

Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann - patologi, utvalgte agens og risikofaktorer

Terje Marken Steinum

Edgar Brun

Duncan Colquhoun

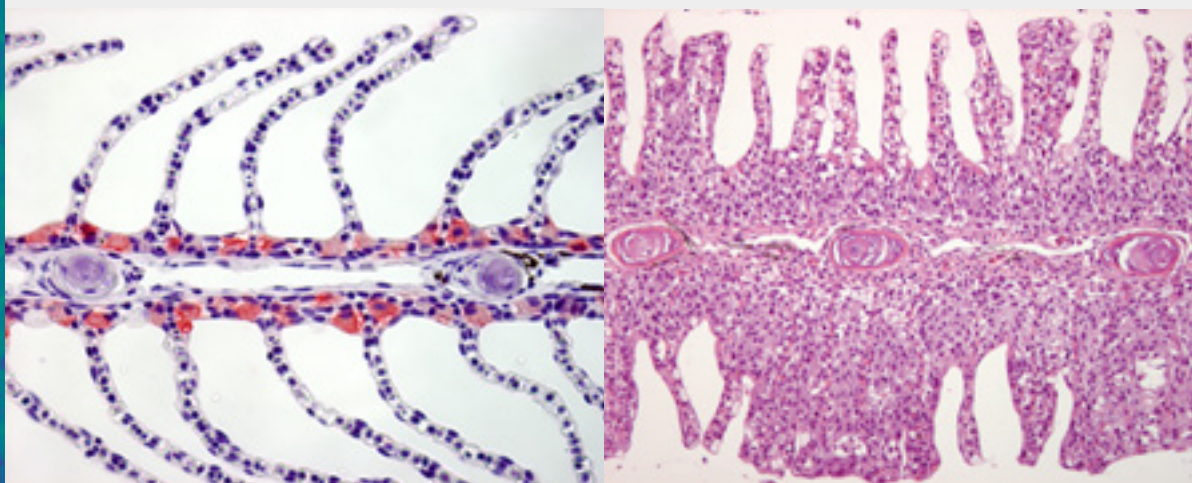
Mona Gjessing

Kai-Inge Lie

Anne Berit Olsen

Saraya Tavoranpanich

Anne-Gerd Gjevre





Veterinærinstituttets rapportserie · 8 - 2015

Tittel

Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann -
patologi, utvalgte agens og risikofaktorer

Oppdragsgiver

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond
(prosjekt nr. 900800)

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form omslag: Graf AS

Forsidefoto: Mona Gjessing

Bestilling

kommunikasjon@vetinst.no

Faks: + 47 23 21 60 01

Tel: + 47 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

Forslag til sitering:

Steinum TM, Brun E, Colquhoun D, Gjessing M, Lie KL, Olsen
AB, Tavornpanich S, Gjevne AG. Proliferativ gjellebetennelse
hos oppdrettslaks i sjøvann - patologi, utvalgte agens og risi-
kofaktorer. Veterinærinstituttets rapportserie 8-2015
Oslo: Veterinærinstituttet; 2015

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når Veterinærinstituttet gjengis som kilde



Veterinærinstituttets rapportserie

Norwegian Veterinary Institute's Report Series

Rapport 8 · 2015

Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann - patologi, utvalgte agens og risikofaktorer

Forfattere

Terje Marken Steinum

Edgar Brun

Duncan Colquhoun

Mona Gjessing

*Kai-Inge Lie**

Anne Berit Olsen

Saraya Tavornpanich

*Anne-Gerd Gjevre***

** Nåværende arbeidsplass Fish Vet Group Norge*

*** Kontaktperson ved spørsmål om rapporten*

Oppdragsgiver

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond

(prosjekt nr. 900800)

30.04.2015

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Innholdsfortegnelse	4
1. Sammendrag	5
2. English summary	6
3. Introduksjon	7
4. Prosjektets organisering og målsetting	8
4.1. Organisering	8
4.2. Resultatmål	8
5. Prosjektets arbeidspakker	9
6. Gjennomføring og oppsummering av resultater	10
6.1. Innsamling av materiale fra anlegg med gjellebetennelse	10
6.2. Undersøkelse av innsamlet materiale fra sykdomsutbrudd i 21 anlegg	10
6.3. En langtidsstudie av en lokalitet med gjentatte gjelleproblemer	12
6.4. Synliggjøring av mikroorganismer i gjellelev (in-situ hybridisering)	13
6.5. Gjellevevets reaksjon	14
6.6. Er det noen sammenheng mellom gjelleforandringer og mikroorganismer?	16
6.7. Genetisk karakterisering av mikroorganismer i gjeller med betennelse	17
6.8. Er noen lokaliteter spesielt utsatt for å få gjellebetennelse og hvorfor?	18
6.9. Smitteforsøk med <i>B. cysticola</i> på VESO Vikan	21
6.10. Workshops og formidling av resultater	22
7. Veien videre	23
8. Takk	23
9. Sentrale publikasjoner	24

1. Sammendrag

Proliferativ gjellebetennelse (Proliferative gill inflammation - PGI) er betegnelsen på en kronisk betennelse i gjellene hos laks. Sykdommen påfører norsk oppdrettsnæring store tap og reduserer fiskens velferd. I perioden fra august 2012 til februar 2015 gjennomførte Veterinærinstituttet et prosjekt der målet var å øke kunnskapen om mikrobiologiske årsaksfaktorer, sykdomsutvikling og risikofaktorer på lokalitetsnivå. I nært samarbeid med fiskehelsetjenestene ble det samlet inn gjellevev fra i alt 26 lokaliteter med gjellesykdom.

Ved hjelp av molekylærbiologiske metoder og vevsundersøkelser (histologi) ble materialet undersøkt for tilstedeværelse av fire antatt gjellepatogene mikroorganismer. Et histopatologisk skåringssystem og *in-situ* hybridiserings-teknikker ble etablert. Disse teknikkene ble benyttet i forbindelse med en analyse av sammenhengen mellom agens og vevsforandringer. Spesifikke vevsforandringer i forbindelse med kronisk gjellebetennelse ble beskrevet. Noen synes å være agens-spesifikke. Gjennom metagenomiske analyser ble nye genområder av potensielle gjellepatogene mikroorganismer kartlagt.

De molekylærbiologiske analysene dokumenterte at den intracellulære bakterien '*Candidatus* Branchiomonas cysticola' (for korthets skyld kalt *B. cysticola* i resten av rapporten) er svært utbredt i gjeller hos oppdrettslaks i hele Norge. Funnene i dette materialet tyder ikke på at bakterien gir systemisk infeksjon hos laks. Dette ble imidlertid dokumentert for mikrosporidien *Desmozoon lepeophtherii* som er svært utbredt i anlegg i Sør- og Midt-Norge, men syntes mindre utbredt i Nord-Norge. '*Candidatus* Piscichlamydia salmonis' (for korthets skyld kalt *P. salmonis* i resten av rapporten) synes ikke å ha like høy forekomst som de to foregående mikroorganismene og funnene antyder at bakterien er mindre utbredt i de nordligste landsdeler.

Det ble påvist store mengder av amøben *Paramoeba perurans* i gjeller fra fisk i fire anlegg i Sør-Norge som alle var rammet av amøbegjellesykdom (AGD). Anleggene med AGD utbrudd hadde også høy forekomst av *D. lepeophtherii* og *B. cysticola*. På en av disse lokalitetene ble alle fire mikroorganismer påvist. Amøben ble påvist i små mengder i noen få fisk på ett anlegg i Midt-Norge og i én fisk ved to lokaliteter i Nord-Norge. Ingen av lokalitetene utviklet AGD. Den nordligste lokaliteten lå i Troms. Funnene bekrefter at flere mikroorganismer opptrer samtidig i kronisk betente gjeller hos oppdrettslaks, og støtter hypotesen om at dette er en multifaktoriell sykdom.

En lokalitet på Sør-Vestlandet med gjelleproblemer på flere utsett, ble prøvetatt hver annen uke i perioden 5. juni til 12. desember 2013. I løpet av juni ble mikrosporidien og amøben påvist i ubetydelige mengder i én av 20 fisk fra lokaliteten. *B. cysticola* ble påvist i små mengder i 55 % av fiskene. I siste del av august var alle fiskene moderat til høygradig infisert med *B. cysticola* og et økende antall fisk var positive for mikrosporidien. Ti prosent av fiskene var også positive for *P. salmonis*. Infeksjonsnivået og prevalensen spesielt for mikrosporidien, men også amøben, økte etter at infeksjonen med de to intracellulære bakteriene nådde sin topp i august for *B. cysticola* og oktober-november for *P. salmonis*. Det ble ikke påvist klinisk gjellesykdom på lokaliteten. Fisken ble aldri avluset.

Den epidemiologiske studien for å kartlegge mulige risikofaktorer på lokalitetsnivå innhentet informasjon fra Havbruksdata, MOM-B-undersøkelser og Lusedata fra 40 lokaliteter. Resultatene fra denne undersøkelsen viste at antall avlusninger kan være en risikofaktor for utvikling av proliferativ gjellebetennelse hos laks. Mulige forskjeller mellom ulike lusemiddel ble ikke vurdert i analysen. I prosjektet ble det også gjennomført smitteforsøk med *B. cysticola*. Overføring av smitte til frisk fisk kunne imidlertid ikke dokumenteres. Prosjektet bidro til å etablere en smitemodell for AGD på atlantisk laks i Norge.

2. English summary

Proliferative gill inflammation (PGI) refers to a chronic inflammation of the gills in seawater-farmed Atlantic salmon. The disease causes significant losses and reduces fish welfare in Norwegian aquaculture. From August 2012 to February 2015 the Norwegian Veterinary Institute conducted a project aiming to increase knowledge of the microbiological causal factors, pathogenesis and risk factors at the farm level. In close cooperation with fish health services samples were collected from 26 sites with gill disease.

Using molecular methods and histology the material was examined for the presence of four assumed gill pathogenic microorganisms. A histopathological scoring system and in-situ hybridization techniques were established. These techniques were used in conjunction with an analysis of the relationship between agent and tissue lesions. Specific lesions associated with chronic gill inflammation were described. Some lesions seemed to be agent-specific. Through metagenomics new gene regions of potential gill pathogenic microorganisms were described.

The molecular analyses demonstrated that the intracellular bacterium '*Candidatus* Branchiomonas cysticola' (*B. cysticola*) is widespread in the gills of farmed salmon in Norway. The results do not suggest that the bacterium causes systemic infection in salmon. However, systemic infection by the microsporidium *Desmozoön lepeophtherii* was confirmed. This agent was widespread in farms in Southern and Central Norway, but seemed less prevalent in the northern part of Norway. '*Candidatus* Piscichlamydia salmonis' (*P. salmonis*) was not as prevalent as the previous two microorganisms. The findings suggest that this bacterium is less common in the northernmost parts of Norway.

Large amounts of *Paramoeba perurans* were detected in the gills of fish in four farms in southern Norway, all diagnosed with amoebic gill disease (AGD). The farms with AGD outbreak also had a high prevalence of *D. lepeophtherii* and *B. cysticola*. At one of these farms all four microorganisms were detected. In addition, the amoeba was detected in small amounts in a few fish at one farm in central Norway and in one fish at two farms in northern Norway. None of the sites developed AGD. The findings confirmed that several microorganisms occur simultaneously in chronically inflamed gills in salmon, and supports the hypothesis that this is a multifactorial disease.

A longitudinal study was conducted in one farm in the Southwest region of Norway which had a history of proliferative gill disease. Fish were sampled every two weeks during the period 5 June to 12 December 2013. During June *D. lepeophtherii* and *P. perurans* were detected in insignificant quantities in one of 20 fish from the site. *B. cysticola* was detected in small amounts in 55% of the fish. In the latter part of August, all fish displayed moderate to high-grad *B. cysticola* infections and an increasing number of fish were positive for *D. lepeophtherii*. Ten percent of the fish also were positive for *P. salmonis*. Infection levels and prevalence of *D. lepeophtherii* and *P. perurans*, increased after infection with the two intracellular bacteria reached their peaks August (*B. cysticola*) and October-November (*P. salmonis*). Clinical gill disease was not identified during the study.

In an epidemiological study to identify possible risk factors at the farm level, information obtained from Havbruksdata, environmental surveys and sea lice data were used. Forty farms were included in the study. The results showed that sea lice treatments may be a risk factor for the development of chronic gill inflammation in salmon. Possible differences between delousing treatments were not considered in the analysis.

The project also conducted an infection trial with *B. cysticola*. However, transmission of infection to healthy fish could not be detected. The project also contributed to establishing a challenge model for AGD in Atlantic salmon in Norway.

3. Introduksjon

Proliferativ gjellebetennelse (Proliferative gill inflammation - PGI) er en kronisk betennelse i gjellene som medfører betydelige tap i norsk oppdrettsnæring. Slike gjelleforandringer er blitt observert i Norge siden 1980-årene, spesielt på Vestlandet. Utbrudd av slik gjellebetennelse opptrer ofte på sensommeren og høsten hos fisk sjøsatt om våren. Det er rapportert om dødelighet på 10-35 %. Sykdommen medfører også dårlig tilvekst og velferd hos individene som overlever.

Diagnosen er basert på fire typer mikroskopiske vevsforandringer i gjellene: 1) betennelse, 2) unormal økning i antall (proliferasjon) celler som dekker gjelleoverflaten (respiratoriske epitelceller), 3) celledød og 4) sirkulasjonsforstyrrelser.

Fisk med proliferativ gjellebetennelse får ofte nedsatt appetitt og sturer. Vanligvis sprer sykdommen seg raskt til samtlige merder på anlegget. Dødeligheten kan variere mellom merdene på en lokalitet.

Ved undersøkelse av nylig død fisk, vil den ofte være i under middels hold og gjellene har ikke lenger sin mørkerøde, friske farge. De kan være lyserøde eller grålige, kan ha hvite flekker og være slimete.

Dominerende funn ved kronisk gjellebetennelse er en unormal økning i antall respiratoriske epitelceller. En slik unormal økning av antall celler kalles proliferasjon. Proliferasjonen fører til sammenvoksinger som gjør at overflatearealet reduseres og gassutvekslingen blir mindre effektiv. Dette medfører redusert oksygenopptak. Dermed håndterer fisken dårligere stressende situasjoner som avlusning, trenging og sortering.

Noen tilfeller med ekstremt høy dødelighet i forbindelse med avlusning av fisk har vist seg å være forårsaket av proliferativ gjellebetennelse. Affisert fisk er sårbar for lave oksygenivåer, og kan derfor dø ved kvelning. Fisk som rammes av sykdommen får ikke bare problemer med respirasjonen, men også nitrogenutskillelse og osmoregulering. Den er altså vesentlig svekket og kan derfor også være mer utsatt for annen sykdom.

Gjellebetennelse blir ofte påvist i en kronisk fase, fordi sykdommen først kommer til syne når gjelleforandringene er blitt så omfattende at fisken blir klinisk syk med pusteproblemer. Dødeligheten kan bli svært høy, og særlig dersom flere gjellepatogene agens opptrer samtidig.

Proliferativ gjellebetennelse kan sammenlignes med kroniske lungelidelser hos pattedyr, som også kan ha sammensatt årsaksforhold. Hos pattedyr er primærårsaken ofte virus, mens sekundære bakterielle infeksjoner kommer senere i forløpet og kompliserer bildet.

I mange tilfeller med proliferativ gjellebetennelse, ser man karakteristiske cyster inne i epitelcellene (epiteliocyster). Det er flere intracellulære bakterier som ser ut til å danne slike cyster. En av bakteriene som har vært i søkelyset er *P. salmonis*. Nyere forskning viser imidlertid at epiteliocystene som blir observert i norsk og irsk oppdrettslaks, ofte inneholder *B. cysticola*. Nylig ble en tredje intracellulær bakterie '*Candidatus Synonymydia salmonis*' påvist i epiteliocyster i gjellevevet hos laks i Norge.

En annen aktuell mikroorganisme er mikrosporidien *Desmozoön lepeophtherii* (s.s. *Paranucleospora theridion*). Denne ble først påvist hos lakselus, men har senere vist seg å være utbredt hos oppdrettslaks, og er blant annet påvist i forbindelse med den såkalte "Høstsyken". De ulike stadiene til denne organismen er svært små, og kan derfor tidligere ha blitt oversett i histologiske snitt.

Både *B. cysticola* og *D. lepeophtherii* er svært vanlig forekommende i laksegjeller, også hos tilsynelatende frisk fisk fra anlegg uten sykdomsutbrudd. Mengden av begge mikroorganismene er imidlertid betydelig høyere i fisk med alvorlig proliferativ gjellebetennelse. Betydningen av mikrosporidien har vært omdiskutert. Fortsatt gjenstår arbeid med å forstå betydningen av de tre ovenfor nevnte agens i utviklingen av proliferativ gjellebetennelse. Ingen av disse har blitt tilstrekkelig genetisk karakterisert eller dyrket, noe som gjør det vanskelig å gjennomføre smitteforsøk som kan avklare deres rolle.

Virus kan også forårsake gjellebetennelse hos fisk. *Piscine poxvirus* kan bidra til gjellebetennelse og dødelighet både hos laks i ferskvann og sjøvann. *Atlantic salmon paramyxovirus* har blitt isolert og dyrket, men kunne ikke alene gi patologi eller gjenskape proliferativ gjellebetennelse i smitteforsøk. Det kan likevel ikke utelukkes at viruset bidrar til gjellebetennelse.

Ektoparasitter (ciliater, flagellater) bidrar til å forverre enkelte tilfeller av proliferativ gjellebetennelse, men de synes ikke å spille en vesentlig rolle. Infestasjon med *Ichthyobodo* sp., såkalt «sjøvannskostia», kan imidlertid i noen tilfeller bidra til klinisk sykdom. Også skader forårsaket av ikke-infeksiøse agens, som f.eks. maneter og alger, samt uheldige miljøfaktorer kan i noen tilfeller bidra til utvikling av proliferativ gjellebetennelse, og også bane vei for sykdomsframkallende agens.

Veterinærinstituttet har hatt fokus på gjellebetennelse hos laks i en årrekke. Dette har bl.a. resultert i to doktoravhandlinger innenfor dette temaet (Steinum 2010, Kvellestad 2013). Også andre norske forskningsmiljøer og utenlandske forskere har arbeidet med problemstillingen. Den samlede kunnskapen understreker at gjellebetennelse hos laks i sjøvann har en multifaktoriell årsakssammenheng, og listen over mulige involverte faktorer synes stadig å bli lenger.

Forekomsten av proliferativ gjellebetennelse ser ut til å variere fra år til år uten at årsaken til dette er klarlagt. Videre synes enkelte lokaliteter å være mer utsatt enn andre. Det er derfor nærliggende å tenke seg at lokalitetenes beliggenhet og faktorer med år-til år variasjon kan være av betydning for sykdomsutviklingen.

Amøben *Paramoeba perurans* er årsaken til amøbegjellesykdom (amoebic gill disease - AGD) som første gang ble påvist i fire anlegg med norsk oppdrettslaks i 2006. AGD ble deretter påvist med fem tilfeller i 2012. I 2013 og 2014 påviste Veterinærinstituttet sykdommen i hhv. 58 og 69 ulike lokaliteter. Sykdommen er påvist helt opp til Flatanger i Nord-Trøndelag. I likhet med andre gjellessykdommer, har fisk med AGD respirasjonsbesvær og dårlig matlyst. Med det blotte øyet kan en se hvite, slimete områder på gjelleoverflaten. Dette kan være forårsaket av amøber, men andre årsaker kan ikke utelukkes. En sikker AGD-diagnose stilles ved histologi. Når AGD forekommer alene, er de respiratoriske enhetene i gjellene vokst sammen, det er økt slimcelleaktivitet og en kan se til dels store mengder amøber på overflaten av det irriterte vevet.

4. Prosjektets organisering og målsetting

4.1. Organisering

Prosjektet er forankret i Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond sin handlingsplan for robust fisk. Det startet i juni 2012 og ble avsluttet i februar 2015.

Prosjektets styringsgruppe besto av

- Agsgeir Østvik, Havbrukstjenesten AS
- Eirik Hoel, Marine Harvest AS
- Arne Guttvik, Salmar AS
- Bjarne Reinert, Lerøy Seafood Group AS
- Atle Lillehaug, Veterinærinstituttet

Merete Bjørgan Schrøder fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) var observatør.

Prosjektet hadde en ramme på 6,2 millioner der FHF finansierte 84 %, resten ble dekket av Veterinærinstituttet.

4.2. Resultatmål

- Identifisere etiologisk agens for proliferativ gjellebetennelse
- Identifisere sammenhenger mellom ulike agens og forandringer i gjellevevet.
- Identifisere mulige sammenhenger mellom lokaliteten og risiko for utvikling av gjellebetennelse.
- Formidle resultater og kunnskap til næringen og stimulere til diskusjon og deling av erfaringer.

5. Prosjektets arbeidspakker

Prosjektet hadde seks arbeidspakker:

Arbeidspakke 1: Innsamling av prøvemateriale

Høsten 2012 og 2013 tilbød Veterinærinstituttet (VI) oppdrettsnæringen en utvidet diagnostikk for sykdommer hvor gjellesymptomer utgjorde en vesentlig del av sykdomsbildet. Informasjon om prosjektet ble formidlet til norske fiskehelsetjenester og oppdrettsfirmaer. Det ble også tatt kontakt med skotske og irske oppdrettsmiljø. Alle innsendelser ble grundig undersøkt, og ved alvorlig utbrudd gjennomførte VI utvidet prøveuttak.

En utvalgt lokalitet på Sør-Vestlandet med gjentatte gjelleproblemer ble fulgt over tid. Her ble det tatt ut gjelleprøver regelmessig fra juni til desember 2013.

Arbeidspakke 2: Analyse av innsendt materiale

Prøvene ble undersøkt med hensyn til patologiske forandringer og molekylærbiologiske verktøy qPCR (kvantitativ måleteknikk) ble brukt til påvisning og kvantifisering av utvalgte smittestoffer. Prosjektet skulle også utvikle diagnostisk verktøy for eventuelle andre aktuelle agens som ble avdekket under prosjektperioden.

Arbeidspakke 3: Analyser utført på utvalgt materiale

Her ble det etablert metoder som synliggjør ulike agens i gjellevevet (*in situ* hybridisering). Gjellenes reaksjon ved utviklingen av sykdom ble undersøkt og karakterisert ved hjelp av histologiske metoder. I denne forbindelse ble det etablert et system for vurdering av mikroskopisk vevsskade i gjellene.

Noen nye gensekvenser fra de aktuelle mikroorganismene i gjeller med betennelse ble identifisert ved hjelp av bioinformatisk analyse etter siste generasjons sekvensering.

Arbeidspakke 4: Epidemiologiske studier

Ved bruk av Havbruksdata ble det hentet inn deskriptive data for de lokalitetene som deltok i studien. Det ble samlet informasjon om aktuelle fiskegrupper og produksjonsbelastningen på lokalitetene. I denne sammenheng ble trendvurderinger fra MOM-B undersøkelsene (der MOM står for Matfiskanlegg Overvåking Modellering) også benyttet. Disse dataene ble analysert for å avdekke mulige assosiasjoner mellom de miljømessige bunnforholdene og gjelleproblemer på lokalitetene.

Arbeidspakke 5: Smitteforsøk

Det ble gjennomført smitteforsøk for å etablere smitte modeller med *B. cysticola*. Denne intracellulære bakterien er sterkt knyttet til gjellebetennelse og lar seg ikke dyrke i laboratoriet. Prosjektet bidro også til at det ble etablert og gjennomført smitteforsøk med *Paramoeba perurans* som forårsaker amøbegjellesykdom (AGD).

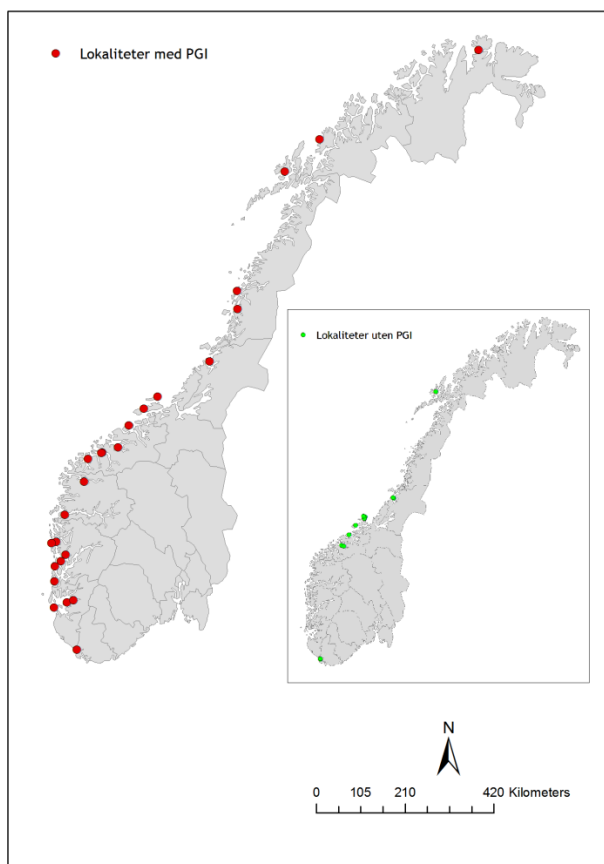
Arbeidspakke 6: Workshop, seminar, formidling til næring

Det ble arrangert en nasjonal og en internasjonal workshop/seminar om gjellesykdom. Dette var møteplasser der fiskehelsetjenestene, fagansatte i oppdrettsselskapene og forskere kunne utveksle erfaringer og resultater og foreslå tiltak mot gjellesykdom. Dette bidro til å øke kompetansen omkring diagnostikk og håndtering av gjellesykdommer nasjonalt og internasjonalt. I tillegg ble resultater fra prosjektet formidlet på en rekke fagseminar og møter der næringsaktører var representert.

6. Gjennomføring og oppsummering av resultater

6.1. Innsamling av materiale fra anlegg med gjellebetennelse

I perioden fra august 2012 til desember 2013 identifiserte lokale fiskehelsetjenester i alt 26 lokaliteter med atlantisk laks som hadde gjelleproblemer. Anleggene fordelte seg geografisk langs hele kysten fra Vest-Agder til Finnmark (Figur 1).



Figur 1. Geografisk plassering av 26 lokaliteter med og 15 lokaliteter uten proliferativ gjellebetennelse.

Vevsbiter på RNAlater™ og formalin ble sendt til Veterinærinstituttet for PCR-analyse med hensyn på fire antatt gjellepatogene mikroorganismer: *P. salmonis*, *B. cysticola*, *Desmozoön lepeophtherii* og *Paramoeba perurans*, og histologisk vurdering.

Det ble i gjennomsnitt sendt inn 25 prøver fra hver lokalitet. Alle som deltok i prosjektet mottok svarbrev fra Veterinærinstituttet med informasjon om status for gjellehelsen.

Disse 26 lokalitetene ble definert som kasus-anlegg i den epidemiologiske studien som ble gjennomført for å identifisere mulige risikofaktorer for gjellebetennelse (se punkt 5.8).

I tillegg ble en lokalitet på Sør-Vestlandet (kalt anlegg X) fulgt med regelmessige prøveuttak fra juni 2013 til desember 2013.

6.2. Undersøkelse av innsamlet materiale fra sykdomsutbrudd i 21 anlegg

Påvisning av utvalgte mikroorganismer i gjellevev

Totalt 21 av de 26 anleggene sendte inn prøver fra 10 laks eller mer, og det er kun resultater fra disse anleggene som presenteres i dette avsnittet. Tilsammen ble gjeller fra ca. 500 fisk undersøkt for tilstedeværelse av de fire antatt gjellepatogene mikroorganismene. Dette ble gjort ved hjelp av real-time PCR analyse av ekstrahert DNA (Tabell 1). Infeksjonsgraden for de ulike agnes kan ikke sammenliknes direkte fordi påvist antall mål-genkopier for mikroorganismene er ukjent.

Fire av anleggene (nr. 3, 4, 5 og 9, Tabell 1) oppga mistanke om AGD i forbindelse med innsendelsen. Dette ble bekreftet av analysene som viste høy infeksjonsgrad med *P. perurans* og typiske histopatologiske forandringer i gjellene. De fire anleggene lå i Sør-Norge (nord til Sogn og Fjordane). I tillegg til *P. perurans* ble det påvist betydelige mengder av både *B. cysticola* og *D. lepeophtherii* i gjellene. I de resterende 17 anleggene ble *P. perurans* bare påvist i et mindre antall fisk. Det nordligste anlegget med påvist *P. perurans* lå i Troms. Her var én fisk positiv.

B. cysticola ble påvist i de fleste fiskene i 20 av de 21 anleggene. *D. lepeophtherii* ble påvist i alle anlegg i Sør- og Midt-Norge, og i mer enn 80 % av alle undersøkte fisk, men synes mindre utbredt i Nord-Norge hvor mikrosporidien enten ikke ble påvist (i to anlegg) eller ble påvist i mellom 17-60 % av fisk (tre anlegg). I Sør- og Midt-Norge kan disse to mikroorganismene betegnes som «allesteds-nærværende» eller ubikvitære. Det kan være slik at de er opportunistiske agens som bare bidrar til gjelleproblem under spesielle omstendigheter.

P. salmonis ble enten ikke påvist eller påvist i færre enn 50 % av alle undersøkte fisk i hele 13 av 21 anlegg. Funnene antyder at det blir mindre av *P. salmonis* jo lengre nord anleggene befinner seg (Tabell 1).

Tabell 1. Resultater fra undersøkelser med real-time PCR for fire ulike mikroorganismer i gjeller fra minimum 10 laks fra hvert av 21 oppdrettsanlegg.

Landsdel	Anlegg	% positiv fisk for agens ¹			
		' <i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i> '	<i>Desmozoon lepeophtherii</i>	' <i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i> '	<i>Paramoeba perurans</i>
Sør-Norge	1	100	83	100	IP ²
		60	100	100	IP
	2	100	94	53	IP
	3 (AGD ³)	100	100	IP	100
	4 (AGD)	60	100	80	70
	5 (AGD)	100	100	50	80
	6	100	100	17	IP
	7	93	97	90	IP
	8	IP*	100	IP	IP
9 (AGD)	100	100	40	100	
Midt-Norge	10	100	90	70	IP
	11	100	97	93	IP
	12	100	100	IP	IP
	13	97	97	IP	IP
	14	100	100	IP	20
	15	100	80	3	IP
	16	100	100	27	IP
Nord-Norge	17	100	60	50	IP
	18	100	IP	IP	IP
		100	IP	7	7
	19	100	IP	13	IP
	20	80	30	67	IP
21	100	17	7	3	

¹Tallet angir % positive fisk per agens, mens fargene hver enkelt celle har er basert på inndeling av PCR-resultatene i tre like store intervaller (lav, moderat og høy infeksjonsgrad). Lys blå = ≥50 % positive prøver; lys grønn = lav infeksjonsgrad, turkis = moderat infeksjonsgrad, mørk turkis = høy infeksjonsgrad.

²IP = ikke påvist.

³AGD = anlegg der det ble påvist amøbegjellesykdom.

Påvisning utvalgte mikroorganismer i nyre og tarm

Forekomst av *B. cysticola*, *P. salmonis* og *D. lepeophtherii* ble også undersøkt i nyrevev fra 51 og tarmvev fra 14 laks. Disse stammet fra tre ulike anlegg.

P. salmonis ble ikke påvist i noen av prøvene, noe som ikke er uventet, da bakterien bare ble påvist i meget lav mengde i kun én gjelle fra de 51 fiskene. *B. cysticola* ble påvist i lav mengde i nyreprøver fra tre fisk fra ett av anleggene. I de samme 51 fiskene ble bakterien imidlertid påvist i betydelig mengde i samtlige gjeller. I dette tilfellet er det derfor nærliggende å tro at påvisningen av bakterien i de tre nyreprøvene, indikerer bakterie-DNA «på avveie». Det vil si at bakterie DNA i gjellene er ført til nyren via blodbanen. Det er derfor mindre sannsynlig at det er levende bakterier i nyren som følge av en systemisk infeksjon med *B. cysticola*.

I ett av de tre anleggene vi undersøkte, ble *D. lepeophtherii* påvist i alle gjelleprøver og nyreprøver og i mesteparten av tarmprøvene. Resultatene viste at mengden *D. lepeophtherii* er tilnærmet lik i ulike vev. Mikrosporidien ble ikke påvist i gjelle- og nyrevev i de to andre anleggene.

Oppsummering

- Bakterien *B. cysticola* er svært utbredt i gjeller hos oppdrettslaks i hele Norge.
- Funnene tyder ikke på at *B. cysticola* gir systemisk infeksjon hos laks.
- Mikrosporidien *D. lepeophtherii* er svært utbredt i Sør- og Midt-Norge, men synes mindre utbredt i Nord-Norge.
- *D. lepeophtherii* gir systemisk infeksjon hos laks.
- Bakterien *P. salmonis* synes ikke å være like vanlig som *B. cysticola* og *D. lepeophtherii*, og funnene antyder at bakterien er mindre utbredt i de nordligste landsdeler.
- Amøben *P. perurans* ble påvist i store mengder i gjeller fra alle fisk i fire anlegg i Sør-Norge med AGD.
- Anleggene med AGD-utbrudd hadde også høy forekomst av *D. lepeophtherii* og *B. cysticola*. På en av lokalitetene ble alle fire mikroorganismer påvist.
- *P. perurans* ble påvist i små mengder i et lavt antall fisk på ett anlegg i Midt-Norge med proliferativ gjellebetennelse.
- *P. perurans* ble påvist i gjeller fra en fisk i to lokaliteter i Nord-Norge uten at AGD ble påvist. Den nordligste lokaliteten lå i Troms.
- Funnene bekrefter at flere mikroorganismer opptrer samtidig i kronisk betente gjeller hos oppdrettslaks.

6.3. En langtidsstudie av en lokalitet med gjentatte gjelleproblemer

Etter planen skulle flere anlegg med gjentatte gjelleproblemer deltatt i denne studien. På grunn av problemer med å rekruttere slike anlegg, ble kun ett anlegg - anlegg X- inkludert i studien. Lokaliteten lå på Sør-Vestlandet og hadde en lang historie med gjelleproblemer på flere utsett.

Det aktuelle utsettet var satt ut høsten 2012. I perioden juni-desember 2013 ble det tatt prøver 12 ganger, minst 20 fisk hver gang (Tabell 2). Total-DNA ble ekstrahert og analysert for tilstedeværelse av de fire aktuelle mikroorganismene fra tilsammen 250 fisk. Infeksjonsgraden for de ulike agnes kan ikke sammenliknes direkte fordi påvist antall mål-genkopier for mikroorganismene ikke er kjent.

Ved første uttak ble kun *D. lepeophtherii* påvist i ubetydelige mengder i én av de undersøkte fiskene. Ved neste uttak var 55 % av fiskene positive for *B. cysticola* og én fisk hadde ubetydelige mengder av *P. perurans* (Tabell 2). Dette indikerer at minst tre av de fire inkluderte agnes var til stede i anlegget i løpet av juni.

Infeksjonsnivået og prevalensen spesielt for mikrosporiden, men også amøben, økte etter at infeksjonen med de to intracellulære bakteriene nådde sin topp i august for *B. cysticola* og oktober-november for *P. salmonis*.

Det ble ikke rapportert om utbrudd av gjellebetennelse i anlegget i løpet av perioden, selv om alle mistenkte agnes ble påvist innen utgangen av august. Fisken på lokaliteten ble aldri avluset.

Tabell 2. Real time PCR-resultater for fire ulike mikroorganismer i gjeller fra laks fra ett anlegg.

Uttaksdato i 2013	% positiv fisk for agens ¹			
	' <i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i> '	<i>Desmozoon lepeophtherii</i>	' <i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i> '	<i>Paramoeba perurans</i>
05.06	IP*	5	IP	IP ²
21.06	55	IP	IP	5
10.07	100	5	IP	IP
01.08	100	5	IP	IP
21.08	100	25	IP	IP
27.08	100	45	10	IP
11.09	100	80	25	IP
01.10	100	100	90	IP
10.10	95	100	100	5
24.10	95	100	100	20
12.11	95	100	100	10
03.12	85	100	100	45

¹Tallet angir % positive fisk per agens, mens fargene hver enkelt celle har er basert på inndeling av PCR-resultatene i tre like store intervaller (lav, moderat og høy infeksjonsgrad). Lys blå = ≥ 50 % positive prøver; lys grønn = lav infeksjonsgrad, turkis = moderat infeksjonsgrad, mørk turkis = høy infeksjonsgrad.

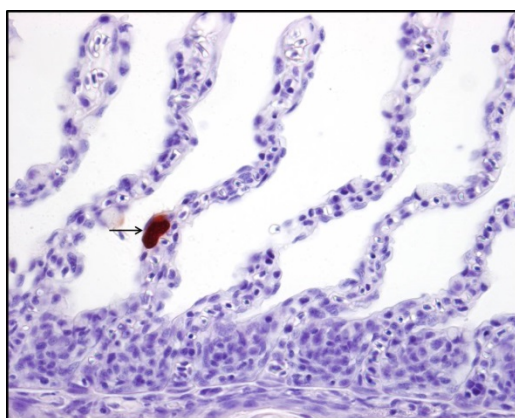
² IP = ikke påvist

Oppsummering

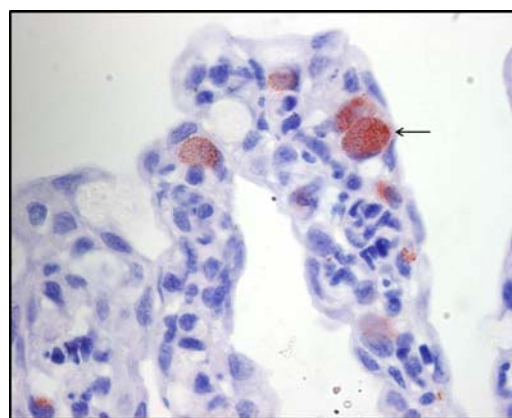
- I løpet av juni ble *D. lepeophtherii* og *P. perurans* påvist i ubetydelige mengder i 5 % av fiskene fra lokaliteten. *B. cysticola* ble påvist i lave mengder i 55 % av fiskene. I siste del av august var alle fiskene moderat til høygradig infisert med *B. cysticola* og et økende antall var positive for *D. lepeophtherii*. Ti prosent var nå også positive for *P. salmonis*.
- Infeksjonsnivået og prevalensen spesielt for *D. lepeophtherii*, men også for *P. perurans*, økte etter at infeksjonen nådde sin topp i. august for *B. cysticola* og oktober-november for *P. salmonis*.
- Det ble ikke påvist klinisk gjellebetennelse på lokaliteten og fisken ble aldri avluset.

6.4. Synliggjøring av mikroorganismer i gjellelev (in-situ hybridisering)

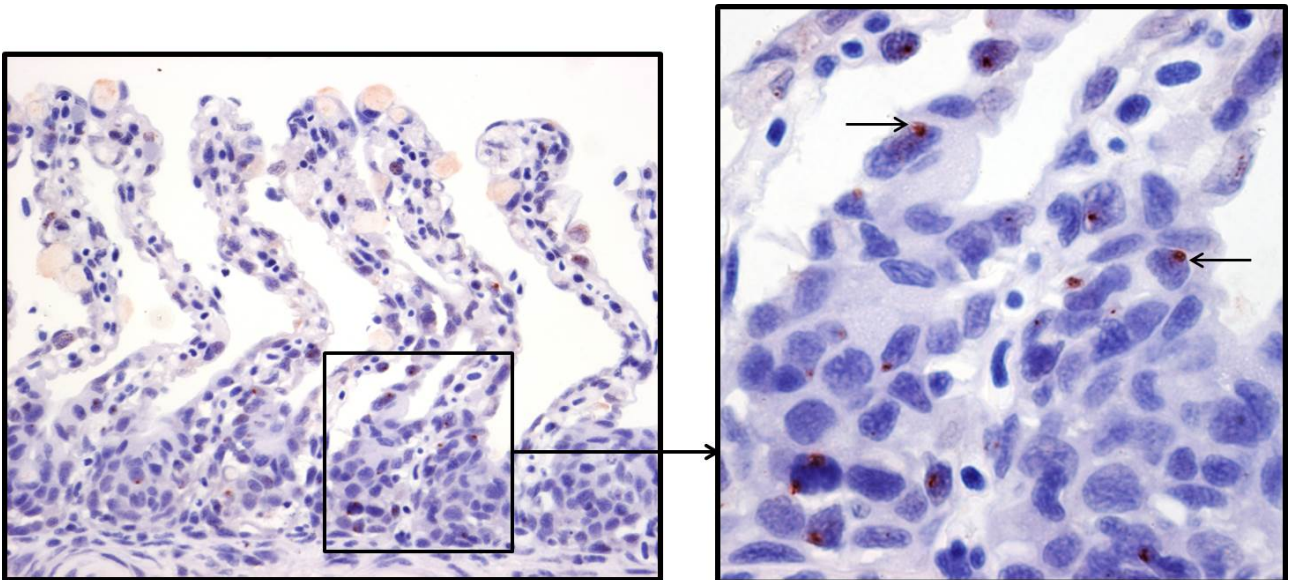
Det ble designet små DNA sekvenser (prober) som er laget slik at de binder seg til/hybridiserer med agens på en spesifikk måte. Visualiseringen er basert på en fargereaksjon i de tilfeller proben har bundet seg til et agens. Proben mot *B. cysticola* er allerede publisert, mens probene mot *P. salmonis* og *D. lepeophtherii* ble designet som en del av dette prosjektet (Figur 2-4).



Figur 2. In situ hybridisering av '*Candidatus P. salmonis*'. Mange bakterier i epitelceller (pil).



Figur 3. In situ hybridisering av '*Candidatus B. cysticola*'. Mange bakterier i epitelceller (pil).



Figur 4. In situ hybridisering av *D. lepeophtherii*. Denne metoden viser stadier av agens i cellekjerner (piler).

Ved hjelp av dette verktøyet blir mikroorganismene gjort synlig i gjellevevet, slik at man kan se hvilke reaksjoner de forårsaker i vevet.

Oppsummering

- Metoder for in-situ hybridisering av *P. salmonis* og *D. lepeophtherii* ble etablert i dette prosjektet

6.5. Gjellevevets reaksjon

Vurdering av vevsforandringer ved hjelp av histopatologi er en kvalitativ og dels semikvantitativ metode, og vurderingen er delvis subjektiv. I prosjektet ble det etablert et system for å beskrive histologiske gjelleforandringer. Metoden er tidkrevende og vil først og fremst være nyttig som et forskningsverktøy for å studere gjelleforandringer på en mest mulig objektiv og systematisk måte. Ettersom det er mangel på etablerte smitte-modeller for de fleste gjelleagens, foreligger det ikke en fullstendig og sikker angivelse av sykdomsforandringer som de ulike agens forårsaker.

Utbrudd/tilfeller av gjelleproblemer hvor det var klar dominans av en av de aktuelle organismene ble plukket ut. Tilfeller av gjellebetennelse hvor flere agens var involvert undersøkt ble også undersøkt.

Totalt 112 snitt vevssnitt fra seks ulike innsendelser ble vurdert. Avlesningen av snittene var blindet slik at det ikke var kjent hvilken sak det enkelte snittet tilhørte. Figur 5 viser et snitt av en normal gjelle.

Det ble etablert et skåringssystem som inkluderte:

- 1) Overordnet evaluering av preparatet med henblikk på snittkvalitet, snittplan og autolyse.
- 2) Vurdering av gjellene med hensyn til følgende hovedgrupper av forandringer:
 - a) forandringer som innebærer nedbrytning av vertsceller (f.eks. celledød)
 - b) sirkulasjonsforstyrrelser (f.eks. blødninger (Figur 6))
 - c) betennelsesforandringer (f.eks. betennelsesceller under epitelcellene (Figur 6), eller pustler (Figur 7))
 - d) adaptive responser (f.eks. økning i antall respiratoriske epitelceller (epitelproliferasjon) på de respiratoriske enhetene (lameller) (Figur 8) eller kloridceller (Figur 9)).

Mikroskopiske funn

Enkelte kroniske forandringer var vanlig forekommende i materialet. Slike forandringer var betennelsesceller under epitelcellene (Figur 6), epitelproliferasjon slik at lamellene ble tykke (Figur 7-8), og økt antall slimceller (Figur 8).

Andelen fisk som hadde disse forandringene var henholdsvis 89, 78 og 87 %, men utbredelsen av forandringene varierte. Med hensyn til epitelproliferasjon, hadde 23 % relativt liten utbredelse av denne forandringen, 31 % hadde moderat, mens 10 % hadde uttalt proliferasjon. Sammenvoksninger av lameller (Figur 7-8), vevsdød i fortykket epitel og blødninger (Figur 6) ble observert hos henholdsvis 54, 55 og 32 % av fiskene. Disse lesjonene fører til at det er vanskeligere for fisken å puste.

For å påvise kloridceller (celler som skiller ut salt) ble det brukt en metode som spesifikt farger denne typen celler rød. Metoden viste at i vev med mye *B. cysticola* var det en tendens til mer kloridceller enn normalt (Figur 9). Om dette kan settes i sammenheng med bakterien eller noe annet er ikke avklart.

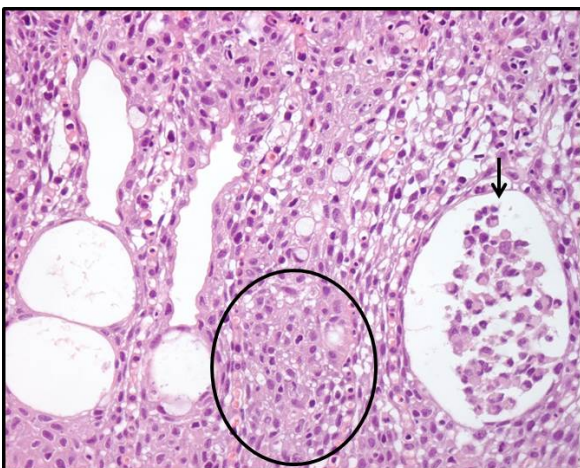
Aktiv epitelcelleproliferasjon ble synliggjort ved bruk av en fargemetode som merker cellekjerner i prolifererende celler med brun farge. Metoden er basert på et antistoff som binder seg til et protein som heter «proliferating cell nuclear antigen». Metoden viser at det er en pågående celledeling i disse lesjonene (Figur 10).



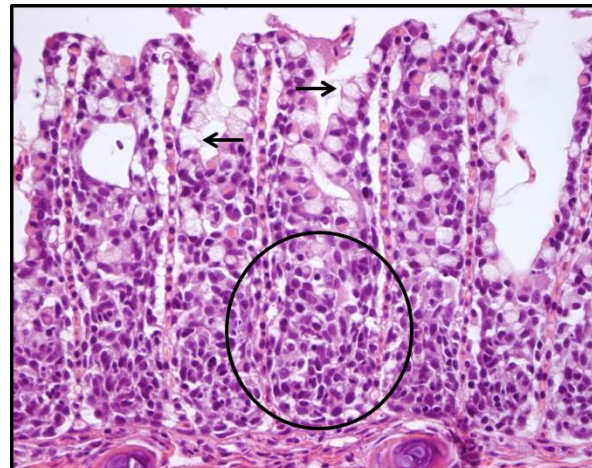
Figur 5. Normal gjelle med slanke respiratoriske enheter (lameller, piler) som sørger for effektiv gassutveksling.



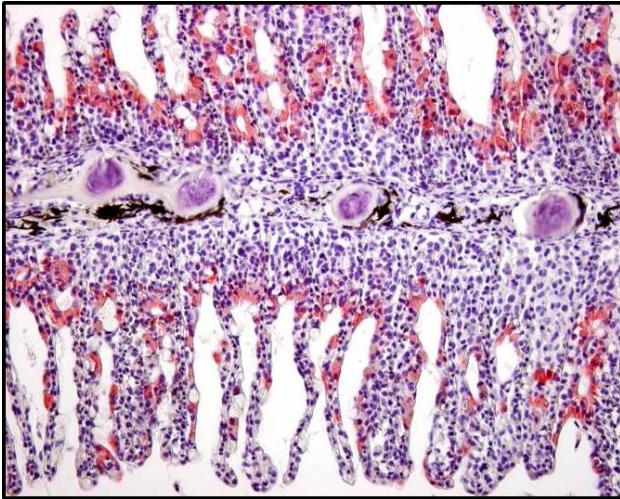
Figur 6. Blødninger (sirkel), fortykkede lameller (piler) og betennelsesceller (grønn pil) under epitel.



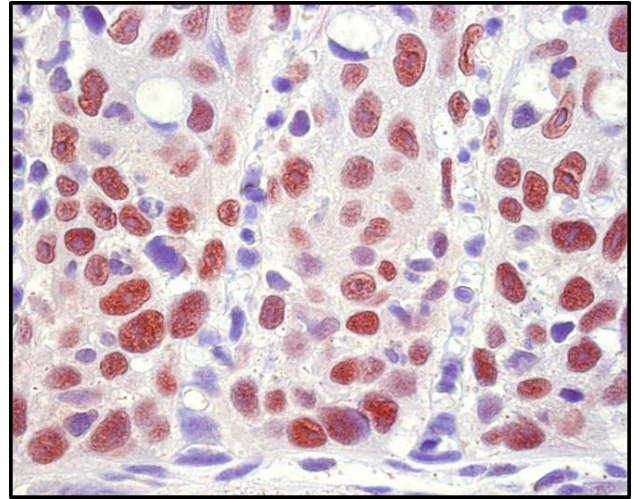
Figur 7. «Pustel»/ansamling av betennelsesceller i fortykket lamell. Lamellene har vokst sammen pga. epitelproliferasjon (sirkel viser område hvor to lameller har vokst sammen pga. epitelproliferasjon).



Figur 8. Økt antall slimceller (piler) og sammenvoksning av lameller pga. epitelproliferasjon (sirkel).



Figur 9. Økt antall kloridceller (røde).



Figur 10. Epitelceller i aktiv deling (brun merking av cellekjerner).

Oppsummering

- Det ble etablert et skåringsystem for bedømmelse av mikroskopiske forandringer i vev med kronisk gjellebetennelse.
- Mellom 80-90 % av fiskene hadde betennelsesceller under epitelcellene, epitelproliferasjon, slik at lamellene ble tykke, og økt antall slimceller.
- Mellom 30-55 % av fiskene hadde sammenvoksninger av lameller, vevsdød i fortykket epitel og blødninger.
- Det kan virke som om mye *B. cysticola* kan forårsake økt mengde kloridceller.

6.6. Er det noen sammenheng mellom gjelleforandringer og mikroorganismer?

Hensikten med denne delen av prosjektet var å undersøke om de ulike mikroorganismene kunne settes i sammenheng med spesielle forandringer i gjellevevet. Dette har betydning for å forstå sykdomsutviklingen. Her ble det gjennomført en statistisk analyse av skåringsresultatene fra de 112 snittene og resultatene fra PCR-analysene.

P. salmonis

Bortsett fra noe fortykkelse av gjelleepitelet i få områder, var det lite sykdomsforandringer knyttet til *P. salmonis*. (Figur 2)

B. cysticola

PCR-verdier som indikerte mye *B. cysticola* ble assosiert med fortykket epitel på lamellene og vevsdød i dette vevet, sammenvokste lameller, døde celler under overflaten (epitelet) på lamellene, blødninger i gjellevevet og økt mengde kloridceller. Det ble også påvist godt samsvar mellom histologisk funn av epiteliocyster og PCR-verdier for *B. cysticola*.

I vev med mye *B. cysticola* var det mye betennelse og kloridcellehyperplasi (Figur 9). Hypotesen var at denne bakterien også fantes fritt rundt i vevet og at frittliggende bakterier hadde fremprovosert betennelsen. Ved hjelp av en *in situ* metodikk var målet å visualisere mulige enkeltbakterier i lesjonene. Hypotesen ble ikke bekreftet ved hjelp av *in situ* metodikken og bakteriene var på dette stadiet nesten utelukkende lokalisert i cyster (Figur 3). En forklaring på dette kan være at fisken som ble undersøkt var i et stadium hvor vertsresponsen (betennelsen) hadde tatt knekken på bakteriene, eller at betennelsen hadde en helt annen forklaring.

D. lepeophtherii

Både funn av microcyster og oppsvulmede celler som inneholdt brunlig kornet materiale var assosiert med høy forekomst av mikrosporidien *D. lepeophtherii*.

In situ hybridisering for *D. lepeophtherii* viste merking i kjernene til epitelcellene i gjellene (Figur 4) noe som stemmer bra med parasittens livssyklus.

P. perurans

PCR-verdier som indikerte mye *P. perurans* var assosiert med økt tykkelse av gjelleepitelet. I tillegg fantes *P. perurans* som det eneste av de undersøkte agensene å være assosiert med visse forandringer på overflaten av fortykket epitel (metaplasi/avflating og avstøtning av celler). Det var også godt samsvar mellom histologiske funn av amøber og PCR-verdier for *P. perurans*.

I studien var det en del gjeller med telangieektasier (blødning i lameller). Disse var i vårt materiale ikke assosiert med forekomst av noen av organismene som det ble undersøkt for.

Oppsummering

- Det var lite sykdomsforandringer knyttet til *P. salmonis*.
- Mye *B. cysticola* ble assosiert med
 - Fortykket epitel på lamellene og vevsdød i dette vevet
 - sammenvokste lameller
 - døde celler under overflaten (epitelet) på lamellene
 - blødninger i gjellevevet og økt mengde kloridceller
- Det ble påvist godt samsvar mellom funn av epiteliocyster og PCR-verdier for *B. cysticola*.
- *D. lepeophtherii* ble assosiert med funn av microcyster og oppsvulmede celler med et brunlig, kornet materiale.
- Høy infeksjon med *P. perurans* var assosiert med økt tykkelse av gjelleepitelet.
- *P. perurans* syntes å forårsake karakteristiske forandringer på overflaten av fortykket epitelceller
- Det var godt samsvar mellom histologiske funn av amøber og PCR-verdier for *P. perurans*.

6.7. Genetisk karakterisering av mikroorganismer i gjeller med betennelse

Hensikten med denne undersøkelsen var å få mer kunnskap om 1) mikroorganismenes virulensgener, 2) antigener for vaksineutvikling, 3) sykdomsutviklingen, 4) hva som kreves for å få organismene til å vokse i en laboratoriekultur.

DNA ble ekstrahert fra et utvalgt gjellemateriale basert på PCR resultater som viste moderat til høy infeksjonsgrad av *B. cysticola*, *P. salmonis* og *D. lepeophtherii*.

Ekstrahert DNA ble sekvensert ved GATC Biotech i Tyskland ved bruk av Roche 454 teknologi. Dette resulterte i totalt 106 716 DNA sekvenser. Sekvensene hadde gjennomgående god kvalitet, med gjennomsnittslengde på 255 (± 146) bp.

Sekvensene ble behandlet i flere trinn og analysert med ulike bioinformatikk-verktøy. Først ble «low-complexity»-sekvenser, korte sekvenser og sekvenser som viste homologi med laksegenomet fjernet. Antallet ukjente sekvenser ble da redusert til 8179.

Disse 8179 sekvensene ble videre analysert med BLAST, som sammenligner nye ukjente sekvenser med kjente sekvenser som allerede ligger i gendatabasen. Denne analysen identifiserte 536 sekvenser som ikke stammet fra laks.

Resultatene indikerte at ca. 0,5 % av sekvensene stammet fra mikroorganismer til stede på eller i gjellevevet.

Etter analyse av de 536 gjenstående sekvensene sto det igjen 21 sekvenser som sannsynligvis stammer fra epiteliocystis-relaterte bakterier. Spesielt interessante sekvenser inkluderer både nye genetiske områder fra *B. cysticola* og sekvenser med likheter til epiteliocystis-relaterte bakterier fra abborfisken Cobia. Bakterielle sekvenser, sannsynligvis relatert til sekvenser tidligere identifisert fra proliferativ gjellesyke og AGD-affiserte gjeller, ble også identifisert.

Sekvenser med likhet til både virus-, sopp- og protist/protozoer-sekvenser ble også identifisert. Sopp/protist-sekvensene representerer antakelig mikrosporidien *D. lepeophtherii*.

Selv om denne kartleggingen leverte et forholdsvis begrenset antall sekvenser, utgjør disse sekvensene et reelt grunnlag for videre slektskapsforskning for aktuelle gjellepatogene agens. De kan også legge grunnlag for patogenese forskning og utvikling av nye diagnostiske metoder.

Forsøket representerer 'proof of principle' om at metagenomisk analyse fra sykt gjellelev kan levere mye relevant genetisk informasjon som foreløpig ikke kan avdekkes på andre måter.

Oppsummering

Følgende nytt genetisk materiale fra mulige gjellepatogene mikroorganismer ble identifisert:

- Nye sekvenser som stammer fra *B. cysticola*.
- Sekvenser med likheter til epiteliocystis-assosierte bakterier fra abborfisken Cobia.
- Nye sekvenser som trolig stammer fra mikrosporidien *D. lepeophtherii*.

Dette danner et reelt grunnlag for videre studier av slektskap og patogenese mht. gjellepatogene mikroorganismer.

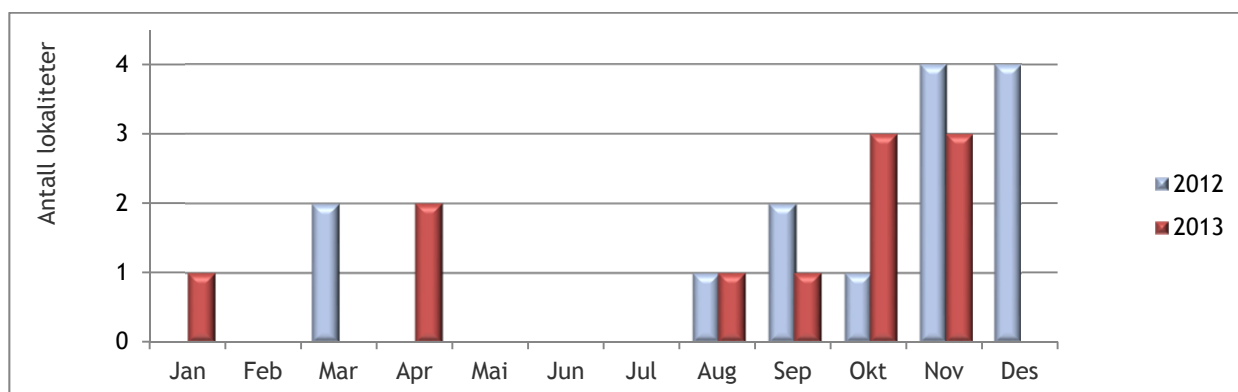
6.8. Er noen lokaliteter spesielt utsatt for å få gjellebetennelse og hvorfor?

I dette prosjektet undersøkte man om det kunne være noen sammenheng (assosiasjon) mellom lokaliteter med diagnosen proliferativ gjellebetennelse og potensielle risikofaktorer knyttet til drift av lokaliteten, sykdomshistorie og miljø.

Opplysninger knyttet til drift ble hentet fra Havbruksdata og inkluderte antall fisk og biomasse på lokaliteten, dødelighet, fôrforbruk, sjøtemperatur, størrelse på fisken (vekt), samlet biomasse innenfor 40 km radius, tidspunkt aktuell fisk ble satt i sjøen og hvor lenge den hadde stått i sjø før diagnosen proliferativ gjellebetennelse ble stilt. I sykdomshistorien så vi på utbrudd av pankreassykdom (PD) registrert i Veterinærinstituttets journalsystem og lakselusinfeksjon fra Lusedata. For å beskrive lakselusinfeksjonen benyttet man antall lus og behandlingshistorikk utarbeidet av Veterinærinstituttets forskergruppe på lakselus.

Miljødata ble hentet ut fra MOM-databasen hos Fiskeridirektoratet. Alle lokaliteter for fiskeoppdrett skal ha dokumentasjon på bunnforhold både under produksjonen og ved en eventuell utvidelse, basert på Norsk Standard 9410:2007. Denne dokumentasjonen består av tre komponenter; A, B og C. MOM-B omhandler undersøkelse av bunnfauna, kjemiske forhold og sensorisk analyse som samlet gir en miljøindeks for hvordan oppdrettet påvirker sjøbunnen under anlegget og i anleggets nærområde. Denne indeksen ble benyttet som en indikator på vannmiljøet i merdene for å se om bunnforholdene kunne ha betydning for proliferativ gjellebetennelse.

I perioden fra januar 2012 til desember 2013 identifiserte lokale fiskehelsetjenester 26 lokaliteter med atlantisk laks som hadde proliferativ gjellebetennelse. Forekomsten viste en sesongmessig variasjon som var like for begge årene og hyppigst på høsten (Figur 11). Anleggene i studien fordelte seg geografisk langs hele kysten fra Vest-Agder til Finnmark (Figur 1). Det ble i gjennomsnitt sendt inn 25 prøver fra hver lokalitet, varierende fra 5 til 88 prøver. En oversikt over regionvis plassering av disse på lokalitetsnivå er presentert i Tabell 1.



Figur 11. Månedlig antall lokaliteter med proliferativ gjellebetennelse i perioden 2012 - 2013.

P. salmonis, *B. cysticola*, *D. lepeophtherii* og *P. perurans* ble påvist henholdsvis i 69 % (18/26), 92 % (24/26), 85 % (22/26) og 31 % (8/26). Nitten prosent av anleggene hadde alle fire patogener til stede. På flertallet av lokalitetene (42 %) ble det påvist en kombinasjon av *P. salmonis*, *B. cysticola* og *D. lepeophtherii* (Tabell 3).

Tabell 3. 26 lokaliteter med proliferativ gjellebetennelse gruppert basert på PCR resultater for fire ulike agens.

PCR-resultat*				Antall (%) lokaliteter med denne kombinasjonen
'Candidatus Piscichlamydia salmonis'	'Candidatus Branchiomonas cysticola'	Desmozoon lepeophtherii	Paramoeba perurans	
1	1	1	0	11 (42,3)
1	1	1	1	5 (19,2)
0	1	1	0	3 (11,5)
0	1	1	1	2 (7,6)
1	1	0	1	1 (3,8)
1	1	0	0	1 (3,8)
0	1	0	0	1 (3,8)
0	0	1	0	1 (3,8)
0	0	0	0	1 (3,8)
1	0	1	1	0 (0)
1	0	1	0	0 (0)
1	0	0	1	0 (0)
0	1	0	1	0 (0)
0	0	1	1	0 (0)
0	0	0	1	0 (0)
1	0	0	0	0 (0)

* 0 = lokalitet inneholder ingen PCR positive fisk, 1 = lokalitet inneholder ≥ 1 PCR positiv fisk

Tabell 4. Oppsummering av forklaringsvariablene på lokalitetsnivå.

Forklaringsvariabel (2012-2013)	Lokaliteter med proliferativ gjellebetennelse (n=23*)		Lokaliteter uten proliferativ gjellebetennelse (n=15*)		P-verdi >0,2 basert på univariat analyse
	Median	Nedre / øvre kvartil	Median	Nedre / øvre kvartil	
Antall fisk	655 321	433 771 / 905 545	610 932	568 362 / 856 222	Nei
Biomasse (mill. tonn)	1,09	5,8 / 1,5	1,3	1,08 / 2,1	Ja
Andel dødelighet	0,003	0,002 / 0,005	0,003	0,002 / 0,003	Nei
Førforbruk (kg)	150 569	101 609 / 210 677	206 370	117 137 / 328 003	Ja
Sjøtemperatur	8,8	8,1 / 9,4	8,2	8,0 / 8,9	Nei
Gjennomsnittsvekt (kg)	1,8	0,9 / 2,5	1,9	1,4 / 3,4	Ja
Biomasse innenfor 40 km sone** (mill. tonn)	0,20	0,11 / 0,32	0,26	0,13 / 0,50	Ja
Antall måneder i sjø	10	7,5 / 10	9,5	6,7 / 11	Nei
Tidspunkt for sjøsetting		Vår = 11 Høst = 6 Ukjent = 2 Blandet = 4		Vår = 4 Høst = 6 Ukjent = 4 Blandet = 1	Nei
Miljøindeks fra MOM-B***		"1" = 10 "2" = 8 "3" = 2 "4" = 1		"1" = 8 "2" = 6 "3" = 0 "4" = 0	Nei
Andel lokaliteter med PD-utbrudd i 2012-2013		0,38 (10 av 26)		0,40 (6 av 15)	Nei
Antall lus per fisk	0,1832	0,0737 / 0,2431	0,1447	0 / 0,2630	Nei
Antall avlusninger	3	1 / 4	2	0,5 / 3	Ja

*Gjelder alle variabler unntatt for MOM-B, der antall lokaliteter MED gjellebetennelse var 21 og UTEN gjellebetennelse var 14, og for andel lokaliteter med PD-utbrudd i 2012-2013 (n= hhv 26 og 15)

**Et relativt mål som gir et vektet gjennomsnitt av biomassen rundt hver lokalitet

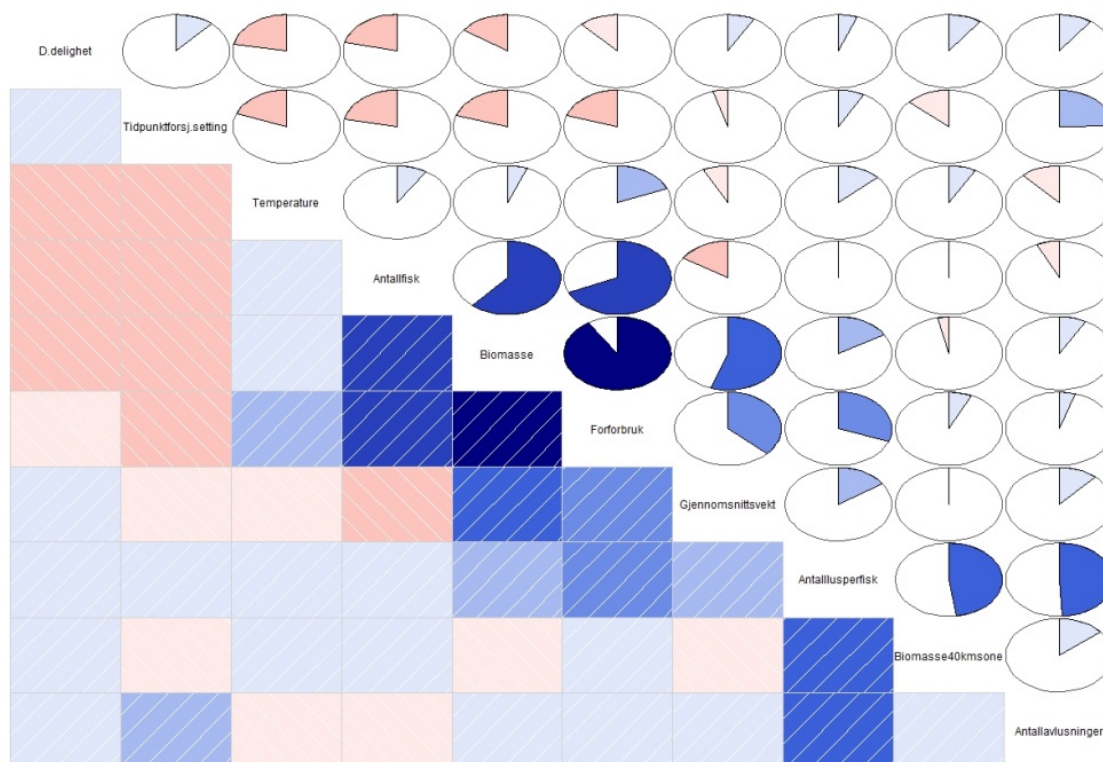
***Indeks basert på miljøundersøkelser

For samme periode (2012-2013) ble det identifisert lokaliteter med laks som ikke hadde kjente problemer med proliferativ gjellebetennelse, og som lå innenfor en avstand på 10 km fra et anlegg med proliferativ gjellebetennelse. I alt ble det påvist 97 slike lokaliteter hvorav 15 ble definert som «fri for proliferativ gjellebetennelse» av fiskehelsetjenestene som ble kontaktet. Den geografiske fordelingen av disse anleggene er vist i Figur 1. De samme lokalitetsdata ble samlet fra alle anlegg som ble inkludert i studien

Oppsummerende statistikk (median og nedre og øvre kvartiler) for hver av variablene som ble analysert i studien er vist i Tabell 4. En binær logistisk regresjonsanalyse ble gjennomført for å se om enkelte risikofaktorer var statistisk assosiert med proliferativ gjellebetennelse (Tabell 4).

Resultater fra den univariate analysen viste at fem variabler (forklaringsvariabler) var assosiert med proliferativ gjellebetennelse (p-verdi <0.2). Disse variablene var biomasse, fôrforbruk, gjennomsnittsvekt, biomasse innenfor 40 km radius, og behandlingshistorikk mot lakselus.

Disse variablene ble videre evaluert i en multivariabel logistisk regresjon. Korrelasjonstest og grafisk framstilling viste ingen eller liten intern korrelasjon mellom forklaringsvariablene, med unntak av biomasse som var moderat korrelert til fôrforbruk (korr=0,68) (Figur 12). Ved å benytte en steg for steg regresjonsanalyse, ble det bygget en prediktiv modell for forekomst av proliferativ gjellebetennelse (Tabell 5). I den endelige modellen var det ingen lineær sammenheng mellom de tre forklaringsvariablene.



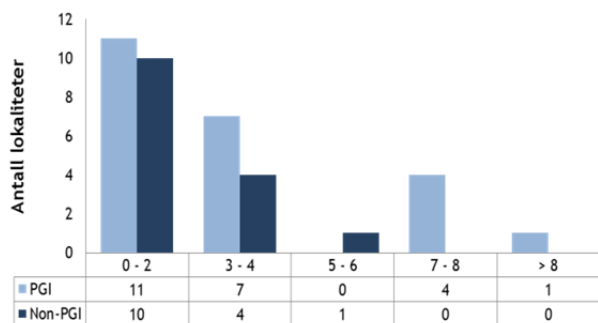
Figur 12. Korrelasjonsplot for alle forklaringsvariablene tatt fra Havbruksdata: rød farge indikerer negativ korrelasjon, blå farge indikerer positiv korrelasjon. Kakediagram viser grad av korrelasjon.

Tabell 5. Forklaringsvariabler i den endelige prediksjonsmodellen for forekomst av proliferativ gjellebetennelse og estimater for odd ratio (OR) med 95 % konfidensintervall (CI), justert for andre kovariater i modellen.

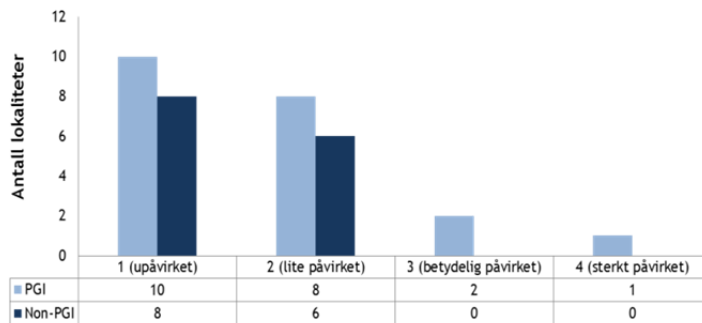
Variabler i endelig modell	Estimat	Std. Error	p-verdi	Justert OR (95 % CI)
Intercept	48,139	21,589		
Log(biomasse)	-1,216	0,658	0,064	0,3 (0,08-1,08)
Log(Biomasse innenfor 40km sone)	-1,231	0,677	0,069	0,29 (0,08-1,1)
Antall avlusninger	0,511	0,253	0,043	1,67 (1,01-2,74)

Den prediktive modellen inkluderte tre forklaringsvariabler: biomasse, biomassen innenfor 40 km radius og antall avlusninger. Økende biomasse og biomasse innenfor 40 km radius var negativt assosiert med proliferativ gjellebetennelse, mens antall avlusninger var knyttet til økt forekomst av sykdommen. Effekten av biomasse kan bero på en skjevhet i materialet siden lokaliteter uten proliferativ gjellebetennelse hadde jevnt over færre og større fisk (kg) pr. lokalitet enn lokaliteter med sykdommen. Et høyt antall lusebehandlinger kan være et uttrykk for ytre påkjenninger som kan disponere for gjelleinfeksjoner (Figur 13). Mulige forskjeller mellom ulike lusemiddel ble ikke vurdert i analysen.

Selv om det ikke var noen statistisk signifikant positiv assosiasjon mellom miljø-indeksen (MOM-B) og lokaliteter som hadde proliferativ gjellebetennelse, er det interessant å se at alle lokaliteter uten sykdommen hadde en MOM-B indeks på 1 eller 2, noe som indikerer en god miljøstatus. En MOM-B indeks på 3 eller 4 var kun observert på lokaliteter med proliferativ gjellebetennelse (Figur 14). Disse resultatene er imidlertid inkonklusive på grunn av få lokaliteter i studien.



Figur 13. Antall behandlinger mot lakselus per lokalitet.



Figur 14. MOM-B status på lokalitetene i studien.

Oppsummering

- Antall avlusninger er positivt korrelert til utvikling av proliferativ gjellebetennelse hos laks.

6.9. Smitteforsøk med *B. cysticola* på VESO Vikan

Hvordan *B. cysticola* smitter til fisk, og bakteriens infektivitet er lite kjent. For å få mer kunnskap om dette er det viktig å ha en funksjonell smittemodell. Det ble derfor gjennomført forsøk med injeksjon av smittestoff i bukhulen på fisk (intraperitoneal smitte) og eksponering av fisk i smittebad. Siden *B. cysticola* per i dag ikke kan dyrkes på laboratoriet, ble det brukt vevshomogenat fra fisk med kjent positiv smittestatus.

Innsamling av smittestoff

Smittematerialet ble samlet inn fra et anlegg (anlegg X) som hadde infeksjon med *B. cysticola* og flere andre agens over tid (Tabell 2). Infeksjon med *B. cysticola* ble først påvist 21. juni 2013 og smittestoff ble samlet inn primo september, på et tidspunkt hvor infeksjonsgraden med *B. cysticola* ble karakterisert som moderat. Smittematerialet var hele gjellebuer fra 25 fisk på ca. 1 kg. Hver gjellebue ble lagret i ca. 50 ml transport medium uten antibiotika. Materialet ble hentet fra anlegget og transportert nedkjølt til VESO Vikan over natt. Fra prøvetaking til smitte gikk det ca. 18 timer.

Forberedelse av smitematerialet

Gjellevevet ble skåret vekk fra brusken og deretter mortret. Materialet ble sentrifugert 4000g x 5 min og den klare delen av supernatanten fjernet. Den «flytende cellulære» delen ble brukt til intraperitoneal smitte (0,2 ml per fisk). For badesmitte ble hele homogenatet benyttet. Smittestoff fra begge forsøk ble oppbevart på RNAlater™, og senere qPCR analyse av smittestoffet viste moderat mengde *B. cysticola* (Ct-verdier mellom 25,9 og 29,0), en liten mengde *P. salmonis* (Ct-verdier mellom 29,8 og 35,0) og liten mengde *D. lepeophtherii* (Ct-verdier mellom 30,8 og 34,0).

Smitte

Femti laks (parr - ca. 40 g) ble smittet med 0,2 ml homogenisert gjellevev intraperitonealt. 50 kontrollfisk fra samme populasjon ble injisert intraperitonealt med 0,2 ml transportmedium. Fiskene ble holdt i ferskvann ved 15 °C og føret etter appetitt. Fiskene ble observert i 33 dager og prøver ble tatt fra fem fisk

ved hhv. 0, 2, 7, 14, 21 og 33 dager etter smitte. Prøvematerialet var gjelle- og nyrevev på formalin og RNAlater™.

Tretti post-smolt av laks (ca. 117 g) ble eksponert for ca. 225 ml homogenisert gjellelev infisert med *B. cysticola* i 5 timer i en minimums mengde oksygenert sjøvann. Vann-nivået ble redusert til ca. 100 l i eksponeringsperioden. Tretti kontrollfisk fra samme populasjon ble eksponert for 225 ml transportmedium i samme mengde oksygenert sjøvann. Etter 5 timer ble vanntilførsel. Fiskene ble føret etter appetitt. Fiskene ble observert i 33 dager og prøver ble tatt som beskrevet i foregående avsnitt.

Resultater

Det var ingen dødelighet etter badesmitte. Tre fisker døde etter intraperitoneal smitte, én på dag 1 og to på dag 4. Dødeligheten var sannsynligvis forbundet med stikkskader eller andre komplikasjoner i forbindelse med håndteringen, siden ingen av disse tre fikk påvist *B. cysticola* ved senere molekylærbiologiske undersøkelser.

Etter 33 dager var det 20 fisk igjen. Gjellelev fra disse ble undersøkt for *B. cysticola* ved hjelp av qPCR. Bakterien ble ikke påvist i noen av fiskene.

Det lyktes ikke å overføre *B. cysticola* i disse to smitteforsøkene. Mulige årsaker kan være at bakterien ikke overlevde transport til forsøksstasjonen, at smitematerialet ikke inneholdt infektive stadier av bakterien på smittetidspunktet eller at bakterien trenger en vektor for å smitte fisk.

I tillegg til disse to smitteforsøkene har prosjektet bidratt til å etablere en smittemodell for AGD med *P. perurans* på VESO Vikan.

Oppsummering

- *B. cysticola* lot seg ikke overføre i to smitteforsøk, et med intraperitoneal smitte og et med badesmitte.
- Prosjektet bidro til etablering av en smittemodell for AGD.

6.10. Workshops og formidling av resultater

Workshops

Det ble gjennomført en workshop 7. november 2012 med over 50 deltakere. Møtet ble karakterisert som meget vellykket av flere deltakere. Presentasjonene ble publisert på www.vetinst.no.

I mai (21.-23. mai) 2014 ble det gjennomført et tre dagers internasjonalt arrangement om gjellehelse i Oslo. Veterinærinstituttet og FHF sto som arrangører i samarbeid med det internasjonale gjellehelsenettverket «the Gill Health Initiative». Det var totalt ca. 130 deltakere fra Norge, Finland, Spania, Skottland, Irland, Canada, Australia og Chile. Det ble gitt mange gode tilbakemeldinger etter møtet. En oppsummering av arrangementet og presentasjoner ligger på Veterinærinstituttets hjemmeside (<http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/FHF-Gjelleprosjekt>)

Formidling av resultater

- Foredrag på brukermøter med Fiskehelsetjenester i Trondheim og Bergen i mai-juni 2013.
- Artikkel om prosjektet i Veterinærinstituttets magasin ARGUS' spesialnummer til AkvaNor 2013 (engelsk).
- Foredrag på FHF seminar om Robust fisk 2013.
- Foredrag på Pharmaq sitt seminar på AkvaNor 2013.
- Poster på EAFP-konferansen i september 2013 i Tampere, Finland.
- Foredrag på åpent fagseminar i Veterinærinstituttet 2013.
- Foredrag Havbrukskonferansen 2014.
- Foredrag på workshop og møte om gjellehelse i Oslo 2014.
- Foredrag på FHF seminar om fiskehelse 2014.

7. Veien videre

Resultatene fra prosjektet bekrefter at flere antatt sykdomsframkallende mikroorganismer ofte opptrer samtidig i gjeller med proliferativ betennelse. Det er kjent at *P. perurans* forårsaker en unormal økning i antall celler på overflaten av gjellene (proliferasjon). Den systematiske vevsundersøkelsen av affiserte gjeller (histopatologisk skåring) i prosjektet tyder på at *B. cysticola* også kan forårsake slike forandringer. Andre vevsforandringer ble også satt i sammenheng med disse mikroorganismene.

D. lepeophtherii ble påvist i syke gjeller, mens *P. salmonis* synes å være mer hamløs i denne forbindelse. Nyere studier tyder på at virus som *Piscine poxvirus* også kan være en bidragsyter i utviklingen gjellebetennelse hos laks. Veterinærinstituttet fikk i 2014 finansiering til et to-årig NFR-prosjekt som skal gjennomføre grunnleggende studier av epitelcellenes respons i forbindelse med proliferativ gjellebetennelse hos atlantisk laks (NFR prosjekt nr. 234037).

Dette FHF-prosjektet har bidratt til at det ble etablert og gjennomført et smitteforsøk med *P. perurans* som bekreftet at amøben gir smittsom gjellesykdom hos atlantisk laks under norske forhold. Videre viste resultatene at fisk på fire lokaliteter med påvist AGD også hadde moderat til høygradig infeksjon med flere av de andre mikroorganismene (Tabell 1).

Det er behov for modeller som kan gi mer kunnskap om hvordan flere faktorer påvirker fisken i forbindelse med utvikling av proliferativ gjellebetennelse. Veterinærinstituttet leder et prosjekt som startet i 2014, der målet er å etablere slike modeller. NIVA er hovedsamarbeidspartner i prosjektet som finansieres av NFR (233858: «Gill disease in Atlantic salmon - studies of multiple factors in challenge models»). De to prosjektene Veterinærinstituttet fikk innvilget i 2014 bygger videre på den kunnskapen vi har opparbeidet i dette FHF-prosjektet.

Det ble innhentet informasjon fra Havbruksdata, Lusedata og MOM-B-data for å finne mulige risikofaktorer for utvikling av proliferativ gjellebetennelse på lokalitetsnivå. Studien viste at det er en sammenheng mellom antall avlusninger og gjellebetennelse. Det er mulig at ytre påkjenninger som avlusing disponerer for gjellebetennelse, og at type avlusningsmiddel kan spille en rolle. Dette bør man undersøke nærmere.

8. Takk

Det rettes en stor takk til oppdrettsselskaper og fiskehelsetjenester som har bidratt med materiale og opplysninger, og til Fiskeridirektoratet for god hjelp mht. informasjon og tolkning av MOM-B-data.

9. Sentrale publikasjoner

Andrews S. FastQC v0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Bowman, J.P., Nowak, B., 2004 Salmonic gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *J. Fish Dis.* 27, pp. 483-492.

Hjeltnes B. (red.) (2009) Fiskehelserapporten. «Høstsyken» s. 15-16.

Kibbe WA. (2007) 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. *Nucleic Acids Res.* 35(webserver issue): May 25.

Kvellestad A. (2013) Gill inflammation in Norwegian seawater-farmed Atlantic salmon - a study of aetiology and manifestation. Thesis for the degree Doctor philosophia (Dr. philos.). Norwegian School of Veterinary Science, Oslo.

Mendoza M., Güiza L., Martinez X., Caraballo X., Rojas J., Aranguren L.F. and Salazar M. (2013) A novel agent (*Endozoicomonas elysicola*) responsible for epitheliocystis in cobia *Rachycentrum canadum* larvae *Dis Aquat Org* 106: 31-37, 2013.

Nylund S., Steigen A., Karlsbakk E., Plarre H., Andersen L., Karlsen M. Watanabe K. Nylund A. (2014) Characterization of '*Candidatus* Syngnamydia salmonis' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Arch Microbiol* DOI 10.1007/s00203-014-1038-3.

Nylund S., Nylund A., Watanabe K., Arnesen C.E. and Karlsbakk E. (2010) *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a Life Cycle in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 57(2) pp. 95-114.

Steinum T., Sjøstad K., Falk K., Kvellestad A. and Colquhoun D.J. (2009) An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture*; pp. 172-179.

Steinum T.M. (2010) Microbial studies related to proliferative gill diseases in Atlantic salmon. Thesis for the degree Philosophia Doctor (PhD). Norwegian School of Veterinary Science, Oslo.

Steinum T.M., Kvellestad A., Colquhoun D.J., Heum M., Mohammad S., Nygaard Grøntvedt R. and K. Falk K. (2010) Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Dis Aquat Org.* Vol. 91: pp. 201-211.

Tao T. Standalone BLAST setup for Unix. (2010) May 31. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640>.

Toenshoff E.R., Kvellestad A., Mitchell S.O., Steinum T., Falk K., Colquhoun D.J. and Horn M. (2012) Novel Betaproteobacterial Agent of Gill Epitheliocystis in Seawater Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) *PLOS One* Vol.7(3):e32696 doi: 10.1371/journal.pone.0032696.

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primær oppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 360 ansatte.

www.vetinst.no

Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9010 Tromsø
9010 Tromsø
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11
vitr@vetinst.no

Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad
9480 Harstad
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51
vih@vetinst.no

Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80
post.vib@vetinst.no

Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes
Pb 295 · 4303 Sandnes
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41
vis@vetinst.no

Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim
Postboks 5695 Sluppen · 7485 Tr.heim
t 73 58 07 50 · f 73 58 07 88
vit@vetinst.no

Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01
post@vetinst.no

