

Havs- och vattenmyndigheten
Box 11 930
404 39 GÖTEBORG
havochvatten@havochvatten.se

Provtagning avseende renibakterios/BKD i vild laxfisk i Umeälven, Ångermanälven, Faxälven och Ljungan

**Delprojekt inom SVA:s hälsoövervakning av vildlevande fisk, kräft-
och blötdjur**



Kaitumjaure, Norrbotten. Foto: Charlotte Axén

Innehåll

Sammanfattning	3
Introduktion	3
Syfte	4
Material och metoder.....	4
Provinsamling	4
Provuttag	7
Laboratorieanalyser	7
Databearbetning.....	8
Resultat	8
Provinsamling	8
Provuttag	8
Analyser	10
Diskussion	13
Många fiskar var positiva i ELISA men endast en var positiv i PCR.....	13
Vattentemperaturens inverkan på analysresultaten.....	14
Sik och harr var i högre grad ELISA-positiva än röding och öring	14
Nästan alla ELISA-positiva hittades i Ljungan	15
Enstaka ELISA-positiva fiskar hittades i uppströms provtagningspunkter.....	15
eDNA-metodiken behöver utvecklas om den ska kunna utvärderas fullt ut	15
Slutsats.....	16
Referenser.....	17
Appendix	18

UPPDRAG

Havs- och vattenmyndigheten (HaV) har gett SVA i uppdrag att övervaka hälsan hos vildlevande fisk, kräftdjur och blötdjur. Övervakningen har ett antal delprojekt varav övervakning av sötvattensfisk är ett. Under 2020 gjordes denna övervakning i form av undersökningar avseende renibakterios (BKD) på vild laxfisk och resultaten redovisas i denna rapport.

SAMMANFATTNING

Provtagning avseende sjukdomen renibakterios/BKD genomfördes på vild laxfisk i fyra vattensystem (Umeälven, Ångermanälven, Faxälven och Ljungan) under sommaren 2020. I vattensystemen ligger odlingsanläggningar som har eller har haft BKD de senaste sju åren. Syftet var att undersöka risk för etablering av smitta i vildpopulationen till följd av en strategi med fördröjda saneringar. Resultaten visar att etablering av smitta i vildpopulationen sker och att sik och harr förefaller mycket mottagliga för smitta.

INTRODUKTION

BKD är en smittsam, kroniskt progressiv sjukdom hos laxfisk orsakad av den intracellulära bakterien *Renibacterium salmoninarum*. Sjukdomen förekommer i både söt- och saltvatten och i de flesta delar av världen där laxfisk odlas eller förekommer vilt. Smittan överförs direkt mellan fiskar både horisontellt (från fisk till fisk) och vertikalt (från hona till rom), via vatten, foder eller kontaminerade föremål. Vanligen tar det minst sex månader efter smittillfället innan tydliga symptom kan observeras. Under tiden kan smittspridning ske genom direktkontakt eller via utsöndring av bakterier i vattnet, vilket gör att smittan ofta är väl etablerad i en anläggning innan den upptäcks. Samtidigt blir fiskens immunförsvar försämrat och risken för sekundära infektioner ökar. Över tid bildas tuberkulosliknande granulom i fiskens inre organ och ibland kan även små sår och blåsor i hud och muskulatur (så kallad spawning rash) ses. Vid stress kan sjukdomen akutiseras och leda till utbrott med hög dödlighet. Av de laxfiskarter som finns naturligt i svenska vatten är röding och lax känsligast, där 80% dödlighet har observerats vid akuta utbrott i odling. Öringen är intermediärt känslig medan känsligheten hos harr och sik är dåligt undersökt. Regnbåge, som inte förekommer naturligt i svenska vatten men är den dominerande arten inom vattenbruket är mer motståndskraftig mot att utveckla tydlig klinisk sjukdom. En kontinuerlig låg dödlighet och något minskad tillväxt, vilket kan vara svårt att uppmärksamma, kan vara enda symptom. Samtidigt sprids bakterier kontinuerligt till omgivande vatten och mer känsliga arter.

I vattensystem där BKD-smitta konstaterats i kassodlingar och där det finns vilda populationer av röding, öring, harr och sik, finns risk för etablering av smittan i vilda bestånd och vidare spridning i vattensystemet. En bedömning av hur lätt smittan etablerar sig i den vilda fiskpopulationen är nödvändig för att kunna göra riskbedömningar för återinfektion av sanerade odlingar, och för att bedöma risken för att andra odlingar i samma vattensystem smittas.

Sverige har för närvarande ett utrotningsprogram avseende BKD. Programmet innebär att Sverige ska motverka smittspridning genom obligatorisk provtagning av laxfiskanläggningar och att smittade anläggningar ska slaktas ut och saneras. Provtagningsintervallen bestäms utifrån Jordbruksverkets riskkategorisering. Alla vilda lax- och öringhonor samt en del sik och harr som tas in för avel inom kompensationsodlingen provtas också efter romstrykning för att säkerställa att avkomman inte smittats med BKD. Sanering av infekterade matfiskanläggningar fördröjs ofta i flera år för att fisken ska tillåtas uppnå slaktstorlek. Denna strategi riskerar att sprida smittan till vild fisk, då vild fisk blir exponerad för smitta från infekterad kassodlad fisk. Det innebär också en hög risk för återintroduktion av smittan när ny fisk sätts in i anläggningen, vilket skapar en ond cirkel och permanentar smittan i vattenområdet.

Sedan 2013 har det skett en ökning i antal påvisade fall av BKD, men det rör sig i de flesta fall om smitta på flera anläggningar inom samma vattenbruksföretag och återinfektion efter sanering och nyintroduktion av fisk. Merparten av påvisade fall finns inom tre vattensystem: Ljungan, Umeälven och Ångermanälven inklusive Faxälven.

Syfte

Vi har tidigare bekräftat att BKD kan påvisas i vildfisk i vattenområden med BKD-smittade anläggningar (SVA, 2016). Syftet med detta projekt var att göra en mer omfattande undersökning av vildfisk i några vattensystem där BKD konstaterats i odling 2013 – 2019 för att bedöma risken för etablering i vildfiskpopulationer och spridning i vattensystemen till följd av fördröjd sanering av anläggningar.

MATERIAL OCH METODER

Provinsamling

Provtagning för BKD bör ske vid vattentemperaturer på 7 – 15°C, det temperaturspann där bakterien är mest aktiv och man därför har störst chans att påvisa smitta. På hösten ska vattentemperaturen ha legat stabilt under 15°C i minst två veckor innan provtagning och i den perioden genomförs den stora massan av BKD-provtagningar inom den offentliga kontrollen. För att hinna med diagnostik, bearbetning och rapportering avseende vildfisken planerades provinsamling till slutet av maj-mitten av juni och analyser till andra halvan av juni.

Provtagningspunkter

Provtagningarna fokuserades till de vattensystem där smitta påvisats i flest anläggningar och risken för permanent smitta bedömdes som hög, nämligen Ljungan, Umeälven och Ångermanälven inklusive Faxälven. Faxälven och Ångermanälven räknades som separata vattensystem då anläggningar med påvisad BKD-smitta i de två älvarna finns uppströms sammanflödet strax uppströms Sollefteå. Länsstyrelsen i Jämtland (Faxälven och Ljungan) respektive Västerbotten (Ångermanälven och Umeälven) ombads utse tio provtagningspunkter per vattensystem, där en provtagningspunkt skulle räknas som helt opåverkad (ingen utplanteringsverksamhet, ingen möjlighet för fisk att förflytta sig från potentiellt smittade vattenområden till provtagningspunkten. Resterande nio provtagningspunkter fördelades uppströms och nedströms anläggningar som klassas som BKD-infekterade eller som har sanerats avseende BKD de senaste sju åren. Fördelning av planerade provtagningspunkter i respektive vattensystem kan ses i **Bild 1**.

Fisk

Från varje provtagningspunkt skulle 30 fiskar av arterna röding, öring, sik eller harr samlas in, vilket innebär 300 fiskar per vattensystem och 1200 fiskar totalt. Av logistiska skäl beslutades det att max två fiskar per punkt skulle genomföras oavsett om man därigenom uppnådde 30 fiskar eller inte. Vattentemperaturen mättes på en meters djup i samband med fisket, och de laxfiskarter som finns i respektive vattenområde (den vattenmassa där fisken kan röra sig fritt, dvs det finns inga vandringshinder) noterades.

Direkt efter fångst frystes fisken för att möjliggöra färre och större inskick till SVA. Fryst fisk håller dessutom bättre under transport eftersom förruttelse undviks och avseende BKD-diagnostik finns inga nackdelar med att fisken fryses innan analys.

Vatten och sediment (eDNA)

eDNA har blivit ett populärt sätt att påvisa närvaro av arter och smittämnen i olika vattenområden. Samtidigt som fisket genomfördes samlades därför 2 x 5 L vatten in från provtagningspunkterna för att utvärdera om eDNA-metodik kan användas för att påvisa BKD-bakterier i vatten. Om enbart ett fiske behövde genomföras skulle båda dunkarna fyllas samtidigt, och om två fisken behövde genomföras skulle en vattendunk fyllas vid första fisket och en dunk vid andra.

Bottensediment samlades in i två omgångar under en kassodling som haft BKD-infekterad regnbåge i anläggningen fram till någon vecka innan första provinsamlingen. Den första provtagningen gjordes på fem punkter i anläggningen samt en bit uppströms (referenspunkt). Uppföljande provtagning gjordes i en punkt i anläggningen samt referenspunkten. Provtagningarna gjordes för att se om eDNA från BKD-bakterier kan påvisas i sedimentet under en infekterad odling.

Liksom fisken frystes vattendunkar och sedimentprover direkt efter provtagning för att möjliggöra senare transport och analys.

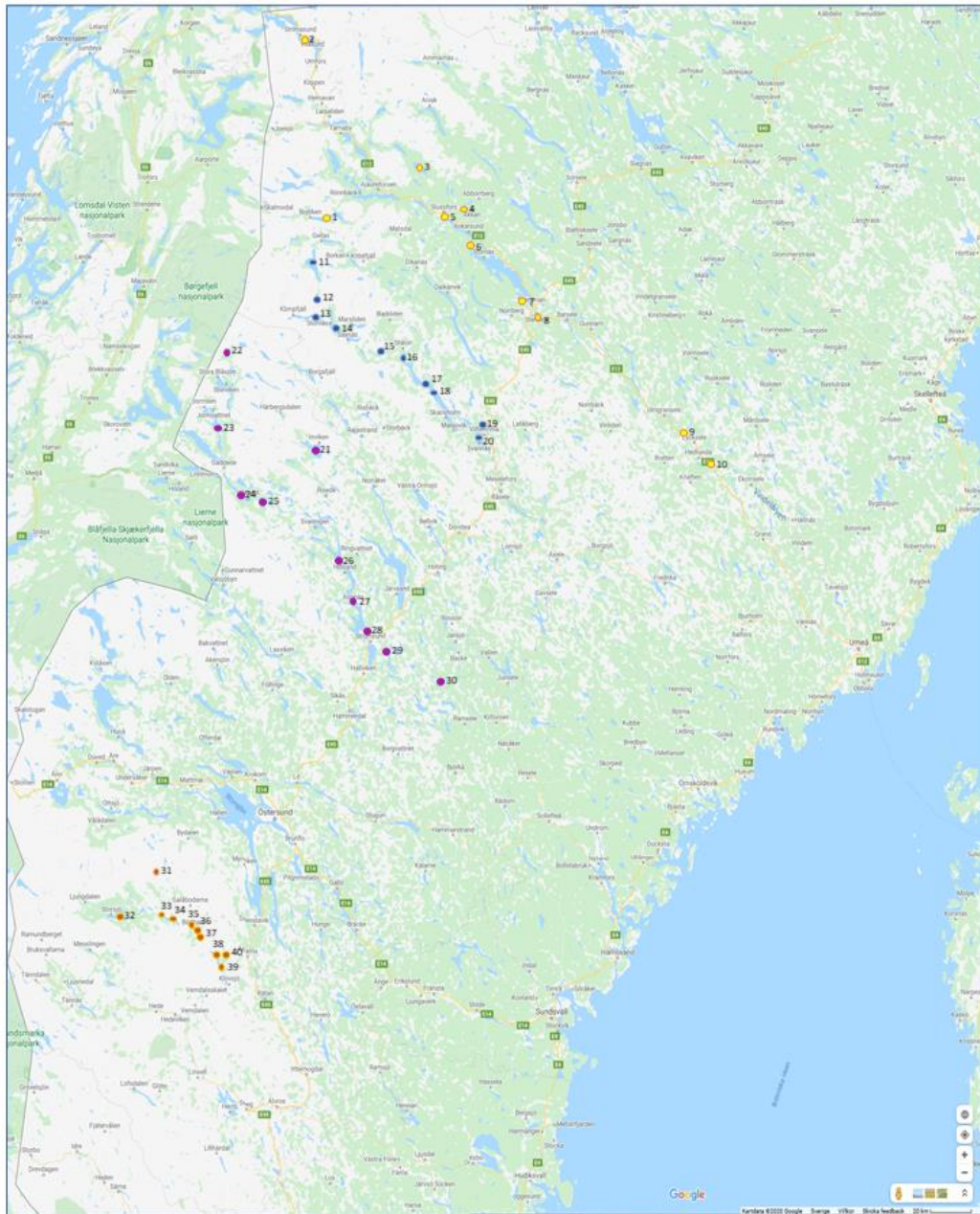


Bild 1. Provtagningspunkter (fisk och vatten för eDNA-analys) avseende BKD i vildfisk 2020 (gult/1-10 = Umeälven, blått/11-20 = Ångermanälven, lila/21-30 = Faxälven och orange/31-40=Ljungan). Punkten med lägst nummer per vattensystem representerar den opåverkade lokalen. Provtagningspunkterna finns listade med namn i **Tabell 1, Appendix** och **Tabell 2, Appendix**. Kartunderlag från Google maps.

Provuttag

Fisk

Från Jämtland skickades fisk till SVA för provuttag. Fisken i Västerbotten provtogs av SVA-personal på SLU i Umeå och uttagna prover skickades ner till SVA för analys.

Cirka 1 g njurvävnad togs från varje fisk, i första hand vävnad som uppvisade sjukliga förändringar. Därefter togs ett svabbprov genom att en steril bomullstopps drogs genom hela den resterande delen av njuren.

Art och eventuella sjukliga förändringar i fisken noterades i en journal. Längd noterades som min-max eller ett snittvärde på alla fiskar av samma art från provtagningspunkten. Data avseende vattensystem, provtagningspunkt, fiskedatum samt vattentemperatur fördes också in i journalen.

Vatten och sediment (eDNA)

Vatten filtrerades med hjälp av en peristaltisk pump, där vattnet passerar ett filter som fångar upp partiklar inklusive eDNA. Mängd filtrerat vatten och filtreringstid noterades i en logg. Filtren frystes därefter i väntan på analys. Länsstyrelsen i Jämtland filtrerade sitt vatten själva, medan insamlat vatten från Västerbotten filtrerades på SLU i Umeå eller på SVA.

Eftersom mängden sediment/prov var relativt stor (ca 1 kg) och enbart en liten mängd kan analyseras togs ett antal delprover ut för att öka analyskänsligheten.

Laboratorieanalyser

Fisk

SVA:s rutindiagnostik avseende BKD inkluderar två analysmetoder. Primärt utförs en polyklonal BKD-ELISA (Jansson et al., 1996) på njurvävnad. Metoden går ut på att påvisa ett renibakterie-specifikt protein, som binder till antikroppar i analysmediet. Analysresultaten (absorbansvärden) avläses på en kontinuerlig skala med tre decimaler, där ett absolut värde (0.100) används som nedre gräns för vad som anses positivt.

Från fiskar som blir positiva i ELISA analyseras en njursvabb för påvisande av renibakterie-DNA med hjälp av Realtids-PCR (Jansson et al., 2008). Om även PCR-resultatet är positivt anses provet vara positivt för BKD. Vid negativt PCR-resultat utförs en ny ELISA med en annan antikropp för att verifiera att BKD-protein påvisats. Om även den sekundära ELISA:n ger utslag för BKD blir provets slutliga status "misstänkt positiv", annars anses provet som negativt.

Vatten och sediment (eDNA)

Miljöproverna analyserades med Realtids-PCR (Jansson et al., 2008). Här användes dessutom en kontroll för att säkerställa att eDNA isolerats från filter och sediment. Detta gjordes med en Realtids-PCR för öring-DNA (Gustavson et al., 2015). Öring-PCR:en sattes upp och utvärderades innan provtagningarna. Det visade sig att PCR:en i viss grad även detekterar lax och röding. Däremot detekterar den inte regnbåge, sik, eller harr. Även gädda och abborre testades i egenskap av "icke laxfiskar" med negativt resultat. Eftersom sedimentproverna härrörde från en regnbågsodling skickades ett urval av delprover till Naturhistoriska riksmuseet, som har en Realtids-PCR avseende regnbågs-DNA (Thomsen et al., 2012; Wilcox et al., 2015; Rusch et al., 2018).

Databearbetning

Efter genomförda laboratorieanalyser extraherades all data avseende fisk och vattenprover från journalsystemet och överfördes till statistikprogrammet R för deskriptiv statistisk bearbetning. Sedimentproverna har inte inkluderats i den statistiska bearbetningen.

RESULTAT

Provinsamling

Fisken genomfördes 9/6 - 12/8 i Västerbotten och 16/5 - 12/8 i Jämtland. I Västerbotten fiskades alla förutbestämda provtagningspunkter, men i en provtagningspunkt resulterade fisket enbart i fångst av gädda, abborre och lake (Gardsjön, Umeälvens vattensystem). I Jämtland fiskades 19 av 20 förutbestämda provtagningspunkter, då temperaturen i en sjö (Vängelsjön, Faxälvens vattensystem) hann bli stadigt över 15°C och inte sjönk under gränsen igen innan tidsperioden för provinsamling var slut. I några andra punkter genomfördes fiske trots att temperaturen passerat 15°C. Uppmätta vattentemperaturer vid provinsamling varierade mellan 6 och 18.5°C. Alla fisken resulterade inte i 30 fiskar, utan resultatet varierade mellan 9 - 32 fiskar. Data avseende provtagningspunkterna finns i **Tabell 1, Appendix** (Västerbotten) och **Tabell 2, Appendix** (Jämtland).

Vatten samlades in från alla provtagningspunkter, men i några provtagningspunkter togs av misstag enbart 5 L (en dunk) vatten och i en provtagningspunkt togs 20 L (fyra dunkar) vatten.

Den 8/7 togs sex sedimentprover á ca 1 kg under en fiskodling. Bottentemperaturen var 6.5°C. Tre prover togs i odlingsläge där infekterad regnbåge vistats till ca en vecka innan provtagning, två prover togs i odlingsläge där det gått några månader sedan infekterad fisk vistats samt ett prov togs i en referenspunkt strax uppströms anläggningen. Den 2/10 togs uppföljande sedimentprover á ca 1 kg i en av de tidigare provtagningspunkterna i odlingsläget samt i referenspunkten. Ingen fisk hade vistats i odlingsläget mellan provtagningarna. Uppgift om bottentemperatur vid den andra provtagningen saknas.

Provuttag

Fisk

Maximalt provtogs 30 fiskar per lokal. Vid överskott valdes i första hand mycket liten fisk bort, i övrigt plockades fisk slumpmässigt tills 30 individer provtagits. Totalt provtogs 1059 fiskar. Ingen fisk uppvisade några uppenbara symptom på BKD men flera olika förändringar som kan uppträda vid infektionen noterades. Dessa var lindrig svullnad i bakre delen av njuren, multipla små vita prickar (misstänkta granulom) i njuren samt granulom i andra organ (lever, hjärta (**Bild 2**)). Antalet fiskar med potentiella BKD-symptom redovisas i **Tabell 3, Appendix** (Västerbotten) och **Tabell 4, Appendix** (Jämtland). Simblåsemask (**Bild 2**) förekom frekvent i fisk från några sjöar, t.ex Fågelsjön i Faxälvens vattensystem. Cystformade fettklumpar runt magsäcken förekom frekvent i sik från alla vattensystem och även en del hos övriga arter. Några fiskar hade förkalkade urinledare (nefrokalinos (**Bild 2**)), och en fisk hade en stor urinsten (urolithiasis) vilket är icke-infektiösa tillstånd. De rödingar som inkom från Malgomaj var väldigt ljusa i färgen och smala medan röding från övriga vattenområden var välnärda och hade normal färgteckning (**Bild 2**). Inga sjukdomstecken noterades på rödingarna från Malgomaj.



Bild 2. Övre raden från vänster till höger: sik med multipla granulom i hjärtat, öring med multipla granulom i njuren. Mellersta raden från vänster till höger: sik med simblåsemask, röding med nefrokalcinos. Undre raden från vänster till höger: röding från Malgomaj och röding från Överuman.

Vatten och sediment (eDNA)

Från den provtagningspunkt där fyra dunkar vatten samlats in filtrerades vatten från två dunkar, i övrigt filtrerades vattnet från alla dunkar från alla provtagningsplatser. Beroende på mängden partiklar i vattnet varierade filtreringstiden (ca 20 - 120 min) och mängden vatten som kunde filtreras (ca 3 - 5 L) innan filtret täppte igen.

De sex sedimentproverna från första omgången luktade och såg ut som rester av foder och avföring. I de två uppföljningsproverna fanns ingen lukt och texturen var som sandbotten. Från vardera av de åtta sedimentproverna togs 8 delprover á 0.25 g ut, vilket genererade totalt 64 delprover.

Analys

Fisk

En fisk var för liten (8 g) för att få tillräckligt med material för ELISA. En njursvabb från denna fisk har därför analyserats med PCR utan föreliggande ELISA-resultat. Av resterande 1058 fiskar var 52 st (4.9%) positiva för BKD med ELISA. Fyra fiskar var precis positiva (0.1-0.11) medan resterande 46 var tydligt positiva (>0.11) och åtta till och med hade mycket höga absorbansvärden (0.6-1.2). Utöver de 52 fiskar som var ELISA-positiva hade 17 fiskar förhöjda värden (0.06 – 0.099) i analysen (dvs. inte positiva men inte heller tydligt negativa). Antal och andel ELISA-positiva fiskar per art och vattensystem finns i **Tabell 3**. Geografisk fördelning av alla analysresultaten finns i **Bild 3**. Resultat specificerade per provtagningspunkt och art finns i **Tabell 4, Appendix (Västerbotten)** och **Tabell 5, Appendix (Jämtland)**. Av de 52 ELISA-positiva fiskarna kom majoriteten (n = 50) från Ljungans vattensystem och bestod framförallt av sik (**Tabell 3**). Förekomsten av positiva prover var högst i de två fiskeplatser som ligger närmast nedströms fiskodlingen i Börtnessjön (**Tabell 5, Appendix**). ELISA-positiva prover kom från fisk som fångats i temperaturintervallet 10.4–15.0°C (**Figur 1**). Enbart en av de 52 ELISA-positiva fiskarna var positiv i PCR. Uppföljande ELISA konfirmerade resultaten från den primära ELISA:n. Detta innebär att inga ospecifika reaktioner har skett och av 52 ELISA-positiva prover räknas 51 prover som misstänkt positiva och 1 prov är verifierat positivt genom PCR.

Tabell 3. Provtagning avseende BKD i vildfisk 2020. Jämförelse mellan antalet analyserade fiskar och positiva ELISA-analyser uppdelat på art och vattensystem.

Vattensystem	Röding		Öring		Harr		Sik		Totalt	
	Antal	Positiva (%)	Antal	Positiva (%)	Antal	Positiva (%)	Antal	Positiva (%)	Antal	Positiva (%)
Umeälven	20	0 (0.0%)	71	0 (0.0%)	3	0 (0.0%)	163	0 (0.0%)	257	0 (0.0%)
Ångermanälven	79	1 (1.3%)	70	0 (0.0%)	10	0 (0.0%)	93	0 (0.0%)	252	1 (0.4%)
Faxälven	26	0 (0.0%)	69	1 (1.4%)	51	0 (0.0%)	109	0 (0.0%)	255	1 (0.4%)
Ljungan	19	0 (0.0%)	26	1 (3.8%)	13	6 (46.2%)	236	43 (18.2%)	294	50 (17.0%)
Totalt	144	1 (0.7%)	236	2 (0.8%)	77	6 (7.8%)	601	43 (7.2%)	1058	52 (4.9%)

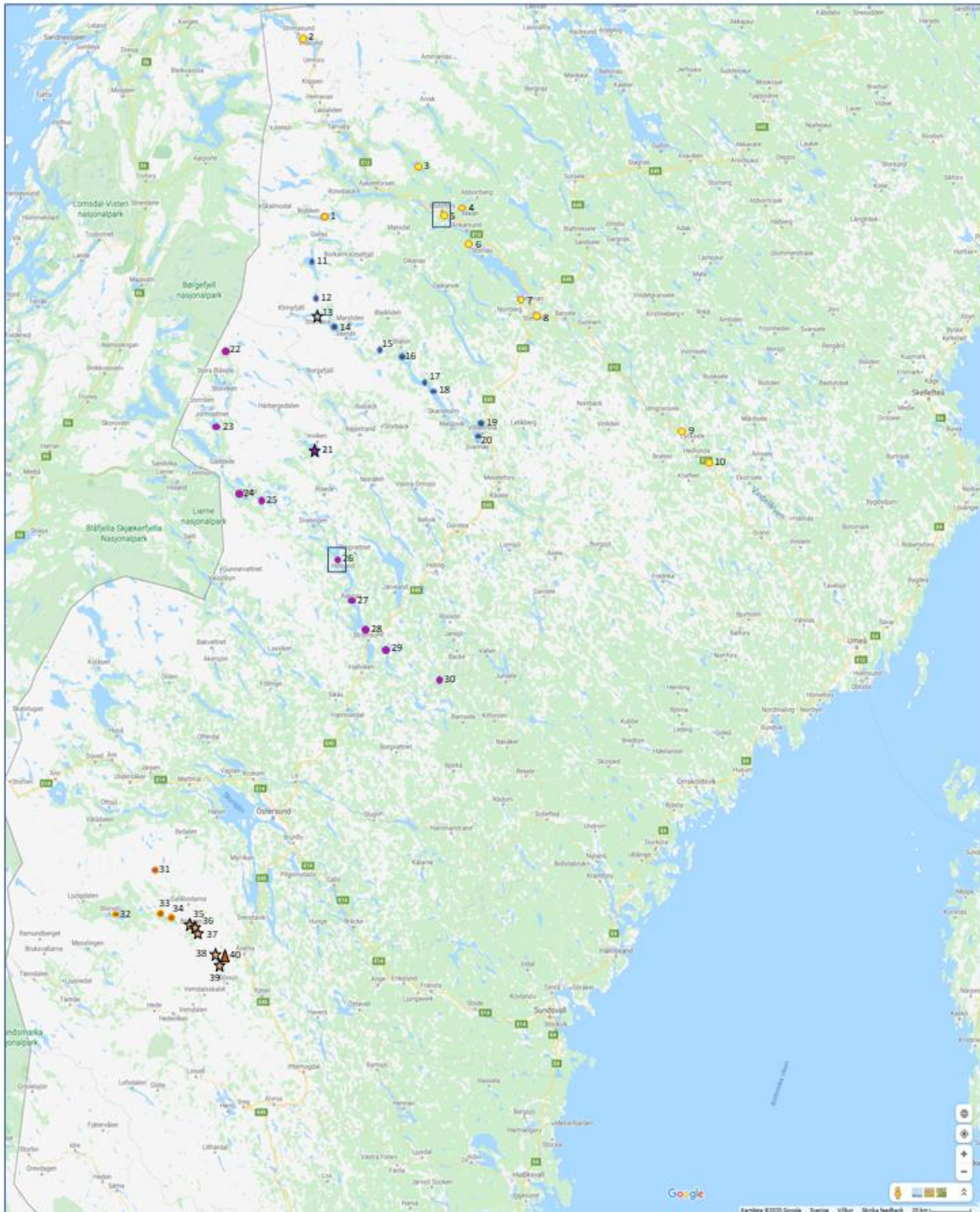
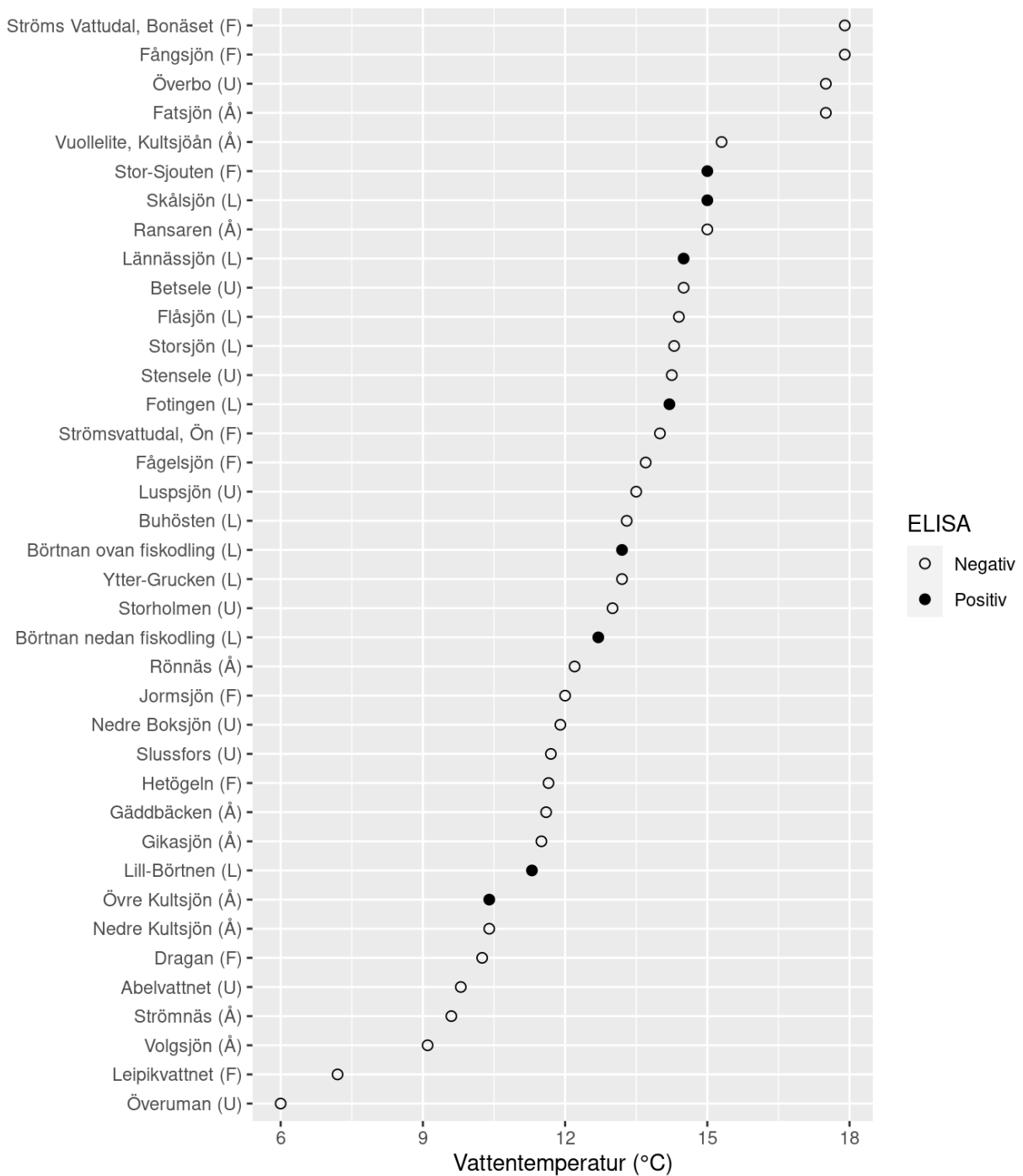


Bild 3. Provtagningspunkter med analysresultat avseende BKD i fisk respektive vatten (eDNA). Rund punkt = all fisk negativ i ELISA, stjärna = ≥ 1 fisk positiv i ELISA, triangel = ≥ 1 fisk positiv i ELISA och PCR, inramad cirkel = PCR-positivt vattenprov. 1-10 = Umeälven, 11-20 = Ångermanälven, 21-30 = Faxälven och 31-40 = Ljungan. Specifik analysinformation per provtagningspunkt finns i **Tabell 4, Appendix** och **Tabell 5, Appendix**. Kartunderlag från Google maps.



Figur 1. Fördelning av vattentemperatur i de olika provtagningspunkterna samt ELISA-resultat (alla fiskar negativa eller minst en fisk positiv). Det vattensystem varje provtagningspunkt tillhör är indikerat med (U): Umeälven, (Å): Ångermanälven, (F): Faxälven eller (L): Ljungan.

Vatten och sediment (eDNA)

I vattenprover från 2 av 38 provtagningspunkter (Dragan, Faxälven respektive Slussfors, Umeälven) påvisades renibakterie-DNA, medan öring-DNA påvisades från 34 av 38 provtagningspunkter. Öring skulle enligt uppgift finnas i alla provtagningsområden. Data avseende eDNA-analysen samt huruvida öring och/eller röding fanns i den fångst som bärgades i samband med att vattenproverna togs finns i **Tabell 6, Appendix**. De två

provtagningsspunkter (nr 4 och nr 30) som inga analyser genomförts för har uteslutits ur tabellen av utrymmesskäl.

Från sedimentproverna påvisades renibakterie-DNA i fyra av sex prover från provtagningsomgången i juli (**Tabell 7**). Två av tre prover (O1-O3) som tagits i odlingsläge som nyligen innehållit BKD-infekterad fisk var positiva, där alla delprover var positiva i en provtagningspunkt (O3). Båda prover (O4, O5) som tagits i odlingsläge där BKD-infekterad fisk förvarats för flera månader sedan var positiva i vardera ett delprov medan referensprovet (O6) var negativt i alla delprover. Alla delproverna från provtagningsomgången i oktober var negativa avseende renibakterie-DNA. Öring-DNA påvisades i två av 64 delprover. Av de 48 delproverna från första provtagningen skickades 12 st till Naturhistoriska riksmuseet. Regnbåge-DNA påvisades i alla 10 prover från odlingsläget, varav fem även var positiva för renibakterie-DNA medan de två proverna från kontrollpunkten var negativa både för renibakterie-DNA och för regnbåge-DNA.

Tabell 7. Provresultat avseende eDNA i sedimentprover. Siffrorna anger antalet delprover per provtagningspunkt där eDNA påvisades respektive inte påvisades.

Provtagningsomgång		Juli						Oktober	
		O1	O2	O3	O4	O5	O6	O3	O6
Parameter (eDNA)									
Renibakterie-DNA	Påvisat	2	0	8	1	1	0	0	0
	Ej påvisat	6	8	0	7	7	8	8	8
Öring-DNA	Påvisat	1	0	0	1	0	0	0	0
	Ej påvisat	7	8	8	7	8	8	8	8
Regnbåge-DNA	Påvisat	2	2	2	2	2	0	-	-
	Ej påvisat	0	0	0	0	0	2	-	-

DISKUSSION

Studien visar att BKD kan få en omfattande spridning i vildfisk i vattenområden där kassodling är eller har varit infekterad med sjukdomen. Resultaten är dock förvånande ur flera aspekter, vilka diskuteras nedan. Det planerade antalet fiskar kunde inte provtas. Vi saknar helt data från två provtagningspunkter och från tre provtagningspunkter hade det varit önskvärt med mer fisk men totalt sett är ändå provstorleken fullgod. Med den här provtagningen har vi fått en ögonblicksbild av infektionens utbredning, men hur förändras bilden över tiden? Eftersom vattensystemen möjliggör förflyttning av infekterade fiskar och smittämnen är det rimligt att det finns en dynamik i spridningen av BKD.

Många fiskar var positiva i ELISA men endast en var positiv i PCR

Påvisande av BKD i en fiskodling leder till spärr och sanering av infekterad anläggning. Användandet av två kompletterande analysmetoder blir därför viktig för att säkerställa att aktiv smitta finns i anläggningen innan spärr upprättas. Det kan finnas flera anledningar till att resultaten med de två analysmetoderna inte stämmer överens.

En sekundär ELISA visade att proverna i denna studie var sant positiva för renibakterieprotein, varför vi känner oss trygga med att säga att BKD-infektion finns i vildfiskpopulationen även om vi inte kunnat verifiera aktiv infektion utom hos en fisk.

Proteinet som detekteras med ELISA är vattenlösligt och kan sprida sig i hela njuren, dvs inte enbart där själva infektionshärden finns, medan påvisande av DNA (PCR) kräver att man får med bakterier i provet. Om svabben inte dragits genom hela njuren utan bara tagits i en punkt kan det alltså ge ett falskt negativt resultat. SVA svabbar alltid längs hela njuren, men i ca 20% av fiskarna fanns i princip ingen njure kvar efter att material för ELISA-analys tagits ut, varför det kan ha varit svårt att få med bakterier på svabben. Detta kan dock inte förklara att 51 av 52 prover blev negativa i PCR.

Prover som ligger på gränsen för vad som anses ELISA-positivt (0.1) är ofta negativa i PCR. Detta beror sannolikt på en relativt inaktiv infektion (indikerat av en låg proteinproduktion). Få bakterier gör det svårare att fånga upp dem med svabben eller bakterierna är döda medan proteiner finns kvar under en tid. I denna studie var det enda PCR-positiva provet precis ELISA-positivt, och totalt var endast 8 prover svagt positiva, varför inte heller detta kan förklara resultaten.

En möjlighet är att sik och harr är relativt infektionskänsliga men inte utvecklar sjukdom, att infektionen läkt av under vinterhalvåret men att bakterieprotein fortfarande kvarstår i njuren.

Vattentemperaturens inverkan på analysresultaten

Alla fiskar som var ELISA-positiva var provtagna inom det optimala temperaturintervallet 7 - 15°C (se **Figur 1**). Detta borde garantera aktiva bakterier (förökning) och öka chansen för att påvisa infektion även med PCR. I en provtagningspunkt skedde fiske vid 6°C, dvs. precis under renibakteriens optimala temperaturintervall. Detta skulle potentiellt kunna leda till att en infekterad fisk blir negativ i ELISA - om infektionen varit lågradig redan innan den kalla perioden och bakterierna inte hunnit komma igång finns inte tillräckligt med protein för att ge positivt utslag i ELISA:n. Några dagar till en vecka över optimalt temperaturintervall kan göra att bakterierna hinner inaktiveras, men åtminstone ELISA borde i dessa fall fortfarande bli positiv om infektion förelåg vid fångst.

Sik och harr var i högre grad ELISA-positiva än röding och öring

Röding och Atlantlax är de arter som förekommer naturligt i Sverige som anses mest känsliga för BKD, medan öringen anses intermediärt känslig och det finns begränsad kunskap om infektionen hos harr och sik. Endast 3 av 52 ELISA-positiva fiskar var röding eller öring, vilket skulle kunna tolkas som att sik och harr är mycket mer mottagliga än röding och öring. De flesta fiskarna med BKD-liknande symptom kom från Börtnessjön och Lill-Börtnen, vilket också var de provtagningspunkter där flest ELISA-positiva fiskar fångades. Symptomen var dock inte grava (exempelvis sågs inga tydligt svullna njurar) och granulom kan orsakas av annat än BKD, något som kan indikera att sik och harr i likhet med regnbåge är infektionskänsliga men relativt resistent mot att utveckla sjukdom. En ytterligare faktor som skulle kunna tala för detta är avsaknaden av PCR-positiva resultat (se föregående diskussionspunkt) vilket kan indikera en infektion under avläkning. Hög infektionskänslighet med samtidig sjukdomsresistens skulle kunna bidra till smittspridning och permanentande av smitta i vattendragen. Om röding och sik i högre grad utvecklar sjukdom och dör skulle det kunna vara en rimlig förklaring till att man inte hittar infekterad röding och öring i

provtagningsspunkter där man förväntar sig att kunna hitta smitta. Om populationerna var så kraftigt påverkade borde det dock finnas larmrapporter om sjuk fisk och minskade bestånd.

Nästan alla ELISA-positiva hittades i Ljungan

Det var en viss skillnad i artfördelning mellan vattensystemen, där Ljungan hade störst andel sik (80% jämfört med 37 – 63% i övriga vattensystem). Detta känns dock inte som en rimlig förklaring, eftersom sik utgjorde minst hälften av fångsten i alla vattenområden där arten finns. Trots att provtagning skett nära infekterade eller relativt nyligen infekterade anläggningar i alla fyra vattensystem var det enbart i Ljungan fiskar från dessa provtagningsspunkter var ELISA-positiva. Fisk i odling går tätt, vilket gör att ett högt smittryck kan byggas upp inom respektive infekterad kasse. Dessutom kommer smittrycket att överföras till omgivande vatten vilket kan sprida infektionen vidare till vildfisk som uppehåller sig runt kassarna. Beroende på hur smittrycket späds ut i vattenvolymen och hur vattenutbytet sker med andra delar av vattensystemet, liksom benägenheten hos vildfisk att förflytta sig i vattensystemet kommer utbredningen av infektionen att påverkas. Börtnessjön och nedströms provtagna ELISA-positiva punkter (Lill-Börtnen, Fotingen, Lännsässjön och Skålsjön) är volymmässigt mycket mindre än Storuman, Malgomaj och Ströms Vattudal. Detta innebär, obeaktat huruvida det finns tätare fiskbestånd i någon av sjöarna, att samma mängd utsöndrade renibakterier från ett BKD-infekterat odlingsläge ger en högre indirekt smittöverföring i Ljungan. I Börtnessjön är fisken provtagen i mycket nära anslutning till tidigare infekterad anläggning, vilket kan indikera att den direkta smittöverföringen varit hög. Det är möjligt att även provtagning närmare övriga odlingslägen skulle generera BKD-positiva prover.

Enstaka ELISA-positiva fiskar hittades i uppströms provtagningsspunkter

När det gäller fisken från Övre Kultsjön finns vattenväg ner till Malgomaj. I Kultsjöån finns dock Dimforsen, som bedöms vara ett vandringshinder för migration uppströms från Malgomaj. Uppströms Dimforsen finns sjöarna Vuolelite, Gaskalite och Bijelite. Här har fisk planterats ut, och Länsstyrelsen bedömer att forsarna mellan Bijelite och Kultsjön eventuellt kan tillåta migration. Om BKD-infekterad fisk av misstag (okänd smittstatus) planterats ut i sjöarna skulle därför smitta potentiellt kunna ha flyttats uppströms till Kultsjön. Odlingsanläggning har tidigare funnits i Kultsjön, men denna lades ner 2004 efter flera års tråda och SVA hittar inga uppgifter om att vi påvisat BKD i den odlingen. Smittvägen går dock inte att utesluta helt.

Stor-Sjouten valdes som referenslokal för Faxälven då sjön inte har öppen vandringsväg till det systemet och det inte har skett utsättning av fisk. Trots detta hittades en ELISA-positiv fisk i sjön. Vattenskotrar och båtar flyttas mellan Ströms Vattudal och Stor-Sjouten, vilket skulle kunna tänkas vara en smittväg om dessa legat i vattnet nära smittat odlingsläge. Denna smittväg misstänks vara orsak till introduktion av BKD i Kvarnbergsvattnet, som provtogs av SVA 2015 inom ett annat projekt (SVA, 2016).

eDNA-metodiken behöver utvecklas om den ska kunna utvärderas fullt ut

Både vatten- och sedimentprovtagning gjordes för att utvärdera metodiken. Endast två vattenprover var positiva för renibakterie-DNA och det fanns ingen korrelation punkter där många fiskprover var ELISA-positiva. Båda provtagningsspunkterna låg strax nedströms odlingslägen, och möjligen skulle resultaten kunna spegla pågående BKD-infektion i dessa. Den öring-PCR som användes kunde inte påvisa eDNA i alla delprover trots att öring finns i alla provtagna vattenområden. Resultatet var inte heller direkt korrelerat till huruvida öring

(eller röding, som PCR:en också detekterar DNA från) fanns med i fångsten i samband med att vattenprovet togs. Utspädningseffekter vara en orsak till negativa resultat, dvs stora vattenvolymer som konstant är i rörelse gör att bakterier och fisk-DNA sprids ut. Beståndstäthet och mängden infekterad fisk påverkar mängden utsöndrat DNA/bakterier och det faktum att fisk kan uppehålla sig varsomhelst i vattenpelaren påverkar förekomsten av fisk-DNA och eventuella utsöndrade bakterier i olika skikt. Dessutom har fritt DNA och bakterier en benägenhet att adherera till partiklar och sedimentera. Detta kan innebära att ytvatten är undermåligt som provmaterial och vill man använda vatten bör andra provtagningsstrategier utarbetas för att utvärdera om smittan hittas lättare i andra delar av vattenpelaren.

Bakterierna/delar av bakterier hamnar uppenbarligen i sedimentet, vilket innebär att detta kan vara ett intressant provtagningsmaterial. Det är dock uppenbart att ett antal delprover behövs för att fånga upp bakterier i ett sedimentprov och metodiken behöver optimeras. Det är också oklart hur tillförlitlig metodiken skulle vara för bottensediment som inte är i direkt anslutning till ett odlingsläge. Det är okänt hur länge renibakterier överlever i sediment och en PCR kan inte avgöra om påvisat DNA kommer från levande eller döda bakterier. Därmed kan inte eDNA användas för att bedöma ett eventuellt smittryck från sedimentet. Att regnbåge-DNA kunnat påvisas visar att fisk-DNA, fritt eller bundet till faeces/vävnad under nedbrytning också kan detekteras i sedimentproverna. Att alla fem BKD-positiva prover som testades för regnbåge var positiva även för regnbåge-DNA innebär att renibakterie-DNA:t kan komma från fiskvävnad under nedbrytning istället för från levande bakterier. Det finns ett stort värde i att kunna visa om positiva resultat för förekomst av renibakterie-DNA kan konfirmeras med odling för att visa om det finns levande och infektiösa bakterier, och i så fall hur länge bakterierna förblir levande, i denna typ av provmaterial. SVA har metodik för odling av renibakterier men har inte gått vidare med sådan undersökning i detta fall, då proverna varit frusna vilket försvårar isolering av levande bakterier. Dessutom torde inte renibakterier vara de enda bakterier som hamnar i sedimentet, vilket skapar en blandflora. Renibakterier är långsamväxande, det kan krävas odling i 6 - 12 veckor innan man ser resultat. Detta vilket innebär en hög risk för att mer snabbväxande bakterier från en blandflora tar över och förhindrar upptäckt av renibakterier. En metod för rening av sedimentet för att separera ut eventuella renibakterier behöver därför utvecklas om odling ska utföras.

SLUTSATS

SVA:s rutindiagnostik fungerar bra som metodik för påvisande av BKD i vildfisk, medan eDNA-metodiken kräver utveckling. Infektionen sprider sig till vilda fiskbestånd och fördröjd sanering av infekterade anläggningar innebär därmed en hög risk för smittöverföring till vild fisk. Ytterligare faktorer påverkar smittspridningen inom vattensystemen och upprepade provtagningar behövs för att följa infektionsdynamiken.

REFERENSER

- Gustavson, M.S., Collins, P.C., Finarelli, J.A., Egan, D., Conchúir, R.Ó., Wightman, G.D., King, J.J., Gauthier, D.T., Whelan, K., Carlsson, J.E.L., Carlsson, J. (2015). An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology* 87: 1254–1262
- Jansson, E., Hongslo, T., Höglund, J., Ljungberg, O. (1996). Comparative evaluation of bacterial culture and two ELISA techniques for the detection of *Renibacterium salmoninarum* antigens in salmonid kidney tissues. *Diseases of aquatic organisms* 27: 197-206.
- Jansson, E., Lindberg, L., Säker, E., Aspán, A. (2008). Diagnosis of bacterial kidney disease by detection of *Renibacterium salmoninarum* by real-time PCR. *Journal of Fish Diseases* 31(10):755-63
- Rusch, J.C., Hansen, H., Strand, D.A., Markussen, T., Hytterød, S., Vrålstad, T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasites & Vectors*, 11(1): 333
- SVA (2016). Överföring av BKD-smitta mellan odlade och vilda bestånd i ett vattenområde. Slutrapport till Jordbruksverket inom anslag 1:6 ”Bekämpande av smittsamma husdjurssjukdomar 2015”. <https://kxs-sva.s1.umbraco.io/media/yeljpw31/jv-bkd-slutrapport.pdf>
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA, *Molecular Ecology* 21(11): 2565–73
- Wilcox, T. M., Carim, K.J., McKelvey, K.S., Young, M. K., Schwartz, M.K. (2015). The dual challenges of generality and specificity when developing environmental DNA markers for species and subspecies of *Oncorhynchus*, *PLoS ONE* 10(11): e0142008

APPENDIX

Tabell 1. Data avseende provinsamling i Västerbottens län.

Vatten-system	Provtagningspunkt	Laxfisk i vattenområdet	Antal fiskar ¹	Datum för fiske	Vattentemp °C
Umeälven					
1	Abelvattnet	öring	30	21/7	9.8
2	Överuman	röding, öring	30	30/6, 1/7	6.0, 6.0
3	Nedre Boksjön	röding, öring	30	2/7	11.9
4	Gardsjön	röding, öring	Ingen laxfisk i näten		
5	Slussfors	röding, öring, harr, sik	30	26/6	11.7
6	Storholmen	röding, öring, harr, sik	30	25/6	13.0
7	Luspsjön	röding, öring, harr, sik	30	23/6	13.5
8	Stensele	öring, harr, sik	30	17/6, 18/6	14.2, 14.3
9	Betsele	öring, harr, sik	30	15/6, 15/6	14.0, 15.0
10	Överbo	öring, harr, sik	17	17/6, 17/6	16.5, 18.5
Ångermanälven					
11	Ransarn	röding, öring	9	12/8	15.0
12	Gikasjön	röding, öring	24	7/7, 8/7	11.5, 11.6
13	Övre Kultsjön	röding, öring	30	9/7	10.4
14	Nedre Kultsjön	röding, öring	29	10/7	10.4
15	Vuollete, Kultsjöån	röding, öring	25	26/6	15.3
16	Malgomaj, Gäddbäcken	röding, öring, harr, sik	30	17/6	11.6
17	Malgomaj, Strömnäs	röding, öring, harr, sik	30	11/6	9.6
18	Malgomaj, Rönnäs	röding, öring, harr, sik	30	17/6	12.2
19	Fatsjön, Eriksberg	röding, öring, harr	17	23/6	17.5
20	Volgsjön	röding, öring, harr, sik	29	9/6	9.1

¹ Antalet provtagna fiskar

Tabell 2. Data avseende provinsamling i Jämtlands län

Vatten-system	Provtagningsspunkt	Laxfisk i vattenområdet	Antal fiskar ¹	Datum för fiske	Vattentemp °C
Faxälven					
21	Stor-Sjouten	röding, öring	30	12/8	15.0
22	Leipikkvattnet	röding, öring	30	8/7, 9/7	7.2, 7.8
23	Jormsjön	röding, öring	30	12/7	12.0
24	Hetögeln	röding, öring, harr, sik	30	22/6, 24/6	11.5, 11.8
25	Fågelsjön	röding, öring, harr, sik	26	21/6	13.7
26	Ströms Vattudal, Dragan	röding, öring, harr, sik	24	11/7, 12/7	10.2, 10.3
27	Ströms Vattudal, Bonäset	öring, harr, sik	30	30/6	17.9
28	Ströms Vattudal, Ön	öring, harr, sik	25	maj-juli	14.0
29	Fångsjön	röding, öring, harr, sik	30	31/7, 9/8	17.8, 18.0
30	Vängelsjön	öring, harr, sik	ej fiskat på grund av fel temperatur		
Ljungan					
31	Buhösten	röding, öring	30	2/7	13.3
32	Storsjön	röding, öring, harr, sik	26	3/8	14.3
33	Ytter-Grucken	öring, harr, sik	30	26/7	13.2
34	Flåsjön	öring, harr, sik	28	1/8	14.4
35	Börtnessjön, uppströms odling	öring, harr, sik	30	14/7	13.2
36	Börtnessjön, nedströms odling	öring, harr, sik	30	14/7	12.7
37	Lill-Börtnen	röding, öring, harr, sik	30	7/7	11.3
38	Fotingen	öring, harr, sik	30	17/7, 20/7	14.1, 14.3
39	Lännässjön	öring, harr, sik	30	18/6	14.5
40	Skålsjön	öring, harr, sik	30	15/6	15.0

¹ Antalet provtagna fiskar

Tabell 4. Data avseende artfördelning, symptom och analysresultat för fisk i Västerbottens län

Vattensystem Provtagningspunkt		Antal fiskar		Symptom	ELISA positiv (förhöjd)	PCR positiv
Umeälven						
1	Abelvattnet	Öring	30	2	0	-
2	Överuman	Röding	10	0	0	-
		Öring	20	0	0	-
3	Nedre Boksjön	Röding	10	0	0	-
		Öring	20	0	0	-
4	Gardsjön	-				
5	Slussfors	Harr	1	0	0	-
		Sik	29	1	0 (1)	-
6	Storholmen	Harr	1	0	0	-
		Sik	29	0	0	-
7	Luspsjön	Harr	1	0	0	-
		Sik	29	0	0	-
8	Stensele	Sik	30	2	0	-
9	Betsle	Öring	1	0	0	-
		Sik	29	2	0	-
10	Överbo	Sik	17	0	0	-
Ångermanälven						
11	Ransarn	Röding	2	0	0	-
		Öring	7	0	0	-
12	Gikasjön	Röding	13	0	0	-
		Öring	11	0	0	-
13	Övre Kultsjön	Röding	25	0	1	0
		Öring	5	0	0	-
14	Nedre Kultsjön	Röding	22	2	0 ¹	0 ¹
		Öring	7	1	0 (1)	-
15	Vuollelite, Kultsjöån	Öring	25	0	0	-
16	Malgomaj, Gäddbäcken	Röding	4	0	0	-
		Öring	4	0	0	-
		Harr	8	0	0	-
		Sik	14	0	0	-
17	Malgomaj, Strömnäs	Röding	6	0	0	-
		Öring	1	0	0	-
		Harr	1	0	0	-
		Sik	22	1	0	-
18	Malgomaj, Rönnäs	Röding	1	0	0	-
		Harr	1	0	0	-
		Sik	28	0	0	-
19	Fatsjön, Eriksberg	Röding	2	0	0	-
		Öring	15	0	0	-
20	Volgsjön	Sik	29	0	0	-

¹en fisk för liten för ELISA-analys, analyserad med PCR istället

Tabell 5. Data avseende artfördelning, symptom och analysresultat för fisk i Jämtlands län

Vattensystem		Antal fiskar	BKD-		ELISA	PCR
Provtagningsspunkt			symptom		positiv (förhöjd*)	positiv
Faxälven						
21	Stor-Sjouten	Öring	30	0	1	0
22	Leipikkvattnet	Röding	19	0	0	-
		Öring	11	0	0	-
23	Jormsjön	Röding	7	0	0	-
		Öring	23	0	0	-
24	Hetögeln	Harr	15	0	0	-
		Sik	15	0	0	-
25	Fågelsjön	Harr	9	3	0	-
		Sik	17	0	0	-
26	Ströms Vattudal, Dragan	Harr	1	1	0	-
		Sik	23	1	0	-
27	Ströms Vattudal, Bonäset	Harr	4	0	0	-
		Sik	26	1	0	-
28	Ströms Vattudal, Ön	Öring	1	0	0	-
		Harr	11	0	0	-
		Sik	13	0	0	-
29	Fångsjön	Öring	4	0	0	-
		Harr	11	0	0	-
		Sik	15	0	0	-
30	Vängelsjön	-				
Ljungan						
31	Buhösten	Röding	18	0	0	-
		Öring	12	0	0	-
32	Storsjön	Röding	1	0	0	-
		Öring	3	0	0	-
		Sik	22	0	0	-
33	Ytter-Grucken	Öring	2	1	0	-
		Harr	1	0	0	-
		Sik	27	0	0	-
34	Flåsjön	Öring	3	0	0	-
		Harr	3	0	0	-
		Sik	24	0	0	-
35	Börtnessjön, uppstr odling	Sik	30	0	2 (4)	0
36	Börtnessjön, nedstr odling	Harr	4	1	3 (1)	0
		Sik	26	10	15 (7)	0
37	Lill-Börtnen	Öring	1	1	1	0
		Harr	4	4	3	0
		Sik	25	25	18	0
38	Fotingen	Öring	2	0	0	-
		Sik	28	0	2 (2)	0
39	Lännässjön	Öring	1	0	0	-
		Harr	1	0	0	-
		Sik	28	2	1	0
40	Skålsjön	Öring	2	0	0	0
		Sik	28	7	5 (1)	1

Tabell 6. Data avseende resultat av eDNA-analyser på vattenprover.

Vattensystem	Provtagningspunkt	eDNA renibakterier ¹	eDNA öring ¹	Öring, röding i fångst ²	
Umeälven	1	Abelvattnet	Ej påvisat	Påvisat	ja
	2	Överuman	Ej påvisat	Påvisat	ja
	3	Nedre Boksjön	Ej påvisat	Påvisat	ja
	5	Slussfors	Påvisat/Ej påvisat	Påvisat	nej
	6	Storholmen	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
	7	Luspsjön	Ej påvisat	Påvisat	nej
	8	Stensele	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat	nej
	9	Betsele	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat	ja /nej
	10	Överbo	Ej påvisat	Påvisat	nej
	11	Ransarn	Ej påvisat	Påvisat	ja
	12	Gikasjön	Ej påvisat	Påvisat	ja
	13	Övre Kultsjön	Ej påvisat	Påvisat	ja
	14	Nedre Kultsjön	Ej påvisat	Påvisat	ja
	Ångerman-älven	15	Vuollelite, Kultsjöån	Ej påvisat	Påvisat
16		Malgomaj, Gäddbäcken	Ej påvisat	Påvisat	ja
17		Malgomaj, Strömnäs	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	ja
18		Malgomaj, Rönnäs	Ej påvisat	Ej påvisat	ja
19		Fatsjön, Eriksberg	Ej påvisat	Påvisat	ja
20		Volgsjön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
21		Stor-Sjouten	Ej påvisat	Påvisat	ja
22		Leipikkvattnet	Ej påvisat	Påvisat	ja
23		Jormsjön	Ej påvisat	Påvisat	ja
24		Hetögeln	Ej påvisat	Ej påvisat	nej
Faxälven	25	Fågelsjön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
	26	Ströms Vattudal, Dragan	Påvisat/Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
	27	Ströms Vattudal, Bonäset	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
	28	Ströms Vattudal, Ön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	ja
	29	Fångsjön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	ja
	31	Buhösten	Ej påvisat	Påvisat	ja
	32	Storsjön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	ja
	33	Ytter-Grucken	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat	ja
	34	Flåsjön	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	ja
	Ljungan	35	Börtnessjön, ovan odling	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat
36		Börtnessjön, nedan odling	Ej påvisat	Påvisat/Ej påvisat	nej
37		Lill-Börtnen	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat	ja
38		Fotingen	Ej påvisat	Ej påvisat/Påvisat	ja
39		Lännässjön	Ej påvisat	Ej påvisat	ja
40		Skålsjön	Ej påvisat	Ej påvisat	ja

¹Provtagningspunkter där resultaten skiljer mellan de två 5 L-delproverna rapporteras som prov 1/prov 2.

²Provtagnings-punkter med två fisken där öring och/eller röding funnits med i ena fångsten rapporteras som fiske 1/fiske 2