

Styrt fettsyresammensetning i fôr for å forebygge utbrudd av viktige virussykdommer i laks

Bjarne Hatlen, Sven Martin Jørgensen, Gerrit Timmerhaus, Aleksei Krasnov, Marta Bou Mira, Bente Ruyter og Øystein Evensen*(* NMBU)





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

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

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Styrt fettsyresammensetning i fôr for å forebygge utbrudd av viktige virussykdommer i laks</p>	<p>ISBN: 978-82-8296-349-7 (trykt) ISBN: 978-82-8296-350-3 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Bjarne Hatlen, Sven Martin Jørgensen, Gerrit Timmerhaus, Aleksei Krasnov, Marta Bou Mira, Bente Ruyter og Øystein Evensen* (* NMBU)</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 3/2016 <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen <i>Dato:</i> 28.januar 2016</p>
<p><i>Avdeling:</i> Ernæring og forteknologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 48</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900966</p>
<p><i>Stikkord:</i> Salmo salar, fiskefôr, EPA, HSMB, betennelse, piscine reovirus (PRV), PD, omega-3</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 10842</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Atlantisk laks ble etter fôring i 18 uker med 4 ulike dietter (A: Lav EPA/DHA kontroll, B: medium EPA, C: høy EPA, D: høy DHA) smittet med PRV (HSMB-virus) eller SAV3 (PD-virus). Fisken var ca 180 g ved smitte. HSMB-smittet fisk fikk kontrollfôr og høy EPA etter smitte, mens PD-smittet fisk bare fikk kontrollfôr.</p> <p>Det var redusert HSMB-patologi i hjertet (myokard) i fisk fôret med høyt EPA-innhold etter smitte, og forskjellen var signifikant ($P < 0,05$) 6 uker etter smitte. Microarray analyser viste en massiv nedregulering av immungener i hjertet på dette tidspunktet. Dette betyr at tidligere observasjoner av forskjellig dødelighet mellom fôr under HSMB-utbrudd i felt trolig kan knyttes til ulikt nivå av EPA. Parallelt med de patologiske endringene i hjertet var det en utvikling av mikrovaskulær steatose i lever. Denne så ut til å være knyttet til fôr og ikke til smitte.</p> <p>Det var ingen effekt av fôr gitt før smitte. Dette kan delvis forklares med høyt fôrintak etter smitte, slik at forskjeller i fettsyresammensetning i vev ble uttynnet. Prosjektet gir dermed ikke klare svar på om medium EPA-innhold eller høyt DHA innhold kunne gitt lignende effekter som det en fikk med høy EPA etter smitte. Også fisken i PD-smitteforsøket hadde fôrintak på linje med usmittet fisk, slik at effektene av fôring før smitte ble fortennet. Det var likevel interessante trender, særlig knyttet til mulig forbedret evne til recovery fra sykdom, som bør følges opp med nye studier.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>Atlantic salmon (ca 180 g) were challenged with PRV (HSMI virus) or SAV3 (PD virus) after feeding 18 weeks on four different diets (A: Low EPA/DHA control, B: medium EPA, C: high EPA, D: high DHA). The fish challenged with PRV was given control feed and high EPA feed after challenge, whereas those challenged with SAV3 only received control feed. There was reduced HSMI pathology in the heart (myocardium) of fish fed high EPA diet, and the difference was significant ($P < 0.05$) at 6 weeks post challenge (wpc). This was supported by microarray analyses showing massive down-regulation of immun genes in the heart. In parallel to the pathological changes in the heart, there was a development of microvesicular steatosis in liver, apparently associated to diet and not to infection.</p> <p>There were no effects of pre-challenge feeding in this study, partly explained with high feed intake after challenge, diluting initial differences in tissue fatty acid composition. Also, the fish in the PD challenge trial had feed intake similar to uninfected fish, so the effects of feeding before challenge were diluted. Despite of this, there were interesting trends, particularly related to improved recovery from disease, which should be followed up.</p>	

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	2
2.1	Bakgrunn	2
3	Problemstilling og formål	5
3.1	Effekt mål	5
3.2	Resultat mål	5
4	Prosjektgjennomføring (Materiale og metoder)	6
4.1	Valg av forsøksmetode	6
4.2	Fôr	6
4.3	Føringsforsøk (før smitte)	10
4.4	Smitteforsøk	10
4.4.1	PRV-smitte (HSMB)	10
4.4.2	SAV2-smitte (PD)	11
4.5	Analysen	11
4.5.1	Kjemiske analyser i fôr og fisk	11
4.5.2	Patologi	12
4.5.3	Virustall	12
4.5.4	Plasma eicosanoider	12
4.5.5	RNA isolering fra laks	12
4.5.6	Microarray analyser	13
4.5.7	Analyse av COX 1 og COX 2 genuttrykk	13
4.6	Formler	13
4.7	Statistiske beregninger	14
5	Resultater og konklusjon	15
5.1	Føring før smitte	15
5.2	HSMB-smitte	24
5.2.1	Vekst og endringer i fettsyreprofil etter smitte	24
5.2.2	Virustall	29
5.2.3	Patologi	29
5.2.4	Microarray resultater	32
5.2.5	Uttrykk av Cox-1 og Cox-2 i lever	36
5.2.6	Sirkulerende eicosanoider	37
5.3	PD-smitte	37
5.3.1	Vektutvikling	37
5.3.2	Virustall	38
5.3.3	Patologi	38
5.3.4	Microarray resultater	40
5.4	Diskusjon	41
5.5	Konklusjon	43
6	Leveranser	45
7	Kvalitetssikring	46

8 Referanser 47

1 Sammendrag

Atlantisk laks ble etter fôring i 18 uker med 4 ulike dietter (A: Lav EPA/DHA kontroll, B: medium EPA, C: høy EPA, D: høy DHA) utsatt for smitte med PRV (HSMB-virus) eller SAV3 (PD-virus). Fisken var ca 180 g ved smitte. Fisken som fikk HSMB-smitte ble gitt kontrollfôr og høy EPA i duplikate grupper etter smitte, mens PD-smittet fisk bare fikk kontrollfôr i to kar. Effekten av smitte ble evaluert ved målinger av virusmengde, histopatologi og uttrykk av gener knyttet til fiskens immunforsvar.

Det var en tendens til mindre patologiske endringer i hjertet (myokard) i fisk fôret med høyt EPA innhold etter HSMB-smitte enn i fisk som fikk kontrollfôr, og forskjellen var signifikant ($P < 0,05$) ved 6 uker etter smitte. Dette ble forklart av microarray analyser som viste en massiv nedregulering av immungener i hjertet. Dette betyr at tidligere observasjoner av forskjellig dødelighet mellom fôr under HSMB-utbrudd i felt med stor sannsynlighet kan knyttes til ulikt nivå av EPA.

Parallelt med de patologiske endringene i hjertet var det en utvikling av mikrovesikulær steatose i lever. Denne så ut til å være mer knyttet til fôr enn til smitte, siden både usmittet og smittet fisk på kontrollfôr hadde høyere histopatologiscore enn smittet fisk fôret med forhøyet EPA-nivå. Det er kjent at fettakkumulering i lever virker proinflammatorisk, og den rollen leversteatose spiller i patogenesen av HSMB fortjener videre studier.

Det var ingen effekt av fôr gitt før smitte, og dette ble forklart ved analyser som viste at fettsyresammensetning i ulike vev relativt raskt bar preg av fôring etter smitte. Prosjektet gir dermed ikke svar på om medium EPA-innhold eller høyt DHA innhold kunne gitt lignende effekter som det en fikk med.

Også fisken i PD-smitteforsøket så ut til, noe overraskende, å ha fôrinntak på linje med usmittet fisk, slik at effektene av fôring før smitte trolig hble kraftig fortynnet. Til tross for dette ble det sett interessante trender, særlig knyttet til mulig forbedret evne til recovery fra sykdom, som bør følges opp med nye studier.

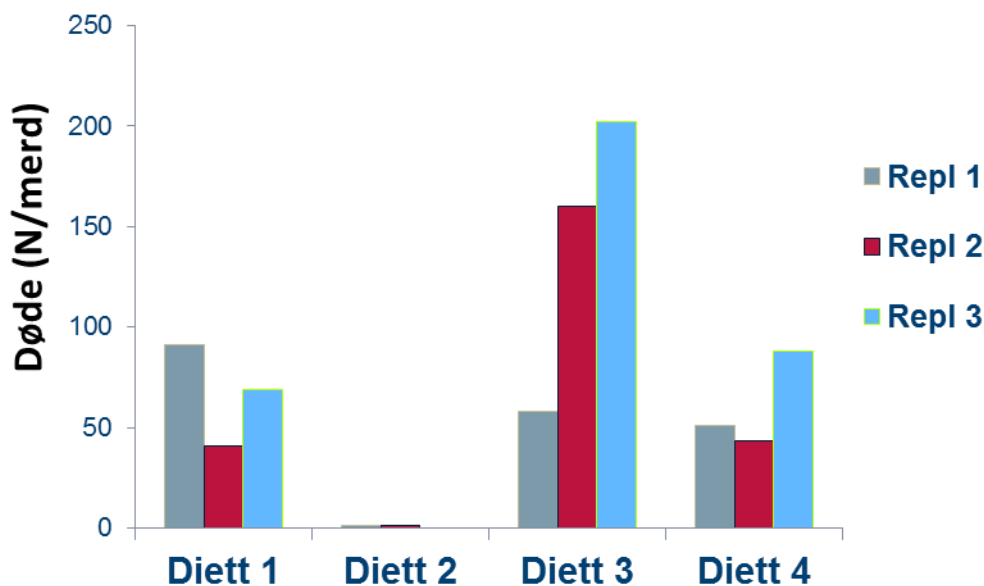
2 Innledning

2.1 Bakgrunn

Hjerte-og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) er en av de vanligste infeksjonssykdommene hos laks i Norge og ble i 2014 påvist i 181 lokaliteter (Fiskehelse rapporten 2014; <http://www.vetinst.no/Publikasjoner/Fiskehelse rapporten/Fiskehelse rapporten-2014>). HSMB har vært kjent i mer enn ti år i Norge (Kongtorp et al., 2004), men først i 2010 ble piscine reovirus (PRV) identifisert i prøver fra HSMB syk fisk (Palacios et al., 2010), og det er vist at dette viruset forårsaker sykdommen. Utbrudd av HSMB kommer ofte ca et halvår etter utsett i sjø og dødeligheten varierer, men kan komme opp i ca. 20 %. Nær 100 % av fisken kan være smittet under et utbrudd. HSMB kjennetegnes spesielt ved alvorlig betennelse i hjertet og de

røde skjelettmuskulaturen. Vevsforandringene i hjertet kan ligne på det en ser i fisk som har CMS (Cardiomyopathy syndrome) og PD (Pancreas disease), to andre viktige, tapsbringende virussykdommer i norsk oppdrett.

I et fôringsforsøk med kommersielle fôr til laks i sjø som Nofima utførte for Lerøy i 2011-2012, og hvor fisken tilfeldigvis ble utsatt for et naturlig utbrudd av HSMB, var det en markant effekt av fôret på dødeligheten. Den ene fôrgruppe (tre merder) hadde ingen dødelighet, mens dødeligheten i de andre 9 merdene (tre fôrgrupper) var fra 10 til 50 %. Fôrgruppen som ikke hadde dødelighet hadde heller ikke endring i fôrintak i perioden, mens alle de andre gruppene hadde en tydelig dropp. Det var altså helt åpenbart at det ene fôret beskyttet laksen mot HSMB, noe som er særlig interessant siden dette var vanlige kommersielle vekstfôr uten tilsats av immunstimulanter eller lignende. Senere analyser av fôrene ga en sterk indikasjon på at forskjellen i overlevelse hadde sammenheng med fôrets innhold av langkjedede, flerumettede n-3 fettsyrer (n-3 PUFA), spesielt EPA (eicosapentaenoic acid; 20:5 n-3).



Figur 1 Akkumulert dødelighet i forbindelse med HSMB-utbrudd i 12 forsøksmerder ved Nofimas forskningsstasjon på Averøy (nå: Marine Harvest) (Hatlen et al., upublisert).

Dødsårsaken hos fisk som dør av HSMB ser ut til å være sirkulasjonssvikt på grunn av de store inflammatoriske vevsforandringene i hjertet. Det er kjent fra både pattedyr og fisk at n-3 PUFA kan virke anti-inflammatorisk, og det er i denne forbindelse interessant å merke seg at dette særlig gjelder EPA, som var den fettsyren som skilte seg mest ut i vårt forsøk. Den anti-inflammatoriske effekten av EPA kan ha ulike mekanistiske forklaringer, som redusert produksjon av proinflammatoriske eicosanoider fra arachidonsyre (ARA; 20:4 n-6), økt produksjon av EPA-deriverte eicosanoider og effekt på cellegjerne-reseptorer (e.g. PPAR) (f.eks. Calder 2010, Gillies et al., 2012). Foruten effekter på inflammasjonsstatus kan det også være reseptor-medierte effekter på fiskens energimetabolisme (Kjær et al., 2008) som bidrar til å øke fiskens toleranse mot sykdom. EPA omdannes i laks delvis til DPA (docosapentaenoic acid; 22:5 n-3), som også har anti-inflammatoriske effekter og docosahexanoic acid DHA, som har en viktig strukturell funksjon i cellemembranenes fosfolipider.

Kontrollerte forsøk utført av Martinez-Rubio og medforfattere i 2012 gav indikasjoner på at EPA nivået i fôr kan ha en forebyggende effekt mot utvikling av HSMB i laks. Laks fôret med forhøyet EPA nivå viste både redusert virusmengde i hjertet og mindre histopatologiske forandringer etter eksperimentell smitte med HSMB. I forsøket til Martinez kunne imidlertid ikke forskerne skille en eventuell EPA-effekt fra effekter av f.eks. totalt fettinnhold i fôret og ratio mellom EPA og arakidonsyre (ARA; 20:4 n-6). Våre tidligere resultater tydet imidlertid på at det er viktig først og fremst å rette fokus på EPA, eventuelt sum EPA og DHA.

Resultatene ovenfor er svært lovende for mulighetene til å redusere de voldsomme tapene oppdrettsnæringen hvert år lider på grunn av virussykdommer. Samtidig er de alarmerende i forhold til den erstatningen av fiskeolje med vegetabiliske oljer, som har funnet sted i de senere år, med mindre oljeb Bruken kan styres slik at fisken får nok EPA og DHA i de periodene de trengs mest. Det er fortsatt behov for kunnskap for å optimalisere bruken av disse fettsyrene med hensyn på motstand mot virus, noe som potensielt vil kunne spare næringen for enorme økonomiske tap (Torstensen et al., 2013). De

til dels sammenfallende kliniske sykdomsbildene for ulike virussykdommer som HSMB, PD og CMS, kan gi håp om at styring av fettsyreprofil i fôr kan virke forebyggende for flere av disse tapsbringende sykdommene, ikke bare HSMB. Dette prosjektet ble gjennomført for å undersøke hvorvidt fôring med ekstra mengder EPA eller DHA påvirker fiskens evne til å motstå virusangrep, uten endring i fôrets protein:energi ratio.

Prosjektorganisering

Prosjektet er et samarbeid mellom Nofima og NMBU, hvor Nofima har prosjektleder. Styringsgruppen for prosjektet består av Tor Eirik Homme, Grieg Seafood og Harald Sveier, Lerøy Seafood Group. Merete Bjørgan Schrøder har fulgt opp prosjektet fra FHF's side.

Nofima har hatt ansvar for oppfôring av fisk før smitte, mens selve smitteforsøkene har vært utført av Veso, Vikan. NMBU har stått for alle histopatologiske undersøkelser, mens øvrige analyser har vært utført av Nofima.

3 Problemstilling og formål

3.1 Effektmål

Hovedmålet var å danne grunnlag for en effektiv forebygging av HSMB, gjennom bruk av riktig fôr til rett tid. HSMB er en sykdom som ofte opptrer på definerte tidspunkter, og tanken var at forebygging kunne skje ved rettet fôring over en relativt kort periode. F.eks. ved at 0+ smolt, som gjerne får sykdommen første vår i sjø, kunne vokse 4-500 g med spesialfôr som koster inntil 60 øre ekstra med dagens fiskeoljepriser. Dette ville ha potensiale til å hindre utbrudd og spare oppdretterne for store beløp.

Dersom prinsippet virker på andre virussykdommer enn HSMB, slik som PD, kan potensialet for innsparinger være enda høyere. Det ble derfor besluttet å undersøke effekt på PD i tillegg til HSMB.

I tillegg til en økonomisk gevinst ville redusert antall utbrudd av virussykdommer ha store positive effekter på fiskevelferd og virke positivt for næringens omdømme.

3.2 Resultatmål

Hovedmålsetningen med prosjektet var å etterprøve hvorvidt EPA nivået i fôr har betydning for laksens motstandskraft mot virussykdommene HSMB og PD.

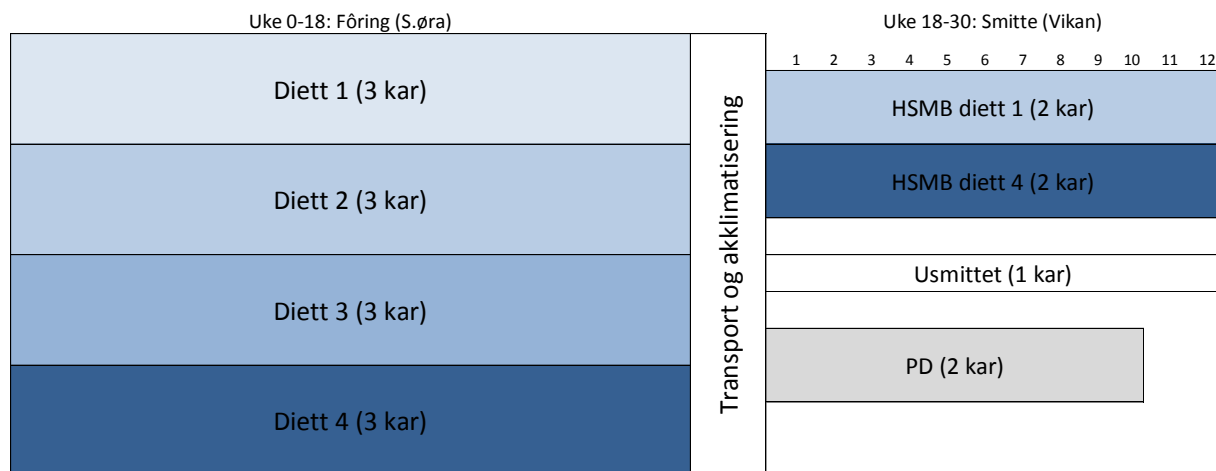
Prosjektet hadde følgende delmål:

1. Undersøke om en eventuell helseeffekt er knyttet til nivået av EPA i fôret alene, eller om det er summen av EPA og DHA som er avgjørende.
2. Fastsette omtrentlig nedre kritiske nivåer av EPA i fôr forbundet med økt motstandsdyktighet mot virussykdom.
3. Øke kunnskapen om virkningsmekanismer for eventuell effekt av EPA på fiskens motstandskraft mot HSMB og PD virus.

4 Prosjektgjennomføring (Materiale og metoder)

4.1 Valg av forsøksmetode

Fiskeforsøkene besto av 18 ukers fôring før smitte, transport og akklimatisering til smittelaboratoriet (til sammen ca 2 uker), fulgt av smitteforsøk med PRV (HSMB-virus) som varte 12 uker og med SAV3 (PD-virus) som varte 8 uker (se Figur 2). Oppfôring av fisken med ulike oljeblandinger i fôret før smitte ble gjort for å etablere forskjeller i fettsyresammensetning i vev, som var antatt å ha effekt på sykdomsmotstand.



Figur 2 Oversikts-skisse av fiskeforsøkene.

4.2 Fôr

Forsøksfôrene ble produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Fire dietter med ulike fettsyresammensetning ble produsert ved å coate et felles ekstrudert tørrfôr med ulike oljeblandinger (Tabell 1). Økende EPA eller DHA nivåer i fôret ble oppnådd ved å erstatte sildeolje med konsentrater av EPA eller DHA i form av triacylglyseroler (Incromega EPA 500TG-LQ and Incromega DHA 500TG-LQ, Croda Europe Ltd, Staffordshire, UK). Fôrene ble produsert som 3 og 4 mm pellets. Fisken ble gitt 3 mm pellets fram til overføring til smittelaboratoriet, deretter 4 mm pellets under akklimatisering og etter smitte. Kjemisk sammensetning av forsøksfôrene er gitt i Tabell 2 og 3.

Tabell 1 Fôrformulering, %.

	Diet A		Diet B		Diet C		Diet D	
	Lav EPA/DHA		Medium EPA		Høy EPA		Høy DHA	
	3 mm	4 mm	3 mm	4 mm	3 mm	4 mm	3 mm	4 mm
Fiskemel ¹	34,78	27,63	34,78	27,63	34,78	27,63	34,78	27,63
Soyaproteinkonsentrat, SPC ²	15,00	17,00	15,00	17,00	15,00	17,00	15,00	17,00
Hvete ³	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Solsikkemel ⁴	7,00	9,00	7,00	9,00	7,00	9,00	7,00	9,00
Hvetegluten ⁵	5,00	5,50	5,00	5,50	5,00	5,50	5,00	5,50
Erteproteinkonsentrat ⁶	5,00	6,00	5,00	6,00	5,00	6,00	5,00	6,00
Fiskeolje (sild) ⁷	3,36	3,77	2,02	2,21	0,34	0,37	0,17	0,18
Rapsolje ⁸	7,39	8,10	7,39	8,10	7,39	8,10	7,39	8,10
EPA konsentrat ⁹	0,67	0,64	2,02	2,21	3,70	4,05	0,67	0,74
DHA konsentrat ¹⁰	0	0	0	0	0	0	3,19	3,50
Kyllingolje ¹¹	3,36	3,68	3,36	3,68	3,36	3,68	3,36	3,68
Palmeolje ¹²	2,02	2,21	2,02	2,21	2,02	2,21	2,02	2,21
Betafin ¹³	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamin mix ¹⁴	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Mineral mix ¹⁴	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Monosodiumphosphate ¹⁵ (24% P)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Carophyll Pink (10% astaxanthin) ¹⁶	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Metionin ¹⁷	0,30	0,35	0,30	0,35	0,30	0,35	0,30	0,35
Yttriumoksid ¹⁸	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

¹(LTQ Fish meal, Welcon AS, Måløy. ²Lvert av Biomar AS, Karmøy (ukjent opphav). ³Norgesmøllene AS, Bergen.

⁴Linax Agro, Litauen. ⁵Tereos-Syral, Frankrike. ⁶AM Nutrition, Stavanger. ⁷Norsildmel, Karmsund. ⁸Vilomix Norway AS, Hønefoss. ⁹Incromega EPA 500TG-LQ, Croda Europe Ltd, Staffordshire, UK. ¹⁰Incromega DHA 500TG-LQ, Croda Europe Ltd, Staffordshire, UK. ¹¹GePro, Tyskland. ¹²Agrotech, Fredrikstad. ¹³Danisco Animal Nutrition. ¹⁴Target levels as in Mundheim et al. (2004). ¹⁵Vilomix Norway AS, Hønefoss. ¹⁶DSM, Frankrike.

¹⁷Vilomix Norway AS, Hønefoss. ¹⁸VWR International, Radnor, PA, USA.

Tabell 2 Kjemisk sammensetning av 3 mm fôr (brukt til fôring før smitte).

	Diet A Kontroll	Diet B Medium EPA	Diet C High EPA	Diet D High DHA
Totalt tørrstoff, %	92,1	92,1	92,3	92,4
Råprotein (Nx6,25), %	43,3	44,1	43,7	43,9
Total fett (Folch), %	25,0	24,7	24,5	25,2
Aske, %	7,5	7,5	7,5	7,5
Bruttoenergi, kJ/g	22,1	22,1	22,3	22,3
Fritt Astaxanthin, mg/kg	42	42	42	42
Fettsyrer, % av ekstrahert fett				
C14:0	2,2	1,8	1,3	1,2
C16:0	13,7	13,3	12,5	12,3
C16:1 n-7	2,1	1,9	1,7	1,6
C16:2 n-4	0,1	0,1	0,1	<0,1
C16:3 n-4	0,1	0,1	0,3	<0,1
C18:0	2,2	2,2	2,1	2,4
C18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	32,9	32,9	32,3	32,4
C18:2 n-6	14,5	14,8	14,7	14,5
C18:3 n-3	3,5	3,5	3,5	3,4
C18:3 n-6	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,7	0,9	1,2	0,5
C20:0	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:1 (n-9)+(n-7)	3,8	3,1	2,2	2,2
C20:2 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:3 n-3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:4 n-3	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-6	0,1	0,2	0,4	0,4
C20:5 n-3	3,3	6,0	9,4	3,9
C21:5 n-3	0,1	0,1	0,2	0,1
C22:0	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	5,3	4,0	2,2	2,4
C22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:5 n-3	0,3	0,2	0,3	0,4
C22:6 n-3	3,6	4,1	4,6	9,5
C24:1 n-9	0,2	0,1	0,1	0,2
Sum mettede fettsyrer	18,4	17,6	16,2	16,2
Sum monoene fettsyrer	44,3	42,0	38,5	38,8
Sum PUFA fettsyrer totalt	26,5	30,2	35,0	32,9
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	11,6	14,9	19,3	17,9
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	14,7	15,1	15,3	15,0
Sum fettsyrer totalt	89,2	89,8	89,7	87,9

Tabell 3 Kjemisk sammensetning av 4 mm fôr (Diett A og C gitt etter til fisk smittet med HSMB. Diett A gitt til fisk smittet med PD.

	Diet A	Diet B	Diet C	Diet D
	Kontroll	Medium EPA	High EPA	High DHA
Totalt tørrstoff, %	91,7	91,7	91,8	92
Råprotein Kjeldahl (N*6,25), %	41,6	41,5	41,4	42,2
Total fett Folch, %	24,8	25,5	25	24,9
Aske, %	6,9	6,8	6,9	6,8
Bruttoenergi, kJ/g	22,2	22,2	22,3	22,6
Fritt Astaxanthin, mg/kg	42	42	41	43
Fettsyrer, g/100g ekstrahert fett				
C14:0	2	1,6	1,1	1
C16:0	13,4	12,9	12	12
C16:1 n-7	1,9	1,7	1,4	1,3
C16:2 n-4	0,1	0,1	0,1	<0,1
C16:3 n-4	<0,1	0,1	0,2	<0,1
C18:0	2,2	2,2	2,1	2,4
C18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	33,2	33	32,1	32,6
C18:2 n-6	15	15	14,9	14,9
C18:3 n-3	3,6	3,5	3,4	3,3
C18:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,6	0,8	1	0,3
C20:0	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:1 (n-9)+(n-7)	3,6	2,8	1,8	1,8
C20:2 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:3 n-3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:4 n-3	0,1	0,2	0,2	0,1
C20:4 n-6	0,1	0,2	0,3	0,3
C20:5 n-3	2,8	5,3	8,5	3,3
C21:5 n-3	0,1	0,1	0,2	0,1
C22:0	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	5,1	3,8	1,8	1,9
C22:4 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:5 n-3	0,2	0,2	0,3	0,4
C22:6 n-3	3	3,3	3,8	8,7
C24:1 n-9	0,2	0,2	0,1	0,2
Sum mettede fettsyrer	17,9	17	15,5	15,7
Sum monoene fettsyrer	44	41,5	37,2	37,8
Sum PUFA fettsyrer totalt	25,7	28,9	33	31,5
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	10,4	13,4	17,4	16,2
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	15,2	15,3	15,3	15,3
Sum fettsyrer totalt	87,6	87,4	85,7	85
% av fôr				
EPA	0,6944	1,3515	2,125	0,8217
DHA	0,744	0,8415	0,95	2,1663
% av FA				
EPA	3,196347	6,064073	9,91832	3,882353
DHA	3,424658	3,775744	4,434072	10,23529

4.3 Fôringsforsøk (før smitte)

Forsøket ble utført ved Nofima, Sunndalsøra. Triplikate grupper av individmerkede (PIT-tags, Trovan, UK) smolt av atlantisk laks ($60,2 \pm 1,0$ g, N=12 kar, 120 fisk pr kar) av Bolaks /SalmoBreed stamme, ble fôret med de fire forsøksfôrene i 18 uker fra overgang til sjøvann. Karene (2 m^2 , ca $1,2 \text{ m}^3$ vannvolum) ble tilsatt sjøvann med naturlig temperatur. Før forsøket hadde fisken vært fôret i ferskvann med et kommersielt fôr (Skretting Protec, 2 mm pellets, Skretting AS, Stavanger). I forsøket ble triplikate kar fôret med de fire ulike diettene ved hjelp av belteautomater innstilt på 48 måltider à 6 sekunder daglig. Fôrspill ble samlet fra avløpet på metallrister, veid daglig og lagret ved $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ for tørrstoffmåling. Utfôret mengde fôr ble justert hver andre dag med sikte på 20 % overfôring. Fôrinntaket i hvert kar ble bestemt utfra mengde fôrspill, tørrstoffinnhold i fôr og fôrspill og analysert prosentandel «recovery» av tørrstoff fra hvert fôr (Helland et al., 1996). Karene ble inspisert daglig for dødfisk og eventuelle dødfisk ble tatt ut, identifisert med pit-tag, veid og deretter destruert. Vanntemperatur ble målt daglig og varierte mellom 6.1 og $8.5 \text{ }^\circ\text{C}$, med et gjennomsnitt på $6.8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fisken ble individuelt veid og lengdemålt etter to dagers fasting ved start og slutt på forsøket. Tre samleprøver av 10 fisk ved start og 10 fisk pr kar ved slutten ble tatt ut til helkroppsanalyse. Fisken ble avlivet med en overdose av metacaine (tricaine methanesulphonate, MS 222, Argent Chemical Laboratories, Redmont, WA, USA), og umiddelbart fryst og lagret ved $< -20 \text{ }^\circ\text{C}$ til de ble homogenisert og analysert. Øvrige vevsprøver ble tatt av 20 fisk ved starten av forsøket og fem pr kar ved slutten. Fisken ble avlivet med en overdose av metacaine, veid og lengdemålt. En blodprøve ble tatt fra halevenen ved hjelp av heparintilsatte vakuumrør (Vacuette Li-heparin 4 ml) og umiddelbart overført til Eppendorf-rør og sentrifugert ($8\ 000 \text{ rpm}$, $10\ 000 \times g$). Plasma ble samlet og umiddelbart frosset i flytende nitrogen og blodceller ble tatt ut fra bunnfallet og frosset på i flytende nitrogen. Hjerne og lever ble dissekert ut og veid og deretter delt i prøver for genekspresjonsstudier og kjemiske analyser, som alle ble frosset på flytende nitrogen.

4.4 Smitteforsøk

Smitteforsøkene ble gjort ved Veso på Vikan, jfr deres smitte modeller for HSMB og PD, og er bekrevet i detalj i rapport fra Veso (Appendix 1). Stikksmitte ble benyttet for å oppnå lik virusdose og infeksjon i forsøksfisken.

Ti fisk fra hvert av de 12 karene i fôringsforsøket (dvs 30 fisk fra hver fôrgruppe) ble allokert til hver av 7 ulike grupper som ble transportert separat til VESO, Vikan for smittetest. Her ble de 7 gruppene satt i hvert sitt kar for akklimatisering i en uke før injeksjonssmitte med PRV (HSMB-virus) i fire kar og SAV3 (PD-virus) i to kar. I tillegg ble fisken i ett kar injisert med negativt kontrollmedium ($0,85 \text{ } \%$ PBS).

4.4.1 PRV-smitte (HSMB)

Fisken i fire kar ble injisert intraperitonealt (i.p) med $0,2 \text{ ml}$ PRV (VESO Vikan J.nr. 2262) fortyntet $1:7$ i $0,85 \text{ } \%$ PBS. Det ble brukt 4 smittekar, hvert med like mange fisk fra hver diettgruppe fra fôringsforsøket på Sunndalsøra. To kar ble gitt diett A (Lav EPA/DHA) og to ble gitt diett C (Høy EPA). Smitteforsøket varte 12 uker og prøver ble tatt ut på 4 ulike tidspunkt; etter 3, 6, 10 og 12 uker. På hvert tidspunkt ble det tatt ut 6 fisk fra hver pre-diett fra hvert kar, til sammen 24 fisk pr kar. Effekt av smitte ble målt ved hjelp av histologi (HSMB-diagnostikk, histologiskore utviklet for hjerte- og lever, NVH) og kvantifisering av virus i vev (qPCR assay, Nofima) som beskrevet nedenfor. Prøvene ble ellers

analysert for fettsyresammensetning, plasma-eicosanoider og genekspresjon, som beskrevet nedenfor.

4.4.2 SAV2-smitte (PD)

Fisken i to kar ble i.p. injisert med 0,2 ml ufortynnet SAV3 virus smitte materiale (VESO, Vikan J.nr. 2306). Hvert av de to smittekarene inneholdt fisk fra alle fôringsgruppene ved Sunndalsøra, men det ble kun fôret med en diett etter smitte (Diett A: Lav EPA kontroll) for å spare kostnad og fordi fisken var forventet å ha minimalt fôrinntak etter smitte. Usmittet kontroll var samme kar som i HSMB-smitteforsøket (se ovenfor). Vevsprøver ble tatt ved 4, 6, 8 og 10 uker etter smitte. På hvert tidspunkt ble det tatt ut 6 fisk fra hver pre-diett fra hvert kar, til sammen 24 fisk pr kar. Effekt av smitte ble målt hjelp av histologi (PD diagnostikk, histologiscore utviklet for hjerte og pankreas, NVH) og kvantifisering av virus i vev (qPCR assay, Nofima) som beskrevet nedenfor.

4.5 Analyser

4.5.1 Kjemiske analyser i fôr og fisk

Fôret ble analysert for tørrstoff (tørketap ved 103 °C til stabil vekt; ISO 6496: 1999), aske (forbrenning ved 550 °C, ISO 5984: 2002), råprotein (Nx6.25, forbrenning etter Dumas prinsippet, ISO 16634-1), bruttoenergi (bombekalorimetri; ISO 9831:1998) og råfett (Folch et al., 1957, etter syrehydrolyse).

Astaxanthin i fôr ble analysert ved normal fase isokratisk HPLC koblet til en diode array detektor, etter en prosedyre basert på Schierle et al. (2008).

Fett ble ekstrahert fra helkropp, lever, plasma, hjerte og erytrocytter som en Folch ekstraksjon (Folch et al., 1957). Deretter ble fettsyrene i ekstraktet trans-forestret til fettsyre metyl estere (FAME) etter en metode beskrevet av Mason og Waller (1964). Fettsyresammensetning ble bestemt ved bruk av Hewlett Packard 6890 gass kromatograf (GC) utstyrt med en ID-BP×70 kolonne (SGE, Melbourne, Australia; 60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film) med helium som bæregass. Temperaturprogram; 50°C i 1.2min, 50°C til 170°C med 4°C/min, til 200°C med 0.5°C/min, og til 300°C med 10°C/min. FAME ble detektert ved hjelp av en flammeionisasjons-detektor (FID) og fettsyresammensetning verifisert ved hjelp av standard 68D (Nu-Check Prep Inc).

For separering av ulike lipidklasser, ble Folch-ekstraktet (tilsatt BHT (0.7 mg/l) dampet inn under nitrogengass og re-oppløst i kloroform. Fri fettsyrer (FFA), fosfolipider(PL), triacylglyseroler (TAG) ble separert ved hjelp av tynnskikt-kromatografi (TLC) med mobilfase: petroleumeter:dietyl eter:eddiksyre (113:20:2 v/v/v). De ulike lipidklassene ble visualisert ved å dyppe platen i en kobber-løsning. Flekkene som korresponderte til henholdsvis FFA, PL og TAG ble identifisert ved sammenligning med kjente standarder ved hjelp av en Bioscan AR-2000 imaging scanner (Bioscan Inc., Washington, DC, USA).

De ulike lipidklassene ble så skrapet ut, ekstrahert og FAME produsert og fettsyrer i lipidklasser bestemt i henhold til metoden beskrevet over.

4.5.2 Patologi

PD score (pancreas) ble bestemt som beskrevet av Karlsen et al (2012) og HSMB score (hjerne) som beskrevet av Finstad et al. (2012).

Leverpatologi ble scoret som beskrevet av Martinez-Rubio et al (2014). Steatose (fettavleiring) ble kategorisert i tråd med termer innen patologien som makro- og mikrovaskulær steatose (Mic S og Mac S). I tillegg ble fisken scoret for betennelse rundt små galleganger og/eller små karstrukturer i lever.

Alle score for histopatologi ble gitt på en skala fra 0 til 3.

4.5.3 Virustall

Syntese av cDNA ble utført på 0.2 µg DNase-behandlet total RNA (Turbo DNA-free™, Ambion, Austin, TX, USA) ved hjelp av TaqMan® Gold Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i 25 µl reaksjoner med en mix av polyT og random hexamer priming i henhold til leverandørens protokoll. Oligonucleotid primere for salmonid alpha virus

(GenBank: NC003930, 5'-ACAGTGAAATTCGACAAGAAATGC-3' and 5'-TGGGAGTCGCTGGTGAAAGT-3') og piscine reovirus gen M3

(GenBank: KR337478, 5'-TCAGTGC GGGA ACTCTAGTGGCA-3', 5'-GACGACCTTGAACGCACGAGCGTG-3')

ble brukt til å bestemme forekomsten av virustranskript i vevsprøvene. PCR amplicon størrelse og spesifisitet ble bekreftet med smeltepunktanalyse (T_m calling; LightCycler 480, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). QPCR ble utført med 2x SYBR® Green Master Mix (Roche Diagnostics) i et optimalisert 12 µl reaksjonsvolum, med 5 µl 1:10 fortynt cDNA, og primerkonsentrasjon på 0.42 µM. PCR reaksjonene ble kjørt i duplikat i 96-brønns optiske plater på en Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) under følgende betingelser: 95 °C i 5 min (pre-inkubasjon), 95 °C i 5 sekunder, 60 °C i 15 sekunder, 72 °C i 15 sekunder (amplifisering, 45 sykler) og 65 °C i 1 min (smeltepunktcurve). CT (Cycle threshold) verdier ble beregnet med calculated ved $\Delta\Delta C_t$ metoden ved hjelp av software pakken LightCycler. Duplikate malinger som avvok med mer enn 0.5 CT verdier ble fjernet og reanalysert. Gjennomsnittlig CT-verdi ble brukt som estimat på virustall.

4.5.4 Plasma eicosanoider

Eicosanoider ble målt i samleprøver av plasma tatt ut 3, 6, og 9 uker etter smitte. Samleprøvene ble laget ved å slå sammen like mengder plasma fra hver av de 6 fiskene i hvert smittekar som hadde fått samme prediett. Eicosanoidene Prostaglandin E2 (PGE2) og leucotriene B4 (LTB4) ble analysert i plasma ved hjelp av to assay kits (KGE004B Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit og KGE006B LTB4 Parameter Assay Kit) fra R&D systems (Minneapolis, MN, USA).

4.5.5 RNA isolering fra laks

Prøver av hjerte og lever ble lagret ved -80 °C før RNA ekstraksjon. En bit på ca 10 mg ble skjært ut fra hver frosne prøve og overført direkte til 1 ml avkjølt TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) i 2 ml tubes med skrutopp (Prellyls®24, Bertin Technologies, Orléans, France). To kjeramiske kuler (diameter: 2 mm) ble tilsatt til hvert rør og vevet homogenisert i en Prellyls®24 homogenisator i to runder på 20 sekunder med 5000 rpm med en pause på 5 sekunder mellom rundene. RNA ble ekstrahert fra det homogeniserte vevet ved hjelp av PureLink RNA Mini kits i henhold til protokollen for TRIzol-

homogeniserte prøver (Invitrogen). Konsentrasjonen av ekstrahert total RNA ble målt med et NanoDrop 1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.5.6 Microarray analyser

Genekspresjonsanalyser ble utført med Nofimas Atlantic salmon 15 k DNA oligonucleotide microarray SIQ6 og bioinformatikkpakken STARS (Krasnov et al. 2011a). I PD-forsøket ble det analysert hjertes fra to prefôringsgrupper (A – Lav EPA og C – Høy EPA) og tre tidspunkter (uke 0, 6 og 10 etter smitte), fire replikater fisk per diett og tidspunkt – totalt 24 microarrays. En blanding av like mengder av alle prøver fra uke 0 ble brukt som en felles referanse. Analysene i HSMB-forsøket inkluderte grupper som hadde fått Høy EPA og Lav EPA etter smitte. Hjerter og lever ble analysert ved 6 uker etter smitte i seks replikater og i tillegg ble lever (åtte replikater) studert ved uke 10 (ved høyeste nivå av steatose). RNA fra uinfisert fisk, tatt ut ved uke 6, ble brukt som referanse, totalt antall microarrays var 32. Microarrays ble levert av Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) og om ikke annet er angitt var reagenser og utstyr fra samme leverandør. RNA amplifisering og merking ble gjennomført med et Two-Colour Quick Amp Labelling Kit. Et Gene Expression Hybridization kit ble brukt til fragmentering av merket RNA. Det ble brukt 200ng RNA i hver reaksjon. Etter hybridisering i en ovn over natten (17 hours, 65 °C, rotation speed 10 rpm), ble arrays vasket med Gene Expression Wash Buffers 1 og 2 og scannet med en GenePix 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). GenePix Pro 6.0 ble brukt til kvalitetsvurdering og kvantifisering, og STARS til påfølgende dataanalyse. Lowess normalisering av log₂-ekspressionsratioer (ER) ble utført. Gener som passerte kvalitetskontrollen i mer enn halvparten av prøvene ble inkludert i videre dataanalyser. Uttrykk av gener ble regnet som forskjellig når $p < 0.05$ (t-test) og forskjellen i uttrykk var >1.5-fold.

4.5.7 Analyse av COX 1 og COX 2 genuttrykk

Total RNA ble ekstrahert ved bruk av Trizol og Purelink Pro 96 Purification Kit (Ambion, Carlsbad, USA) i henhold til produsentens protokoll. RNA ble behandlet med RNase-free DNase I for å fjerne kontaminerende DNA. cDNA syntese ble laget fra 300 ng total RNA i et volum på 20 uL med SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Reaksjonen ble kjørt 10 minutter ved 25 °C, 42 °C i 60 minutter, og 85 °C i 5 minutter. PCR reaksjonen ble kjørt med 4 uL cDNA (1:10 fortynnet), 1 uL primer miks (0.5 uM av hver primer) og 5 uL SYBR green master miks under følgende betingelser: 95 °C i 5 sekunder, 45 sykluser med 95 °C i 15 sekunder/60 °C i 15 sekunder/ 72 °C i 15 sekunder. Genuttrykk av følgende gener ble målt:

Cox1 (NM_001140374, 5'-GAGGCCAGACAGGCTTTGAT-3', 5'-GGCTGGAGGGACATTGAAGG-3'),

Cox2 (AY848944, 5'-CCCCGACTTACAATGCTGA-3', 5'-GCGGTTCCCATAGGTGTAGG-3'),

rpl2 (CA049789, 5'-TAACGCCTGCCTCTTACGTTGA-3', 5'-ATGAGGGACCTTGTAGCCAGCAA-3'),

eif3 (DW542195 (5'-CAGGATGTTGTTGCTGGATGGG-3', 5'-ACCCAAGTGGCAGGTCAAGA-3')). rpl2 og

eif3 ble evaluert som referansegener, og rpl2 ble vurdert til å være mest stabil. Smeltepunktsanalyse ble kjørt for å bekrefte amplifisering av kun et fragment. Relativt genuttrykk ble beregnet ved $\Delta\Delta Ct$ metoden med rpl2 som referansegen.

4.6 Formler

Spesifikk vekstrate (% d⁻¹); $SGR = \ln(W_2/W_1) \times (t_2 - t_1)^{-1} \times 100$,

hvor W_1 og W_2 er fiskevekt (g) ved tidspunktene (dag) t_1 og t_2 ,

Vekstfaktor (Thermal growth coefficient); $TGC = (W_2^{1/3} - W_1^{1/3}) \times (T \times d)^{-1} \times 1000$

hvor (T x d) døgnggradsummen for perioden.

Fôrintak ($\text{g} \times \text{kar}^{-1}$) ble beregnet utfra utfôret mengde og oppsamlet fôrspill, justert for tørrstoff (TS) og recovery (gjenfangst):

$$\text{Fôrintak} = ((\text{Utfôret} \times \text{TS}_{\text{fôr}}) - (\text{Fôrspill} \times \text{TS}_{\text{spill}} / \text{Recovery } \%)) / \text{TS}_{\text{fôr}}$$

Fôrfaktor (Feed conversion ratio); FCR = fôrintak, g / tilvekst, g

Hvor tilvekst er (sluttbiomasse) + (biomasse av døde fisk) - (startbiomasse)

4.7 Statistiske beregninger

Eventuelle fôreffekter på variabler målt før smitte ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA). Eventuelle fôreffekter på variabler målt etter smitte ble testet med en toveis variansanalyse (ANOVA). Signifikant forskjellige fôrgrupper ble rangert ved hjelp av Tukey HSD test. Alle statistiske bergninger ble gjort ved hjelp av programpakken SYSTAT[®] 11 (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA, USA). Forskjeller ble ansett som signifikant når $P < 0.05$.

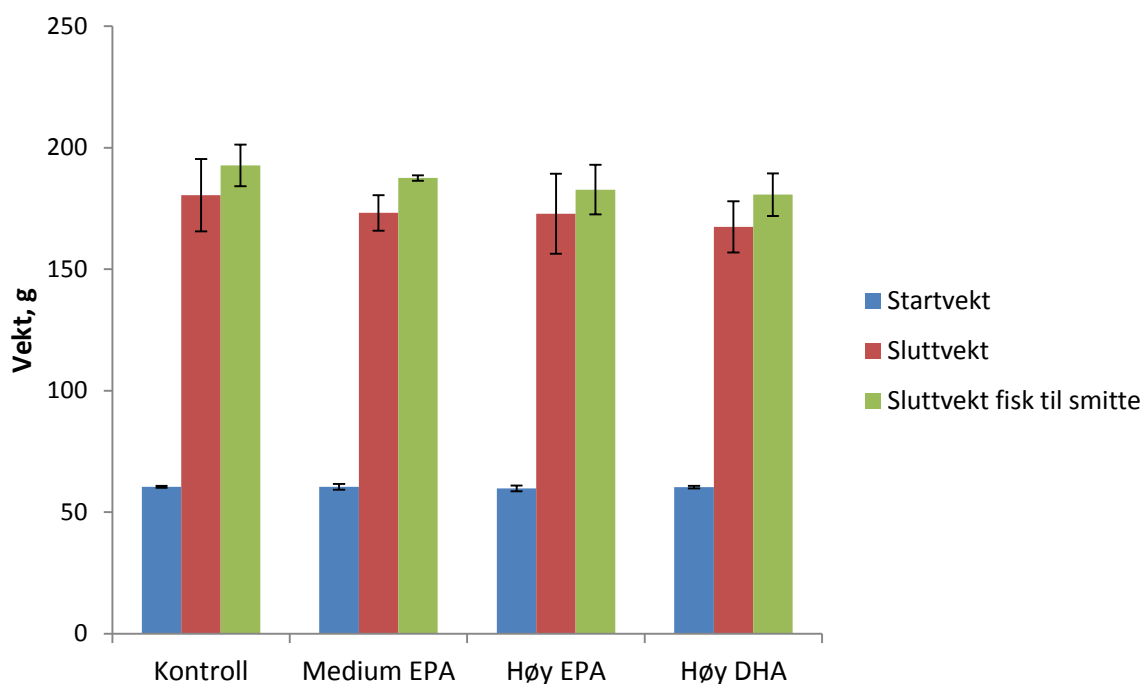
5 Resultater og konklusjon

5.1 Fôring før smitte

Fisken i fôringsforsøket på Sunndalsøra vokste fra en gjennomsnittlig startvekt på 60 g til 173 g etter 18 ukers fôring (Figur 3 Tabell 4). Til videre utprøving i smitteforsøk på Vikan ble det bare selektert fisk med normal tilvekst, slik at snittvekten på denne var noe høyere (186 g). Fôrgruppene hadde TGC fra 1,85 til 2,01 (1,99-2,14 for fiske til smitte). Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i tilvekst eller kroppsvekt.

Fettsyresammensetningen i erythrocytter (PL og TAG), hjerte (PL og TAG), plasma og helkropp ved avslutning av forsøket på Sunndalsøra er gitt i Tabell 5.2 - 5.6. Sammensetningen reflekterte som forventet i stor grad sammensetningen av fôret, slik at materialet burde være egnet til å måle eventuelle effekter av fettsyresammensetningen i vev på sykdomsmotstand.

Fosfolipidfraksjonene (PL) skilte seg fra triacylglyserolfraksjonene (TAG) ved at økende EPA i fôr ga en tendens til redusert DHA i PL. I TAG derimot, ble mønsteret i fôr mer nøyaktig gjenspeilet, og det samme var tilfelle i plasma og i helkropp, hvor det meste av fett er TAG.



Figur 3 Start- og sluttvekter av laksen gitt de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt \pm std.avv., n=3 kar pr diett).

Tabell 4 Vekt, tilvekst og organindeks i fisk gitt ulike dietter før smitte.

	Diet				ANOVA
	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	
Startvekt g	60,5 ± 0,4	60,4 ± 1,2	59,7 ± 1,2	60,3 ± 0,5	ns
Sluttvekt, g	180,5 ± 14,9	173,2 ± 7,3	172,8 ± 16,4	167,4 ± 10,6	ns
Tilvekst, % av startvekt	198,4 ± 22,8	187,1 ± 17,4	188,9 ± 21,7	177,7 ± 17,3	ns
SGR	0,87 ± 0,06	0,84 ± 0,05	0,84 ± 0,06	0,81 ± 0,05	ns
TGC	2,01 ± 0,17	1,92 ± 0,12	1,93 ± 0,17	1,85 ± 0,13	ns
FCR	0,87 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,85 ± 0,01	ns
Leverindeks, %	1,19 ± 0,14	1,14 ± 0,16	1,13 ± 0,04	1,11 ± 0,08	ns
Hjerteindeks, %	0,079 ± 0,008	0,078 ± 0,001	0,079 ± 0,004	0,077 ± 0,001	ns
Fisk til smitteforsøk:					
Sluttvekt, g	192,7 ± 8,6	187,5 ± 1,1	182,8 ± 10,3	180,7 ± 8,8	ns
Tilvekst, % av startvekt	220,6 ± 14,1	211,7 ± 3,9	207,1 ± 16,0	200,7 ± 16,7	ns
SGR	0,92 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,88 ± 0,04	0,86 ± 0,04	ns
TGC	2,14 ± 0,10	2,07 ± 0,03	2,04 ± 0,11	1,99 ± 0,11	ns

Tabell 5 Fettsyresammensetning i fosfolipider i erythrocytter fra laks føret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet								ANOVA ¹
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		
Sum FA, mg/g	8,2	± 1,6	9,9	± 2,5	8,1	± 0,8	8,4	± 1,5	ns
% of fatty acids									
C 16:0	20,6	± 0,9	20,2	± 0,4	20,5	± 0,2	20,2	± 0,2	ns
C 18:0	4,0	± 0,3	4,4	± 0,7	4,3	± 0,3	4,0	± 0,2	ns
Sum Saturated ²	25,8	± 1,0	25,6	± 0,5	25,7	± 0,3	25,9	± 0,3	ns
C 18:1 n-9	6,3	± 0,4	6,2	± 0,3	6,2	± 0,3	6,0	± 0,1	ns
Sum monoenes ³	11,5	± 0,7 ^a	11,0	± 0,6 ^a	10,4	± 0,4 ^{ab}	9,6	± 0,1 ^b	**
C 18:2 n-6	3,3	± 0,3 ^a	2,9	± 0,2 ^{ab}	2,6	± 0,1 ^b	2,7	± 0,0 ^b	**
C 20:4 n-6 (ARA)	1,8	± 0,2	1,9	± 0,4	1,8	± 0,0	1,9	± 0,1	ns
Sum N-6 PUFA ⁴	8,4	± 1,1	8,2	± 0,6	6,8	± 0,3	6,8	± 0,7	*
C 18:3 n-3	0,4	± 0,0	0,4	± 0,0	0,4	± 0,0	0,4	± 0,0	ns
C 20:5 n-3 (EPA)	7,7	± 0,7 ^c	9,4	± 0,9 ^b	11,5	± 0,2 ^a	5,9	± 0,4 ^d	***
C 22:5 n-3 (DPA)	1,9	± 0,2 ^c	2,4	± 0,1 ^b	2,9	± 0,1 ^a	1,1	± 0,1 ^d	***
C 22:6 n-3 (DHA)	42,9	± 1,7 ^b	41,3	± 1,5 ^b	40,9	± 0,7 ^b	48,4	± 0,3 ^a	***
Sum EPA/DHA	50,6	± 1,0 ^b	50,7	± 0,8 ^b	52,4	± 0,5 ^{ab}	54,3	± 0,7 ^a	**
Sum N-3 PUFA ⁵	53,1	± 0,9 ^b	53,6	± 0,6 ^b	55,8	± 0,5 ^a	56,0	± 0,8 ^a	**

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6

⁵Includes C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 6 Fettsyresammensetning i triacylglyseroler i erythrocytter fra laks fôret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet										ANOVA ¹
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA				
Sum FA, mg/g	0,4	± 0,1	0,5	± 0,2	0,5	± 0,2	0,5	± 0,1			ns
% of fatty acids											
C 16:0	10,5	± 0,6	10,7	± 0,7	10,1	± 0,8	9,7	± 1,1			ns
C 18:0	4,2	± 0,4	4,0	± 0,2	4,3	± 0,5	4,2	± 0,4			ns
Sum Saturated ²	17,6	± 1,4	17,9	± 0,7	17,4	± 2,6	17,2	± 0,6			ns
C 18:1 n-9	31,8	± 2,3	31,2	± 1,7	30,4	± 0,3	31,5	± 0,8			ns
Sum monoenes ³	47,9	± 0,8 ^a	46,2	± 1,2 ^{ab}	42,7	± 1,6 ^b	45,1	± 1,6 ^{ab}			**
C 18:2 n-6	9,1	± 1,2	9,9	± 0,5	9,7	± 0,4	9,9	± 0,1			ns
C 20:4 n-6 (ARA)	0,7	± 0,1	0,6	± 0,2	0,7	± 0,0	0,5	± 0,2			ns
Sum N-6 PUFA ⁴	15,0	± 1,2	14,4	± 0,3	13,3	± 0,7	14,2	± 0,6			ns
C 18:3 n-3	1,8	± 0,3	2,1	± 0,1	2,1	± 0,0	2,0	± 0,0			ns
C 20:5 n-3 (EPA)	3,1	± 0,2 ^c	4,7	± 0,2 ^b	7,7	± 0,9 ^a	3,8	± 0,3 ^{bc}			***
C 22:5 n-3 (DPA)	0,8	± 0,1 ^c	1,5	± 0,4 ^{ab}	1,9	± 0,3 ^a	1,1	± 0,1 ^{bc}			**
C 22:6 n-3 (DHA)	9,4	± 1,5 ^b	9,5	± 0,7 ^b	10,5	± 0,5 ^b	14,2	± 0,9 ^a			**
Sum EPA/DHA	12,5	± 1,7 ^b	14,2	± 0,8 ^b	18,2	± 1,4 ^a	18,1	± 1,2 ^a			**
Sum N-3 PUFA ⁵	16,5	± 1,6 ^b	19,1	± 1,3 ^{ab}	23,2	± 2,1 ^a	22,5	± 1,9 ^a			**

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6

⁵Includes C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 7 Fettsyresammensetning i fosfolipider i hjerte fra laks føret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet								ANOVA ¹
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		
Sum FA, mg/g	32,6	± 12,7	32,9	± 7,4	37,1	± 4,6	30,8	± 9,0	ns
% of FA									
C 16:0	20,6	± 1,6	19,6	± 0,5	19,5	± 1,4	19,7	± 0,7	ns
C 18:0	4,1	± 0,2	4,5	± 0,3	4,7	± 0,5	4,3	± 0,1	ns
Sum Saturated ²	25,9	± 1,6	25,3	± 0,3	25,6	± 0,7	26,3	± 0,6	ns
C 18:1 n-9	7,4	± 0,7	6,9	± 0,0	6,8	± 0,2	6,7	± 0,0	ns
Sum Monoenes ³	12,8	± 0,8	13,4	± 1,5	12,2	± 0,1	11,5	± 0,2	ns
C 18:2 n-6	3,4	± 0,0 ^a	3,1	± 0,1 ^b	2,8	± 0,2 ^b	2,8	± 0,1 ^b	***
C 20:4 n-6	2,1	± 0,1 ^b	2,1	± 0,2 ^b	2,1	± 0,1 ^b	2,5	± 0,0 ^a	**
Sum n-6 PUFA ⁴	9,4	± 2,2	8,4	± 1,9	9,4	± 0,4	10,1	± 2,5	ns
C 18:3 n-3	0,8	± 0,0	0,8	± 0,0	0,8	± 0,1	0,7	± 0,1	ns
C 20:5 n-3	7,5	± 0,8 ^{bc}	9,3	± 0,9 ^{ab}	11,1	± 0,7 ^a	6,1	± 0,6 ^c	***
C 22:5 n-3	1,4	± 0,0 ^b	1,7	± 0,1 ^b	1,9	± 0,1 ^a	1,0	± 0,1 ^c	***
C 22:6 n-3	40,0	± 1,4 ^{ab}	37,9	± 2,1 ^b	36,6	± 0,6 ^b	42,1	± 1,8 ^a	*
Sum EPA/DHA	47,6	± 0,9	47,2	± 2,3	47,8	± 0,2	48,2	± 2,4	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	50,0	± 0,9	49,8	± 2,5	50,7	± 0,2	50,1	± 2,6	ns

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 14:1 n-5, C 15:1, C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6

⁵Includes C 16:2 n-3, C 18:4 n-3, C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 8 Fettsyresammensetning i triacylglyseroler i hjerte fra laks føret med de fire forsøksfødrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet								ANOVA ¹
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		
Sum detekterte	10,3	± 4,3	14,2	± 8,4	12,1	± 2,7	9,9	± 3,4	ns
% of FA									
C 16:0	12,5	± 0,4	12,5	± 0,4	11,9	± 0,5	11,8	± 0,6	ns
C 18:0	3,1	± 0,1	3,0	± 0,2	3,1	± 0,1	3,2	± 0,1	ns
Sum Saturated ²	19,0	± 0,6	18,8	± 0,5	17,9	± 0,8	18,6	± 0,9	ns
C 18:1 n-9	30,4	± 1,3	30,5	± 2,0	30,4	± 1,1	29,4	± 0,9	ns
Sum Monoenes ³	48,7	± 1,0	46,8	± 1,2	44,4	± 0,1	43,3	± 1,6	**
C 18:2 n-6	11,9	± 0,4	12,4	± 0,6	12,6	± 0,6	12,5	± 0,3	ns
C 20:4 n-6	0,4	± 0,2	0,4	± 0,1	0,5	± 0,0	0,6	± 0,1	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	14,2	± 0,5	14,6	± 0,5	14,8	± 0,6	14,7	± 0,3	ns
C 18:3 n-3	2,8	± 0,2	2,9	± 0,2	2,9	± 0,1	2,9	± 0,0	ns
C 20:5 n-3	2,5	± 0,1	3,9	± 0,0	6,0	± 0,2	2,8	± 0,2	***
C 22:5 n-3	0,9	± 0,0	1,2	± 0,0	1,7	± 0,1	1,0	± 0,0	***
C 22:6 n-3	8,9	± 1,6	8,3	± 0,7	9,0	± 0,5	13,9	± 0,6	***
Sum EPA/DHA	11,4	± 1,7	12,1	± 0,7	15,0	± 0,4	16,7	± 0,7	***
Sum n-3 PUFA ⁵	16,1	± 1,7	17,5	± 1,0	20,4	± 0,2	21,5	± 0,7	***

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 14:1 n-5, C 15:1, C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6

⁵Includes C 16:2 n-3, C 18:4 n-3, C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 9 Fettsyresammensetning i plasma fra laks føret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet												ANOVA ¹
	Control			Medium EPA			High EPA			High DHA			
Sum detekterte	6,6	±	1,4	6,9	±	1,0	5,7	±	1,3	6,2	±	0,2	ns
% of FA													
C 16:0	18,2	±	0,2	18,1	±	0,4	17,6	±	0,3	17,7	±	0,4	ns
C 18:0	3,3	±	0,2	3,2	±	0,2	3,3	±	0,1	3,1	±	0,0	ns
Sum Saturated ²	23,3	±	0,4	22,8	±	0,6	22,1	±	0,3	23,4	±	0,3	ns
C 18:1 n-9	13,9	±	0,3	13,3	±	0,3	13,3	±	0,6	12,9	±	0,1	ns
C 20:1 n-9	2,9	±	0,4	2,6	±	0,3	2,1	±	0,1	2,2	±	0,2	ns
Sum Monoenes ³	23,3	±	0,7 ^a	22,1	±	0,5 ^{ab}	20,7	±	0,9 ^b	20,2	±	0,4 ^b	**
C 18:2 n-6	5,3	±	0,1 ^a	4,7	±	0,2 ^b	4,4	±	0,1 ^b	4,6	±	0,1 ^b	***
C 20:4 n-6	2,2	±	0,2	2,3	±	0,2	2,4	±	0,0	2,6	±	0,0	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	11,6	±	0,2 ^a	10,2	±	0,2 ^b	9,4	±	0,1 ^c	9,8	±	0,1 ^{bc}	***
C 20:5 n-3	8,2	±	0,6 ^c	11,2	±	0,5 ^b	13,8	±	0,1 ^a	7,1	±	0,4 ^c	***
C 22:5 n-3	1,5	±	0,0 ^c	1,9	±	0,0 ^b	2,4	±	0,1 ^a	1,1	±	0,1 ^d	***
C 22:6 n-3	29,4	±	0,8 ^b	29,2	±	0,7 ^b	28,4	±	0,7 ^b	36,1	±	0,5 ^a	***
Sum EPA/DHA	37,7	±	0,3 ^c	40,4	±	0,8 ^b	42,2	±	0,7 ^a	43,2	±	0,3 ^a	***
Sum n-3 PUFA ⁵	40,3	±	0,3 ^b	43,3	±	0,8 ^b	45,6	±	0,6 ^a	45,3	±	0,3 ^a	***

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C 14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 16:1 n-7, C 16:1 n-5, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 16:2 n-6, C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6

⁵Includes C 18:3 n-3, C 20:4 n-3, C 18:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 10 Totalt fettinnhold og fettsyresammensetning i helkropp av laks føret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Start	Diet				ANOVA ¹
		Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	
Crude fat (Folch) %	11,1 ± 0,2	13,1 ± 0,2	13,1 ± 0,1	13,0 ± 0,5	12,8 ± 0,4	ns
Sum FA	94 ± 4	108 ± 4	108 ± 2	110 ± 2	105 ± 3	ns
% of FA						
C 16:0	12,7 ± 0,1	12,8 ± 0,2 ^a	12,5 ± 0,2 ^{ab}	12,2 ± 0,1 ^b	12,2 ± 0,1 ^b	*
C 18:0	2,9 ± 0,0	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,0	*
Sum Saturated ²	20,6 ± 0,1	19,3 ± 0,3 ^a	18,7 ± 0,1 ^{ab}	18,0 ± 0,2 ^c	18,5 ± 0,1 ^{bc}	***
C 18:1 n-9	24,4 ± 0,1	32,3 ± 0,3 ^a	31,7 ± 0,2 ^b	31,2 ± 0,1 ^b	31,2 ± 0,1 ^b	**
C 20:1 n-9	5,2 ± 0,0	4,7 ± 0,0 ^a	4,2 ± 0,0 ^b	3,4 ± 0,1 ^d	3,6 ± 0,0 ^c	***
Sum Monoenes ³	46,2 ± 0,2	50,0 ± 0,4 ^a	48,1 ± 0,1 ^b	45,4 ± 0,4 ^c	45,3 ± 0,2 ^c	***
C 18:2 n-6	8,0 ± 0,0	12,4 ± 0,0	12,5 ± 0,1	12,7 ± 0,2	12,7 ± 0,1	ns
C 20:4 n-6	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ^c	0,5 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	***
Sum n-6 PUFA ⁴	10,1 ± 0,0	15,0 ± 0,0	15,1 ± 0,1	15,0 ± 0,4	15,1 ± 0,1	ns
C 18:3 n-3	2,5 ± 0,0	2,8 ± 0,0 ^c	2,9 ± 0,0 ^b	3,0 ± 0,0 ^a	3,0 ± 0,0 ^a	***
C 20:5 n-3	3,7 ± 0,1	2,4 ± 0,0 ^d	3,8 ± 0,1 ^b	5,9 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,1 ^c	***
C 22:5 n-3	1,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0 ^d	1,2 ± 0,0 ^b	1,7 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^c	***
C 22:6 n-3	12,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1 ^d	8,1 ± 0,1 ^c	8,8 ± 0,1 ^b	12,4 ± 0,1 ^a	***
Sum EPA/DHA	16,3 ± 0,1	9,9 ± 0,1 ^c	11,9 ± 0,2 ^b	14,8 ± 0,2 ^a	15,2 ± 0,2 ^a	***
Sum n-3 PUFA ⁵	21,3 ± 0,2	14,4 ± 0,2 ^c	16,9 ± 0,2 ^b	20,3 ± 0,3 ^a	20,1 ± 0,2 ^a	***

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C 14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C 14:1 n-5, C 16:1 n-5, C16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-9, 22:1 n-11, C 24:1 n-9

⁴Includes C 16:2 n-6, C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6

⁵Includes C 16:2 n-3, C 20:4 n-3, C 18:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 11 Totalt fettinnhold og fettsyresammensetning i lever fra laks fôret med de fire forsøksfôrene i 18 uker før smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=3 kar per diett).

	Diet								ANOVA ¹
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		
Crude lipids, % (Folch)	4,8	± 0,0 ^{ab}	4,5	± 0,1 ^b	5,3	± 0,3 ^a	5,2	± 0,2 ^a	*
Sum FA, mg/g	30,5	± 1,1	28,7	± 1,8	28,9	± 0,4	33,1	± 3,9	ns
% of total FA									
C 16:0	15,0	± 0,1	15,6	± 0,4	15,4	± 0,7	15,0	± 0,5	ns
C 18:0	5,3	± 0,2	5,0	± 0,4	5,5	± 0,2	5,5	± 0,4	ns
Sum Saturates ²	22,3	± 0,2	22,4	± 0,5	22,6	± 0,7	23,1	± 0,6	ns
C 18:1 n-9	20,8	± 0,5 ^a	17,8	± 1,1 ^b	17,5	± 1,0 ^b	19,3	± 1,5 ^{ab}	*
C 20:1 n-9	2,6	± 0,3	2,3	± 0,3	1,9	± 0,4	3,1	± 1,7	ns
Sum Monoenes ³	27,7	± 0,4	23,4	± 1,1	22,9	± 1,4	26,9	± 5,9	ns
C 18:2 n-6	6,1	± 0,2	5,9	± 0,2	5,6	± 0,2	5,8	± 0,6	ns
C 20:4 n-6	3,2	± 0,6	3,4	± 0,5	3,4	± 0,2	3,5	± 0,4	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	13,0	± 0,5	12,5	± 0,4	11,6	± 0,3	12,0	± 1,2	ns
C 18:3 n-3	0,8	± 0,1	0,9	± 0,1	0,9	± 0,1	0,9	± 0,1	ns
C 20:5 n-3	5,3	± 0,3 ^c	7,4	± 0,2 ^b	9,0	± 0,6 ^a	4,1	± 0,4 ^d	***
C 22:5 n-3	1,2	± 0,1 ^c	1,6	± 0,1 ^b	2,2	± 0,1 ^a	0,9	± 0,1 ^d	***
C 22:6 n-3	27,6	± 0,7	29,7	± 1,1	29,0	± 0,7	29,8	± 3,9	ns
Sum EPA/DHA	32,8	± 0,4	37,1	± 1,0	38,0	± 1,3	33,8	± 4,3	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	35,2	± 0,1 ^b	39,9	± 0,8 ^{ab}	41,4	± 1,3 ^a	36,3	± 4,1 ^{ab}	*

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C 12:0, C 14:0, C 15:0, C 17:0, C 20:0, C 22:0, C 24:0

³Includes C14:1 n-5, C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

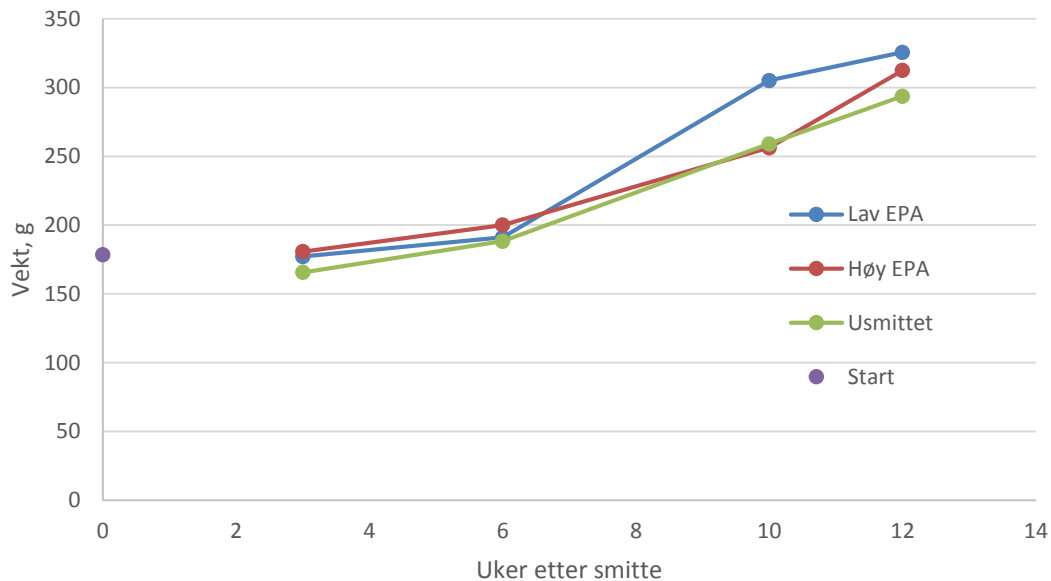
⁴Includes C 16:2 n-6, C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6

⁵Includes C 16:2 n-3, C 18:4 n-3, C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

5.2 HSMB-smitte

5.2.1 Vekst og endringer i fettsyreprofil etter smitte

Det ble i smitteforsøket bare gjort veiing av fisk som ble tatt til prøver. Det foreligger derfor ikke sikre veksttall, men prøvefisken økte i vekt fra ca 170 til ca 300 g i løpet av smitteforsøket (F 5.5), noe som betyr at den hadde et ikke ubetydelig fôrintak i løpet av smitteforsøket. Fisken i de smittede gruppene vokst minst like godt som usmittet fisk.



Figur 4 Vekt av prøvefisk tatt ut på ulike tidspunkter etter PRV-smitte og i usmittet kontroll.

Fettsyresammensetning i PRV-smitte fisk ble målt 3, 6 og 10 uker etter smitte i erythrocytter, lever fosfolipider og lever triacylglyseroler (prioritering av behandlingsgrupper, vev og prøvetidspunkt ble gjort etter vurdering av virustall og patologi). I tillegg ble det gjort analyser av hjerte 6 uker etter smitte. Som følge av fôrintak etter smitte endret sammensetningen seg i den smittede fisken (Tabell 12-15). Både i erythrocytter og lever bar innholdet av EPA og DHA ved 3 uker etter smitte tydelig preg av fôring før smitte. Etter 6 uker var dette i ferd med å endres, ved at det var klareste effekt av fôring etter smitte, men fortsatt ble det påvist noen effekter av fôring før smitte. Etter 9 uker var det ikke lenger signifikante effekter av fôring før smitte, mens fettsyresammensetningen både i lever og erythrocytter klart gjenspeilte fôrene som var gitt etter smitte. I hjerte tatt ut etter 6 uker var det effekt av fôring både før og etter smitte (Tabell 15).

Tabell 12 Fettsyresammensetning 3, 6 og 9 uker etter smitte (WPC) i erythrocytter fra laks gitt før med ulik fettsyresammensetning før og etter smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=2).

Postdiet Prediet	Control				High EPA				P (ANOVA) ¹		
	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Pre	Post	Int
3 wpc											
Sum FA, mg/g	9,7 ±	9,5 ± 0,6	10,6 ± 0,8	9,0 ± 1,2	9,6 ± 0,9	9,2 ± 0,5	9,4 ± 0,2	11,6 ± 2,5	ns	ns	ns
% of FA											
C 16:0	20,6 ± 0,2	20,6 ± 0,2	20,7 ± 1,4	20,7 ± 0,3	20,7 ± 0,4	21,3 ± 0,4	21,5 ± 0,2	22,4 ± 0,3	ns	*	ns
C 18:0	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,0	7,5 ± 0,4	7,2 ± 0,7	7,6 ± 0,5	7,5 ± 0,1	7,9 ± 0,0	7,6 ± 1,8	ns	ns	ns
Sum Saturate ²	28,7 ± 0,7	28,9 ± 0,2	29,5 ± 1,2	29,1 ± 0,5	29,6 ± 1,2	30,0 ± 0,2	30,8 ± 0,4	32,0 ± 2,6	ns	*	ns
C 18:1 n-9	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,0	9,3 ± 5,8	4,5 ± 0,1	5,3 ± 0,4	4,7 ± 0,4	4,7 ± 0,1	7,2 ± 2,7	ns	ns	ns
Sum Monoenes ³	10,0 ± 0,2	9,9 ± 1,0	16,1 ± 9,9	7,9 ± 0,6	9,3 ± 1,2	8,6 ± 0,3	7,9 ± 0,1	12,0 ± 4,9	ns	ns	ns
C 18:2 n-6	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,0	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,0	3,6 ± 2,2	ns	ns	ns
C 20:4 n-6 (ARA)	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	2,3 ± 0,6	3,6 ± 1,0	3,1 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,0	ns	ns	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	6,8 ± 0,6	6,4 ± 0,2	5,3 ± 0,7	6,6 ± 0,7	6,8 ± 0,1	6,0 ± 0,0	5,9 ± 0,2	6,9 ± 2,0	ns	ns	ns
C 18:3 n-3	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	ns	ns	ns
C 20:5 n-3 (EPA)	6,5 ± 0,0	8,0 ± 0,1	7,9 ± 1,5	5,2 ± 0,1	7,1 ± 0,4	8,1 ± 0,3	9,8 ± 0,3	5,1 ± 0,9	***	ns	ns
C 22:5 n-3 (DPA)	1,6 ± 0,0	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,0	1,0 ± 0,1	***	ns	ns
C 22:6 n-3 (DHA)	44,7 ± 1,4	43,5 ± 0,2	36,8 ± 6,6	47,6 ± 0,4	43,5 ± 0,9	43,5 ± 0,1	41,6 ± 0,3	41,4 ± 8,7	ns	ns	ns
Sum EPA/DHA	51,2 ± 1,4	51,6 ± 0,3	44,7 ± 8,0	52,9 ± 0,4	50,6 ± 0,6	51,7 ± 0,2	51,3 ± 0,0	46,5 ± 9,6	ns	ns	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	53,5 ± 1,5	54,2 ± 0,4	47,4 ± 8,4	54,6 ± 0,2	53,0 ± 0,5	54,4 ± 0,2	55,1 ± 0,8	48,0 ± 9,7	ns	ns	ns
6 wpc											
Sum FA, mg/g	10,9 ± 1,6	10,5 ± 0,4	10,7 ± 1,3	11,5 ± 1,6	11,0 ± 0,2	11,8 ± 0,6	10,5 ± 0,1	9,3 ± 3,2	ns	ns	ns
% of FA											
C 16:0	21,6 ± 0,2	21,8 ± 0,1	21,4 ± 0,3	21,2 ± 0,1	21,2 ± 0,2	21,6 ± 0,0	21,1 ± 0,4	21,6 ± 0,0	ns	ns	ns
C 18:0	5,2 ± 0,1	5,5 ± 0,6	6,3 ± 2,2	6,1 ± 0,9	6,9 ± 1,0	6,2 ± 0,7	6,4 ± 1,9	7,0 ± 0,9	ns	ns	ns
Sum Saturates ²	27,9 ± 0,2	28,4 ± 0,5	28,9 ± 1,7	28,7 ± 0,8	29,1 ± 0,9	28,7 ± 0,7	28,5 ± 1,4	29,9 ± 0,9	ns	ns	ns
C 18:1 n-9	7,0 ± 0,4	7,2 ± 0,6	7,0 ± 0,7	7,0 ± 0,7	6,1 ± 0,4	6,6 ± 1,2	5,9 ± 0,7	5,8 ± 0,2	ns	*	ns
Sum Monoenes ³	11,8 ± 0,8	11,5 ± 0,4	11,1 ± 1,0	10,9 ± 1,1	9,8 ± 0,8	10,3 ± 1,7	9,3 ± 0,7	9,0 ± 0,5	ns	**	ns
C 18:2 n-6	3,5 ± 0,6	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,7	3,4 ± 0,7	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2,7 ± 0,1	ns	ns	ns
C 20:4 n-6 (ARA)	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,5	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,7	2,9 ± 0,5	ns	*	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	7,6 ± 1,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,6	7,4 ± 1,2	6,8 ± 0,1	6,6 ± 0,2	6,0 ± 0,0	6,6 ± 0,5	ns	ns	ns
C 18:3 n-3	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	ns	ns	ns
C 20:5 n-3 (EPA)	7,3 ± 0,7	8,1 ± 0,3	9,3 ± 0,0	6,6 ± 0,7	8,0 ± 0,1	10,5 ± 0,8	10,6 ± 2,0	9,6 ± 0,0	*	**	ns
C 22:5 n-3 (DPA)	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,0	1,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3	**	***	ns
C 22:6 n-3 (DHA)	41,7 ± 2,2	41,2 ± 0,0	39,9 ± 0,0	42,7 ± 1,7	42,0 ± 0,2	39,7 ± 1,9	41,1 ± 1,8	40,9 ± 0,4	ns	ns	ns
Sum EPA/DHA	49,0 ± 1,5	49,3 ± 0,3	49,3 ± 0,0	49,3 ± 1,0	50,0 ± 0,1	50,2 ± 1,1	51,6 ± 0,1	50,6 ± 0,4	ns	**	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	51,4 ± 1,4	51,9 ± 0,4	52,1 ± 0,1	51,2 ± 0,7	52,6 ± 0,1	53,3 ± 0,9	55,1 ± 0,4	53,3 ± 0,6	ns	***	ns
9 wpc											
Sum FA, mg/g	12,3 ± 2,1	12,0 ± 0,8	12,6 ± 1,0	12,6 ± 1,6	12,8 ± 1,6	11,9 ± 1,0	11,6 ± 0,4	11,1 ± 0,4	ns	ns	ns
% of FA											
C 16:0	21,5 ± 0,5	20,6 ± 0,3	20,9 ± 0,3	21,3 ± 0,3	20,3 ± 0,2	21,4 ± 0,0	20,6 ± 0,5	21,1 ± 0,7	ns	ns	ns
C 18:0	5,9 ± 1,2	5,3 ± 0,0	5,3 ± 0,2	5,1 ± 0,6	6,5 ± 0,2	6,8 ± 0,5	6,6 ± 1,2	6,4 ± 0,7	ns	*	ns
Sum Saturates ²	29,2 ± 2,5	27,1 ± 0,3	27,5 ± 0,5	27,8 ± 0,3	27,9 ± 0,2	29,4 ± 0,2	28,1 ± 0,7	28,7 ± 0,0	ns	ns	ns
C 18:1 n-9	7,8 ± 0,5	8,4 ± 0,0	8,1 ± 0,9	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,4	10,1 ± 3,5	6,9 ± 0,1	7,0 ± 0,1	ns	ns	ns
Sum Monoenes ³	13,8 ± 0,8	14,1 ± 0,1	13,6 ± 0,8	13,4 ± 0,6	12,4 ± 0,8	15,1 ± 4,4	11,3 ± 0,1	11,2 ± 0,4	ns	ns	ns
C 18:2 n-6	3,9 ± 0,8	4,4 ± 0,1	4,1 ± 0,4	4,2 ± 0,3	3,3 ± 0,0	2,9 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,1 ± 0,0	ns	***	ns
C 20:4 n-6 (ARA)	2,7 ± 0,9	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,6	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,4	ns	ns	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	9,1 ± 0,4	8,8 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,2 ± 0,3	7,1 ± 0,3	6,5 ± 0,9	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,4	ns	***	ns
C 18:3 n-3	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	ns	*	ns
C 20:5 n-3 (EPA)	8,0 ± 1,7	9,2 ± 0,2	8,8 ± 0,6	8,4 ± 0,2	11,4 ± 0,5	9,8 ± 0,6	11,7 ± 1,3	11,5 ± 0,1	ns	***	ns
C 22:5 n-3 (DPA)	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,0	2,7 ± 0,4	2,2 ± 0,4	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,1	ns	**	ns
C 22:6 n-3 (DHA)	35,7 ± 1,0	36,5 ± 0,4	37,1 ± 2,2	38,3 ± 0,8	36,2 ± 1,3	34,8 ± 3,5	37,1 ± 0,6	36,6 ± 0,4	ns	ns	ns
Sum EPA/DHA	43,7 ± 2,7	45,7 ± 0,2	45,9 ± 1,5	46,7 ± 0,6	47,7 ± 1,8	44,5 ± 3,0	48,8 ± 0,6	48,2 ± 0,5	ns	ns	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	47,2 ± 3,9	48,8 ± 0,1	49,0 ± 1,5	49,4 ± 0,5	51,2 ± 2,1	47,5 ± 3,5	52,5 ± 0,7	51,6 ± 0,6	ns	ns	ns

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C15:0, C17:0, C20:0, C22:0, C24:0

³Includes C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 16:1 n-5, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6

⁵Includes C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 13 Fettsyresammensetning 3, 6 og 9 uker etter smitte (WPC) i fosfolipider i lever fra laks gitt før med ulik fettsyresammensetning før og etter smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=2).

Postdiet Prediet	Control				High EPA				P (ANOVA) ¹		
	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Pre	Post	Int
3 wpc											
Sum FA in PL, mg/g	37,5 ± 6,0	32,6 ± 0,5	36,6 ± 4,3	38,5 ± 2,3	49,4 ± 11,2	50,8 ± 8,8	46,3 ± 2,5	36,5 ± 5,9	ns	*	ns
<u>% of FA</u>											
C 16:0	21,9 ± 1,5	20,9 ± 0,8	19,8 ± 0,4	20,8 ± 0,5	20,6 ± 0,1	19,6 ± 1,4	20,0 ± 1,9	14,7 ± 8,0			
C 18:0	4,1 ± 0,0	4,3 ± 0,2	5,0 ± 0,0	4,7 ± 0,6	4,5 ± 0,2	4,7 ± 0,7	4,9 ± 0,7	4,9 ± 0,9	ns	ns	ns
Sum Saturates ²	27,2 ± 1,1	26,4 ± 0,6	25,8 ± 0,4	26,7 ± 0,1	26,1 ± 0,0	25,4 ± 0,9	25,6 ± 0,8	20,9 ± 8,9	ns	ns	ns
C 18:1 n-9	11,6 ± 1,0	11,3 ± 0,3	10,9 ± 0,1	11,1 ± 0,1	11,8 ± 0,8	12,2 ± 2,2	11,5 ± 0,0	10,5 ± 0,8	ns	ns	ns
Sum Monoenes ³	17,6 ± 1,5	16,6 ± 1,1	16,3 ± 0,2	15,6 ± 0,2	16,9 ± 0,9	17,5 ± 3,0	16,2 ± 0,1	14,5 ± 1,5	ns	ns	ns
C 18:2 n-6	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,7	5,2 ± 0,1	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,4	4,6 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,0	ns	ns	ns
C 20:4 n-6	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,1	2,9 ± 0,9	3,2 ± 1,0	3,7 ± 0,7	ns	ns	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	9,8 ± 0,3	9,3 ± 0,9	9,9 ± 1,2	9,4 ± 0,9	9,4 ± 0,2	8,0 ± 1,2	8,8 ± 1,3	8,9 ± 0,6	ns	ns	ns
C 18:3 n-3	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	ns	ns	ns
C 20:5 n-3	6,5 ± 0,1	7,8 ± 0,3	8,4 ± 0,6	5,6 ± 0,1	8,1 ± 1,0	7,6 ± 0,2	9,5 ± 0,0	6,0 ± 0,3	***	*	ns
C 22:5 n-3	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	***	ns	ns
C 22:6 n-3	34,1 ± 1,6	35,4 ± 1,2	34,5 ± 0,5	39,3 ± 1,0	34,2 ± 0,2	34,0 ± 0,1	33,9 ± 0,4	40,8 ± 0,1	***	ns	ns
Sum EPA/DHA	40,6 ± 1,7	43,2 ± 1,5	43,0 ± 1,0	44,9 ± 1,2	42,3 ± 1,3	41,6 ± 0,3	43,4 ± 0,4	46,8 ± 0,2	***	ns	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	43,6 ± 1,6	46,4 ± 1,6	46,3 ± 1,3	47,0 ± 1,1	45,8 ± 1,4	44,8 ± 0,2	47,0 ± 0,9	48,9 ± 0,8	*	ns	ns
6 wpc											
Sum FA in PL, mg/g	34,8 ± 3,5	41,8 ± 1,1	41,2 ± 5,5	40,1 ± 1,4	58,6 ± 36,9	77,7 ± 58,4	103,3 ± 2,5	106,8 ± 1,2	ns	**	ns
<u>% of FA</u>											
C 16:0	20,9 ± 1,1	20,7 ± 1,6	20,8 ± 0,1	20,3 ± 0,0	20,9 ± 0,6	20,5 ± 0,5	20,3 ± 0,5	19,9 ± 1,0	ns	ns	ns
C 18:0	4,5 ± 0,5	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,3	5,0 ± 1,2	ns	ns	ns
Sum Saturates ²	26,8 ± 1,2	26,1 ± 1,1	26,0 ± 0,2	26,1 ± 0,3	25,5 ± 0,7	25,8 ± 0,6	25,4 ± 0,8	25,9 ± 2,7	ns	ns	ns
C 18:1 n-9	12,5 ± 0,0	12,1 ± 0,0	12,4 ± 0,5	11,8 ± 0,2	12,3 ± 0,1	11,4 ± 0,2	11,3 ± 0,2	12,4 ± 0,4	*	*	**
Sum Monoenes ³	18,2 ± 1,0	17,3 ± 0,5	17,9 ± 0,3	17,5 ± 0,2	17,4 ± 0,1	16,0 ± 0,7	15,6 ± 0,0	16,7 ± 0,3	*	***	ns
C 18:2 n-6	5,8 ± 0,9	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,8	5,4 ± 0,2	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,2	ns	*	ns
C 20:4 n-6	3,2 ± 1,2	2,7 ± 0,7	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,4 ± 0,9	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,0	ns	ns	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	11,9 ± 0,1	10,2 ± 1,3	10,6 ± 0,7	10,8 ± 0,9	10,0 ± 1,0	8,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2	9,1 ± 0,2	*	***	ns
C 18:3 n-3	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0	ns	*	ns
C 20:5 n-3	6,6 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,7 ± 0,7	6,0 ± 0,1	9,4 ± 0,2	9,8 ± 0,4	10,4 ± 1,0	10,5 ± 0,5	ns	***	ns
C 22:5 n-3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,3 ± 0,3	1,5 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,4	2,8 ± 0,3	ns	***	ns
C 22:6 n-3	31,6 ± 1,5	34,1 ± 0,2	33,0 ± 0,0	35,3 ± 1,2	32,6 ± 0,8	34,0 ± 1,1	34,6 ± 0,8	32,3 ± 1,2	ns	ns	*
Sum EPA/DHA	38,1 ± 1,7	41,4 ± 0,3	40,7 ± 0,7	41,2 ± 1,2	42,0 ± 1,1	43,8 ± 0,7	44,9 ± 0,2	42,7 ± 1,7	*	***	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	41,0 ± 1,8	44,5 ± 0,4	44,0 ± 1,0	43,7 ± 1,2	45,6 ± 0,9	47,5 ± 0,6	48,9 ± 0,6	46,4 ± 2,1	*	***	ns
9 wpc											
Sum FA in PL, mg/g	49,1 ± 9,4	41,2 ± 0,7	39,7 ± 2,2	38,0 ± 0,8	44,4 ± 2,4	39,1 ± 3,4	39,0 ± 3,1	45,0 ± 0,2	ns	ns	ns
<u>% of FA</u>											
C 16:0	20,2 ± 0,7	20,1 ± 0,6	19,9 ± 1,2	20,8 ± 1,1	18,9 ± 0,1	18,5 ± 0,6	18,3 ± 0,7	17,8 ± 0,1	ns	**	ns
C 18:0	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,6 ± 0,6	4,4 ± 1,0	4,8 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,8	5,6 ± 0,3	ns	*	ns
Sum Saturates ²	26,1 ± 0,8	25,8 ± 0,3	25,8 ± 0,5	26,8 ± 0,0	24,8 ± 0,1	24,8 ± 0,4	24,7 ± 0,1	24,3 ± 0,4	ns	***	ns
C 18:1 n-9	11,9 ± 0,1	12,5 ± 0,5	12,2 ± 0,1	11,9 ± 0,1	12,2 ± 0,1	12,3 ± 0,1	11,8 ± 0,6	11,8 ± 0,7	ns	ns	ns
Sum Monoenes ³	17,8 ± 0,2	18,2 ± 0,6	17,9 ± 0,3	17,9 ± 0,3	16,7 ± 0,1	17,1 ± 0,2	16,7 ± 0,7	16,7 ± 0,7	ns	***	ns
C 18:2 n-6	6,7 ± 0,2	6,4 ± 0,5	6,3 ± 0,2	6,5 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0	5,0 ± 0,0	ns	***	ns
C 20:4 n-6	3,1 ± 0,5	3,3 ± 0,6	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,7	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,4	3,9 ± 0,6	4,0 ± 0,1	ns	*	ns
Sum n-6 PUFA ⁴	12,7 ± 0,4	12,5 ± 0,3	13,1 ± 0,3	12,4 ± 0,5	10,1 ± 0,2	10,1 ± 0,5	10,1 ± 1,0	10,2 ± 0,2	ns	***	ns
C 18:3 n-3	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,0	ns	*	ns
C 20:5 n-3	7,6 ± 0,4	8,3 ± 0,3	7,5 ± 0,0	7,4 ± 0,4	11,0 ± 0,1	10,6 ± 1,0	10,8 ± 0,6	10,5 ± 0,0	ns	***	ns
C 22:5 n-3	2,2 ± 0,0	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,0	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,1	ns	***	ns
C 22:6 n-3	31,0 ± 1,5	30,4 ± 0,8	30,7 ± 0,9	30,9 ± 0,3	31,8 ± 0,3	32,0 ± 1,1	32,0 ± 0,2	32,0 ± 0,3	ns	*	ns
Sum EPA/DHA	38,6 ± 1,1	38,6 ± 0,5	38,2 ± 0,9	38,3 ± 0,7	42,8 ± 0,2	42,6 ± 0,0	42,8 ± 0,8	42,5 ± 0,2	ns	***	ns
Sum n-3 PUFA ⁵	41,7 ± 1,0	42,0 ± 0,3	41,3 ± 0,9	41,4 ± 0,6	46,8 ± 0,1	46,4 ± 0,1	47,0 ± 1,2	46,4 ± 0,2	ns	***	ns

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C14:0, C15:0, C17:0, C20:0, C22:0, C24:0

³Includes C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 16:1 n-5, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:3 n-6

⁵Includes C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 14 Fettsyresammensetning 3, 6 og 9 uker etter smitte (WPC) i triacylglyseroler i lever fra laks gitt før med ulik fettsyresammensetning før og etter smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=2).

Postdiet	Control				High EPA				P (ANOVA) ¹			
	Prediet	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Control	Medium EPA	High EPA	High DHA	Pre	Post	Int
3 wpc												
Sum FA in TAG, mg/g	3,9 ± 0,5	5,2 ± 0,8	3,8 ± 1,8	2,4 ± 0,8	3,6 ± 1,0	4,7 ± 2,4	2,9 ± 0,5	4,7 ± 0,4	ns	ns	ns	
% of FA												
C 16:0	9,3 ± 0,8	11,9 ± 1,0	8,9 ± 0,7	10,4 ± 1,6	10,7 ± 1,1	10,0 ± 0,2	8,2 ± 0,7	9,0 ± 0,8	*	ns	ns	
C 18:0	4,0 ± 0,7	5,0 ± 0,0	3,3 ± 0,4	5,1 ± 0,9	4,8 ± 1,3	3,3 ± 0,2	3,7 ± 0,1	3,2 ± 0,2	ns	ns	*	
Sum Saturates ²	16,3 ± 0,3	20,2 ± 1,6	14,6 ± 0,4	19,0 ± 1,4	18,2 ± 2,0	15,9 ± 0,6	14,0 ± 0,8	13,8 ± 1,1	*	**	**	
C 18:1 n-9	40,8 ± 1,8	34,4 ± 2,9	33,6 ± 3,6	34,4 ± 4,3	37,5 ± 1,1	34,4 ± 2,5	37,3 ± 3,5	35,4 ± 0,1	ns	ns	ns	
Sum Monoenes ³	57,0 ± 2,5	51,7 ± 1,7	47,7 ± 3,6	48,7 ± 4,8	53,1 ± 0,4	50,7 ± 3,0	51,7 ± 3,7	49,6 ± 0,2	ns	ns	ns	
C 18:2 n-6	11,9 ± 0,0	10,5 ± 1,2	11,5 ± 0,8	11,0 ± 0,1	10,4 ± 2,0	11,8 ± 0,4	11,8 ± 0,1	12,4 ± 0,4	ns	ns	ns	
C 20:4 n-6 (ARA)	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	**	ns	ns	
Sum n-6 PUFA ⁴	15,9 ± 0,2	13,7 ± 1,8	15,6 ± 0,7	14,6 ± 0,6	15,0 ± 0,4	15,9 ± 0,8	16,0 ± 0,4	16,4 ± 0,0	ns	ns	ns	
C 18:3 n-3	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,0	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,7	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,3	ns	ns	ns	
C 20:5 n-3 (EPA)	2,2 ± 0,8	3,8 ± 0,3	7,6 ± 0,7	3,3 ± 0,6	2,9 ± 0,4	4,8 ± 0,4	6,3 ± 0,9	4,5 ± 0,1	***	ns	ns	
C 22:5 n-3 (DPA)	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	*	ns	ns	
C 22:6 n-3 (DHA)	3,3 ± 1,0	4,9 ± 1,4	8,0 ± 2,9	8,9 ± 2,1	4,6 ± 0,1	5,9 ± 1,8	5,5 ± 1,1	9,9 ± 0,5	**	ns	ns	
Sum EPA/DHA	5,6 ± 1,8	8,7 ± 1,7	15,6 ± 3,6	12,3 ± 2,7	7,5 ± 0,4	10,6 ± 2,3	11,9 ± 2,0	14,4 ± 0,6	**	ns	ns	
Sum n-3 PUFA ⁵	9,0 ± 2,2	12,8 ± 2,1	20,4 ± 3,8	16,2 ± 3,4	11,3 ± 1,0	15,1 ± 2,8	16,3 ± 2,7	18,6 ± 1,1	**	ns	ns	
6 wpc												
Sum FA in TAG, mg/g	7,5 ± 5,0	8,0 ± 2,3	2,0 ± 0,3	3,1 ± 1,1	3,3 ± 0,8	4,8 ± 3,4	3,0 ± 0,8	4,1 ± 3,1	ns	ns	ns	
% of FA												
C 16:0	9,3 ± 0,2	8,5 ± 0,6	7,7 ± 1,1	8,0 ± 1,2	9,6 ± 1,2	11,3 ± 0,6	9,6 ± 1,3	8,6 ± 0,8	ns	*	ns	
C 18:0	4,7 ± 1,5	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,6 ± 1,3	4,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,5 ± 0,0	ns	ns	ns	
Sum Saturates ²	15,9 ± 1,7	14,0 ± 0,6	14,5 ± 1,2	14,5 ± 0,8	16,7 ± 2,9	17,4 ± 0,6	14,9 ± 2,6	14,4 ± 0,9	ns	ns	ns	
C 18:1 n-9	40,0 ± 2,7	40,1 ± 1,3	37,2 ± 1,1	39,6 ± 3,1	39,0 ± 1,5	33,7 ± 2,1	34,3 ± 3,4	38,3 ± 0,6	ns	*	ns	
Sum Monoenes ³	57,1 ± 3,1	55,9 ± 0,0	55,0 ± 2,5	57,2 ± 6,2	55,0 ± 2,4	52,8 ± 2,3	48,3 ± 4,0	52,0 ± 1,2	ns	*	ns	
C 18:2 n-6	10,4 ± 0,3	13,7 ± 0,4	11,5 ± 0,2	11,8 ± 0,3	12,1 ± 2,0	10,5 ± 1,4	12,7 ± 0,7	14,2 ± 0,4	ns	ns	**	
C 20:4 n-6 (ARA)	0,9 ± 0,7	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,0	ns	ns	ns	
Sum n-6 PUFA ⁴	15,4 ± 0,7	17,3 ± 0,9	15,1 ± 0,3	15,5 ± 0,2	15,4 ± 1,1	12,8 ± 1,0	15,9 ± 1,4	17,4 ± 0,6	ns	ns	**	
C 18:3 n-3	1,5 ± 0,0	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,0	ns	*	ns	
C 20:5 n-3 (EPA)	1,9 ± 0,3	3,4 ± 0,1	4,5 ± 0,7	2,0 ± 0,8	3,0 ± 0,5	4,1 ± 1,1	7,1 ± 0,2	4,5 ± 0,3	***	***	ns	
C 22:5 n-3 (DPA)	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	*	*	ns	
C 22:6 n-3 (DHA)	5,4 ± 2,8	3,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,7 ± 3,8	4,0 ± 0,1	4,9 ± 1,4	7,7 ± 2,7	6,1 ± 1,1	ns	ns	ns	
Sum EPA/DHA	7,3 ± 2,4	7,0 ± 0,0	9,9 ± 0,8	7,7 ± 4,6	7,0 ± 0,6	9,0 ± 2,5	14,8 ± 2,6	10,6 ± 0,8	ns	ns	ns	
Sum n-3 PUFA ⁵	10,3 ± 2,3	10,9 ± 0,0	13,9 ± 0,3	10,9 ± 5,0	10,7 ± 0,1	12,9 ± 3,3	20,0 ± 2,9	15,0 ± 0,9	*	*	ns	
9 wpc												
Sum FA in TAG, mg/g	1,7 ± 0,1	3,0 ± 0,6	2,9 ± 0,0	3,1 ± 0,2	2,6 ± 1,3	3,6 ± 0,8	2,6 ± 1,0	3,1 ± 1,8	ns	ns	ns	
% of FA												
C 16:0	8,9 ± 1,1	7,9 ± 1,2	7,9 ± 1,1	8,8 ± 3,7	6,3 ± 0,1	5,6 ± 0,5	7,5 ± 1,2	12,3 ± 2,8	ns	ns	ns	
C 18:0	5,4 ± 1,7	4,6 ± 0,0	6,1 ± 0,1	6,6 ± 3,5	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,0	4,3 ± 0,8	5,8 ± 1,1	ns	ns	ns	
Sum Saturates ²	17,2 ± 2,3	15,0 ± 1,1	16,6 ± 1,3	18,1 ± 7,8	12,6 ± 0,8	11,8 ± 0,9	14,3 ± 0,3	21,7 ± 2,5	ns	ns	ns	
C 18:1 n-9	40,2 ± 1,5	42,5 ± 1,7	43,9 ± 0,0	41,4 ± 4,8	43,9 ± 0,4	42,1 ± 2,3	38,1 ± 4,8	32,0 ± 5,7	ns	ns	ns	
Sum Monoenes ³	56,7 ± 2,3	58,8 ± 1,7	60,7 ± 0,1	57,1 ± 6,9	58,4 ± 0,7	56,3 ± 1,3	51,5 ± 4,6	49,6 ± 0,2	ns	*	ns	
C 18:2 n-6	11,6 ± 0,7	11,4 ± 1,1	11,0 ± 0,7	12,5 ± 2,3	13,3 ± 0,0	14,1 ± 0,6	12,6 ± 0,6	9,4 ± 2,1	ns	ns	*	
C 20:4 n-6 (ARA)	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,2	ns	ns	ns	
Sum n-6 PUFA ⁴	15,3 ± 0,4	15,3 ± 0,9	14,9 ± 0,9	16,4 ± 2,4	17,5 ± 0,5	18,4 ± 1,0	16,5 ± 1,1	12,7 ± 3,1	ns	ns	ns	
C 18:3 n-3	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3	ns	*	ns	
C 20:5 n-3 (EPA)	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,0	1,3 ± 0,1	3,7 ± 0,2	4,5 ± 0,1	5,8 ± 1,9	4,9 ± 0,7	ns	***	ns	
C 22:5 n-3 (DPA)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,7	1,3 ± 0,2	ns	**	ns	
C 22:6 n-3 (DHA)	3,7 ± 0,3	2,6 ± 0,9	2,1 ± 0,2	2,3 ± 1,2	2,6 ± 0,5	3,5 ± 1,0	5,1 ± 3,1	4,3 ± 0,4	ns	ns	ns	
Sum EPA/DHA	5,8 ± 0,7	4,5 ± 1,1	3,5 ± 0,2	3,5 ± 1,3	6,3 ± 0,7	8,0 ± 1,1	10,9 ± 5,0	9,2 ± 0,4	ns	**	ns	
Sum n-3 PUFA ⁵	9,0 ± 0,6	7,5 ± 1,5	6,1 ± 0,2	6,6 ± 1,2	9,8 ± 0,8	12,1 ± 1,3	15,2 ± 6,2	12,7 ± 0,0	ns	**	ns	

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

²Includes C15:0, C17:0, C20:0, C21:0

³Includes C 14:1 n-5, C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 16:1 n-5, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11, C 22:1 n-9, C 24:1 n-9

⁴Includes C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6

⁵Includes C 18:4 n-3, C 20:4 n-3, C 20:3 n-3

Tabell 15 Fettsyresammensetning 6 uker etter smitte (WPC) i hjerte fra laks gitt fôr med ulik fettsyresammensetning før og etter smitte (gj.snitt ± std.avvik, N=2).

Postdiet	Control								High EPA				P (ANOVA) ¹						
	Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		Control		Medium EPA		High EPA		High DHA		Pre	Post	Int
Fett % (Folch)	3,63 ± 0,48	4,23 ± 0,93	3,41 ± 1,41	4,14 ± 0,95	5,53 ± 0,48	3,68 ± 1,33	4,09 ± 1,71	4,66 ± 0,66	ns	ns	ns								
Sum FA, mg/g	22,8	7,7	22,9	2,1	24,0	1,7	22,3	0,8	23,9	2,1	20,7	1,0	18,2	6,9	18,3	0,7	ns	ns	ns
Prosentvis fordeling																			
C 16:0	15,9 ± 1,8	15,2 ± 0,6	15,6 ± 0,9	15,4 ± 0,8	14,8 ± 0,1	16,1 ± 1,1	15,3 ± 0,6	16,2 ± 0,3	ns	ns	ns								
C 18:0	4,9 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,0	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,4	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,1	ns	ns	ns								
Sum saturates ²	22,5 ± 1,5	21,3 ± 0,7	22,0 ± 1,4	21,4 ± 1,0	21,0 ± 0,5	22,2 ± 1,4	21,3 ± 0,4	22,3 ± 0,0	ns	ns	ns								
C 18:1 n-9	15,5 ± 3,1	15,3 ± 0,2	16,3 ± 0,6	14,8 ± 0,1	17,8 ± 0,7	14,8 ± 0,7	15,3 ± 1,2	14,5 ± 0,1	ns	ns	ns								
Sum Monoenes ³	23,8 ± 5,2	23,5 ± 0,9	24,4 ± 0,5	22,0 ± 0,1	27,0 ± 0,9	22,6 ± 1,6	22,9 ± 1,0	21,0 ± 0,3	ns	ns	ns								
C 18:2 n-6	8,0 ± 1,3	8,8 ± 0,6	8,4 ± 0,7	8,3 ± 0,2	9,2 ± 0,1	7,8 ± 0,9	8,5 ± 0,9	7,2 ± 0,5	ns	ns	ns								
C 20:4 n-6	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,0	2,1 ± 0,0	ns	ns	ns								
Sum n-6 PUFA ⁴	12,0 ± 1,2	12,2 ± 0,6	11,6 ± 0,8	12,1 ± 0,1	12,7 ± 0,1	10,9 ± 0,9	11,6 ± 0,6	10,4 ± 0,5	ns	ns	ns								
C 18:3 n-3	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,1	ns	ns	ns								
C 20:5 n-3	5,6 ± 1,3	6,7 ± 0,2	7,6 ± 0,1	5,4 ± 0,6	6,0 ± 0,3	8,8 ± 1,0	9,1 ± 1,2	8,6 ± 0,6	**	**	ns								
C 22:5 n-3	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,0	2,2 ± 0,0	2,5 ± 0,2	2,0 ± 0,1	***	*	ns								
C 22:6 n-3	28,6 ± 4,2	29,0 ± 0,8	26,8 ± 0,9	31,7 ± 1,4	26,0 ± 1,8	28,4 ± 0,0	27,3 ± 1,6	30,6 ± 0,0	*	ns	ns								
SUM EPA+DHA	34,2 ± 5,6	35,7 ± 0,6	34,4 ± 0,8	37,1 ± 0,9	32,0 ± 2,1	37,3 ± 1,1	36,5 ± 0,4	39,2 ± 0,6	ns	ns	ns								
Sum n-3 PUFA ⁵	38,2 ± 5,3	40,2 ± 0,2	39,1 ± 0,5	41,3 ± 1,2	36,5 ± 2,1	42,0 ± 0,9	41,6 ± 0,7	43,5 ± 0,6	*	ns	ns								

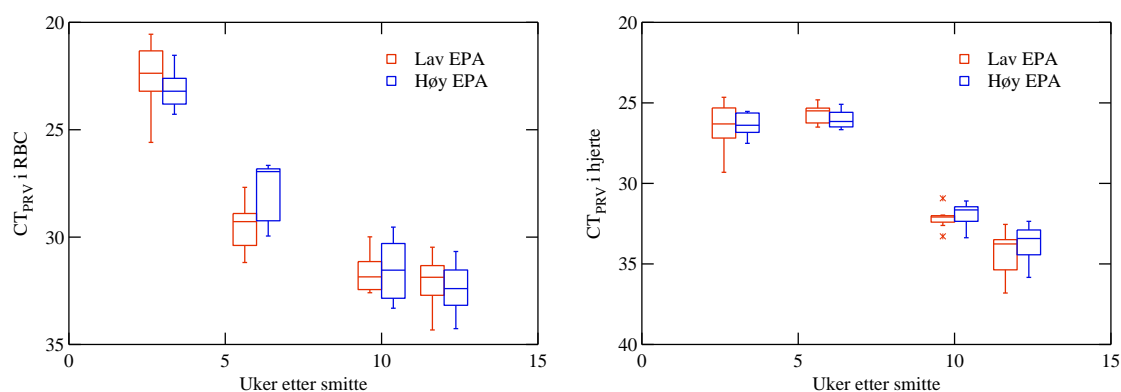
¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ²Includes C 14:0, C 15:0, C17:0, C 20:0, C 22:0

³Includes C 15:1, C 16:1 n-9, C 16:1 n-7, C 17:1 n-7, C 18:1 n-11, C 18:1 n-7, C 20:1 n-11, C 20:1 n-9, C 20:1 n-7, C 22:1 n-7, C 22:1 n-11

⁴Includes C 16:2 n-6, C 18:3 n-6, C 20:2 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6, ⁵Includes C 16:2 n-3, C 20:3 n-

5.2.2 Virustall

Virustall i PRV-smittet fisk ble målt i prøver av erythrocytter og hjerte. I erythrocytter var virustallet på det høyeste (lavest CT-verdi) etter 3 uker, og avtok deretter gjennom hele forsøket (Figur 5). Det var ingen effekter av fôring før smitte på virustall. Fôring etter smitte ga heller ingen konsistent trend, men det var signifikant høyere virustall i fisk gitt høy EPA fôr etter 6 uker ($P=0.02$). Hva dette kan skyldes er ikke klart



Figur 5 Virustall (CT-verdi) i erythrocytter (RBC, figur til venstre) og hjerte (figur til høyre) fra fisk gitt fôr med lavt og høyt EPA-innhold etter smitte med PRV-virus.

Virustallene i hjerte holdt seg stabile fra 3 til 6 uker etter smitte og avtok deretter markert (Figur 5). Det var ingen effekt av fôr verken før eller etter smitte.

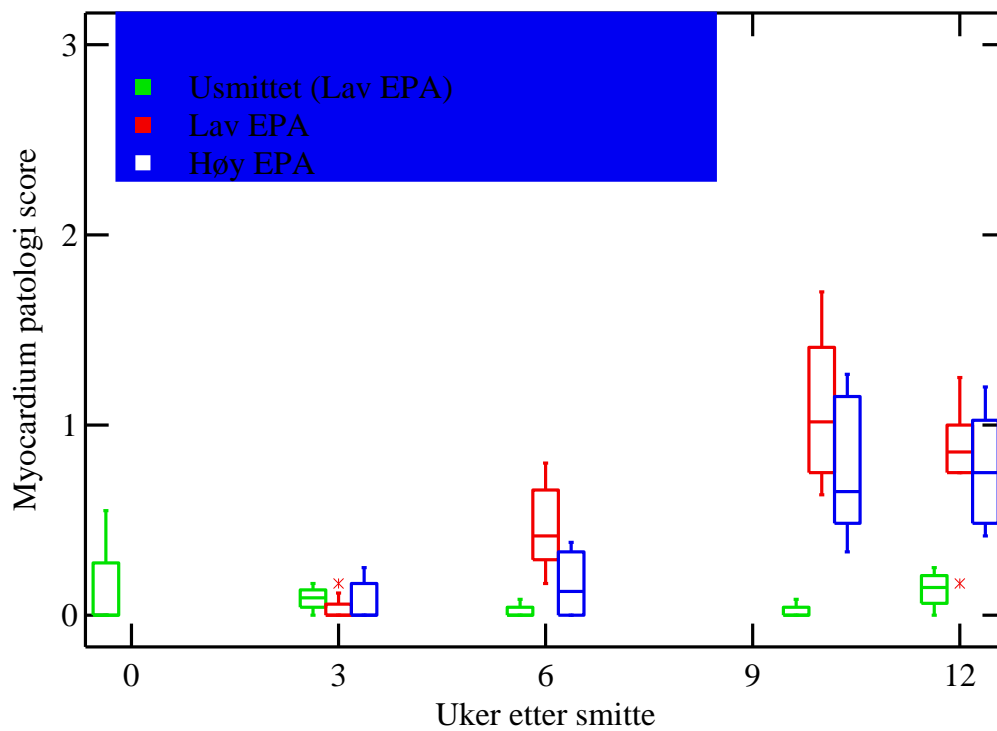
5.2.3 Patologi

Det ble funnet forandringer som er typiske for HSMB i PRV-smittet fisk, men disse var moderate. Forandringene i hjertet var særlig lokalisert til ventrikkelen. Forandringene i hjertet økte fram til 10 uker og stagnerte eller falt deretter fram til 12 uker etter smitte (Tabell 16, Figur 6). Endringene i epikard var mer beskjedne enn i ventrikkelen og for små til at det kan forventes å se forskjeller mellom fôr. I ventrikkelen var det en tendens til høyere score i fisk fôret med Lav EPA enn Høy EPA ved 6 og 10 uker etter smitte. Når endringene i ventrikkelen og atrium ble lagt sammen til en score for myokard, var forskjellen mellom diettene signifikant ved 6 uker ($P=0,02$). Forandringene i hjerte var små i usmittet fisk gjennom hele forsøket (Figur 6).

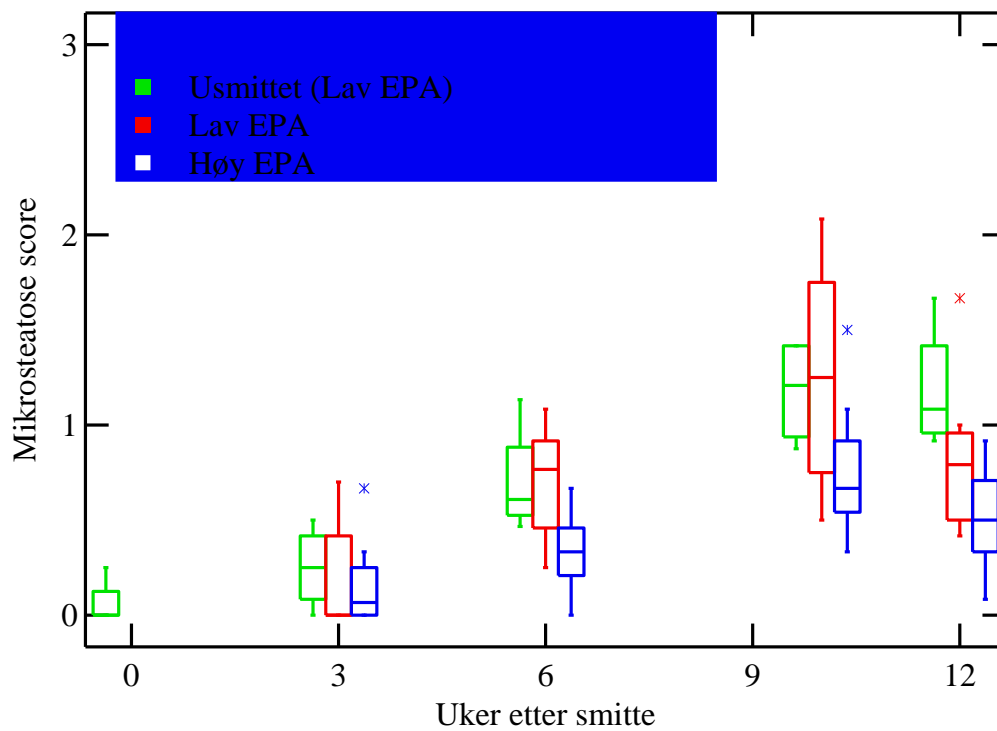
Lever ble scoret for tre kategorier av forandringer: macrovesikulær steatose, mikrovesikulær steatose og inflammasjoner rundt små galleganger og/eller små karstrukturer. Det var ingen fisk med score > 0 for macrovesikulær steatose. Score for mikrovesikulær steatose og inflammasjoner er gitt i Tabell 16. Gjennomsnittlig score for mikrovesikulær steatose økte fram til 10 uker og avtok deretter (Figur 7), tilsynelatende sammenfallende med utviklingen i hjerteforandringer (Figur 6). Det var en tendens til mindre leverforandringer i fisk fôret med høy EPA enn i gruppene fôret med lav EPA diett, og forskjellen var signifikant ved 6 uker ($P=0.02$). I motsetning til i hjerte så endringene i lever ut til å være knyttet til fôr mer enn til smitte: den usmittede gruppen, som ble gitt kontrollfôret med lavt EPA-innhold hadde omtrent samme utvikling som den smittede fisken gitt samme fôr (Figur 7).

Tabell 16 Patologi-score i ulike vev i fisk smittet med PRV.

Pre diet	Low EPA		Medium EPA		High EPA		High DHA		ANOVA P-verdier		
	Low EPA	High EPA	Low EPA	High EPA	Low EPA	High EPA	Low EPA	High EPA	Pre diet	Post diet	Int
Uke 3											
Atrium	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,17	0,08	0,00	0,40	0,38	0,24
Ventrikkel	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ingen variasjon		
Myocard (sum V+A)	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,17	0,08	0,00	0,40	0,38	0,24
Epicard	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,44	0,35	0,44
Sum hjertepatologi	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,21	0,08	0,00	0,33	0,28	0,16
Microsteatose	0,35	0,00	0,13	0,17	0,29	0,33	0,00	0,15	0,73	0,85	0,67
Lever inflammasjoner	0,21	0,00	0,00	0,08	0,21	0,21	0,17	0,08	0,05	0,17	0,08
Sum leverpatologi	0,56	0,00	0,13	0,25	0,50	0,54	0,17	0,23	0,47	0,64	0,47
Uke 6											
Atrium	0,25	0,23	0,38	0,08	0,29	0,00	0,08	0,04	0,48	0,11	0,55
Ventrikkel	0,08	0,13	0,19	0,04	0,23	0,00	0,35	0,13	0,49	0,07	0,50
Myocard (sum V+A)	0,33	0,36	0,57	0,13	0,52	0,00	0,43	0,17	0,92	0,02	0,34
Epicard	0,17	0,00	0,21	0,21	0,06	0,25	0,13	0,23	0,84	0,76	0,64
Sum hjertepatologi	0,50	0,36	0,78	0,33	0,58	0,25	0,56	0,40	0,91	0,11	0,87
Microsteatose	0,63	0,29	0,60	0,25	0,54	0,38	1,04	0,42	0,37	0,02	0,13
Lever inflammasjoner	0,21	0,00	0,04	0,04	0,06	0,04	0,08	0,13	0,82	0,46	0,50
Sum leverpatologi	0,83	0,29	0,64	0,29	0,60	0,42	1,13	0,54	0,42	0,03	0,81
Uke 10											
Atrium	0,50	0,17	0,13	0,25	0,63	0,46	0,21	0,17	0,38	0,52	0,76
Ventrikkel	0,67	0,76	0,92	0,59	0,76	0,29	0,54	0,40	0,23	0,08	0,33
Myocard (sum V+A)	1,17	0,93	1,04	0,84	1,38	0,75	0,75	0,57	0,56	0,19	0,87
Epicard	0,04	0,13	0,13	0,00	0,04	0,00	0,04	0,08	0,35	0,67	0,05
Sum hjertepatologi	1,21	1,05	1,17	0,84	1,43	0,75	0,79	0,65	0,58	0,18	0,81
Microsteatose	1,33	1,08	1,00	0,71	1,46	0,79	1,25	0,46	0,76	0,13	0,88
Lever inflammasjoner	0,08	0,21	0,04	0,21	0,21	0,04	0,25	0,08	0,96	0,88	0,22
Sum leverpatologi	1,42	1,29	1,04	0,92	1,67	0,83	1,50	0,54	0,80	0,14	0,68
Uke 12											
Atrium	0,25	0,04	0,29	0,46	0,67	0,29	0,25	0,42	0,25	0,58	0,27
Ventrikkel	0,73	0,40	0,25	0,53	0,33	0,50	0,54	0,43	0,69	1,00	0,29
Myocard (sum V+A)	0,98	0,44	0,54	0,98	1,00	0,79	0,79	0,85	0,85	0,69	0,22
Epicard	0,00	0,04	0,04	0,04	0,13	0,04	0,08	0,00	0,70	0,43	0,58
Sum hjertepatologi	0,98	0,48	0,58	1,03	1,13	0,83	0,88	0,85	0,71	0,55	0,23
Microsteatose	1,04	0,21	0,79	0,46	0,96	0,71	0,50	0,67	0,76	0,12	0,33
Lever inflammasjoner	0,17	0,21	0,08	0,13	0,00	0,04	0,17	0,21	0,18	0,47	1,00
Sum leverpatologi	1,21	0,42	0,88	0,58	0,96	0,75	0,67	0,88	0,97	0,19	0,38



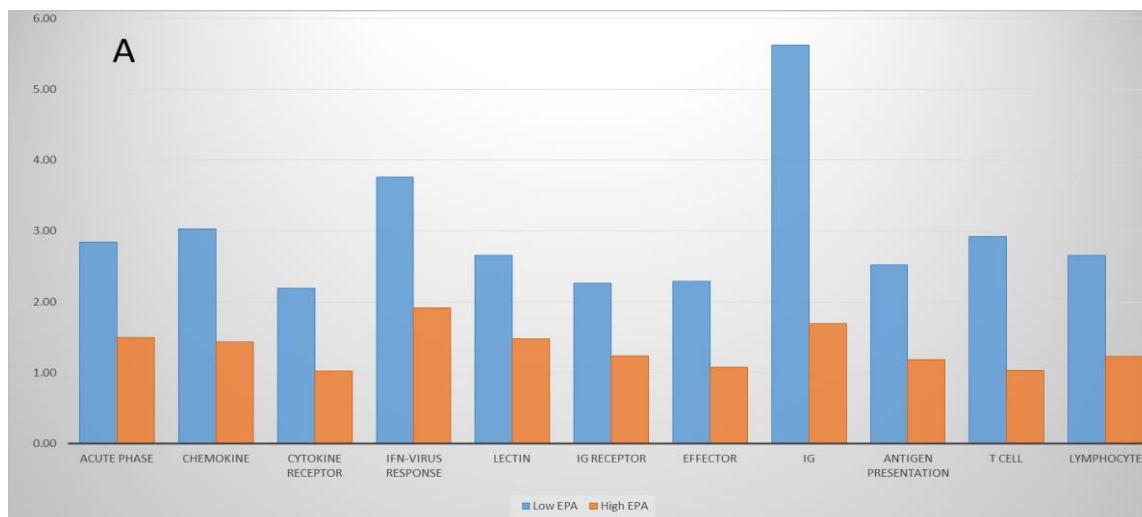
Figur 6 Samlet patologiscore i myocardium (ventrikel+atrium) i fisk gitt fôr med lavt og høyt innhold av EPA etter injeksjonssmitte med PRV. Statistiske beregninger er gitt i Tabell 16.



Figur 7 Microvesikulær steatose i fisk gitt fôr med lavt og høyt innhold av EPA etter injeksjonssmitte med PRV. Statistiske beregninger er gitt i Tabell 16.

5.2.4 Microarray resultater

I HSMB-forsøket var det en kraftig effekt av både smitte og fôr på genuttrykk. Ved 6 wpc var det 1350 gener som responderte på smitte og 762 gener viste forskjell mellom fôr (fôring med Høy vs Lav EPA etter smitte). Det var en massiv immunsuppresjon i hjerte av laks gitt fôr med høyt EPA-innhold. Nedsatt ekspresjon ble vist for alle grupper av immungener (Figur 8A), spesielt VRG – gener for uspesifikk antiviral immunitet (2-fold, 98 gener) og immunoglobuliner – Ig (3.3-fold, 35 gener). Eksempler på gener med ulike roller knyttet til immunitet er gitt i Figur 8B.



B Annotation	Gene	LOW EPA	High EPA
Antigen presentation	H-2 class II HC antigen gamma chain	3.39	1.01
Antigen presentation	Beta-2 microglobulin	4.61	1.61
Antigen presentation	MHC class I antigen	1.60	1.06
B cells	Ig kappa chain V-III region	10.79	1.64
B cells	Ig heavy chain	10.01	2.22
B cells	Ig light chain	11.09	2.36
B cells	Tyrosine-protein kinase BTK	3.24	1.26
Chemokine	CC chemokine with stalk CK2	5.90	1.09
Chemokine receptor	C-C chemokine receptor type 3	3.30	1.50
Effector	Lysozyme C II precursor	3.66	1.27
IFN-virus response	Barrier-to-autointegration factor	6.06	1.26
IFN-virus response	Interferon-induced protein 44	6.39	1.88
IFN-virus response	Gig2-2	6.19	1.73
IFN-virus response	Viperin	6.72	2.42
Lectin	Natlectin C-type lectin	7.81	1.43
Lymphocyte	CD45	3.26	1.17
Lymphocyte	Plastin-2	4.07	1.41
Lymphocyte	Leukocyte surface antigen CD53	2.98	1.44
Lymphocyte	CD80-like protein	2.82	1.40
T cell	T cell receptor alpha chain	8.72	1.24
T cell	T-cell antigen receptor	7.03	1.75
T cell	T-cell surface glycoprotein CD4	3.26	1.41
T cell	CD8 beta	3.05	0.95
T cell	CD3gammadelta-A	5.64	1.33
T cell	CD28 T-cell-specific surface glycoprotein	4.24	1.41

Figure 8 Genuttrykk i hjerte ved 6 wpc. A: forskjeller mellom fôr innen funksjonelle grupper av immungener (gjennomsnitt av fold-økning relativt til usmittede kontroller). B: Eksempler på forskjellig uttrykte immungener.

I leveren var endringene i genekspressjon (246 forskjellig uttrykte gener), som skyldtes smitte, betydelig mindre enn i hjerte. Immunresponsen i lever var forholdsvis svak, med 40 forskjellig uttrykte gener (16,2 %), hvorav 23 gener var nedregulert. I hjerte var antall forskjellig uttrykte immungener 330, og bare 11 var nedregulert. Noen av immungenene som responderte på sykdom i leveren, for eksempel

ni oppregulerte VRG (virus-responsive gener) (Krasnov et al., 2011b) kan ha vært uttrykt i blodceller, siden det er vist at blodceller tar opp PRV og utvikler sterke antivirale responser (Dahle et al., 2015). Resultatene indikerer at lever ikke har en viktig, direkte rolle i immunbeskyttelsen mot HSMB. Det er verdt å notere seg at halvparten (122) av de genene som endret uttrykk med smitte, også endret uttrykk i lever med steatoses ved uke 9, da PRV-mengden i fisken var lav.

Aktivering av cellesyklus spiller trolig en viktig rolle i reparasjon og recovery av leveren. Sterk oppregulering ble også observert for hemoglobiner og to markører for røde blodceller (Figure 5.). Resultatene indikerer enten økt blodsirkulasjon eller stimulering av erythropoesen. Oppregulering av *mafb* (2,9-fold) og *smad* (,9-fold), som regulerer differensiering av erythrocytter i laks (Krasnov et al., 2013) taler for den siste forklaringen.

Gene	6 wpc	9 wpc	Feed	Gene	6 wpc	9 wpc	Feed
Cell cycle				Steroid metabolism, proteases			
Cell division control protein 2 homolog	-2.39	2.76	-4.50	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 1	-1.44	-4.21	1.83
Cell division cycle protein 20 homolog	-2.32	1.71	-3.16	Squalene synthetase	-1.29	-3.74	1.26
Cell division cycle protein 23 homolog	-1.33	2.17	-2.98	Diphosphomevalonate decarboxylase	-1.21	-3.03	-1.11
Cell division protein kinase 2	-1.38	1.43	-1.95	Farnesyl pyrophosphate synthetase	-1.17	-2.44	1.29
Centromere protein H	-1.12	1.84	-1.79	Sterol regulatory element-binding protein 2	-1.20	-1.81	1.14
Centromere protein M	1.18	2.35	1.09	Cytochrome P450 24A1	1.04	-1.80	1.77
Centromere protein N	-1.08	1.91	-1.14	Chymotrypsin B	3.61	1.00	1.39
Centrosomal protein of 27 kDa	-1.15	1.81	-1.48	Elastase-1	2.68	-1.13	1.76
Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1.67	1.64	-2.44	Trypsin-1	2.42	-1.16	1.44
Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1.40	2.60	-2.29	Trypsin-3	2.30	1.24	1.06
Condensin complex subunit 3	-1.39	2.20	-6.22	Trypsin	2.30	-1.16	1.17
Cyclin-A2	-1.21	2.43	-1.88	Trypsin-2	2.26	-1.22	1.42
Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	-1.33	2.09	-1.74	Carboxypeptidase B precursor	2.25	-1.03	2.11
Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1	1.00	1.78	-1.89	Erythrocytes			
G2/mitotic-specific cyclin-B1	-2.41	2.76	-3.17	Erythroid membrane-associated protein	1.23	1.74	-1.10
G2/mitotic-specific cyclin-B3	-1.96	2.16	-2.48	Carbonic anhydrase, CAH	1.23	2.38	-1.28
Histone H1	1.37	1.88	1.25	Hemoglobin subunit alpha-4	-1.06	3.78	-1.69
Histone H3-like centromeric protein A	-2.00	2.41	-2.31	Hemoglobin subunit alpha-4	-1.13	3.61	-1.66
Inner centromere protein B	-1.41	2.34	-4.52	Hemoglobin subunit alpha	1.38	2.99	-1.41
Kinesin-like protein KIF22 - Ident 95	-1.03	2.62	-1.25	Hemoglobin subunit alpha	1.18	2.94	-1.11
Mitotic checkpoint serine-protein kinase BUB1	-1.01	1.85	-1.45	Alpha-globin IV	1.17	2.67	1.00
Mitotic spindle assembly checkpoint MAD2A	-1.94	1.86	-2.36	Hemoglobin subunit alpha	-1.04	2.75	-1.19
Nucleolar and spindle-associated protein 1	-1.10	2.31	-1.26	Hemoglobin subunit alpha	-1.22	2.74	-1.30
Regulator of cytokinesis 1	-1.30	2.29	-2.47	Hemoglobin subunit beta	1.02	2.65	-1.10
Spindle and kinetochore-associated protein 1	-1.96	1.60	-2.19	Hemoglobin subunit alpha	1.20	2.65	-1.17
Targeting protein for Xklp2	-1.91	1.90	-1.98	Hemoglobin subunit beta	1.05	2.58	-1.06

Figure 9 Endringer i uttrykk av funksjonelt relaterte gener i lever. 6 wpc (modent stadium av HSMB) og 9 wpc (steatose) – data er foldøkning i forhold til usmittet kontroll; Feed – ratio mellom genuttrykk i gruppene med høy og lav EPA i fôret. Signifikante verdier er indikert med fete typer understreket og i kursiv.

Tabell 17 *Funksjonelle grupper av gener påvirket av steatose. Data er gjennomsnittlig foldøkning i forhold til usmittet kontroll og antall gener.*

Group	Mean fold	Number of genes
Erythrocytes	2.6	19
Cell cycle	1.8	32
Apoptosis	-1.6	6
Transcription	-2.1	10
Protein folding and modification	-1.9	18
Reticulum	-1.6	9
Metabolism Sugar	-1.4	10
Metabolism Iron heme	-1.4	8
Metabolism Amine	-1.4	4
Metabolism Mitochondria	-1.5	19
Metabolism Nucleotide	-1.5	5
Metabolism Amino acid	-1.5	11
Protein biosynthesis	-1.7	16
Metabolism RNA	-1.9	21
Differentiation	-1.6	22
Lectins	-1.9	6
Glycans	-2.0	7

EPA hadde minimal effect på laksens repons på HSMB i lever: bare 13 gener (3.5 %) var påvirket av både fôr og smitte, og fem av disse var involvert i cellyklus (Figure 9). Overlapp med steatose var mye større, med 66 gener. Bortsett fra cellyklus (18 nedregulerte gener), RNA prosessering (12 oppregulerte gener) og metabolisme av heme og jern (seks nedregulerte gener), var det ingen andre fremtredende funksjonelle grupper med samtidig endring i genuttrykk. Et antall individuelle gener påvirket av EPA fortjener likevel oppmerksomhet (Figur 10). Som forventet var uttrykk av gener involvert i biosyntesen av PUFA (*delta-6 fatty acyl desaturase* and *elongation of very long chain fatty acids protein 6*) nedregulert, og det same var gener i prostaglandin-syntese og retinoid-metabolisme. Derimot var tre gener involvert i biosyntese og transport av steroider (*hydroxysteroid dehydrogenase*, *FK506-binding protein 5* og *apolipoprotein A II*) oppregulert.

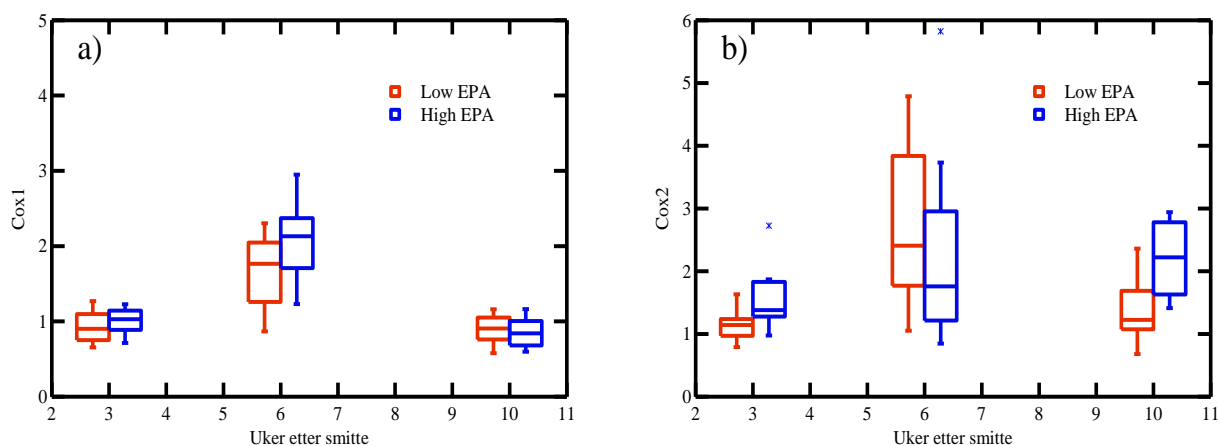
Oppregulering ble også vist for *ornithine decarboxylase 1*, et nøkkelenzym i polyamin-metabolismen, mens to enzymer i nukleotidmetabolismen ble nedregulert. Redusert uttrykk ble observert for to markører for stress: ROS scavenger *glutathione peroxidase* og matrix metalloproteinase *collagenase 3*.

Gene	W6	W9	Feed
Delta-6 fatty acyl desaturase	1.34	1.78	-2.02
Elongation of very long chain fatty acids protein 6	-1.61	1.54	-3.27
Lipoprotein lipase	-1.09	1.23	-2.91
Lipocalin-type prostaglandin D synthase	-1.46	1.18	-2.88
Prostaglandin D synthase	-1.56	1.15	-3.90
Retinoid-binding protein 7	-1.85	1.15	-3.73
Hydroxysteroid dehydrogenase	1.03	1.23	2.39
FK506-binding protein 5	1.50	1.02	3.22
Apolipoprotein A II	-1.33	-2.30	3.00
Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	-1.60	-2.44	2.47
Ornithine decarboxylase 1	1.01	-2.52	2.56
Thymidylate synthase	-1.84	1.25	-3.40
Ribonucleoside-diphosphate reductase	-1.60	1.17	-2.78
Collagenase 3	1.46	1.37	-3.66
Glutathione peroxidase type 2	-1.14	1.52	-2.98
Glutaredoxin 2	1.22	-1.90	2.07
IGF binding protein 1	-1.11	-2.30	2.79
Transcription factor CP2-like protein 1	1.37	-1.51	3.23

Figure 10 Eksempler på gener påvirket av førsammensetning. Data er ekspresjonsratio for høy vs lav EPA-gruppene. Signifikante verdier er indikert med fete typer, understreket og i kursiv.

5.2.5 Uttrykk av Cox-1 og Cox-2 i lever

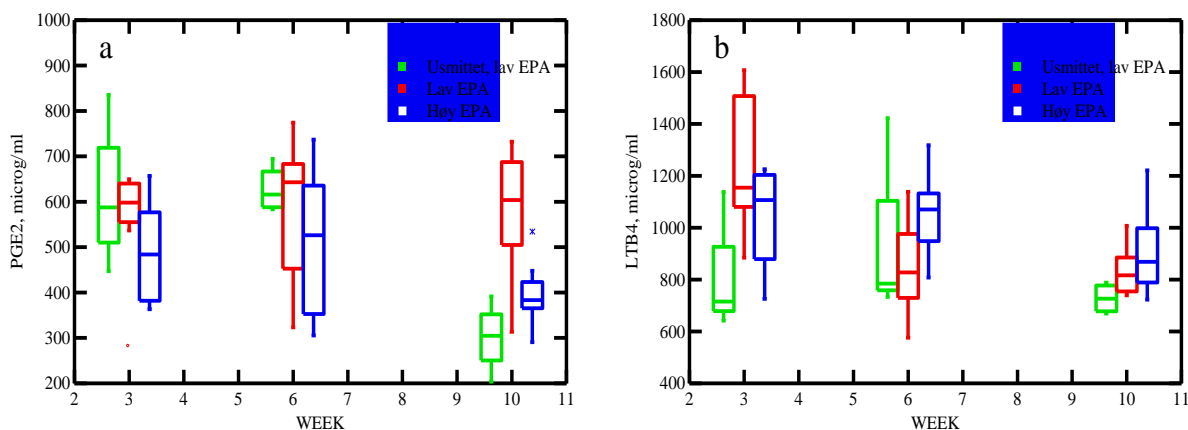
Genuttrykk av to forskjellige cyklooksygenaser (COX-1 og COX-2) ble analysert i lever. COX-1 er kjent for å være til stede i de fleste vev. COX-2 er i hovedsak til stede på inflammasjonssteder. Både COX-1 og COX-2 omdanner arakidonsyre til prostaglandiner, noe som resulterer i økt betennelsesrisiko. Uttrykk (fold-økning) av COX-1 og COX-2 (Cyclooxygenase 1 og 2) ved 3, 6 og 9 uker etter smitte er gitt i Figur 11. Uttrykket av Cox1 og Cox2 var noe høyere etter 6 uker enn etter 3 og 9 uker. Det var ingen signifikante effekt av fôring, verken før eller etter smitte, på uttrykk av de to genene.



Figur 11 Uttrykk av a) cyclooxygenase 1 (Cox1) og b) cyclooxygenase 2 (Cox2) 3, 6 og 9 uker etter smitte med PRV i grupper gitt fôr med lavt og høyt innhold av EPA etter smitte.

5.2.6 Sirkulerende eicosanoider

Plasma eicosanoidene, prostaglandiner som er produkter av COX enzymene og leukotriener, ble målt 3, 6 og 10 uker etter smitte er gitt i Figur 12. Det var ingen effekt av fôring før smitte, så data fra ulike fôringsgrupper før smitte er slått sammen. Det var en signifikant fôreffekt på konsentrasjon av PGE2 etter 10 uker ved at smittet fisk som hadde fått lav EPA diett hadde noe høyere nivå, ellers ingen klare og konsistente effekter verken av smitte eller fôr.

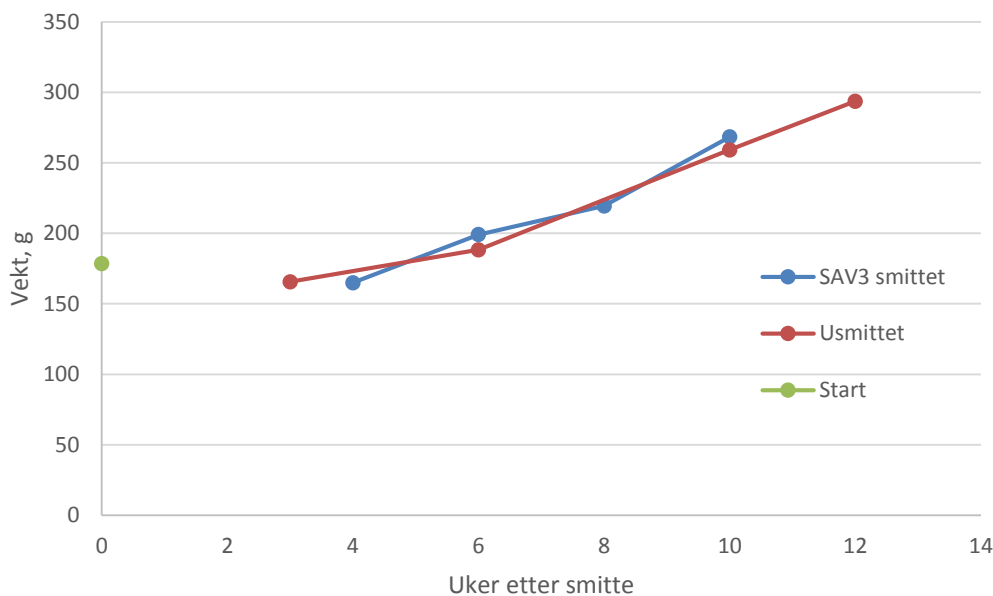


Figur 12 Eicosanoider i plasma 3, 6 og 10 uker etter smitte i usmittet fisk og PRV-smittet fisk gitt fôr med lavt og høyt EPA-innhold: a) prostaglandin E2, b) leucotriene B4. (det er fjernet to uteliggere for PGE2 og tre uteliggere for LTB4).

5.3 PD-smitte

5.3.1 Vektutvikling

Vekten på prøvefisker i PD-smitteforsøket økte fra ca 170 til ca 270 g i løpet av forsøket, og veksten så ut til å være omtrent som i usmittet kontrollgruppe (Figur 13). Dette tyder på mild sykdomsutvikling, som bekreftet av histopatologien (se nedenfor)



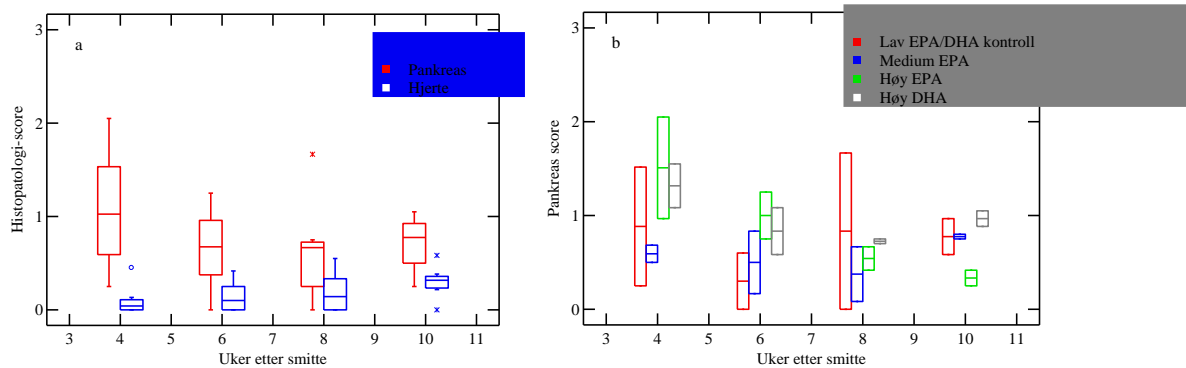
Figur 13 Vekt av prøvefisk tatt ut på ulike tidspunkter etter SAV3-smitte, sammenlignet med usmittet kontroll.

5.3.2 Virustall

Mengden SAV i hjerte var høyest 4 uker etter smitte og på dette tidspunktet var infeksjonsnivået lavest (høyest CT-verdi) i fisken som hadde fått kontrollfôret med lavt EPA- og DHA-innhold før smitte (Tabell 5.13). Ved 6 uker etter smitte hadde virusmengden sunket i alle grupper bortsett de som hadde fått Høy EPA-dietten, som da hadde signifikant høyere mengder ($P < 0.05$), og 8 uker etter smitte var forskjellen borte. På slutten av forsøket (10 wpc) var virusmengden litt lavere i gruppene som hadde fått de to diettene med høyt nivå av henholdsvis EPA og DHA (Diett C og D), men ikke signifikant.

5.3.3 Patologi

PD-smitten var vellykket, men smittepresset så ut til å være lavt: forandringene i hjertemuskulaturen var generelt moderate/lave, men litt mer uttalt i pankreas (Figur 14a). Forandringene var mest uttalt (i pankreas) ved 4 uker. Det var stor individuell variasjon i score innen gruppe, noe som ikke er uvanlig ved PD smitte. Dette og generelt lav score gjør det vanskelig å trekke sikre konklusjoner, men en interessant trend å merke seg er at høy EPA ser ut til å gi høye nivåer av virus og patologi tidlig i smitteforløpet, mens det er minst patologi i denne gruppen i recovery-fasen mot slutten av smitteforsøket (Figur 14b, Tabell 18).



Figur 14 Histopatologiscore på ulike tidspunkter etter smitte a) pankreas og hjerte i gjennomsnitt fra all fisk smittet med SAV3 og b) pankreas på ulike tidspunkter etter smitte i fisk fôret med ulike dietter før smitte med SAV3.

Tabell 18 Patologiscore i pancreas og hjerte, samt virustall (CT-verdi) i hjerte fra fisk fôret med ulike fôr og deretter smittet med SAV3 (Hjertescore er sum av score 1-3 for atrium, ventrikkel og epikardium, slik at maximalscore er 9) (gjennomsnitt \pm std.avvik, N=2).

Prefeed	Diet				ANOVA
	Lav EPA/DHA	Medium EPA	Høy EPA	Høy DHA	
4 uker etter smitte					
Pancreas-score	0,88 \pm 0,90	0,59 \pm 0,13	1,51 \pm 0,77	1,32 \pm 0,33	ns
Hjerte-score	0,00 \pm 0,00	0,04 \pm 0,06	0,07 \pm 0,09	0,27 \pm 0,26	ns
CT _{SAV3} i hjerte	35,4 \pm 2,8	33,6 \pm 0,9	33,9 \pm 1,8	32,9 \pm 0,7	ns
6 uker etter smitte					
Pan	0,30 \pm 0,42	0,50 \pm 0,47	1,00 \pm 0,35	0,83 \pm 0,35	ns
Hjerte	0,00 \pm 0,00	0,18 \pm 0,09	0,25 \pm 0,24	0,13 \pm 0,18	ns
CT _{SAV3} i hjerte	38,2 \pm 1,7	37,0 \pm 0,9	33,4 \pm 0,5	35,9 \pm 0,6	*
8 uker etter smitte					
Pan	0,83 \pm 1,18	0,38 \pm 0,41	0,54 \pm 0,18	0,73 \pm 0,04	ns
Hjerte	0,14 \pm 0,08	0,13 \pm 0,18	0,00 \pm 0,00	0,48 \pm 0,09	*
CT _{SAV3} i hjerte	36,9 \pm 4,2	36,9 \pm 0,8	35,7 \pm 0,6	36,1 \pm 1,1	ns
10 uker etter smitte					
Pan	0,78 \pm 0,27	0,78 \pm 0,04	0,33 \pm 0,12	0,97 \pm 0,12	ns
Hjerte	0,46 \pm 0,18	0,29 \pm 0,06	0,15 \pm 0,21	0,30 \pm 0,12	ns
CT _{SAV3} i hjerte	38,0 \pm 2,5	38,2 \pm 1,7	40,6 \pm 2,1	40,4 \pm 3,4	ns

¹ns (not significant) P>0.05, *P<0.05

5.3.4 Microarray resultater

I SAV-forsøket ble det funnet forskjell i uttrykk av 764 gener ved 6 wpc (uker etter smitte) og 677 gener ved 10 wpc. Effektene var likevel små i forhold til i HSMB-forsøket, noe som måtte forventes, siden det her er pre-dietter som sammenlignes og fisken har spist samme fôr etter smitte. Immunresponsene var typisk for virussykdommer og omfattet inflammasjon, aktivering av antiviral immunitet og adaptiv immunrespons (data ikke vist). Forskjeller mellom diettgruppene (fôring før smitte med Lav EPA kontroll vs Høy EPA) ble funnet i 73, 93 and 53 genes ved henholdsvis 0, 6 og 10 wpc. En viktig observasjon var et samsvar mellom endringer på grunn av smitte og forskjeller mellom fôrene, særlig ved 6 wpc (Figur 14) gener aktivert ved infeksjon viste noe høyere uttrykk i laks fôret med høy EPA diett. Dette ble observert for flere virus responsive gener (VRG) som induseres i laks av alle kjente virus (Krasnov et al., 2011b) (kan være knyttet til høyere virusmengde på dette tidspunktet). Flere immunregulatorer hadde økt høyere uttrykk i Høy EPA gruppene allerede før smitte. Lignende observasjoner ble gjort for gener med ukjent rolle i PD; gener som koder for transkripsjonsfaktorer og proteiner involvert i DNA replikasjon, metabolisme av ioner, celle adhesjon og differensiering.

Genes	Feed 0 wpc	Feed 6 wpc	Feed 10 wpc	PD 6 wpc	PD 10 wpc
Immunity					
Viperin	1.17	-1.09	2.18	2.21	2.08
Unknown	1.45	1.50	1.93	1.80	1.98
Ubiquitin-like protein-1	1.12	1.49	1.88	3.44	3.07
Fish virus induced TRIM-3	-1.26	1.31	1.68	1.64	1.66
52 kDa Ro protein-1	1.29	1.42	1.58	1.92	2.05
Gig1-2	1.26	1.07	1.55	1.79	1.77
Transport-associated protein	-1.66	2.00	1.35	1.68	1.40
C1R/C1S subunit of complement	1.77	1.01	1.01	2.04	1.92
G protein-coupled receptor 12	1.18	2.56	1.16	9.83	3.40
Cytokine-inducible SH2-containing	1.64	-1.21	1.27	1.74	1.57
Annexin A2-A	1.52	-1.01	1.19	1.37	2.24
Plastin-2	2.30	1.16	-1.29	1.83	1.98
Cell structures and processes					
Tumor protein p53 binding protein_2	1.28	-1.06	-1.66	-1.22	-1.72
Chromatin assembly factor 1A	1.40	1.30	-1.77	-1.58	-1.14
Structural maintenance of chromosomes	1.53	1.03	1.01	2.16	1.75
Chromosome transmission fidelity 8	1.07	2.26	1.16	6.67	2.38
DNA replication complex GINS PSF3	1.25	2.36	1.13	7.77	3.02
DNA replication licensing factor mcm2	1.11	1.25	-1.67	-2.49	-1.48
Espin-like protein	1.07	2.71	1.34	7.40	2.88
TBC1 domain family member 5	1.22	2.45	1.12	5.32	2.53
Neuronal calcium sensor 1	-1.03	2.15	1.07	3.97	2.13
SplA/ryanodine receptor domain	-1.04	1.04	1.66	1.70	1.56
Transient receptor cation channel	-1.08	-1.19	1.68	1.97	1.77
Initiation factor IF-2, mitochondrial	-1.13	2.31	1.27	15.25	5.37
Tissue structures and processes					
Intercellular adhesion molecule 2	2.05	1.11	1.24	2.29	2.71
Kazrin-A	1.19	2.35	1.18	4.60	2.21
CD97	-1.25	2.66	1.31	15.17	4.38
C-terminal-binding protein 2	1.15	2.24	1.19	5.63	2.41
Zinc finger BED domain	-1.13	1.96	1.18	3.17	1.82
Zinc finger protein 572	1.37	2.09	1.15	4.77	2.38
Beta-1,3-glucosyltransferase	-1.28	2.22	1.11	3.23	1.67

Figur 14 Eksempler på forskjellig uttrykte gener i PD-forsøket, microassay resultater. De tre første kolonnene (Feed) gir ratio mellom diet C (høy EPA) og A (lav EPA) gitt før smitte. De to siste kolonnene (PD) gir ratio mellom smittet fisk og usmittede kontrollfisk. Signifiante endringer i genuttrykk er markert med rød skrift.

5.4 Diskusjon

Prosjektet har vist at fôring med en diett med høyt innhold av EPA etter PRV-smitte gir en kraftig nedregulering av immungener i hjerte. Dette må forventes å kunne ha en beskyttende effekt mot sykdommen, siden dødsårsaken hos fisk som dør av HSMB ser ut til å være sirkulasjonssvikt på grunn av de store inflammatoriske vevsforandringene i hjertet. Resultatene bidrar derfor til å forklare observasjonene vi gjorde på Averøy hvor et kommersielt fôr med forhøyet EPA-innhold reduserte dødeligheten fra 10-50 % til 0 % i forbindelse med et HSMB-utbrudd (Hatlen et al., upubliserte resultater). Mens man ikke har kunnet utelukke at fôrene den gang hadde andre avgjørende ulikheter

enn innholdet av EPA, styrker våre data fra dette forsøket hypotesen om at EPA-innholdet i fôr har en avgjørende effekt på patogenesen. Det er kjent at selv høye nivå av PRV kan være til stede i vev uten at fisken tar skade av det. Tilsynelatende er det slik at viruset blir patogent under spesifikke cellulære miljøbetingelser. Resultatene fra dette og tidligere studier tyder sterkt på at fettsyresammensetning i vevet, avhengig av fôr, spiller en avgjørende rolle. Sammensetning i alle undersøkte vev før og etter smitte bar klart preg av de ulike fôrene fisken hadde fått. Dette stemmer med all litteratur, som viser at fiskens fettsyresammensetning reflekterer fôrets (se f.eks review av Torstensen et al., 2013).

Selv om den antiinflammatoriske effekten av EPA i laks har vært vist tidligere (Martinez-Rubio et al., 2012), så var endringene større og trenden klarere i dette studiet. I tillegg varierte vi, i den grad det er mulig, kun innholdet av EPA i fôrene som ble gitt etter smitte, mens Martinez-Rubio et al (2012) samtidig gjorde andre endringer.

Trolig som et resultat av den kraftige immunsuppresjonen i hjerte 6 uker etter smitte, var det en signifikant lavere patologiscore i myokard i fisk som hadde fått høy EPA-diett enn i fisk gitt kontroldiett, og dette bidrar til å bekrefte forklaringen ovenfor. Det var likevel generelt moderate patologiske forandringer i alle grupper, og forskjellen i hjertepatologi mellom de to fôrene var forholdsvis små.

Årsakene til at histopatologi alene ikke ga et mer klart bilde i dette forsøket kan være flere. Det kan være at forskjellene hadde blitt tydeligere dersom fisken hadde fått de samme fôrene både før og etter smitte, slik at forskjellene i fettsyresammensetning fiskevevet hadde blitt ennå større. Det kan også være forbedringspotensiale i smitte modellen for å ta ut fôreffekter (smittepress, varighet, temperatur, etc). Både den moderate graden av vevsforandringer og den tilsynelatende uaffiserte apetitten til fisken smittegruppene i dette forsøket tyder på at fisken ikke var spesielt syk i noen av gruppene og at potensialet for forbedring derfor kan ha vært begrenset.

Trolig er det flere faktorer, muligens knyttet både til fisken og miljøet, som må være tilstede for at fisk som er infisert med PRV skal utvikle HSMB. I dette forsøket var det en utvikling av fôrindusert leversteatose samtidig med utvikling av hjertepatologi. Forskjellen mellom diettene i hjertepatologi sammenfalt også i tid med forskjell i leverpatologi. Dette sammenfallet er interessant, siden fettakkumulering i lever i pattedyr er kjent for å virke proinflammatorisk (Brown & Kleiner, 2015). Det er vist i ulike forsøk at reduksjon av marint fett i fôr til laks, og økning av mengde planteolje, gir økt fettinnhold i lever og i mange tilfeller fettlever (se Torstensen et al., 2013). Dette kan være delvis knyttet til andre komponenter, som fytosteroler eller mettet fett, men EPA og DHA i fôret kan også redusere fettavleiring i lever (Ruyter et al., 2006).

En mulig forklaring på ulik patologiutvikling i ulike forsøk kan derfor muligens være knyttet til hvorvidt fisken akkumulerer fett i lever og utvikler ulike grader av steatose, eller fettlever. Hvorvidt fisk utvikler fettlever når den gis fôr med redusert innhold av marint fett er trolig også avhengig av faktorer som fiskevekt, veksthastighet (fôrinntak) og totalt fettinnhold i fôret. Her kan det ligge viktige forskjeller mellom sykdomstilfeller i felt og de fleste modellsmitteforsøk. Fisken i vårt forsøk var ca 180 g da den gikk inn i smitteforsøket og det er vanlig å kjøre slike smitteforsøk på postsmolt kort tid etter overføring til sjøvann. Fisken i det nevnte forsøket på Averøy var derimot rundt 0,5 kg da sykdommen brøt ut, noe som trolig er mer representativt for en typisk situasjon i felt. Vår erfaring fra forsøk er at små fisk

sjelden utvikler fettlever. Heller ikke i dette forsøket kunne økt fett i lever påvises ved kjemiske analyse, men små endringer kunne ses ved histopatologi.

Det var forventet at fôring før smitte skulle være avgjørende for fettsyresammensetning i vev, mens fôring etter smitte skulle være mer avgjørende for sirkulerende nivåer av EPA. Men forandring i fettsyresammensetning i vev var allerede tydelig ved 6 uker etter smitte i HSMB-forsøket, hvor fisken fikk to ulike fôr. Dette gjør at en ikke kan si noe sikkert om effekter av fôring med høyt innhold av DHA, som bare ble gitt før smitte. Det er heller ikke mulig å si om fôret med medium innhold av EPA hadde vært tilstrekkelig til å gi effekter på genekspresjon og patologi. Trolig er dette avhengig av lengden på fôringsperioden.

Fisken i PD-smitteforsøket ble bare fôret ulike fôr før smitte, mens fisken i begge karene fikk samme diett (lav EPA) etter smitte. Dette var basert på tidligere erfaring som tilsa at fisken ville bli nær anorektisk etter smitte. Basert på prøvevekter ser det imidlertid ut som fisken i dette PD-forsøket hadde fôrintak etter smitte på linje med usmittet fisk. Basert på fettsyreanalyser av fisk fra HSMB-forsøket, som viste at fiskevevet raskt endret fettsyreprofil til å reflektere postdiett, så er det grunn til å tro at forskjellene i vevsprofil var kraftig fortennet da vi gjorde våre histopatologiske og biokjemiske undersøkelser av fisken 4-10 uker etter smitte. Til tross for dette ble det sett noen interessante trender, særlig knyttet til mulig forbedret evne til recovery fra sykdom, som gir håp om lignende effekter som de en ser med HSMB, dersom fisken gis kontinuerlig fôring med økt EPA.

5.5 Konklusjon

Prosjektet har vist at forskjellene vi tidligere har sett i dødelighet mellom fôr i felt med stor sannsynlighet kan knyttes til ulikt nivå av EPA, og at hovedeffekten av EPA er en massiv immunsuppresjon i hjertet. Dette reduserer trolig utviklingen av inflammatoriske vevsskader i hjertet, som ellers kan være dødelig for fisken.

Fisken i smitteforsøkene spiste såpass mye etter smitte at dette fortennet effekten av fôring før smitte på fettsyresammensetning av vev. Forsøket ga derfor ikke klare svar på hvor mye EPA som må tilsettes for å få effekt på HSMB, eller om DHA ville gitt samme effekt som EPA. På den andre siden var fettsyresammensetningen i hjertet ved 6 uker etter smitte, da effekten av fôring etter smitte på patologiscore var klarest, fortsatt noe preget av fôring før smitte. Det kan ikke utelukkes at deler av effekten skyldes sammensetning av sirkulerende fettsyrer som fisken tar opp fra fôret, mer enn vevssammensetning.

Det bør gjøres mer arbeid for å finne ut hvordan marine fettsyrer kan utnyttes mest mulig optimalt for å hindre sykdom på en ressurseffektiv måte. Det at vi fikk såpass gode effekter av å starte fôring med høy EPA først i det fisken ble smittet, gir godt håp for utvikling av en tilpasset strategi som er gjennomførbar selv med dagens begrensede tilgang på marine oljer.

Immunsuppresjonen i hjerte er trolig knyttet til endret fettsyresammensetning i hjertevevet. EPA ga også redusert grad av microvesikulær steatose i lever, som sammenfalt med forbedring i hjertepatologi. Fettakkumulering i lever er kjent å virke proinflammatorisk og betydningen av dette i patogenesen av HSMB bør studeres nærmere.

Det var tendenser til effekt av ulike fôr før smitte i PD-smittet fisk som kan tyde på at dersom fisken hadde fortsatt å få de ulike fôrene (særlig høy EPA) også etter smitte, så hadde dette kunnet gi lignende effekter som det en så i den HSMB-smittede fisken. Dette må imidlertid utforskes nærmere.

6 Leveranser

Det foreligger referat fra tre styringsgruppemøter (27/1-14, 11/2-14, 20/10-14). Det er avholdt ett møte uten referat (13/1-15). Alle styringsgruppemøter er avholdt per telefon/Skype.

Prosjektet har blitt løpende presentert på ulike nasjonale møter:

- FHF Dialogmøte: Endret fettsyresammensetning av fôr til laks og mulige konsekvenser for fiskehelse, 15. mai 2014, Park Inn Hotell, Gardermoen.
- FHF's fiskesamling 27.-28. oktober 2014, Rica Hell hotell, Værnes
- FHF Dialogmøte: Endret fettsyresammensetning av fôr til laks og mulige konsekvenser for fiskehelse, 21. januar 2015, Park Inn Hotell, Gardermoen
- Frisk Fisk-Konferansen 2015, 3.-4. mars 2015 Radisson Blu Hotel, Tromsø.
- FHF's fiskehelsesamling 1.-2. september 2015, Clarion Hotel Bergen Airport, Flesland (To separate presentasjoner basert på prosjektet)
- FHF Dialogmøte: Endret fettsyresammensetning av fôr til laks og mulige konsekvenser for fiskehelse, 25. november 2015, Clarion Hotel Bergen Airport, Flesland

Det har vært ett presseoppslag om prosjektet: «Rett feitt er viktig for overleving av HSMB», Intrafish.no, 4. september 2015; <http://www.intrafish.no/norsk/nyheter/article1419014.ece>

Deler av arbeidet vil bli presentert på Konferansen Havbruk 2016, Bodø, april 2016.

Det er planlagt en vitenskapelig artikkel med vekt på effekt av EPA på HSMB.

7 Kvalitetssikring

Det vitenskapelige arbeidet er gjennomført av kvalifisert personell i henhold til vitenskapelige standarder som sikrer mulighet til publisering av resultatene i tidsskrift med referee-ordning.

Smitteforsøket ble utført ved VESO Vikan i henhold til Good Laboratory Practice (GLP; EO Council Directive 2004/10/EC) og «Good Manufacturing Practice» (GMP; Directive 2003/94/EC og 91/412/EC). Forsøket var godkjent av Forsøksdyrutvalget (godkjenning nr 6422).

Rapporten har vært kvalitetssikret etter interne rutiner i Nofima, som omfatter faglig kvalitetssikring av førsteforfatter og minst en medforfatter eller annen kollega, godkjenning av forskningssjef og kvalitetssikring av layout i forhold til gjeldende maler.

8 Referanser

- Brown, G.T., Kleiner D.E., 2015. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*. doi: 10.1016/j.metabol.2015.11.008. [Epub ahead of print]
- Calder, P.C., 2010. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients* 2, 355-374.
- Dahle, M.K., Wessel, O., Timmerhaus, G., Nyman, I.B., Jorgensen, S.M., Rimstad, E., Krasnov, A., 2015. Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV), *Fish & shellfish immunology* 45, 780-790.
- Finstad Ø.W., Falk, K., Løvoll, M., Evensen, Ø, Rimstad, E. 2012. Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res.* 43, 27.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497-509.
- Gillies, P.J., Bhatia, S.K., Belcher, L.A., Hannon, D.B., Thompson, J.T., Vanden Heuvel, J.P. 2012. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J. Lipid Res.* 53, 1679-1689.
- Helland, S.J., Grisdale-Helland, B., Nerland, S. 1996. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture* 139, 157-163
- Karlsen, M., Tingbø, T., Solbakk, I.T., Evensen, Ø., Furevik, A., Aas-Eng, A. 2012. Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Vaccine* 30, 5688-5694.
- Kjaer, M.A., Vegusdal, A., Gjøen, T., Rustan, A.C., Todorcević, M., 2008. Effect of rapeseed oil and dietary n-3 fatty acids on triacylglycerol synthesis and secretion in Atlantic salmon hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1781, 112-22.
- Kongtorp, R.T., Taksdal, T., Lyngøy, A., 2004. Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 217-224.
- Krasnov, A., Timmerhaus, G., Afanasyev, S., Jørgensen, S.M. 2011a. Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 6, 31-38.
- Krasnov A, Timmerhaus G, Schiøtz B.L., Torgersen, J., Afanasyev, S., Iliev, D., Jørgensen, J. Takle, H., Jorgensen, S.M. 2011b. Genomic survey of early responses to viruses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, *Molecular immunology* 49, 163-174.
- Krasnov, A., Timmerhaus, G., Afanasyev, S., Takle, H., Jorgensen, S.M., 2013. Induced erythropoiesis during acute anemia in Atlantic salmon: a transcriptomic survey. *General and comparative endocrinology* 192,181-190.
- Martinez-Rubio, L., Morais, S., Evensen, Ø., Wadsworth, S., Ruohonen, K., Vecino, J.L.G., Bell, G., Tocher, D.R., 2012. Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV). *PLOS ONE* 7 (11): e40266. DOI:10.1371/journal.pone.0040266, 17 pp.
- Martinez-Rubio L., Evensen Ø., Krasnov A., Jørgensen S.M., Wadsworth S., Ruohonen K., Vecino J.L.G., Tocher D.R. 2014. Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV). – *BMC Genomics* 15, 462.
- Mason, M.E., Waller, G.R. 1964. Dimethoxypropane induces transesterification of fats and oils in preparations of methylesters for gas chromatographic analyses. *Anal. Chem.* 36, 583.

- Palacios, G., Lovoll, M., Tengs, T., Hornig, M., Hutchison, S., Hui, J., Kongtorp, R.T., Savji, N., Bussetti, A.V., Solovyov, A., Kristoffersen, A.B., Celone, C., Street, C., Trifonov, V., Hirschberg, D.L., Rabadan, R., Egholm, M., Rimstad, E., Lipkin, W.I., 2010. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One* 5(7):e11487. doi: 10.1371/journal.pone.0011487. 7 pp.
- Ruyter, B., Moya-Falcon, C., Rosenlund, G and Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture*. 252, 441-452.
- Schierle, J., Faccin, N., Frey, C., Riegert, V., 2008. Determination of Carophyll Pink Astaxanthin in Premixes and Fish Feeds. v1.7. DSM Nutritional Products.
- Tadiso, T.M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., Nilsen, F., 2011. Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition, *BMC genomics* 12, 141.
- Torstensen, B.E., Ruyter, B., Sissener, N., Østbye, T.K., Waagbø, R., Jørgensen, S.M., Ytterborg, E., Rud, I., Liland, N., Mørkøre, T., Dessen, J.E., 2013. Utredning: Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet. Rapport FHF prosjekt nr. 900889. 80 pp.

