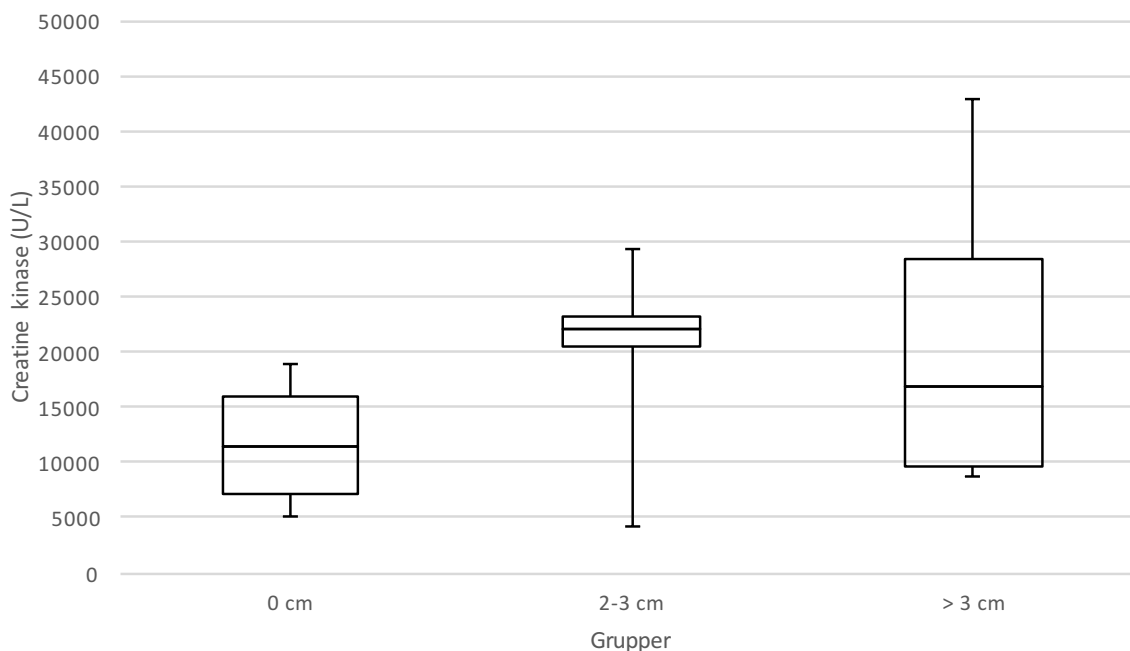
Maksverdi for >3cm var 705 U/L. I boksene er 25% til 75% av maksverdien til gruppene vist. Uparet T-test viste ingen signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom gruppene. Enhet er Units per liter (U/L).

Målt LDH i tre ulike melaningrupper basert på melaninstørrelsene fra tabell 7 er vist i figur 10. LDH-verdiene i serumprøvene fra fisk uten melaninflekker i laksefileten hadde en median på 350 U/L. For melaninflekker med lengde mellom 2 og 3 cm var medianen for LDH på 366 U/L. Medianen for LDH i serumprøvene til melaninflekker med lengde over 3 cm var på 280 U/L. Maksverdien for LDH i serumprøvene til fileter uten melaninflekker var 509 U/L. LDH ble målt til en maksverdi på fisk 383 U/L hos melaninflekker mellom 2 og 3 cm. Hos melaninflekker over 3 cm ble maksverdien for LDH målt til 705 U/L. Boksene i figur 10 illustrerte 25% til 75% av maksverdi for de respektive melaningruppene. Uparet T-test viste ingen signifikant forskjell ($p > 0,05$) mellom melaningruppene.

4.4.2 Kreatinkinase (CK)

Kreatinkinase (CK) ble testet som biomakrør for melaninflekker i laksefilet. Målt CK i serumprøvene fra fra fisker uten melaninflekker i laksefileten ($n=10$), fra fisker med melaninflekker med lengde mellom 2 og 3 cm ($n=6$) og fra fisker med melaninflekker med lengde over 3 cm ($n=4$) er vist i figur 11. En Unit for CK (U/L) er mengden enzym som omdanner 1 μmol fosfokreatin til Kreatin ved å overføre en fosfogruppe fra fosfokreatin til ADP, og dermed få ATP, per minutt ved pH 6.0. Målingene er gjort på Sentrallaboratoriet ved Veterinærhøgskolen i Oslo

Resultater



Figur 11: CK-verdier fra serum til tre ulike melaningrupper. Serumprøver uten melaninflekk (n=10) hadde en median på 11382 U/L. Melaninflekk mellom 2 og 3 cm (n=6) hadde median på 22118 U/L. Melaninflekk over 3 cm (n=4) hadde median på 16831 U/L. Maksverdi for 0 cm var 18894 U/L. Maksverdi for 2-3 cm var 29200 U/L. Maksverdi for >3cm var 42960 U/L. I boksene viste 25% og 75% av maksverdi til gruppene. Uparet T-test viste ingen signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom gruppene. Enhet er Units per liter (U/L).

Målt CK i tre ulike melaningrupper basert på melaninstørrelse fra tabell 7 er vist i figur 11. CK-verdiene i serumprøver fra fisker uten melaninflekker hadde en median på 11382 U/L. For melaninflekker med lengde mellom 2 og 3 cm var CK-verdiene for medianen for CK på 22118 U/L. Medianen for CK-verdiene i serumprøver til melaninflekker med lengde over 3 cm var på 16831 U/L. Maksverdi for CK fra serumprøver til fisk uten melaninflekk var 18894 U/L. Serumprøver fra melaninflekk mellom 2 og 3 cm viste en maksverdi for CK på 29200 U/L. Hos melaninflekker over 3 cm var maksverdien for CK på 42960 U/L. Boksene til figur 11 illustrerte 25% til 75% av maksverdien CK for hver melaningruppe. Uparet T-test viste ingen signifikant forskjell ($p > 0,05$) mellom gruppene.

5. Diskusjon

Melaninflekker forekommer i én av fem oppdrettslaks som har blitt slaktet langs norskekysten [3]. I de senere år har forekomsten av melaninflekker økt dramatisk, noe som fører til negative konsekvenser for oppdrettsnæringen. Melaninflekker i laksefileten er et alvorlig kvalitetsproblem som koster næringen omtrent én milliard norske kroner i året [6]. I tillegg til dette kan melaninflekkene skade næringens omdømme og langsiktige kontrakter med kjøpere kan gå tapt. I de senere årene er det blitt gjort mye forskning på hva som forårsaker melaninflekker i laksefileten og en tidlig identifisering av melaninflekkene vil kunne bidra til å bestemme tidspunktet for når melaninflekk oppstår [60]. På denne måten kan andre faktorer som kan påvirke melaninforekomsten lettere oppdages. En tidlig identifisering vil være gunstig for oppdrettsnæringen ved at de unngår å selge fisk med melaninflekker og dermed unngår klager og reklamasjon på deres produkt [5, 60]. Hovedmålsettingen i denne oppgaven har vært å sammenligne ulike metoder for identifisering av melaninflekker i slaktefisk. Metodene som ble brukt var histologi, kvantitativ Real-Time PCR (RT-qPCR) og blodkjemiske analyser av serum. Det ble gjort histologiske undersøkelser av hjerte, nyre, lever, pankreas, rød og hvit muskulatur og melaninflekk samt RT-qPCR-analyser av melaninflekk, hjerte og rød og hvit muskulatur. Disse undersøkelsene ble gjennomført på Norges Fiskerihøgskole ved Universitetet i Tromsø- Norges arktiske universitet. Serumprøver ble sendt inn til Sentrallaboratoriet på Veterinærhøgskolen i Oslo for analyser for enzymene laktat dehydrogenase (LDH) og kreatinkinase (CK). Prøvene ble tatt ut gjennom seks prøveuttak fra Lerøy Auroras slakteri på Skjervøy.

5.1. Visuelle resultater

Resultatene viste at 36 av de 135 fiskene som ble undersøkt hadde melaninflekker i laksefileten. Dette tilsvarer en prevalens på 26,7%, noe som er høyere enn både Nofima sine registreringer [5] og Lerøy Aurora sine egne produksjonstall (tabell 6). Koppang et al. 2005 fant en prevalens på melaninflekker mellom 10 og 30% i sin studie [44]. Melaninflekkene ble fordelt i fire forskjellige grupper etter størrelse i henhold til Bjørgen et al. sine observasjoner av størrelse på melaninflekkene [39]. De fleste observasjonene som ble gjort viste melaninflekker under bukhinnen med størrelse mindre enn 3 cm. Dette stemmer godt overens med de registreringene Nofima gjorde mellom 2011 og 2015 [5]. Våre observasjoner viste flest melaninflekker med størrelse under 1 cm, mens lavest

Diskusjon

antall melaninflekker ble målt for flekker med lengde over 3 cm. Larsen et al. 2012 observerte melaninflekker fra et par millimeter til flere centimeter i sin studie [59]. Størrelsen på melaninflekken ble vurdert som lengdemål der melaninflekken var lengst. Alternativ kunne melaninflekkene ha blitt gradert ut fra areal eller volum. Både areal og volum ville gitt en bedre indikasjon på hvor stor melaninflekken var, spesielt volum ville vært interessant, siden det registrerer hvor dypt melaninflekken stikker i muskulaturen. Hvor dypt melaninflekken stikker i muskulaturen er viktig for oppdretteren som har mulighet til å trimme bort melaninflekken. Sitter melaninflekken dypt i muskulaturen vil en stor del av fileten fjernes og fileten er ikke like attraktiv for kjøperen. Hverken Koppang et al. eller Larsen et al. brukte areal eller volum for å bestemme størrelsen på melaninflekken [44, 59]. Årsaken til at vi ikke brukte areal og volum i stedet for lengde, var den raske produksjonen på slakteriet som gjorde at vi da ikke ville rukket å undersøke mange nok fisk. I løpet av et døgn slaktes oppdrettslaks fra minst to ulike lokaliteter hvor den ene lokaliteten tilhørte Lerøy, mens den andre tilhørte Salmar. Siden denne oppgaven var et samarbeidsprosjekt med Lerøy, var det kun Lerøy sin laks som ble undersøkt. Lerøys slakteri på Skjervøy slakter nesten 4000 fisk i timen og all laks var slaktet i løpet av 7 timer. Siden det ikke er mulig å se om en laks har melaninflekker i laksefileten fra utsiden, var det viktig å undersøke så mange fisk som mulig for å få så mange melaninflekker som mulig til videre analyser. For å rekke å undersøke så mange fisk som mulig var det raskere å måle lengden på melaninflekken, enn å måle arealet og volumet på melaninflekken.

Informasjonen fra Lerøy (Tabell 6) viste en så lav prevalens for melaninflekker at en antok at det ville være vanskelig å få nok analysemateriale. Det var derfor viktig å undersøke et høyt antall fisk. En årsak til at vår prevalens var høyere enn Lerøy sine kan skyldes den subjektive vurderingen som vi gjorde sammenlignet med Lerøy sine registreringer. Lerøy registrerte antall melaninflekker fra 100 fileter fortløpende på samlebåndet hvor fokuset er å finne melaninflekker som kan nedklassifisere laksefileten [Pers. med Øystein Skallebø]. I vårt tilfelle ble fileten grundigere undersøkt og det kan ha ført til at flere melaninflekker med lengde under 1 cm ble oppdaget og prevalensen ble dermed økt. Det kan tenkes at melaninflekker under bukhinnen, som har lettere for å skjule seg, kan bli oppdaget i våre registreringer, men ikke registrert hos Lerøy. I tillegg til dette befant de

Diskusjon

fleste av melaninflekkene med størst lengde på under 3 cm seg bak bukhinnen. Melaninflekkene over 3 cm ble observert over laterallinjen i loinsen. Observasjonene fra slaktelinjen viste at det forekom flest melaninflekker med lengde under 1 cm. Våre observasjoner viste at det forekommer like mye melaninflekker i både høyre og venstre filet. Dette stemmer godt overens med Nofimas registreringer [4].

Produksjonsdata fra Lerøy viste påvisning av HSMB hos fisk i én av merdene. Observasjoner gjort av fagpersonell, fra Lerøy, opplevde ingen økt dødelighet eller andre symptomer som skulle tilsi at det var et HSMB-utbrudd i merden. Til tross for at fisken hadde påvist HSMB ble ikke dette ansett som et HSMB-utbrudd [Pers med. Eirik Monsen]. Fisk fra denne merden ble tatt ut ved det siste prøveuttaket. Til tross for påvisningen av sykdommen, hadde ikke prøveuttaket økning i antall fisk med melaninflekker i laksefileten sammenlignet med de fem andre prøveuttakene.

5.2. Histologi

Vi har analysert små og store melaninflekker med hensyn til nekrotiske muskelceller og vev. Utgangspunktet vårt var at store melaninflekker ga flere nekrotiske celler i melaninflekken enn små melaninflekker. Resultatene våre viste ingen forskjell i antall nekrotiske muskelceller hos små og store melaninflekker.

Fra et organ blir tatt ut av fisken til det er et ferdig histologisk preparat, er det en del trinn hvor det kan oppstå feil. De fleste av melaninflekkene var små, noe som kunne gjøre det vanskelig å få skåret ut den midterste delen av melaninflekken til videre histologiundersøkelse. Ved undersøkelse av histologisnitt som viste nekrotiske muskelceller, kan det observeres intakte muskelceller i ytterkanten av nekrosen. Om snittet ble lagt feil er det derfor ikke usannsynlig at noen av de snittene som viste normalt muskelvev kunne ha nekrotiske muskelceller på andre steder enn det som ble observert i snittet. Sannsynligheten for at dette kunne skje var større hos de små melaninflekkene enn for de store.

Diskusjon

De samme histologiske preparatene av de små og store melaninflekkene ble også analysert med hensyn til betennelse og betennelsesceller i muskulaturen. Her var også vårt utgangspunkt at de større melaninflekkene hadde mer betennelse og betennelsesceller enn de små. Resultatene våre viste at nesten alle preparatene fra både små og store melaninflekker var fri for betennelse og betennelsesceller. Av de preparatene som hadde betennelse og betennelsesceller, var det heller ingen forskjell mellom små og store melaninflekker. En annen potensiell årsak til lavere grad av betennelse og betennelsesceller kan være at det er mindre virus til stede. Det er kjent at makrofager fagocytterer døde celler og reparere skaden, mens immunceller fra det adaptive immunsystemet blir aktivert av cytokiner utskilt fra celler infisert av virus eller bakterier [96]. Om den nekrotiske muskelskaden har oppstått uten virus eller bakterier til stedet kan det tenkes at kun makrofagene blir aktivert for å reparere.

Den siste parameteren de histologiske preparatene ble analysert med hensyn til var melaninholdige celler i muskulaturen. Melaninholdige celler gir laksefileten de brun-svarte flekkene og i stor grad definerer melaninflekkene som liten eller stor. Våre resultater viste ingen forskjell i antall melaninholdige celler i små melaninflekker sammenlignet med større melaninflekker. Noe av grunnen til det kan være at melanomakrofager har en dendrittisk form som er karakteristisk for cellene. Denne karakteristiske formen, sammen med det brun-svarte melaninpigmentet, kan gjøre at cellene forveksles med urenheter i snittet som ikke ble fjernet under preparering av snittene. Slike urenheter blir svarte ved observasjon i lysmikroskop. En slik forveksling kan ha innvirkning på registreringene av melaninholdige celler i scoringssystemet hvis denne urenheten blir telt som melanomakrofag ved en feiltagelse. På den måten vil histologipreparatet registrere flere melaninholdige celler enn det faktisk inneholdt. For å sikre seg mot dette burde snittene blitt holdt tilstrekkelig lenge i HistoClear slik at debrisen ble vasket bort. En annen metode for å sikre seg mot denne feilkilden vil være å farge snittene etter Masson-Fontana-melanin metoden. Denne metoden farger spesifikt melaninpigment, i motsetning til Hematoxylin og Eosin som farger cellekjernene lilla og cytoplasma rosa [97].

Diskusjon

Betennelse og betennesceller ble observert i mindre grad sammenlignet med nekrose og melanin. I de fleste histologisnittene fra de ulike melaninstørrelsene ble ingen betennelse og betennesceller registrert. Det kan tenkes at betennelse og betennesceller bruker lengre tid på å respondere på nekrosen. Melanomakrofager har uttrykker MHC klasse II og kan dermed fungere som APC [21, 98, 99]. Andre melaninproduserende melanocytter har vist å ha MHC klasse II og kan også fungere som APC [32]. Det kan derfor tenkes at betennelse og betennesceller kan øke i omfang i melaninflekken. Noe som motsier denne påstanden er at melaninflekken er en kronisk betennelse [3, 5]. Det betyr at betennelsen har vært i melaninflekken over en lengre periode ved at betennelsen har gått fra å være akutt til å bli kronisk. Både Bjørgen et al. og Larsen et al. observerte kroniske granulomatøse betennelser med stor infiltrasjon av melaninholdige celler [39, 59]. De mer akutte betennelsene viste mindre infiltrasjon av melaninholdige celler [39, 59]. De observasjonene som ble gjort i våre histologiundersøkelser viste at både små og store melaninflekker hadde kronisk betennelse. Det har blitt gjort en annen studie hvor melaninflekker fra slaktelinjen har blitt undersøkt [44]. Denne studien fant også nekrotiske muskelceller med melanomakrofager tydelig til stede. I tillegg fant studien typiske betennelser og betennesceller i melaninflekken

Resultatene fra de histologiske undersøkelsene viste at både små og store melaninflekker er kroniske betennelser med nekrotiske muskelceller og infiltrasjon av melaninholdige celler. Det var ingen forskjell i graderingen av små og store melaninflekker med tanke på nekrotiske muskelceller, tilstedeværelse av betennelse og betennesceller og melaninholdige celler.

Det ble analysert histologiprøver av hjerte, rød og hvit muskulatur og pankreas med hensyn til differensialdiagnostikk av fisesykdommene Hjerte-Skjelett-Muskelbetennesle (HSMB), Pancreas Disease (PD) og Kardiomyopati (CMS). Dette er tre sykdommer som lett kan forveksles med hverandre og alle tre har vist seg å gi eller medvirker til melaninflekker i laksefileten [5, 39, 40, 100]. Resultatene fra de histologiske

Diskusjon

undersøkelsene viste at ingen av de undersøkte organene hadde påvisning av noen av fiskesykdommene.

En svakhet i denne histologiske undersøkelsen var at kun ventrikkelen av hjerte ble undersøkt. Atrium er den delen av hjerte som blir først affisert av CMS før den spongiøse delen av ventrikkelen blir affisert [50, 58, 100]. Til tross for at kun ventrikkelen ble undersøkt kan sykdommene HSMB og CMS likevel skilles fordi CMS affiserer kun den spongiøse delen av ventrikkelen, mens HSMB affiserer både kompakte og spongiøse delen. PD affiserer både spongiøs og kompakt del av ventrikkelen, men skiller seg fra HSMB ved å affisere pankreas[50, 90, 100]. Dette betyr at feilkilden ikke nødvendigvis har den største betydningen, men en undersøkelse av atrium ville gitt en sikrere diagnostikk av de undersøkte fiskene.

Det var forventet at ingen av fiskene hadde akutte nekrotiske skader i acinarcellene i pankreas. Akutt nekrotisk skade er vanlig ved påvisning av PD som er en strengt kontrollert sykdom og en slik nekrotisk vevskade finnes normalt ikke nord for Nord-Trøndelag. Ved påvisning av PD nord for Nord-Trøndelag blir all fisk slaktet umiddelbart for å unngå smitte nordover. Siden alle prøvene kom fra fisk oppdrettet i området rundt Tromsø var det ikke stor sannsynlighet for å finne PD [3]. CMS og HSMB er fiskesykdommer som finnes i Nord-Norge. Det ble ikke påvist CMS hos fisken gjennom produksjonssyklusen verken av fagpersonell fra Lerøy eller ved histologiske undersøkelser av veterinærinstituttet. HSMB ble derimot påvist av veterinærinstituttet i en av merdene under produksjonssyklusen. Siden HSMB kun var påvist og ikke definert som utbrudd er det usikkert om hvor mange fisk som hadde denne påvisningen. Siden det ble tatt ut et begrenset antall fisk ved hvert prøveuttak, kan det være at noen av fiskene som faktisk hadde HSMB symptomer ikke ble undersøkt. Det kan derfor være en tilfeldighet at ingen av fiskene som ble plukket ut ved det siste prøveuttaket ble registrert for HSMB. Våre resultater viste at ingen av de undersøkte fiskene hadde symptomer på HSMB, CMS eller PD.

5.3. Real-Time Kvantitativ PCR

Metoden RT-qPCR ble brukt for å bestemme mengden RNA fra Piscine orthoreovirus (PRV) i prøver fra hjerte, melaninflekk og muskel fra laksefilet med og uten melaninflekk ble analysert. PRV blir ansett som en medvirkende årsak til at melaninflekker oppstår i laksefileten [39]. Våre resultater fra analysen viste ingen signifikant forskjell i mengden RNA fra PRV mellom prøvene fra hjerte, muskel og melaninflekker fra fileter med melaninflekker og fra muskel uten melaninflekker. Terskelverdien signaliserer en signifikant økning i amplikon sammenlignet med baseline. Vanligvis blir denne terskelverdien satt til 10 ganger høyere enn standardavviket til baseline [91]. Hvor mange ganger DNA må kopieres opp for å nå denne terskelverdien kalles Cq-verdi (quantification cycle). En prøve med lav Cq-verdi betyr at DNA er kopiert opp færre ganger enn en prøve med høy Cq-verdi for å nå terskelverdien. En prøve med lav Cq-verdi inneholder derfor i utgangspunktet mer DNA enn prøven med høy Cq-verdi [91]. Løvoll et al. definerte en prøve som positiv for PRV ved en Cq-verdi under 28 [101]. Dette var lavere enn vår laveste Cq-verdi som ble målt i prøven med feil mengde cDNA fra muskel fra fisk nummer 4 uten melaninflekk i fileten på 32,48 (Appendiks IV). Garseth et al. derimot anså alle prøver med en lavere Cq-verdi enn 40 som positive for PRV [102]. Bjørgen et al. hadde en Cq-verdi hos de positive PRV-prøvene på 20, dette ga en økt prevalens på melaninforandringer på mellom 40 og 90% for de ulike testgruppene [39]. I de testgruppene hvor Cq-verdien lå på 32 var prevalensen på melaninforandringer i fileten på 3% [39]. En potensiell årsak til høye Cq-verdier for positive prøver, kan være lite prøvemateriell. Mengden organ i hver prøve ble tatt ut etter anbefaling fra Patogen Analyse AS hvor prøvene tilsvarte en størrelse på et fyrstikkhode. Organbiten ble estimert til å ligge rundt 10 mg, mens kitets leverandør, Qiagen, anbefalte prøvemateriale på over 30 mg. Det kan tenkes at med mer prøvemateriell ville resultatene fra PCR-analysene gitt lavere Cq-verdier som igjen gir andre relative verdier for RNA fra PRV mellom de ulike prøvene. Økonomi hadde også en innvirkning på størrelsen på prøvematerialet. For å sikre god fiksering av organet var det viktig at organet ble lagt i tilstrekkelig mengde RNA later slik at løsningen fikk trengte godt inn i vevet, slik at organbiten måtte være liten for at mediet skulle trenge godt inn i organet. For å sikre at organet ble tilstrekkelig fiksert ble organet i tillegg delt i to. Riktignok ga de fleste av prøvene, spesielt prøver fra hjertet, god mengde med RNA fra RNA-isoleringen. Av de 18 prøvene som var positiv for RNA fra PRV og som ble tatt fra fisk med melaninflekk i, inneholdt prøven med riktig mengde

Diskusjon

cDNA fra muskel til fisk nummer 4 med melaninflekk med lengde under 1 cm høyest Cq-verdi. Denne prøven ble dermed satt som en kalibrator som de resterende prøvenes relative verdi ble sammenlignet mot.

Når data ble analysert, ble det oppdaget at enkelte av de negative kontrollene (vannprøvene) var blitt kontaminert. Det viste seg at noen av prøvene som ble analysert for PRV også til en viss grad hadde samme kontaminasjon som den negative kontrollen. For å skille mellom kontaminerte og positive prøver, ble smeltekurven til hver enkelt prøve undersøkt. Smeltekurven viste ved hvilken temperatur den dsDNA går fra hverandre og blir ssDNA [103]. Amplikon inneholder cytosin, guanin, tymin og adenin hvor cytosin og guanin danner basepar og tymin og adenin danner et annet basepar. Bindingene mellom cytosin og guanin dannes av tre hydrogenbindinger, mens tymin og adenin bindes sammen av to hydrogenbindinger. De tre hydrogenbindingene mellom cytosin og guanin gjør at det kreves mer energi for å få skilt baseparet ifra hverandre sammenlignet med de to hydrogenbindingene mellom adenin og tymin. RT-qPCR-prøver som inneholder mye cytosin og guanin vil derfor smelte ved en høyere temperatur enn prøver med mye adenin og tymin [103]. Den kontaminerte negative kontrollen viste en topp på smeltekurven rundt 75°C hvilket var 4°C lavere enn toppen på smeltekurven hos de andre prøvene. Prøvene med en topp på smeltekurven rundt 79°C ble dermed regnet som positive for PRV. I figur 9 har to av prøvene et stort standardavvik, altså stor variasjon mellom triplikatene. Årsaken til det store standardavviket kan tenkes å være at én eller to av triplikatene til prøven var kontaminert på samme måte som den negative kontrollen. For at disse prøvene fortsatt skal regnes som positive for PRV, må en eller flere av triplikatene til prøven ha en topp i smeltekurven på 79°C.

Resultatene viste at alle organene, bortsett fra hjerte fra fisk uten melaninflekk i fileten, hadde påvist RNA fra PRV. Gruppen med flest positive prøver var muskelprøver fra laksefilet med en melaninflekk med lengde under 1 cm. Et interessant resultat var at tre av prøvene som ble regnet som positiv kom fra muskulatur i laksefileter uten melaninflekk. Disse prøvene hadde i tillegg høyere relativ verdi, som betyr at de inneholder mer RNA fra PRV, enn prøvene fra melaninflekkene. Kun to melaninflekker

Diskusjon

var positiv for RNA fra PRV. Av disse to prøvene var én av prøvene fra melaninflekk med lengde under 1 cm, mens den andre var fra en flekk med lengde over 3 cm. Prøven fra melaninflekk med lengde under 1 cm hadde en høyere relativ verdi enn prøven fra melaninflekk med lengde over 3 cm. Det betyr at prøven med melaninflekk med lengde under 1 cm inneholdt mer virus enn prøven med melaninflekk med lengde over 3 cm. Studien til Bjørgen et al. viste at PRV- antigener var representert i melanomakrofager og makrofag-lignende celler i den granulomatøse betennelsen i melaninflekken [39]. Hvor mye vekt som bør legges på dette resultatet er usikkert. Totalt ble det analysert 20 prøver fra melaninflekker med lengde under 1 cm og med lengde over 3 cm der 18 av prøvene ble ansett som negative. Til sammenligning med Bjørgen et al. viste våre resultater ingen forskjell mellom fisk med melaninflekk og fisk uten melaninflekk[39]. Noe av grunnen til at våre resultater ikke samsvarer med Bjørgen et al. kan være at forskjellige organer ble brukt for å identifisere PRV. Bjørgen et al. brukte blod og melaninflekk for å detektere PRV i atlantisk laks (*S. salar*)[39]. Finstad et al. viste at erytrocytter er primærmålet for PRV[52]. Dette ble bekreftet i Wessel et al. sin studie som viste at PRV replikeres i erytrocyttene [53]. Hvor mye valg av organ har å si for identifisering av PRV er usikkert ettersom Løvoll et al. 2012 brukte hjerte på å identifisere PRV[101].

Til tross for at våre PCR-resultater ikke stemmer overens med Bjørgen et al. er det en interessant bemerkning at våre PCR-resultater stemmer overens med graderingen av de histologiske snittene. De histologiske snittene viste en sparsom grad av betennelse og betennelsesceller. Betennelsesceller blir aktivert av celler som er infisert av virus ved at de infiserte cellene sender ut cytokiner som tilkaller betennelsescellene. Den sparsomme graden av betennelse og betennelsesceller i de histologiske snittene kan tyde på at melaninflekkene inneholdt lite virus [Pers. med. Prof Roy Dalmo].

I en primertest ble seks prøver som inneholdt mye RNA, og som ga et godt resultat ved uttrykking av elongeringsfaktor EF-1, valgt ut til å teste de tre ulike primerne for beta-enolase. Resultatet fra den primertesten var kun målt bakgrunnsstøy og ingen uttrykk av enolase. Som en følge av dette resultatet, ble ikke flere prøver analysert. Årsaken til at beta-enolase ikke ble uttrykt kan være at beta-enolase ikke var i prøven. Dette er lite trolig

Diskusjon

siden enolase er et viktig enzym i glykolysen og finnes derfor i alle celler [85]. Mest sannsynlig stemte ikke primernesekvensene med cDNA i prøvene slik at primersekvansene ikke bandt seg til cDNA og replikasjonen kunne starte.

5.4. Blodkjemiske analyser

Serumprøvene ble analysert for laktat dehydrogenase (LDH) og kreatinkinase (CK) med hensyn til små og store melaninflekker i laksefileten. Våre resultater viste ingen signifikant forskjell for LDH og CK i serum ved fravær av melaninflekk og ved stor melaninflekk. Figur 11 viste riktignok en stigning i CK fra gruppen uten melaninflekk og for gruppen med melaninflekker med lengde over 3 cm. Hvor stor vekt som kan legges på dette er usikkert, siden gruppene består av få fisk. Grunnen til det er at et lavt antall prøver gir ikke et godt utgangspunkt for en god statistisk analyse. Ved et lavt antall prøver vil de individuelle forskjellene mellom prøvene ha stor innvirkning på utfallet av resultatet. Om antallet prøver hadde vært høyere hadde dette redusert påvirkningen hver enkelt prøve har på resultatet i den statistiske analysen. Om man likevel skal tolke resultatene for CK kan det tenkes at de større melaninflekkene gir høyere CK i serum enn mindre melaninflekker og ingen melaninflekker. Riktignok brukte Kent et al. totalt 20 fisk i en studie for å undersøke hvordan Atlantisk laks reagerte på å bli trent sammen for en kort periode [88]. CK ble brukt som biomakrør i denne studien for å måle eventuell forskjell mellom kontrollgruppen og testgruppen. Yousaf et al. hadde totalt syv forskjellige testgrupper hvor testgruppen med færrest fisk inneholdt 16 fisk og testgruppen med flest fisk inneholdt 31 fisk [77].

Flere serumprøver hadde nødvendigvis ikke gitt en annen median, men det kan tenkes at flere serumprøver ville ha gitt kortere avstand mellom maksimalverdi og 75% av maksimalverdi og tilsvarende kortere avstand mellom bunnverdi og 25% av maksimalverdi. En kortere avstand mellom maksverdi, 75% av maksverdi, median og 25% av maksverdi vil gi et klarere bilde på den reelle mengden LDH og CK i serum for melaningruppen. En potensiell feilkilde som kan ha hatt innvirkning på LDH i serum, kan ha oppstått ved at erytrocyttene har blitt utsatt for en røff behandling og dermed blitt ødelagt. Erytrocyttene har LDH i cytoplasma og ved en hemolyse så vil LDH slippes ut i serum [104]. Turen fra slakteriet på Skjervøy til Norges Fiskerihøgskole tok mellom 3,5

Diskusjon

og 4 timer hvor blodprøvene kan ha blitt forstyrret og ført til ødeleggelse av erytrocyttene. Hemolyse er vanskelig å unngå i blodprøver, men en studie gjort av Grasser og Sundell viste at en liten grad av hemolyse har trolig ikke innvirkning på mengden LDH i serum [105].

LDH og CK har en begrenset holdbarhet i serum og kan måles kun i en viss periode etter at en vevskade har oppstått. Kemp et al. viste at varigheten til LDH og CK i serum er henholdsvis syv til ti dager for LDH og tre til fire dager for CK [63]. Det betyr at tidspunktet for blodprøvetakingen er viktig for å registrere forskjell i LDH og CK i serum ved nekrotiske vevsskader. En melaninflekk har vist seg å være en kronisk betennelse hvilket betyr at det har vært en skade i muskulaturen over en lengre periode [21]. Det kan ha ført til at mengden enzym har sunket ned til normale verdier før blodprøvene ble tatt.

Våre resultater viste ingen signifikant forskjell mellom melaningruppene, hvilket betyr at LDH og CK fungerer dårlig som biomarkører for melaninflekker i laksefileter.

5.5. Forslag til videre forskning

For videre forskning bør det utvikles et prosjekt som undersøker LDH og CK fra serum gjennom hele produksjonsfasen hos Atlantisk laks (*S. salar*). Et sânt prosjekt vil avklare om LDH og CK faktisk slipper ut i serum ved nekrotisk skade fra melaninflekkene. Mange studier viste at LDH og CK slippes ut i serum ved nekrotiske skader, og ved et langtidsprosjekt som dette, vil det være mulig å se hvilke andre ytre faktorer som kan medvirke til melaninflekker i laksefileten. Slike faktorer kan være miljø, oksygendropp eller andre stresssituasjoner. Berg et al. 2006 viste at fisk som befant seg i sjøvann i tanker på land fikk færre melaninflekker under bukhinnen enn fisk som befant seg i sjøvann i merden. Studien konkluderte med at det er forholdene i sjøen som forårsaker melaninflekkene [38]. I et sânt prosjekt har man også mulighet til å teste for uttrykk for tyrosinase og DTC i laksen. Det er godt dokumentert at tyrosinase og DTC er oppregulert i melanogensen [20, 25, 33, 34, 36]. Undersøkelser av disse to enzymene kan underbygge resultatet av LDH og CK analysene fra samme prosjekt. De røde melaninflekkene har blitt sett på som forløperen til de svarte melaninflekkene, men det er fortsatt ukjent når de

Diskusjon

røde melaninflekkene blir svarte [39]. En undersøkelse av tyrosinase og DTC i tillegg til LDH og CK kan kanskje gi svar på dette. I et slikt prosjekt kan det gjøres et nytt forsøk på å utvikle primere for enolase. Nye primerne kan gi bedre svar på om enolase, mest sannsynlig beta-enolase, fungerer som en god biomarkør for identifisering av melaninflekker.

Hvis PRV er en sterk medvirkende årsak til melaninflekker i laksefilet, kan utvikling av PRV-vaksine være et godt forslag. En PRV-vaksine vil være meget gunstig for å redusere forekomsten av melaninflekker i laksefileten, men også redusere forekomsten av HSMB-utbrudd.

6. Konklusjon

- Våre resultater viste høyere forekomst av melaninflekker i laksefileten enn registreringene til Lerøy Aurora AS og høyere enn Nofima sine registreringer for forekomst av melaninflekker for Nord-Norge.
- Histologiske undersøkelser viste ingen sammenheng mellom nekrotiske muskelceller, tilstedeværelse av betennelse og betennelsesceller og melaninholdige celler i små og store melaninflekker.
- PRV ble detektert i laks hvor muskulatur til fisk med melaninflekker i laksefileten hadde flest positive prøver. Ingen forskjell mellom fisk med melaninflekk og fisk uten melaninflekk
- Ingen av de tre primersettene for beta-enolase som ble testet i primertesten viste resultater.
- LDH og CK i serum viste ingen signifikant forskjell mellom fileter med og uten melaninflekker, men CK hadde en økning hos fisk med stor melaninflekk i fileten sammenlignet med fisk uten melaninflekker.
- Resultatene fra denne mastergradsoppgaven viste at melaninflekker ble påvist makroskopisk ved slaktelinjen på slakteriet og mikroskopisk ved histologiske undersøkelser.

Referanser

1. Norges sjømatråd. *Norsk sjømateksport mer enn doblet på 10 år*. 8.05.2016]; Available from: <http://www.seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Norsk-sj%C3%B8mateksport-mer-enn-doblet-p%C3%A5-10-%C3%A5r2>.
2. Lilleby Jan and Molnes Geir. *Rekordår for norsk sjømatnæring*. 2016 16. mai 2016]; Available from: <http://e24.no/naeringsliv/fiskeri/eksportrekord-for-norsk-sjoemat-i-2015/23590530>.
3. Hjeltnes Brit, et al., *Fiskehelserapporten 2015*. 2016.
4. Mørkøre, T., *Filet av oppdrettslaks: Kvalitetsavvik og årsakssammenhenger*. Nofima rapport, 2012.
5. Mørkøre, T., et al., *Mørke flekker i laksefilet. Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget*. 2015.
6. Risbråthe Mette and Koppang Erling O. *Har løst gåten med mørke flekker i laksekjøtt*. 2015 09.05.2016]; Available from: <https://www.nmbu.no/forskning/tema/mat/nyheter/node/23658>.
7. Lerøy Seafood Group ASA. *Aurora Salmon*. 09.05.2015]; Available from: <https://www.leroyseafood.com/en/Business/Products/Key-brands/Aurora-Salmon/>.
8. Bagnara, J.T. and J. Matsumoto, *Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues*. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology, Second Edition, 2007: p. 11-59.
9. Hearing, V.J. and K. Tsukamoto, *Enzymatic control of pigmentation in mammals*. The FASEB Journal, 1991. **5**(14): p. 2902-2909.
10. Kondo, T. and V.J. Hearing, *Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation*. Expert review of dermatology, 2011. **6**(1): p. 97-108.
11. Meredith, P. and T. Sarna, *The physical and chemical properties of eumelanin*. Pigment Cell Research, 2006. **19**(6): p. 572-594.
12. Arciuli, M., et al., *Melanogenesis in visceral tissues of Salmo salar. A link between immunity and pigment production?* Biochemistry and Cell Biology, 2012. **90**(6): p. 769-778.
13. Christensen, B.M., et al., *Melanization immune responses in mosquito vectors*. Trends in parasitology, 2005. **21**(4): p. 192-199.
14. Salinas, C., et al., *Dopachrome tautomerase decreases the binding of indolic melanogenesis intermediates to proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1994. **1204**(1): p. 53-60.
15. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. Physiological reviews, 2004. **84**(4): p. 1155-1228.
16. Nordlund, J.J., et al., *Pigment cell biology: an historical review*. Journal of Investigative Dermatology, 1989. **92**: p. 53S-60S.
17. Sichel, G., M. Scalia, and C. Corsaro, *Amphibia kupffer cells*. Microscopy research and technique, 2002. **57**(6): p. 477-490.
18. Sichel, G., et al., *The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view*. Pigment cell research, 1997. **10**(5): p. 271-287.
19. Ferguson, H.W., *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. 1989: Iowa State University Press.

Referanser

20. Cooper, M. and K.Ø. Midling, *Blood vessel melanosis: a physiological detoxification mechanism in Atlantic cod (Gadus morhua)*. Aquaculture International, 2007. **15**(1): p. 43-54.
21. Agius, C. and R. Roberts, *Melano - macrophage centres and their role in fish pathology*. Journal of Fish Diseases, 2003. **26**(9): p. 499-509.
22. Koppang, E., et al., *Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment*. Current pharmaceutical design, 2007. **13**(36): p. 3649-3655.
23. Mackintosh, J.A., *The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin*. Journal of Theoretical Biology, 2001. **211**(2): p. 101-113.
24. Fitzpatrick, T.B., et al., *Terminology of vertebrate melanin-containing cells: 1965*. Science, 1966. **152**(3718): p. 88-89.
25. Thorsen, J., B. Høyheim, and E.O. Koppang, *Isolation of the Atlantic salmon tyrosinase gene family reveals heterogenous transcripts in a leukocyte cell line*. Pigment cell research, 2006. **19**(4): p. 327-336.
26. Meseguer, J., A. Lopez-Ruiz, and M. Esteban, *Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (Dicentrarchus labrax) and gilthead seabream (Sparus aurata): morphology, formation and possible function*. Cell and Tissue Research, 1994. **277**(1): p. 1-10.
27. Agius, C. and S. Agbede, *An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish*. Journal of fish biology, 1984. **24**(4): p. 471-488.
28. Sichel, G., et al., *Relationship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals*. Cell biochemistry and function, 1987. **5**(2): p. 123-128.
29. Wolke, R.E., et al., *Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1985. **35**(1): p. 222-227.
30. Scalia, M., et al., *Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: protective role of melanin*. Pigment Cell Research, 1990. **3**(2): p. 115-119.
31. Tang, H., *Regulation and function of the melanization reaction in Drosophila*. Fly, 2009. **3**(1): p. 105-111.
32. Le Poole, I., et al., *A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders*. The Journal of Immunology, 1993. **151**(12): p. 7284-7292.
33. Larsen, H.A., et al., *Transcription of the tyrosinase gene family in an Atlantic salmon leukocyte cell line (SHK-1) is influenced by temperature, but not by virus infection or bacterin stimulation*. Developmental & Comparative Immunology, 2013. **41**(1): p. 50-58.
34. Camacho-Hübner, A., C. Richard, and F. Beermann, *Genomic structure and evolutionary conservation of the tyrosinase gene family from Fugu*. Gene, 2002. **285**(1): p. 59-68.
35. Boonanuntasarn, S., et al., *Molecular cloning, gene expression in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout*. Pigment Cell Research, 2004. **17**(4): p. 413-421.

Referanser

36. Purrello, M., et al., *Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in Kupffer cells from Rana esculenta*. Pigment Cell Research, 2001. **14**(2): p. 126-131.
37. Kim, D.-S., et al., *Temperature regulates melanin synthesis in melanocytes*. Archives of pharmacal research, 2003. **26**(10): p. 840-845.
38. Berg, A., et al., *Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk-effekter og bivirkninger*. 2006.
39. Bjørgen, H., et al., *Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (Salmo salar)*. Veterinary research, 2015. **46**(1): p. 1-12.
40. Fagerland, H.A., et al., *Pathological pigmentation in cardiac tissues of Atlantic salmon (Salmo salar L.) with cardiomyopathy syndrome*. Veterinary research, 2013. **44**(1): p. 107.
41. Nærings- og fiskeridepartementet. *Forskrift om drift av akvakulturanlegg*. FOR-2008-06-17-822 10.05.2015]; Available from: <https://lovdata.no/pro/-document/SF/forskrift/2008-06-17-822?searchResultContext=938>.
42. Drangsholt, T.M.K., et al., *Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in farmed Atlantic salmon (Salmo salar)*. Aquaculture, 2011. **318**(3): p. 316-324.
43. Berg, A., et al., *Vaccinated farmed Atlantic salmon are susceptible to spinal and skull deformities*. Journal of Applied Ichthyology, 2012. **28**(3): p. 446-452.
44. Koppang, E., et al., *Vaccine - associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, Salmo salar L., white muscle*. Journal of Fish Diseases, 2005. **28**(1): p. 13-22.
45. Tafalla, C., J. Bøgwald, and R.A. Dalmo, *Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives*. Fish & shellfish immunology, 2013. **35**(6): p. 1740-1750.
46. Jafelice, M.P., *Effects of vaccination and dietary treatment on development and melanin deposition of Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. 2014.
47. Larsen, H., et al., *The effect of vaccination, ploidy and smolt production regime on pathological melanin depositions in muscle tissue of Atlantic salmon, Salmo salar L.* Journal of fish diseases, 2014. **37**(4): p. 327-340.
48. Kongtorp, R., et al., *Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, Salmo salar L.: a new infectious disease*. Journal of Fish Diseases, 2004. **27**(6): p. 351-358.
49. Carstens, E. and L. Ball, *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008)*. Archives of virology, 2009. **154**(7): p. 1181-1188.
50. Bruno, D., P.A. Noguera, and T.T. Poppe, *A colour atlas of salmonid diseases*. Vol. 91. 2013: Springer Science & Business Media.
51. Palacios, G., et al., *Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus*. PLoS one, 2010. **5**(7): p. e11487.
52. Finstad, O.W., et al., *Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes*. Vet Res, 2014. **45**: p. 35.
53. Wessel, Ø., et al., *Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (Salmo salar L.) erythrocytes ex vivo*. Vet Res, 2015. **46**: p. 26.
54. Kongtorp, R., T. Taksdal, and A. Lyngøy, *Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon Salmo salar*. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS., 2004. **59**: p. 217-224.

Referanser

55. Kongtorp, R., et al., *Longitudinal study of a natural outbreak of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, Salmo salar L.* Journal of fish diseases, 2006. **29**(4): p. 233-244.
56. Taksdal, T., et al., *Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, Salmo salar L., and rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), in Norway.* Journal of Fish Diseases, 2007. **30**(9): p. 545-558.
57. Haugland, Ø., et al., *Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (Salmo salar L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family.* Journal of virology, 2011. **85**(11): p. 5275-5286.
58. Brun, E., et al., *Cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon Salmo salar: occurrence and direct financial losses for Norwegian aquaculture.* Diseases of Aquatic Organisms, 2003. **56**(3): p. 241-247.
59. Larsen, H.A., et al., *Pigment-producing granulomatous myopathy in Atlantic salmon: a novel inflammatory response.* Fish & shellfish immunology, 2012. **33**(2): p. 277-285.
60. Braceland, M., et al., *Serum enolase: a non - destructive biomarker of white skeletal myopathy during pancreas disease (PD) in Atlantic salmon Salmo salar L.* Journal of fish diseases, 2015. **38**(9): p. 821-831.
61. Apple, F.S., et al., *International survey on the use of cardiac markers.* Clinical chemistry, 2001. **47**(3): p. 587-588.
62. Sandnes, K., Ø. Lie, and R. Waagbø, *Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, Salmo salar.* J. Fish Biol, 1988. **32**(1): p. 129-136.
63. Kemp, M., et al., *Biochemical markers of myocardial injury.* British journal of anaesthesia, 2004. **93**(1): p. 63-73.
64. Mannen, H., et al., *The cDNA cloning and molecular evolution of reptile and pigeon lactate dehydrogenase isozymes.* Molecular biology and evolution, 1997. **14**(11): p. 1081-1087.
65. Kopperschläger, G. and J. Kirchberger, *Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996. **684**(1): p. 25-49.
66. Almeida, J., et al., *The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to in vivo cadmium contamination.* Environment International, 2002. **27**(8): p. 673-679.
67. Tseng, Y.-C., et al., *Regulation of lactate dehydrogenase in tilapia (Oreochromis mossambicus) gills during acclimation to salinity challenge.* Zool Stud, 2008. **47**: p. 473-480.
68. Gosz, E., et al., *Enzymatic activities in spermatozoa and butyltin concentrations in Baltic turbot (Scophthalmus maximus).* Marine environmental research, 2011. **72**(4): p. 188-195.
69. Gronczewska, J., et al., *Inhibition by tributyltin of herring skeletal muscle lactate dehydrogenase activity.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2004. **137**(4): p. 307-311.
70. Greco, L., E. Capri, and T. Rustad, *Biochemical responses in Salmo salar muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin.* Chemosphere, 2007. **68**(3): p. 564-571.

Referanser

71. Anderson, E., et al., *Hematology, plasma biochemistry, and tissue enzyme activities of invasive red lionfish captured off North Carolina, USA*. Journal of aquatic animal health, 2010. **22**(4): p. 266-273.
72. Vieira, L., et al., *Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish Pomatoschistus microps*, 2009: p. 1416-1427.
73. Osman, A.G., et al., *Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes*. Natural Science, 2010. **2**(11): p. 1302.
74. Osman, A.G., et al., *Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, Clarias gariepinus (Burchell, 1822)*. Fish Physiology and Biochemistry, 2007. **33**(1): p. 1-13.
75. Li, Z.-H., et al., *Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, after chronic exposure to carbamazepine*. Chemico-biological interactions, 2010. **183**(1): p. 98-104.
76. Banaee, M., et al., *Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Fish physiology and biochemistry, 2011. **37**(4): p. 885-896.
77. Yousaf, M.N. and M.D. Powell, *The effects of heart and skeletal muscle inflammation and cardiomyopathy syndrome on creatine kinase and lactate dehydrogenase levels in Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. The Scientific World Journal, 2012. **2012**.
78. Lin, L.-Y., et al., *Cellular distributions of creatine kinase in branchia of euryhaline tilapia (Oreochromis mossambicus)*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2003. **284**(1): p. C233-C241.
79. Wallimann, T., M. Tokarska-Schlattner, and U. Schlattner, *The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine*. Amino acids, 2011. **40**(5): p. 1271-1296.
80. Otway, N.M., M.T. Ellis, and R. Starr, *Serum biochemical reference intervals for wild dwarf ornate wobbegong sharks (Orectolobus ornatus)*. Veterinary Clinical Pathology, 2011. **40**(3): p. 361-367.
81. Edsall, C.C., *A blood chemistry profile for lake trout*. Journal of Aquatic Animal Health, 1999. **11**(1): p. 81-86.
82. Li, Z.-H., et al., *Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost*. Chemosphere, 2011. **83**(4): p. 572-578.
83. Pancholi, V., *Multifunctional α -enolase: its role in diseases*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2001. **58**(7): p. 902-920.
84. Tracy, M.R. and S.B. Hedges, *Evolutionary history of the enolase gene family*. Gene, 2000. **259**(1): p. 129-138.
85. Woźny, M., et al., *Differential gene expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver and ovary after exposure to zearalenone*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2012. **156**(3): p. 221-228.
86. Kuehn, A., et al., *Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens*. Clinical & Experimental Allergy, 2013. **43**(7): p. 811-822.
87. Sanchez, B.C., et al., *Liver proteome response of largemouth bass (Micropterus salmoides) exposed to several environmental contaminants: potential insights into biomarker development*. Aquatic toxicology, 2009. **95**(1): p. 52-59.
88. Veiseth-Kent, E., et al., *Changes in muscle and blood plasma proteomes of Atlantic salmon (Salmo salar) induced by crowding*. Aquaculture, 2010. **309**(1): p. 272-279.

Referanser

89. Veterinærinstituttet. *Prøvetaking fisk, krepsdyr og skjell*. 16.05.2016]; Available from: <http://www.vetinst.no/Proevetaking-og-diagnostikk/Proevetaking-fisk-krepsdyr-skjell>.
90. McLoughlin, M., et al., *Virological, serological and histopathological evaluation of fish strain susceptibility to experimental infection with salmonid alphavirus*. *Diseases of aquatic organisms*, 2006. **72**: p. 125-133.
91. Life Technologies. *Real-Time PCR handbook*. 10. Mai 2016]; Available from: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.
92. Olsvik, P.A., et al., *Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon*. *BMC Molecular Biology*, 2005. **6**(1): p. 1.
93. qBase, *Management and automated analysis of real-time quantitative PCR data*, in *User manual*. 2006.
94. Sigma-Aldrich. *Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit*. Product Information 2016; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak066bul.pdf>.
95. Sigma-Aldrich, *Creatine kinase Activity Assay Kit*, in *Product Information*. 2014.
96. Watters, S.A., P. Mlcochova, and R.K. Gupta, *Macrophages: the neglected barrier to eradication*. *Current opinion in infectious diseases*, 2013. **26**(6): p. 561-566.
97. Kwon-Chung, K.J., W.B. Hill, and J.E. Bennett, *New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis*. *Journal of clinical microbiology*, 1981. **13**(2): p. 383-387.
98. Koppang, E., et al., *Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II β chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*)*. *Fish & shellfish immunology*, 2003. **14**(2): p. 115-132.
99. Haugarvoll, E., et al., *Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon*. *Vaccine*, 2010. **28**(31): p. 4961-4969.
100. Yousaf, M.N., et al., *Comparative cardiac pathological changes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI), cardiomyopathy syndrome (CMS) and pancreas disease (PD)*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2013. **151**(1): p. 49-62.
101. Løvoll, M., et al., *Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production*. *Diseases of aquatic organisms*, 2012. **99**(1): p. 7.
102. Garseth, Å., et al., *Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and sea - trout, *Salmo trutta* L., in Norway*. *Journal of fish diseases*, 2013. **36**(5): p. 483-493.
103. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. *Analytical biochemistry*, 1997. **245**(2): p. 154-160.
104. Vesell, E.S. and A.G. Bearn, *Variations in the lactic dehydrogenase of vertebrate erythrocytes*. *The Journal of general physiology*, 1962. **45**(3): p. 553-565.
105. Gesser, H. and L.-E. Sundell, *Functional aspects of lactate dehydrogenase isoenzymes of atlantic salmon (*Salmo salar* L.)*. *International Journal of Biochemistry*, 1971. **2**(10): p. 462-472.

Appendiks

Appendiks I

Reagenser

Reagenser	Produsent
Creatine kinase Activity Assay kit	Sigma- Aldrich
CK Assay Buffer	Sigma-Aldrich
CK Enzyme mix	Sigma-Aldrich
CK Substrat soulution	Sigma-Aldrich
DNase	Qiagen
Eosin	Thermo Fischer Scientific
Eukitt	Fluka Analytical
Fast SYBR green mastermix	Applied biosystems
Formaldehyde	Sigma-Aldrich
Hematoxylin	Thermo Fischer Scientific
HistoClear	National Diagnostics
Lactate dehydrogenase Activity Assay kit	Sigma- Aldrich
LDH Assay buffer	Sigma-Aldrich
LDH Positive control	Sigma-Aldrich
LDH Substrat miks	Sigma- Aldrich
Paraffin Histowax	Histolab products AB
QuantiThech® Reverse Transcription Kit	Qiagen
Quantiscript RT Buffer	Qiagen
Quantiscript Reverse Transcriptase	Qiagen
Quantiscript RT primer mix	Qiagen

Appendiks

<i>RNAlater</i>	Ambion, Life Technologies
RNase-fritt vann	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy RLT Buffer	Qiagen
RNeasy RPE Buffer	Qiagen
RNeasy RW1 Buffer	Qiagen
Ultra Pure Water	Biochrom AG
2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
96% etanol	Sigma-Aldrich
99,98% etanol	Sigma-Aldrich

Appendiks

Appendiks II

Løsninger

Løsninger til Real-Time kvantitativ PCR

Genomisk DNA-eliminering	
gDNA Wipeout buffer, 7x	2 µl x antall prøver
RNase-fritt vann	7 µl x antall prøver
Templat RNA	5 µlx antall prøver
Totalt reaksjonsvolum	14 µl

Reverse- transcription master mix	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl x antall prøver
Quantiscript RT buffer	4 µl x antall prøver
RT primer mix	1 µl x antall prøver
Templat RNA	10 µl x antall prøver
Totalt reaksjonsvolum	20 µl x antall prøver

Master mix for Real-Time kvantitativ PCR	
SYBR® Green	7,5 µl x antall prøver
Primer FW	0,8 µl x antall prøver
Primer RW	0,8 µl x antall prøver
Nuc H₂O	0,9 µl x antall prøver
cDNA templat	5 µl x antall prøver
Totalt reaksjonsvolum	15 µl

Appendiks

Løsninger til serumanalyser på Norges Fiskerihøgskole

Laktat dehydrogenase

Master Reaction Mix for Laktat dehydrogenase (LDH)

LDH Assay Buffer 48 μl x antall prøver

LDH Substrate Mix 2 μl x antall prøver

Totalt reaksjonsvolum 50 μl

Kreatinkinase

Reconstituted Reagent for Kreatinkinase (CK)

Assay Buffer 100 μl x antall prøver

Substrate Solution 10 μl x antall prøver

Enzyme mix 1 μl x antall prøver

Totalt reaksjonsvolum 111 μl

Appendiks

Appendiks III

Histologi

Gradering av melaninsnitt. 36 melaninflekker av fire ulike størrelser ble preparert og gradert for nekrotiske muskelceller, betennelse og betennelsesceller og melaninholdige celler. Tabellen viste prøveuttak, melaninstørrelse og graderingen av hvert enkelt melaninsnitt.

Fisk (nr)	Prøveuttak (nr)	Melaninstørrelse (cm)	Nekrose	Inflammasjon	Melaninholdige celler
1	1	1-2	3	2	1
2	2	>3	1	0	1
3	6	<1	0	0	0
4	4	<1	0	0	1
5	5	2-3	0	0	1
6	1	2-3	2	1	2
7	1	<1	1	0	1
8	1	1-2	1	0	1
9	4	2-3	0	0	2
10	4	<1	0	1	1
11	6	<1	0	0	1
12	6	>3	1	0	1
13	6	1-2	0	1	2
14	6	>3	3	1	2
15	6	<1	1	1	2
16	3	1-2	3	1	2
17	1	1-2	1	0	1
18	5	<1	0	0	1
19	4	<1	1	0	1
20	2	1-2	1	0	2
21	2	1-2	2	0	2
22	3	<1	1	0	2
23	4	<1	1	0	0
24	6	1-2	2	1	0
25	1	>3	2	0	0

Appendiks

26	2	<1	1	0	1
27	5	<1	0	0	1
28	4	2-3	0	0	1
29	4	2-3	0	0	2
30	3	1-2	2	1	2
31	1	1-2	1	0	1
32	1	2-3	1	0	1
33	5	<1	2	0	1
34	4	<1	1	0	1
35	5	1-2	1	0	1
36	4	<1	1	0	1

Appendiks

Appendiks IV

Cq-verdier for RNA fra PRV målt i RT-qPCR

Cq-verdier for RNA fra PRV målt i RT-qPCR. 84 prøver av hjerte, melaninflekk, muskel fra fileter med og uten melaninflekk. PH; Positiv hjerte fra melaninflekk over 3cm. PH-1; Positiv hjerte fra melaninflekk under 1 cm. PM; Positiv muskel fra melaninflekk over 3 cm. PM-1; Positiv muskel fra melaninflekk under 1 cm. ME; melaninflekk over 3 cm. ME-1; melaninflekk under 1 cm.

Prøve	Gjennomsnitt Cq	Prøve	Gjennomsnitt Cq	Prøve	Gjennomsnitt Cq
F11H	Undetermined	PM10	36,159	PM11-1	32,726
F12H	37,788	PH11-1	35,132	ME11-1	35,458
F13H	39,636	PM1-1	32,822	ME1	34,871
F14H*	33,82	ME1-1	35,451	ME2	35,778
F15H	37,537	PH1-1	35,406	ME3	34,826
F16H	39,365	PM2-1	32,785	ME4	35,142
F17H	Undetermined	ME2-1	35,633	ME5	34,929
F18H	37,608	PH2-1	35,025	ME6	35,37
F19H	39,332	PM3-1	33,851	ME7	34,915
F20H	36,79	ME3-1	35,231	ME8	35,615
F11M	36,865	PH3-1	35,164	ME9	35,034
F12M	35,549	PM4-1	36,431	ME10	34,331
F13M	37,461	ME4-1	35,6	PH1	35,189
F14M	32,48	PH4-1	34,616	PH2	35,133
F15M	33,419	PM5-1	32,7	PH3	35,033
F16M	Undetermined	ME5-1	35,415	PH4	35,181
F17M	34,403	PH5-1	35,665	PH5	34,665
F18M	37,169	PM6-1	33,347	PH6	32,957
F19M	35,561	ME6-1	35,307	PH7	34,624
F20M	36,623	PH6-1R	35,706	PH8	34,519
PM1	36,943	PM7-1	36,146	PH9	35,377
PM2	35,967	ME7-1	35,216	PH10	35,454
PM3	35,746	PH8-1	35,325	PH6-1	34,868
PM4	34,758	PM9-1	33,956	PM8-1	34,919

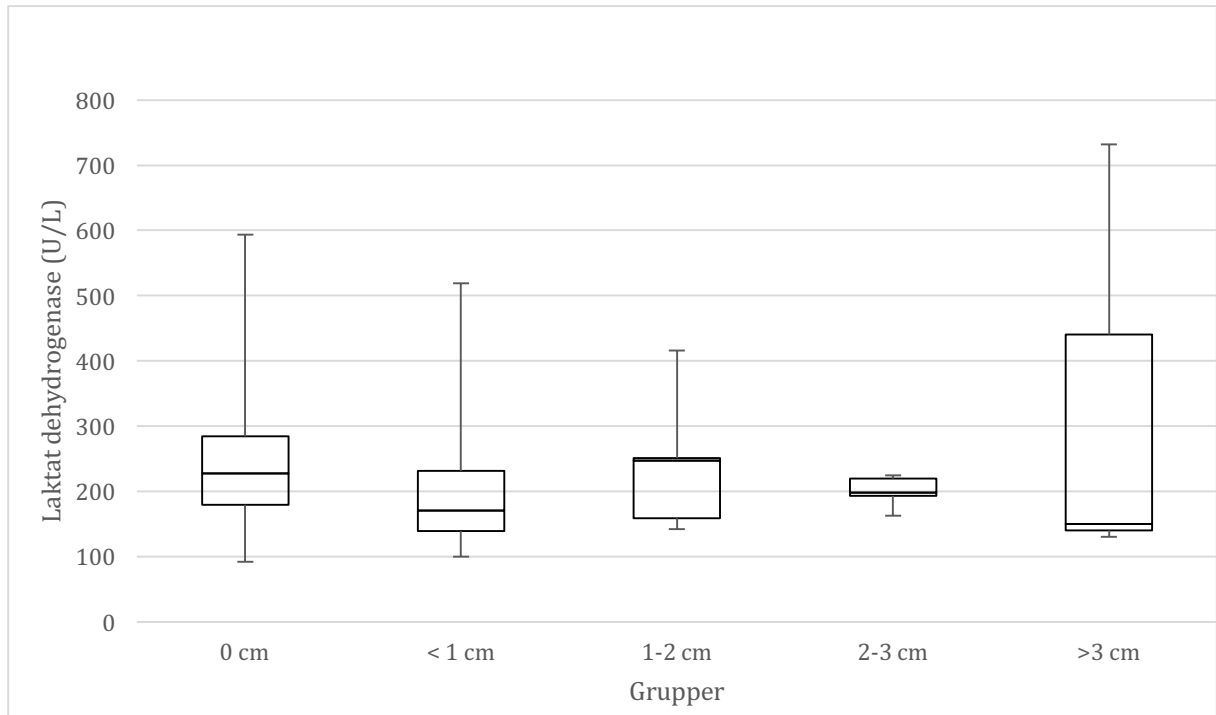
Appendiks

PM5	36,185	ME9-1	35,387	PH7-1	35,307
PM6	36,005	PH9-1	35,961	ME8-1	35,364
PM7	36,653	PM10-1	36,049	PM9	36,159
PM8	34,98	ME10-1	34,481	PH10-1	35,863

Appendiks

Appendiks V

Målinger av laktat dehydrogenase



Laktat dehydrogenase analyse fra Norges Fiskerihøgskole. Fire ulike melaningrupper ble undersøkt for laktat dehydrogenase. Serum fra fileter uten melanin ble brukt som kontroll. Én gruppe hadde ingen melaninflekk. Student T- test viste ingen signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom gruppene.