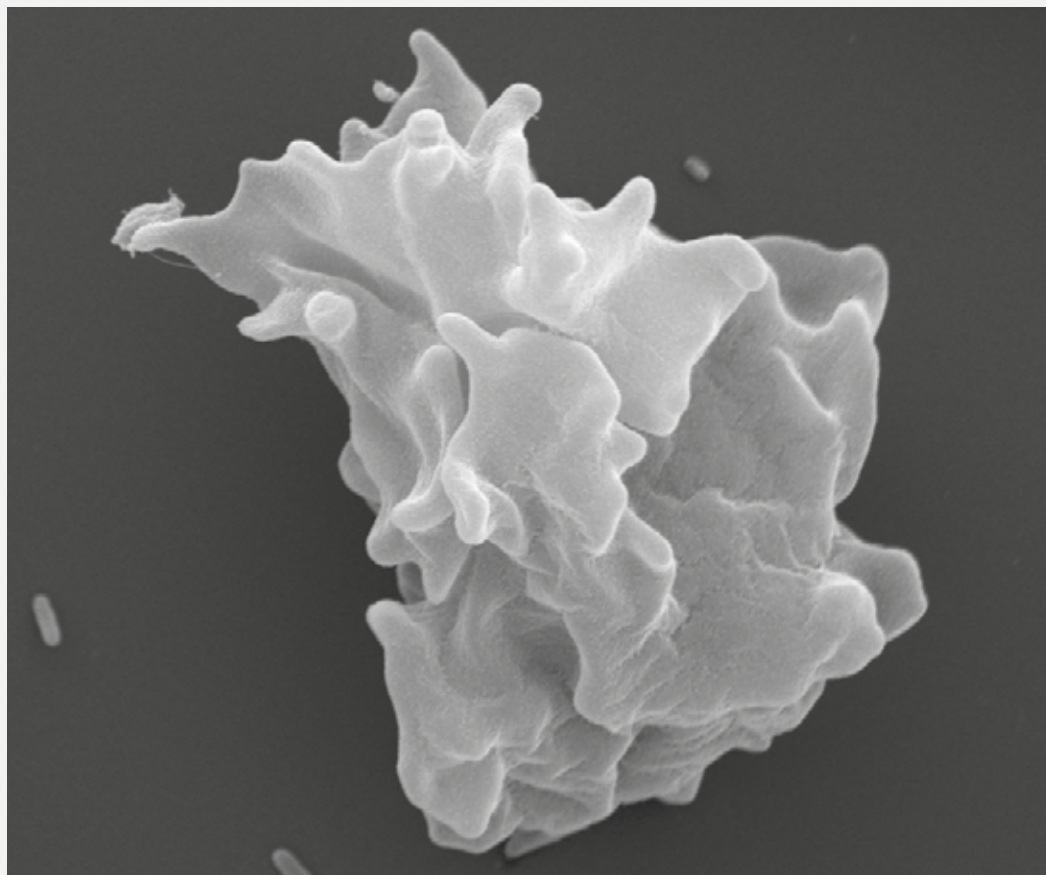


Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014

*Tor Atle Mo
Sigurd Hytterød
Anne Berit Olsen
Haakon Hansen*





Veterinærinstituttets rapportserie · 9 - 2015

Tittel

Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks
i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014

Publisert av

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

Form omslag: Graf AS

Forsidefoto: Jannicke Wiik-Nielsen, Veterinærinstituttet

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)

Forslag til sitering:

Mo, T.A., Hytterød, S., Olsen, A.B., Hansen, H.
Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre
oppdrettsanlegg i 2013-2014.

Veterinærinstituttets rapportserie 9-2015.

Oslo: Veterinærinstituttet; 2015.

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når kilde gjengis

Dato: 22. mai 2015



Veterinærinstituttets rapportserie
— Norwegian Veterinary Institute's Report Series

Rapport 9 · 2015

Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014

Oppdragsgiver

*Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF),
prosjektnummer 900926*

22. mai 2015

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)



Veterinærinstituttet
— Norwegian Veterinary Institute

Innhold

1. Sammendrag.....	5
2. Summary	5
3. Introduksjon.....	6
4. Problemstilling og formål	6
5. Gjennomføring	7
5.1. Valg av oppdrettslokaliteter	7
5.2. Hyppighet av prøveuttak, valg av prøvemateriale og prosjektets varighet	8
5.3. Prøvemateriale	8
5.4. Laboratorieanalyser	8
5.5. Vanntemperatur og salinitet	9
6. Resultater.....	9
6.1. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 1 (merd 5 og merd 9)	9
6.2. Vanntemperatur og salinitet i anlegg 1	12
6.3. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 2 (merd 1 og merd 6) ...	13
6.4. Vanntemperatur i anlegg 2	16
6.5. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 3 (merd 3 og merd 8) ...	17
6.6. Vanntemperatur og salinitet i anlegg 3	20
7. Diskusjon.....	22
7.1. Anlegg 1.....	22
7.2. Anlegg 2.....	25
7.3. Anlegg 3.....	30
8. Konklusjoner	34
8.1. Anlegg 1.....	34
8.2. Anlegg 2.....	35
8.3. Anlegg 3.....	35
9. Referanser	36
10. Takk til.....	36

1. Sammendrag

Amøbegjellesykdom (engelsk: AGD), forårsaket av *Paramoeba perurans*, etablerte seg som en alvorlig sykdom hos norsk oppdrettsfisk i 2012/2013. Det er i liten grad kjent hvordan AGD utvikler seg på laks i oppdrett over tid. Denne rapporten beskriver en studie av amøbeforekomst og AGD-utvikling hos laks i tre forskjellige oppdrettsanlegg over en periode på ca. syv måneder. Utviklingen av AGD og forekomst av amøber ble undersøkt ved hjelp av gjellescore, real-time PCR og histopatologi. Generelt var forekomst av amøber og AGD i alle anleggene på sitt høyeste i perioden oktober til desember. Sykdommen ble så faset ut i løpet av vinteren, trolig på grunn av synkende vanntemperatur. Resultatene viser at gjellescore, andel PCR-positive fisk og andel histologi-positive fisk utviklet seg relativt likt mellom merder innenfor samme anlegg. Alle anleggene ble behandlet med hydrogenperoksid (H₂O₂) mot *P. perurans* i prosjekt-perioden, men det var forskjeller i hyppighet og antall behandlinger. Effekten av behandlingene synes også å være forskjellig. Resultatene, både gjellescore og histologi, viser at sykdomsutviklingen var mest alvorlig i anlegg 3, og dette anlegget hadde også flest behandlinger i prosjektperioden. I anlegg 1 utviklet ikke AGD seg til å bli en alvorlig sykdom til tross for amøbeforekomst over en periode på ca. fire måneder. En sannsynlig årsak til dette var en relativt lav gjennomsnittlig salinitet gjennom prosjektperioden (28 ‰), sammenlignet med de andre anleggene. Studien viser også at amøben kan påvises ved real-time PCR før den forårsaker AGD-patologi, og at fisken ser ut til å bruke tid på å reparere gjelleskadene etter at amøbene ikke lenger er tilstede. En rekke faktorer, som for eksempel forskjeller i behandlingsregime og geografisk beliggenhet, vanskelig-gjør en direkte sammenligning av AGD-utviklingen mellom anleggene.

Hovedfunn:

- AGD-utbruddene varte fra september til januar-februar i alle tre oppdrettsanlegg.
- To anlegg hadde en overvekt av fisk med mild AGD-patologi, mens ett anlegg hadde mer uttalte funn.
- Det var et godt samsvar mellom PCR-funn og histopatologiske funn både på individ og merdnivå.
- Det var ikke et like godt samsvar mellom gjellescore og PCR/histopatologi. Tidvis var gjellescore høyere enn det PCR/histologiske funn skulle tilsi. Dette kan skyldes at gjellescore omfatter forandringer med annen årsak enn amøber. En slik «overscoring» kan resultere i unødvendige behandlinger rettet mot amøber.
- *Paramoeba perurans* forårsaker AGD ved lavere vanntemperatur i norske oppdrettsanlegg enn det som er observert i andre land. Under norske forhold viser våre undersøkelser at AGD utvikles hos laks ved vanntemperaturer ned mot 6-7 °C.
- Hydrogenperoksidbehandling så ut til å ha kortvarig og/eller begrenset effekt på *P. perurans* og utvikling av AGD i september/oktober sammenlignet med senere behandling i januar/februar. Dette kan ha sammenheng med temperaturavhengig oppformering av amøber og konstant smittepress i miljøet.
- Studien bekrefter at salinitet er av betydning for utvikling av AGD. Utvikling i saltholdighet ved en lokalitet bør vurderes i forhold til nødvendigheten av gjennomføre kjemisk behandling rettet mot amøber.

2. Summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by *Paramoeba perurans*, was established as a severe disease in Norwegian fish farms in 2012/2013. Longitudinal studies of AGD development in farmed Atlantic salmon under North Atlantic conditions are lacking. This report describes the occurrence of *P. perurans* and the development of AGD in Atlantic salmon in three different farms over a period of almost seven months. The development of AGD and occurrence of amoebae were examined using a gill score system, real-time PCR and gill histopathology. Generally, the abundance of amoebas and AGD were at the highest in the period October to December in all three farms. The disease gradually disappeared during the winter, likely due to the declining water temperature. The results show that the gill score, proportion of PCR-positive fish and proportion of histology-positive fish had a similar development pattern in cages within the same farm. All three farms were treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) against *P. perurans* during the project, but there were differences in the frequency and number of treatments. The effects of the treatments also seem to be different. The results, both for gill scores and histopathology, show that the disease was most severe in farm 3 and this farm also had the highest number of treatments during the project. In farm 1, AGD did not develop to a severe disease despite the continuous presence of amoebae during a period of approximately four months. This could likely be due to the relatively low mean seawater salinity throughout the project period (28 ‰), compared to the other two farms. The study also shows that *P. perurans* can be detected by real-time PCR before the amoebae causes gill pathology, and that the fish need some time to repair the gill damages after the amoebae have disappeared. A number of factors, such

as differences in treatment regimens and geographical locations, complicate a direct comparison of the AGD development between the three farms.

Major observations:

- The AGD outbreaks lasted from September to January-February in all three farms.
- In two farms most of the Atlantic salmon had mild AGD pathology, while the fish in the third farm had severe pathology.
- There was a good correlation between PCR results and histopathology at both individual fish and cage level.
- Occasionally the gill score was higher than the PCR/histological findings suggested, indicating an “over-scoring” of gills. Such an “over scoring» may result in unnecessary treatments directed towards amoebas.
- *Paramoeba perurans* causes AGD in Norwegian fish farms at lower water temperatures than observed in other countries. At Norwegian conditions AGD can be developed in Atlantic salmon at water temperatures down to 6-7 °C.
- Hydrogen peroxide treatment seems to have a short-lasting and/or limited effect on *P. perurans* and the development of AGD in September/October compared to treatments in January/February. This may be associated with temperature dependent propagation of amoebas and constant infection pressure in the environment.
- The study confirms that seawater salinity is of importance for the development of AGD. The salinity in a locality should thus be taken into consideration when planning a chemical treatment directed towards *P. perurans*.

3. Introduksjon

Amøbegjellesykdom (engelsk: AGD), forårsaket av *Paramoeba perurans*, var den mest tapsbringende laksesykdommen i irske og skotske oppdrettsanlegg i 2012 og samme år ble AGD påvist i fem norske oppdrettsanlegg. Historien fra Irland og Skottland gav grunn til å frykte et stort antall AGD-utbrudd i Norge i 2013. Kunnskap om sykdomsutvikling og smittespredning under norske forhold var mangelfull, og våren 2013 laget Veterinærinstituttet et prosjekt for FHF der målsetningen var å følge smittespredning og sykdomsutvikling etter positive AGD-funn i løpet av 2013. Prosjektet omfattet tre arbeidspakker (delprosjekter); én som omfattet sykdomsutvikling, én som omfattet smittespredning og én som omfattet små reservoarstudier. Det var vanskelig å forutsi hvordan AGD ville ramme norske oppdrettsanlegg i 2013, prosjektet ble derfor designet slik at prosjektstyringsgruppen raskt kunne beslutte endringer i innhold og omfang i de ulike arbeidspakkene.

Fra de første påvisningene av *P. perurans* og AGD hos oppdrettslaks i september 2013, tok det bare noen dager til sykdommen ble påvist ved mange oppdrettslokalteter over et stort geografisk område. I og med at amøben syntes å ha en stor geografisk forekomst, ble det vurdert som lite hensiktsmessig å gjennomføre de to arbeidspakkene som omfattet smittespredning og reservoarstudier. Prosjektstyringsgruppen besluttet en endring i prosjektet slik at det bare ville omfatte sykdomsutvikling. Samtidig ble antall oppdrettslokalteter med AGD-utbrudd som skulle følges over tid, økt fra en til tre. Ved hver lokalitet skulle AGD-utviklingen følges i to merder. Hver av de tre næringsaktørene i styringsgruppen valgte ut et av sine oppdrettsanlegg for denne studien.

Prosjektets styringsgruppe har bestått av Olav Breck (Marine Harvest), Tor Eirik Homme (Grieg Seafood) og Bjarne Reinert (Sjøtroll Havbruk/Lerøy Vest). Merete Bjørgan Schrøder (FHF) har vært observatør. Prosjektets referansegruppe har bestått av Vidar Aspehaug (Patogen Analyse) og Amund Litlabø (Pharmaq Analytic), mens prosjektgruppen har bestått av Anne-Gerd Gjevne, Atle Lillehaug og Tor Atle Mo (alle Veterinærinstituttet).

4. Problemstilling og formål

AGD ble første gang påvist i fire norske oppdrettsanlegg i 2006 (Steinum mfl. 2008), men verken AGD eller *P. perurans* ble funnet på oppdrettslaks i de fem påfølgende år. Da AGD utviklet seg til å bli det største sykdomsproblemet for irsk og skotsk lakseoppdrett i 2012 samt at AGD ble påvist i fem norske oppdrettsanlegg samme år, var det grunn til å frykte at AGD kunne bli en alvorlig sykdom også for norsk oppdrettsnæring i 2013 og kanskje i påfølgende år. På dette tidspunktet hadde naturligvis Norge mangelfull kunnskap og erfaring med den nye fiske sykdommen. Flere forskningsprosjekter ble igangsatt for

å få økt kunnskap om AGD under norske forhold. I dette prosjektet der AGD-utvikling hos oppdrettslaks ble studert over lang tid, var hensikten å få økt kunnskap om hvor raskt AGD utvikles, hvor alvorlig AGD blir på individ og merd nivå under norske forhold, hvor lenge sykdommen varer og om amøbene forsvinner etter at sykdommen fases ut gjennom vinteren. Samtidig gav studien mulighet til å sammenligne ulike diagnostiske metoder (gjellscore, real-time PCR, histopatologi) som brukes til å påvise *P. perurans* og AGD gjennom ulike faser av sykdomsutviklingen. I flere av merdene som inngikk i studien, ble AGD så alvorlig at det var nødvendig med én eller flere kjemiske behandlinger mot *P. perurans*. Således gav dette prosjektet også økt kunnskap om effekt av kjemiske behandlinger på amøbene og om amøbenes reetablering etter slik behandling på ulike tider av året. Studien gav også økt kunnskap om AGD-utvikling ved ulike sjøvannssaliniteter.

5. Gjennomføring

5.1. Valg av oppdrettslokaliteter

Hvert av de tre oppdrettsselskapene, som var representert i styringsgruppen, valgte ut hver sin lokalitet med påvist AGD. Ved hver lokalitet ble det besluttet å følge AGD-utviklingen i to laksemerder, først og fremst for å sikre at det faktisk ble mulig å følge utvikling av AGD ved en lokalitet (noe vi ikke kunne være sikre på på forhånd), men også for å kunne studere AGD-utviklingen i to nærliggende laksemerder innenfor samme lokalitet. Uttak av prøver kom raskt i gang i én av lokalitetene, mens det tok lengre tid (3-4 uker) før prøveinnsamlingen kom i gang ved de to andre lokalitetene. I en periode fra 15.1.2014 til 14.3.2014 var det ikke mulig å ta ut prøver i anlegg 1 på grunn av kraftig vind. Det samme var tilfelle i perioden 5.12.2013 til 5.2.2014 i anlegg 3. Dette gav et «hull» i prøveserien i de to anleggene. Det var opprinnelig planlagt at prøveinnsamlingene skulle pågå i en periode på fire måneder. Endringer i prosjektinnhold og periodevis stopp i innsamlingen gjorde det mulig, innenfor prosjektets økonomiske ramme, å følge AGD-utviklingen i nesten syv måneder, fra 28. september 2013 til 22. april 2014. De tre valgte oppdrettslokalitetene ligger i henholdsvis Rogaland (Grieg Seafood) og Hordaland (Marine Harvest og Lerøy).

5.1.1. Lokalitetsdata anlegg 1

Fisken (avstamning/avlslinje Salmobreed) ble satt ut den 7.4.13 i begge merder og hadde normal appetitt og vekst i prosjektperioden. Dødeligheten i prosjektperioden var på 4,96 % i merd 5 og på 1,83 % i merd 9. Merd 5 ble behandlet med H₂O₂ (1400 ppm) mot AGD i uke 44. Merd 9 ble ikke behandlet mot AGD. Begge merder var av typen 160 meter plastring.

5.1.2. Lokalitetsdata anlegg 2

Fisken i merd 1 (avlslinje Aqua Gen) ble satt ut den 28.8.2013, mens fisken i merd 6 (avlslinje Stofnfiskur) ble satt ut den 9.8.2013. Fisken i begge merder ble behandlet med H₂O₂, med en dags mellomrom, hhv den 16. og 17. januar 2014. Begge merder var også behandlet en gang med H₂O₂ den 30.10.2013 i merd 1 og den 31.10.2013 i merd 6, dvs. før det første prøveuttaket i prosjektet.

5.1.3. Lokalitetsdata anlegg 3

Fisken (avstamning/avlslinje Mowi) ble satt ut den 1.6.2013 i merd 3 og den 23.6.2013 i merd 8. Fisken i begge merder hadde lav appetitt og dårlig vekst i perioden september til desember og normal appetitt fra januar. Dødelighet i prosjektperioden var 15,4 % (AGD 11,2 %, behandlingsdødelighet 0,4 %, tapere 2,7 %, uten diagnose 1,1 %) i merd 3 og 13,8 % (AGD 7,9 %, behandlingsdødelighet 1,9 %, tapere 4,0 %) i merd 8.

Følgende behandlinger ble gjennomført i merd 3:

1.10.2013 med H₂O₂ (1100 ppm) mot AGD
24.10.2013 med H₂O₂ (1300 ppm) mot AGD
13.-20.11.2013 med ferskvann mot AGD
17.1.2014 med H₂O₂ (1700 ppm) primært mot lakselus

Følgende behandlinger ble gjennomført i merd 8:

01.10.2013 med H₂O₂ (1275 ppm) mot AGD
25.10.2013 med H₂O₂ (1300 ppm) mot AGD
13.-20.11.2013 med ferskvann mot AGD
19.1.2014 med H₂O₂ (1700 ppm) mot AGD

Begge merder var av typen stålbur, 24x24m, med dybde 20m (til blyline).

5.2. Hyppighet av prøveuttak, valg av prøvemateriale og prosjektets varighet

Basert på erfaring fra smitteforsøk med *P. perurans* og utvikling av AGD hos oppdrettslaks, var intensjonen å ta prøver hver 14. dag i en periode på fire måneder. Dette opplegget ble fulgt så langt det var praktisk mulig. Vi observerte imidlertid at utfasingen av AGD og reparasjon av affisert gjellelev tok lengre tid enn antatt. Styringsgruppen ønsket derfor at prosjektet fortsatte inntil AGD-forandringene og amøbene var borte fra fiskenes gjeller. Dette resulterte i at prøveuttaksperioden totalt ble på nesten syv måneder.

For å studere AGD-utvikling hos laks er det viktig å vite om fiskene også er bærere av andre infeksjoner og/eller har kroniske eller akutte gjelleforandringer. Dette kunne i så fall være av betydning for våre analyseresultater og vurderinger. Ved første og siste prøveuttak i hver merd ble det i tillegg til gjeller, derfor tatt prøver av hjerte, nyre, lever, milt og pankreas som ble lagt på formalin og RNA-later.

5.3. Prøvemateriale

5.3.1. Utsendelse av prøvetakingsutstyr og innsendelse av prøver

Veterinærinstituttet laget en arbeidsbeskrivelse for prøveuttak og sendte ut nødvendig prøvetakingsutstyr til fiskehelsetjenesten FOMAS, som bistod med prøveuttaket, eller til fiskehelsepersonell ved den enkelte oppdrettslokalitet. Prøvene ble returnert til Veterinærinstituttet i Oslo som fordelte prøvene mellom de to involverte laboratoriene (se 5.4. Laboratorieanalyser).

5.3.2. Registrering av gjellescore

Alle visuelle gjellundersøkelser hos oppdrettslaks og vurderinger av gjellescore ble gjort av fiskehelsetjenesten FOMAS eller av selskapenes eget fiskehelsepersonell. Vurderingen av gjellescore fulgte Taylor mfl. (2009).

5.3.3. Uttak av vevsprøver

Alle uttak av vevsprøver fra oppdrettslaks ble gjort av fiskehelsetjenesten FOMAS eller av selskapenes eget fiskehelsepersonell.

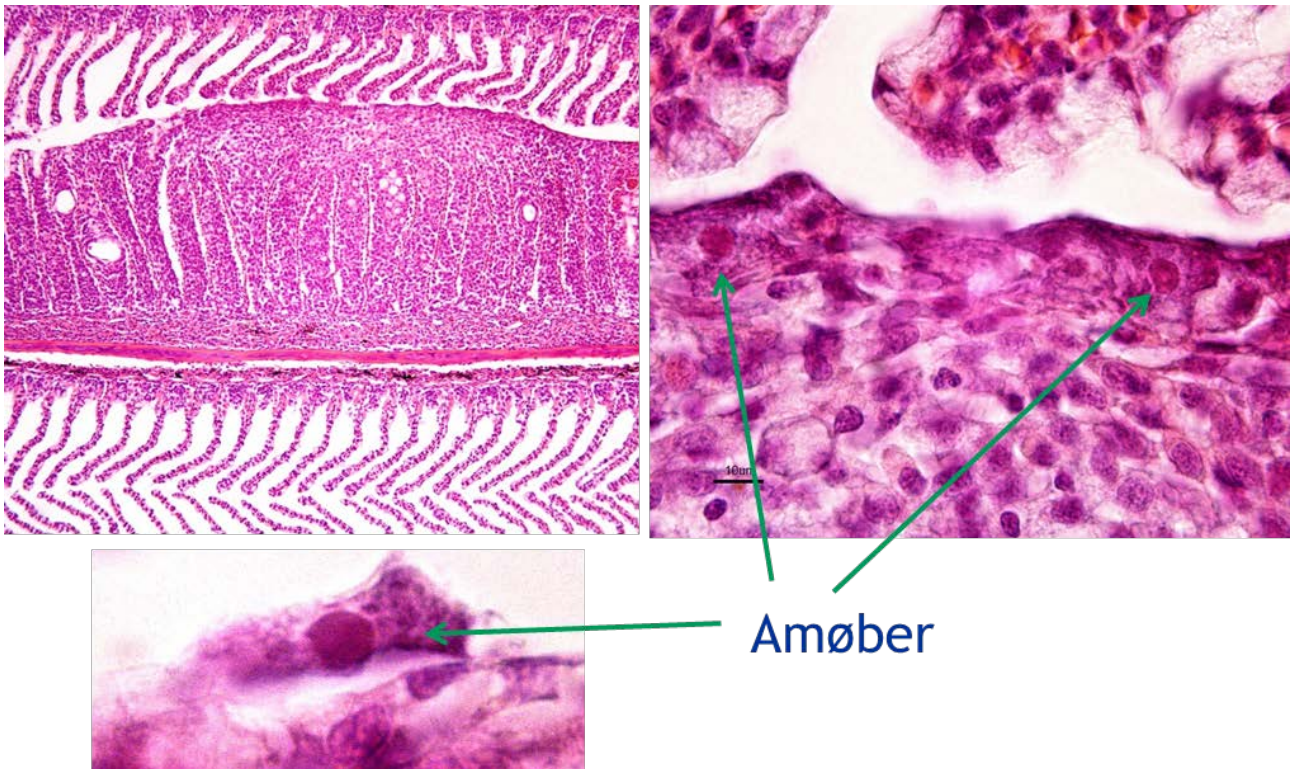
Ved alle prøveuttak, ble det fortrinnsvis tatt prøver fra 10 normale fisk fra hver merd. Tapere ble unngått fordi de kan ha en annen sykdomsutvikling enn normale fisk. Fiskene ble avlivet med en overdose bedøvelsesmiddel. Avliving med et slag i hodet ble unngått fordi dette kan forårsake gjelleblødninger. Etter registrering av gjellescore (se 3.3.2.), ble «standardgjellen» (gjellebue nr. 2 på venstre side) klippet ut og delt i to. En del ble fiksert i formalin for histologisk vurdering av gjellepatologi. Den andre delen ble konserveret i etanol (96 %) og brukt til påvisning av amøber ved hjelp av molekylærbiologiske metoder.

5.4. Laboratorieanalyser

Etter mottak av vevsprøver, ble formalinfikserte gjeller og andre organer videresendt til Veterinærinstituttets laboratorium i Bergen for prosessering og analyser av vevssnitt. Gjeller og andre organer som var konserveret på RNA-later, ble analysert med molekylærbiologiske metoder ved Veterinærinstituttet i Oslo.

5.4.1. Histologi

Vevssnitt av formalinfikserte gjeller og andre organprøver ble fremstilt etter standard prosedyrer. Gjellelev og organvev ble dehydrert og støpt inn i parafin. Fra parafinblokkene ble det laget tynne vevssnitt som så ble farget med hematoxylin og eosin. Histopatologiske vurderinger av de fargete vevssnittene ble gjort ved hjelp av et lysmikroskop (Figur 1). Prosentvis andel av området med vevsforandringer typisk for AGD ble registrert (Mitchell mfl. 2012).



Figur 1. Gjellelevssnitt fra laks med AGD. Øverst til venstre: Hyperplasi og sammenvokste lameller på den ene siden av filamentet. Øverst til høyre og nederst til venstre: Amøbene er assosiert til de typiske lesjonene.

5.4.2. PCR

DNA ble ekstrahert fra laksegjeller med DNeasy® Tissue Kit protocol (Qiagen) og ekstraksjonen ble utført på en QiaCube robot (Qiagen). Forekomsten av *P. perurans* på laksegjellene ble analysert ved bruk av en single-plex realtime-PCR spesifikk for *P. perurans* med primere og prober som gitt i Fringuelli mfl. (2012). Prøver med en Ct > 37 ble regnet som negative. Som en test på ekstraksjonsprosedyren og kvaliteten på DNA ble et utvalg prøver analysert med hensyn på genet Elongation factor 1-alpha (Elf-1a) fra laks, også dette med prober og primere som gitt i Fringuelli mfl. (2012).

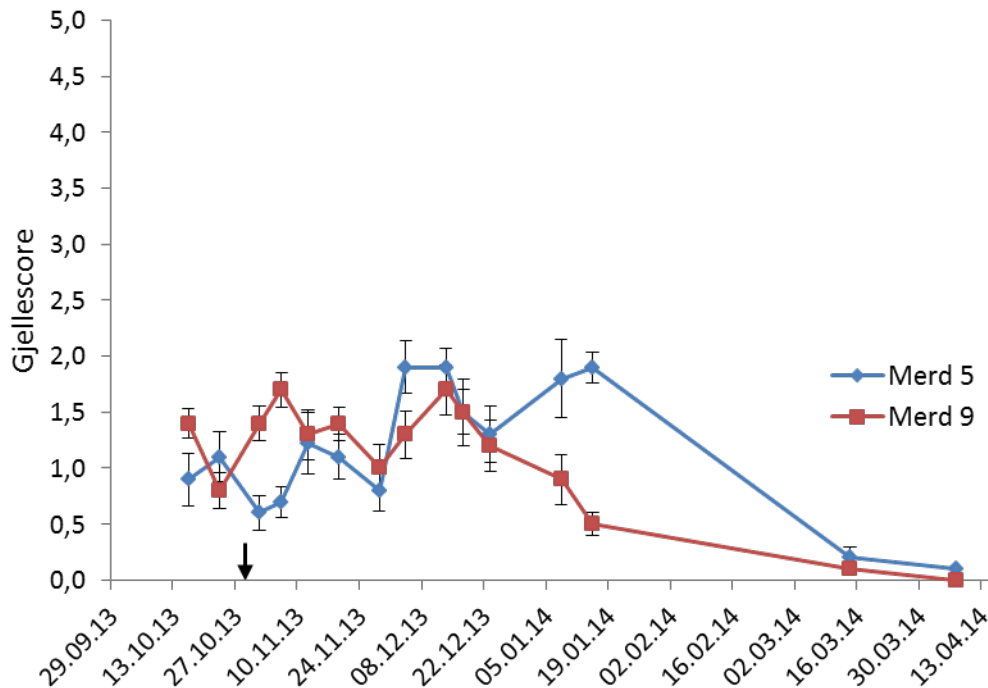
5.5. Vanntemperatur og salinitet

Ved alle de tre anleggene ble det gjort daglige målinger av vanntemperatur. I tillegg gjorde anlegg 1 og 3 salinitetsmålinger. Målingene ble gjennomført fra 1. september 2013 til 1. mai 2014, og er gjort tilgjengelige for publisering i denne rapporten. Vanntemperatur ble målt på 3, 10 og 15 meter i anlegg 1 og på 0,5, 5 og 15 meter i anlegg 3. I anlegg 2 ble vanntemperatur målt ved 7 meters dyp. Anlegg 1 har oppgitt en gjennomsnittsverdi for salinitet for de daglige målingene, men har ikke oppgitt hvilke dyp som er grunnlaget for gjennomsnittsmålingene. I anlegg 2 ble det ikke målt salinitet, mens salinitet og vanntemperatur ble målt på samme dyp i anlegg 3.

6. Resultater

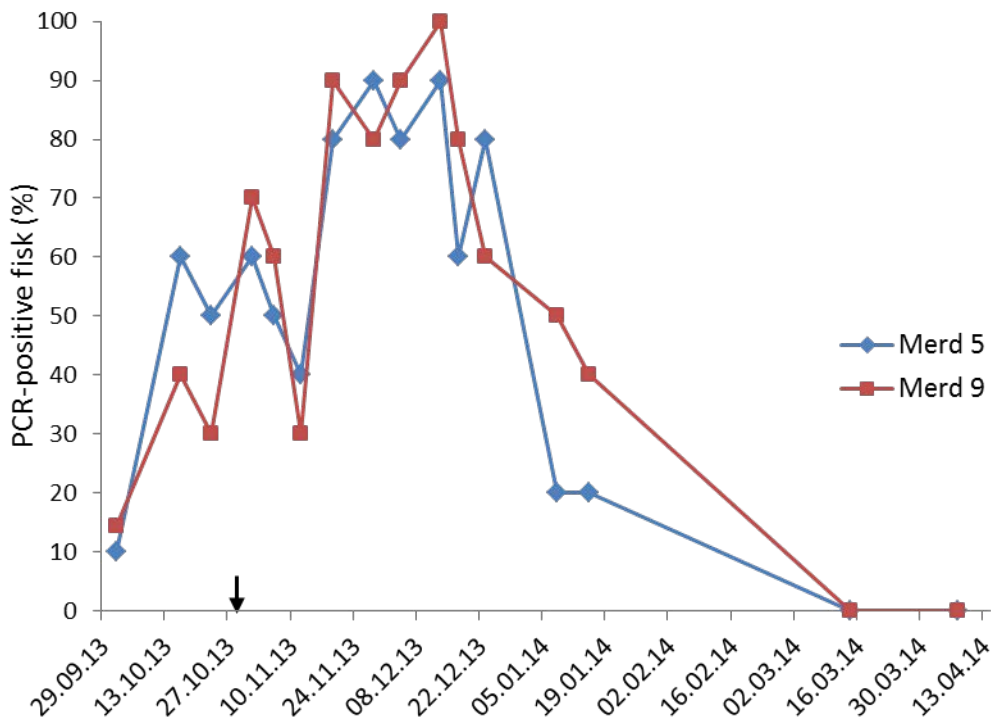
6.1. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 1 (merd 5 og merd 9)

Gjennom prosjektperioden var gjennomsnittlig gjellescore variabel i både merd 5 og merd 9, og lå mellom 0,5 og 2,0 frem til midten av januar (Figur 2). Selv om fiskene hadde diagnosen AGD i begge merdene, utviklet ikke sykdommen seg til å bli et alvorlig problem. I merd 5 ble det gjennomført en hydrogenperoksidbehandling i uke 44 (siste uke i oktober). I etterkant av denne ble det observert en nedgang i gjennomsnittlig gjellescore. Mot slutten av perioden ble gjellescore redusert i begge merder, men raskest i merd 9 som tidligere ikke var behandlet. I merd 5 økte gjellescore i midten av januar 2014 uten at det var en tilsvarende økning i merd 9. Gjellescore var imidlertid forholdsvis lik og lav i begge ved to siste prøveuttakene i mars og april 2014.



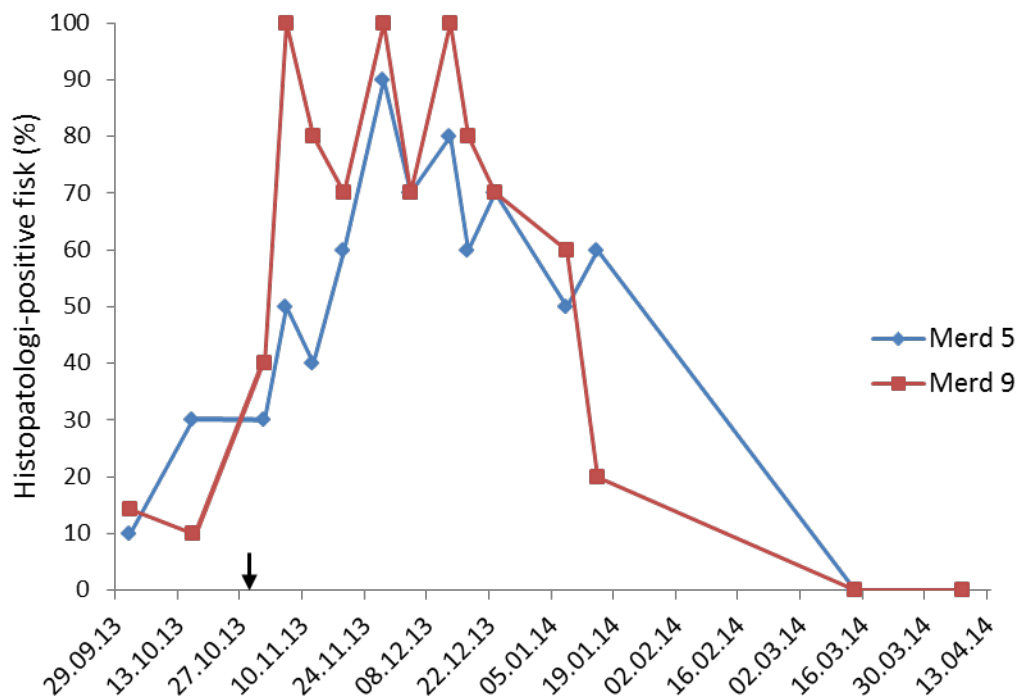
Figur 2. Utvikling av gjennomsnittlig gjellescore i merd 5 og merd 9. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans* i merd 5.

Andelen PCR-positive fisk var lav ved første prøveuttak i begynnelsen av oktober 2013. Deretter økte andelen positive fisk i begge merder og utviklet seg relativt likt gjennom hele prosjektperioden (Figur 3). I etterkant av hydrogenperoksidbehandlingen i merd 5 ble det observert en nedgang av PCR-positive fisk i begge merder, men andelen økte raskt igjen. Andel PCR-positive var på det høyeste fra medio november til slutten av desember. Deretter falt andelen positive fisk og amøben ble ikke påvist i prøveuttaket den 14. mars 2014 eller senere.



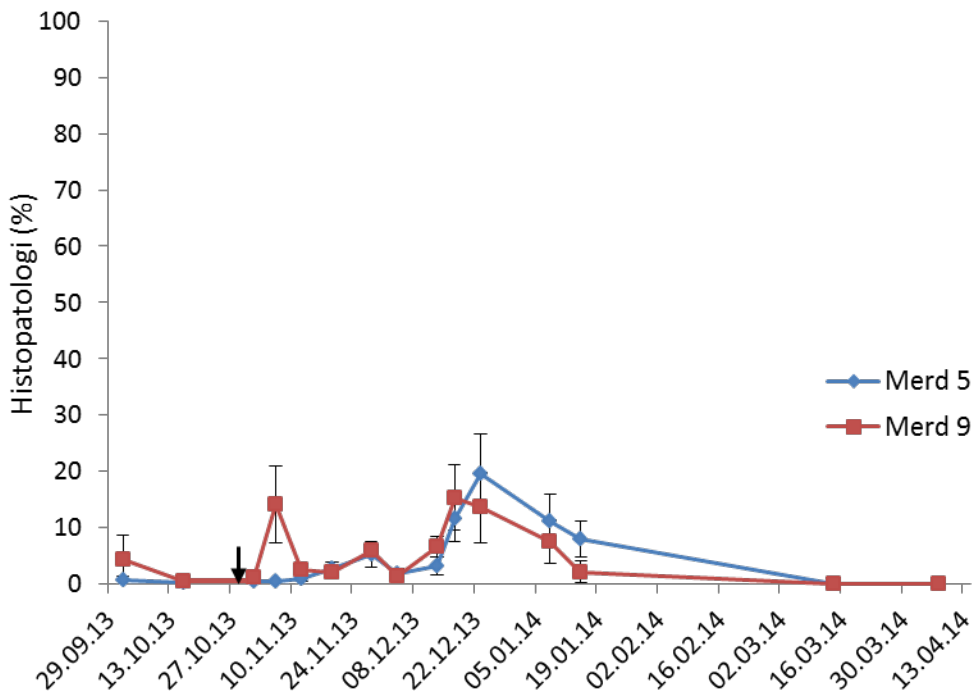
Figur 3. Utvikling i andel PCR-positive laks i merd 5 og merd 9. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans* i merd 5.

Andelen histopatologi-positive fisk var lav ved første prøveuttak i begynnelsen av oktober 2013. Deretter økte andelen positive fisk i begge merder og andelen utviklet seg relativt likt gjennom hele prosjektperioden (Figur 4). Andel histopatologi-positive fisk var 100 % i merd 9 allerede i begynnelsen av november 2013 og svingte mellom 60 % og 100 % fram til siste halvdel av desember. AGD-typiske forandringer ble ikke påvist i prøveuttaket den 14. mars 2014 og senere. I merd 5 var det en lignende utvikling, men andelen positive fisk var generelt noe lavere og med en topp i slutten av november.



Figur 4. Utvikling av andel laks med AGD-typisk histopatologi i merd 5 og merd 9. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans* i merd 5.

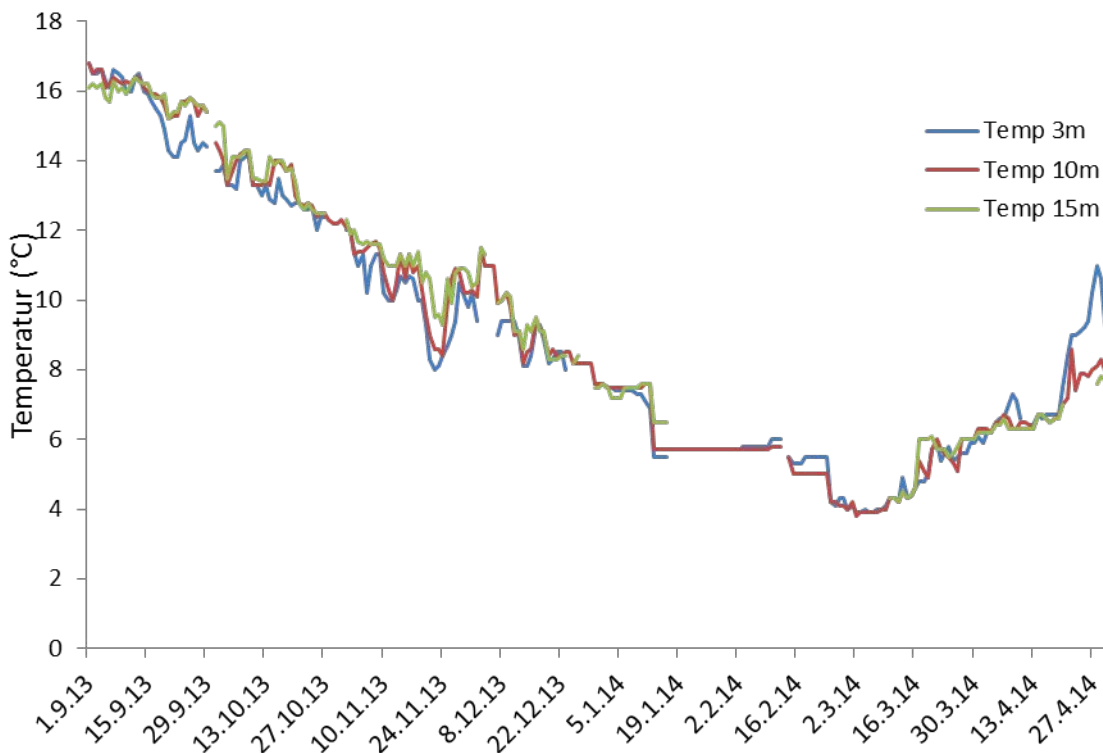
Prosentandelen av AGD-affisert gjellelev var forholdsvis lav og hadde tilnærmet lik utvikling i begge merder gjennom hele prosjektperioden (Figur 5). I merd 9 var det en markert økning i prosentandel affisert gjellelev ved prøveuttaket den 6. november, men ved neste prøveuttak var prosentandelen igjen lav. Mot slutten av 2013 økte prosentandelen affisert gjellelev forholdsvis likt i begge merder, men gjennomsnittet ble aldri høyere enn 20 %. AGD-affisert gjellelev ble ikke påvist i prøveuttakene fra merd 5 og merd 9 den 14. mars 2014 eller senere.



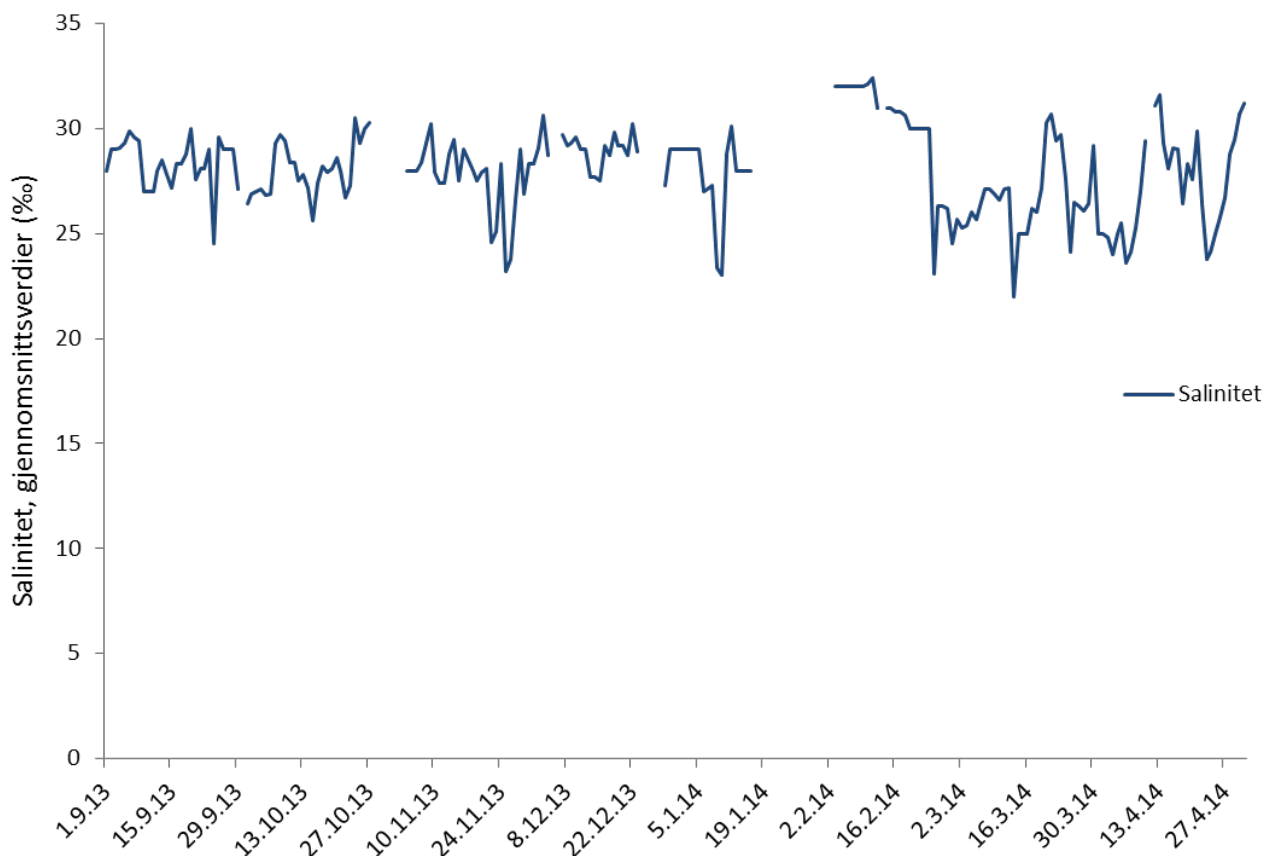
Figur 5. Utvikling av histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellevev) i merd 5 og merd 9. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans* i merd 5.

6.2. Vanntemperatur og salinitet i anlegg 1

I perioden 1. september 2013 til begynnelsen av mars 2014 var vanntemperaturen generelt synkende i anlegg 1 (Figur 6). Den 1. september 2013 var temperaturen 16,8 °C på 3 og 10 meters dyp og 16,1 °C på 15 meters dyp. Sjøtemperaturen var på det laveste (3,8 °C på alle tre dyp) fra begynnelsen av mars 2014, og frem til siste prøveuttak den 7. april 2014, steg vanntemperaturen på alle de de tre måledybene til henholdsvis 7,0 °C, 6,6 °C og 6,3 °C.



Figur 6. Vanntemperatur målt ved 3, 10 og 15 meters dyp i anlegg 1 i perioden 1. september 2013 til 1. mai 2014.

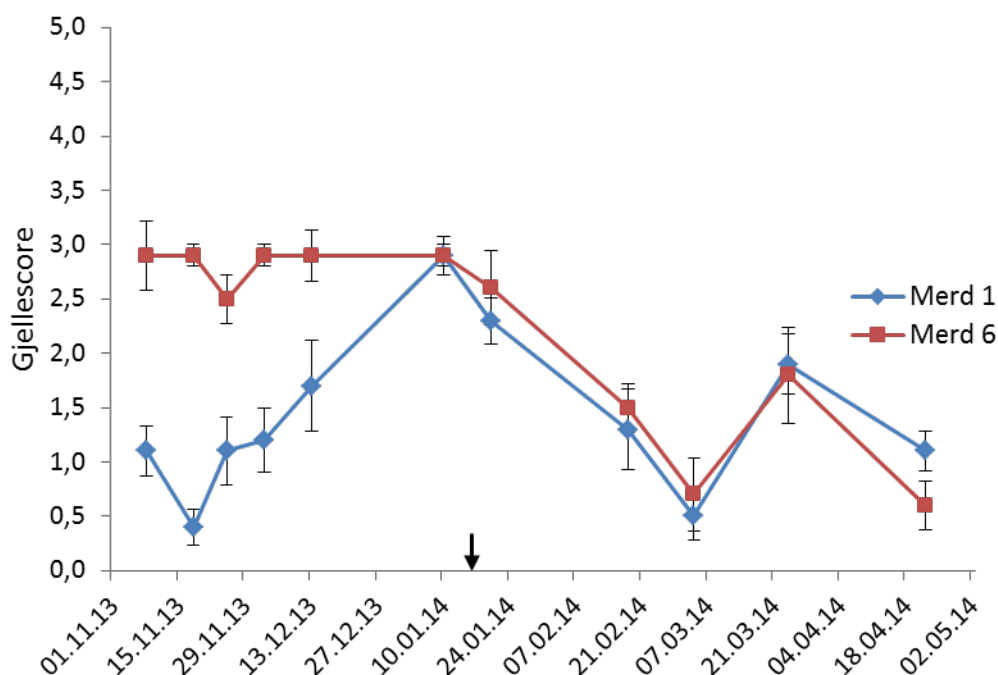


Figur 7. Saliniteten i anlegg 1 i perioden 1. september 2013 til 1. mai 2014, der hver måling representerer gjennomsnittsverdi av salinitetsmålinger fra flere dyp.

Saliniteten i anlegg 1, oppgitt som gjennomsnittsverdi av målinger på flere dyp, varierte mellom 22,0 ‰ og 32,4 ‰ i perioden 1. september 2013 til 1. mai 2014 (Figur 7). Gjennomsnittlig saltholdighet i perioden var 28,0 ‰. Det var ingen tendens til endring i gjennomsnittlig salinitet gjennom prosjektperioden.

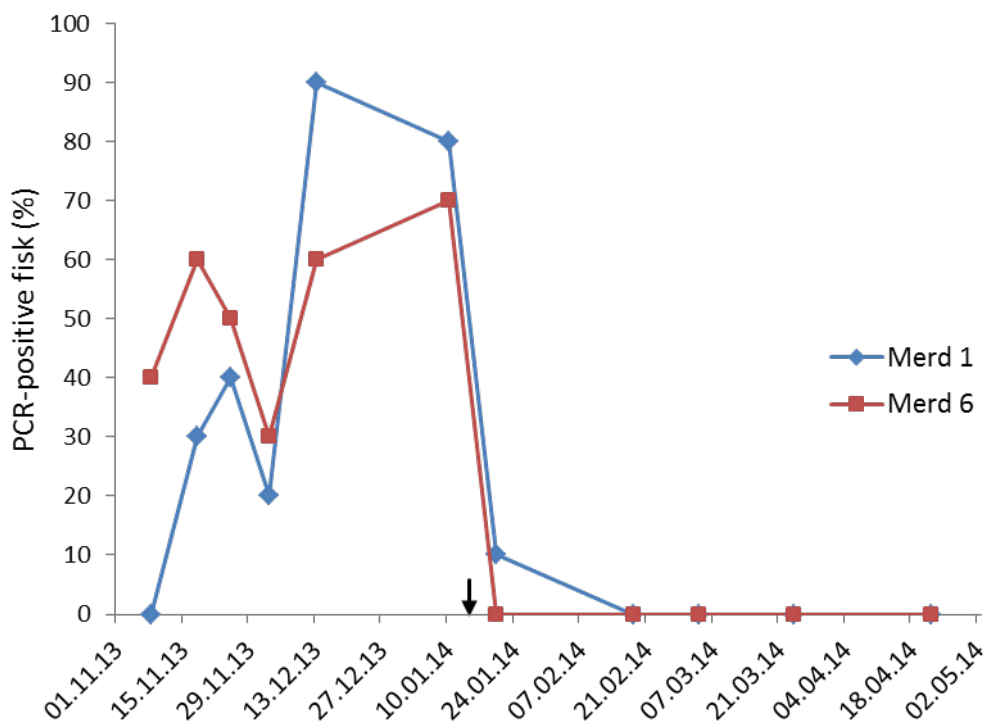
6.3. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 2 (merd 1 og merd 6)

Ved prosjektperiodens start, i begynnelsen av november 2013, var gjennomsnittlig gjellescore i de to merdene svært forskjellig (Figur 8). Fiskene i merd 6 hadde en gjellescore på nesten 3, mens den i merd 1 var på like over 1. I merd 6 holdt gjellescoren seg stabil frem til tidlig i januar, mens den i merd 1 hadde en stigning i samme periode til gjennomsnittlig gjellescore var på samme nivå som i merd 6. Det ble foretatt en behandling i anlegget tidlig i januar og gjellescoren i begge merder gikk etter dette jevnt nedover frem til tidlig i mars, hvor det ble påvist en økning i begge merder. Mot slutten av prosjektperioden falt gjellescoren noe igjen, men den var fortsatt mellom 0,5 og 1,5 ved prosjektperiodens slutt.



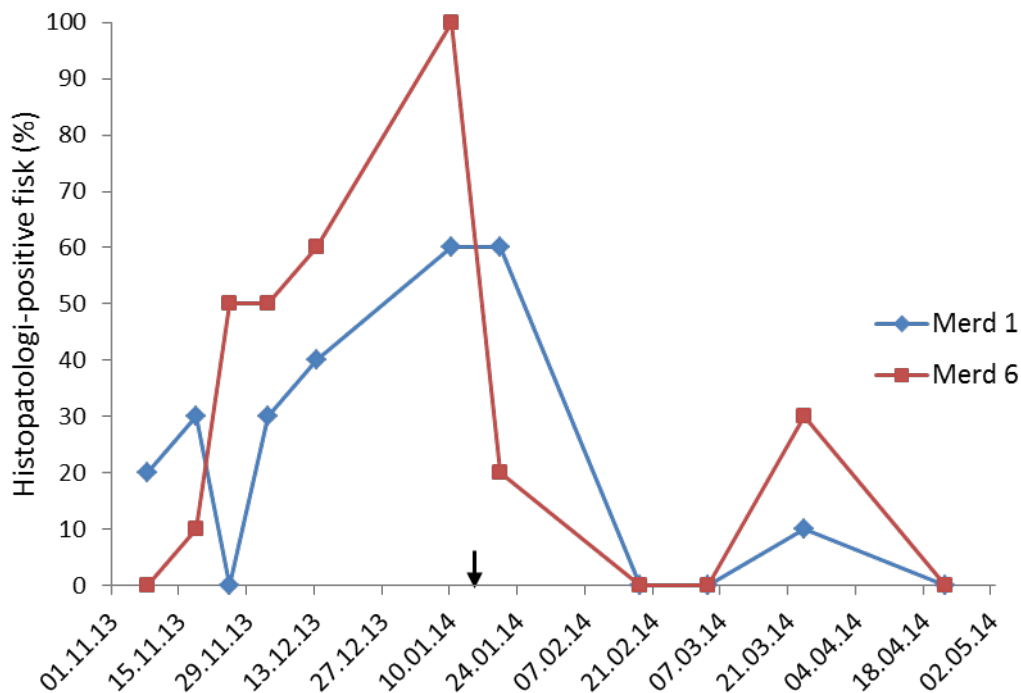
Figur 8. Utvikling av gjennomsnittlig gjellescore i merd 1 og merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

Andelen PCR-positive fisk var, som for gjennomsnittlig gjellescore, svært forskjellig i de to merdene ved prosjektperiodens start (Figur 9). Andelen i merd 6 var på 40 %, mens alle fiskene i merd 1 var negative med hensyn på *P. perurans*. I løpet av den første uken økte andelen infiserte til 30 % og 60 % i henholdsvis merd 1 og 6, og etter dette utviklet denne andelen seg relativt likt i begge merdene gjennom resten av perioden. Etter hydrogenperoksidbehandlingen i midten av januar ble det kun påvist amøber på én fisk i merd 1 og ingen i merd 6.



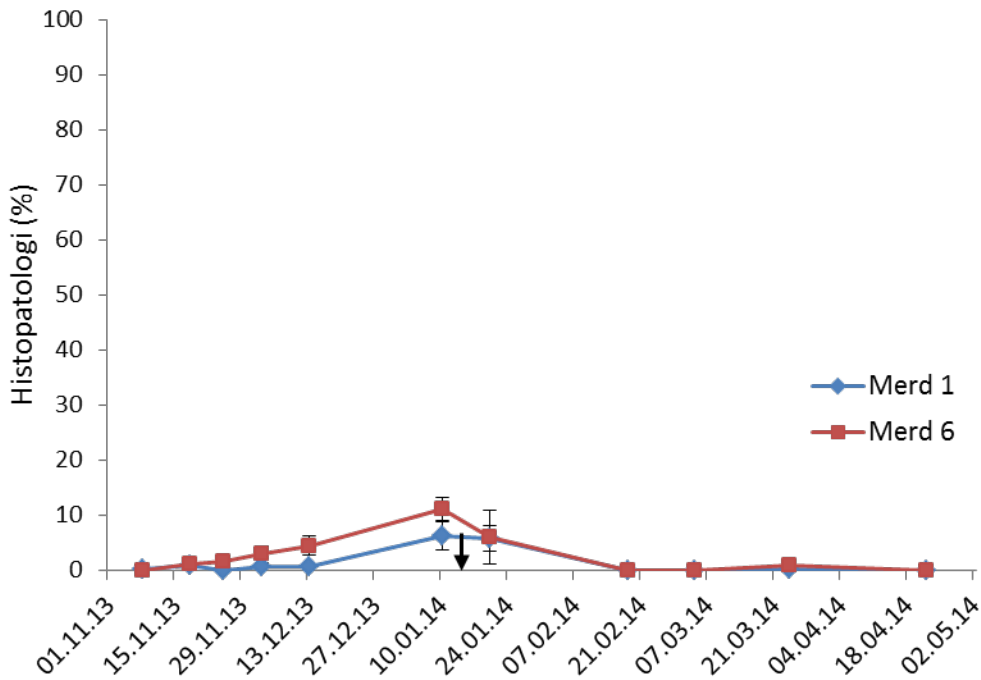
Figur 9. Utvikling i andel PCR-positive laks i merd 1 og merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

Andelen histopatologi-positive fisk var lav ved første prøveuttak i begynnelsen av november 2013, henholdsvis 0 % og 20 % i merd 6 og 1 (Figur 10). De første 14 dager etter prosjektperiodens start var det tilsynelatende en forskjellig utvikling i de to merdene; merd 1 hadde ingen histopatologi-positive fisk etter 14 dager, mens merd 6 gikk fra ingen histopatologi-positive fisk til 50 % positive. Etter dette steg andelen histopatologi-positive fisk og nådde en topp i begynnelsen av januar på henholdsvis 60 % og 100 %. Etter hydrogenperoksidbehandlingen i midten av januar falt andelen positive til null mot slutten av februar/begynnelsen av mars. Deretter ble det igjen observert en økning i begge merder. Ved siste prøveuttak i slutten av april var andelen histopatologi-positive igjen null i begge merder.



Figur 10. Utvikling av andel laks med AGD-typisk histopatologi i merd 1 og merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

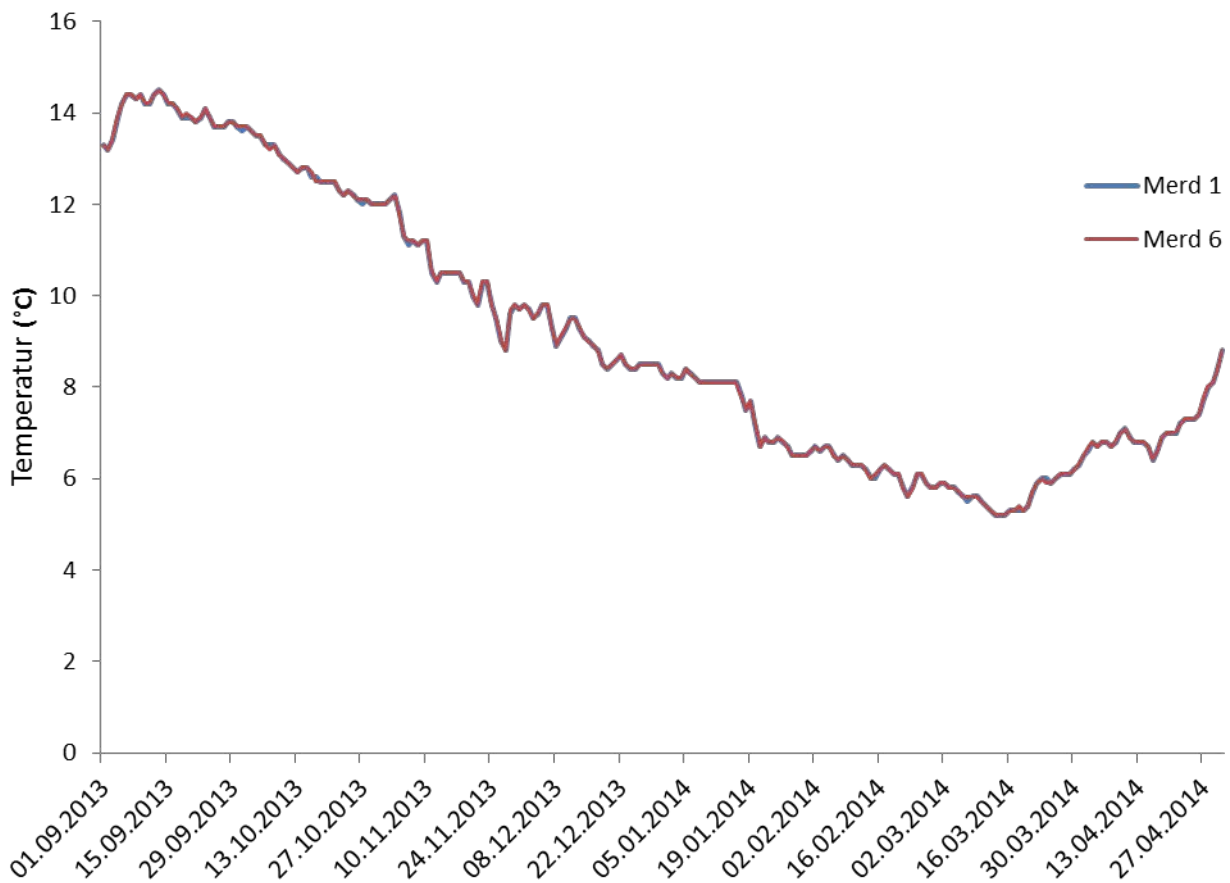
Prosentandelen av AGD-affisert gjellevev var lav og hadde en tilnærmet lik utvikling i begge merder gjennom hele prosjektperioden (Figur 11). Begge merder nådde en topp på mellom 5 % og 10 % affisert vev i midten av januar. Etter 18. februar 2014 var andelen affisert gjellevev tilnærmet lik null i begge merdene.



Figur 11. Utvikling av histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjelleveg) i merd 1 og merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperosidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

6.4. Vanntemperatur i anlegg 2

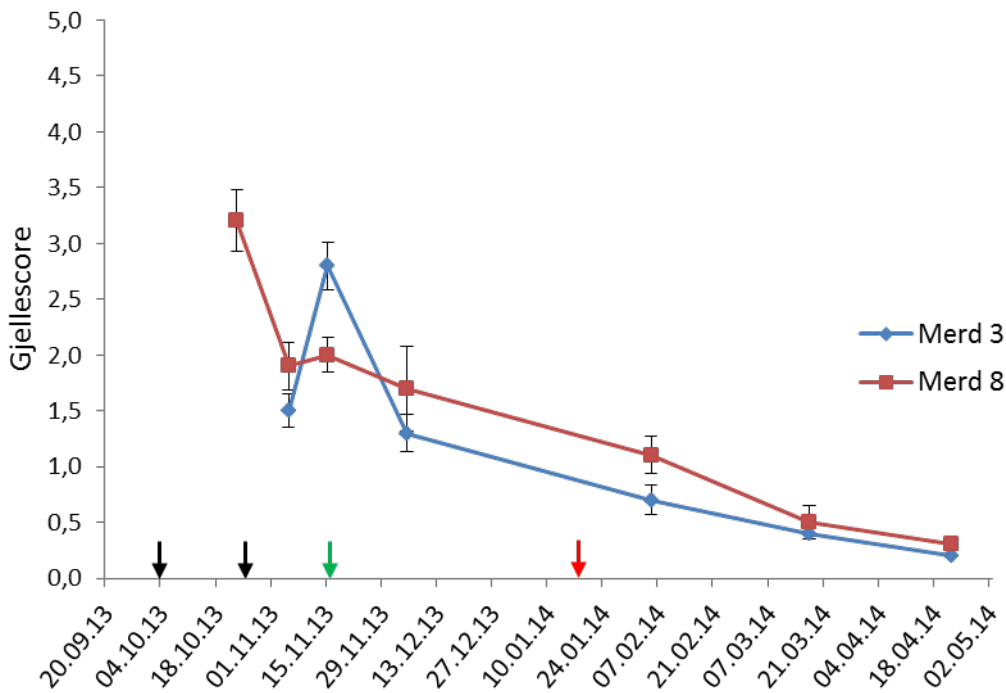
I perioden 1. september 2013 til begynnelsen av mars 2014 var vanntemperaturen generelt synkende i anlegg 2 (Figur 12). Den 1. september 2013 var vanntemperaturen 13,3 °C på 7 meters dyp, mens den var 11,1 °C ved første prøveuttak den 8.11.2013. Vanntemperaturen var på det laveste 5,2 °C medio mars 2014, og frem til siste prøveuttak den 22. april 2014, steg den til 7,2 °C.



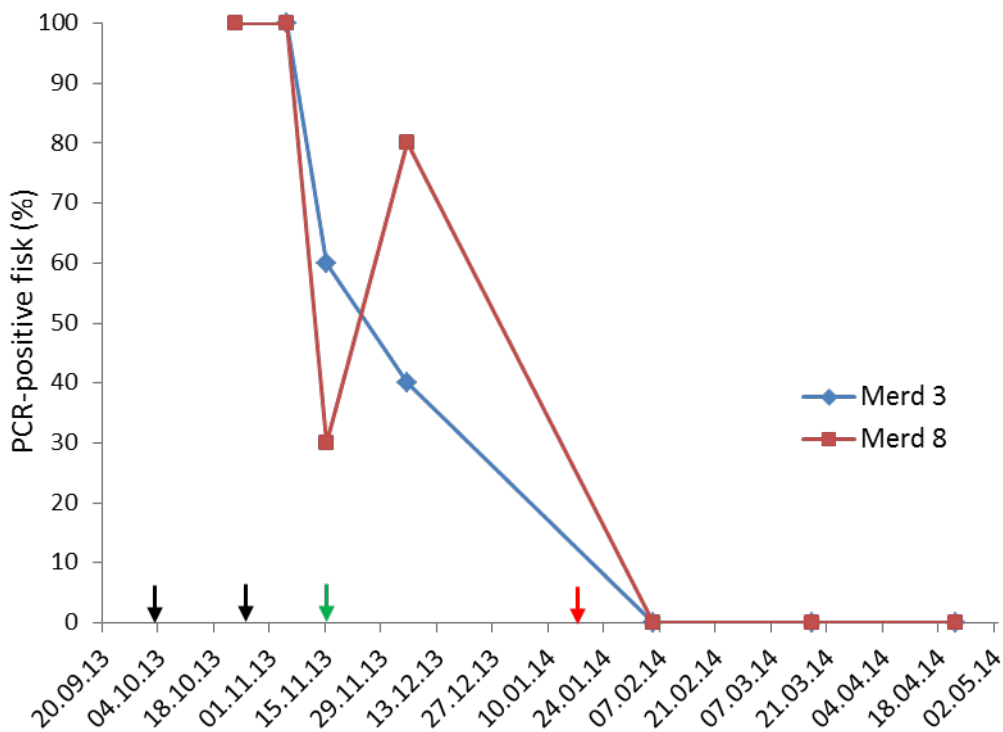
Figur 12. Vanntemperatur målt daglig ved 7 meters dyp i merd 1 og 6 i anlegg 2 i perioden 1. september 2013 til 1. mai 2014.

6.5. Utvikling av gjellescore, amøbeforekomst og histopatologi i anlegg 3 (merd 3 og merd 8)

Det ble kun tatt prøver for histologi fra merd 8 ved det første prøveuttaket 28. september (se Figurene 13 og 14). Ved andre prøveuttak 23. oktober ble det tatt ut prøver til histologi, PCR og registrert gjellescore, men igjen kun fra merd 8. Gjellescore var da høyere enn 3. Ved neste prøveuttak i begynnelsen av november hadde begge merdene en gjellescore på mellom 1,5 og 2. Gjellescoren i merd 3 økte så til omtrent 3 i midten av november, mens den holdt seg stabil i merd 8, før gjellescore i begge merdene viste en nedadgående tendens frem mot prosjektperiodens slutt i slutten av april.



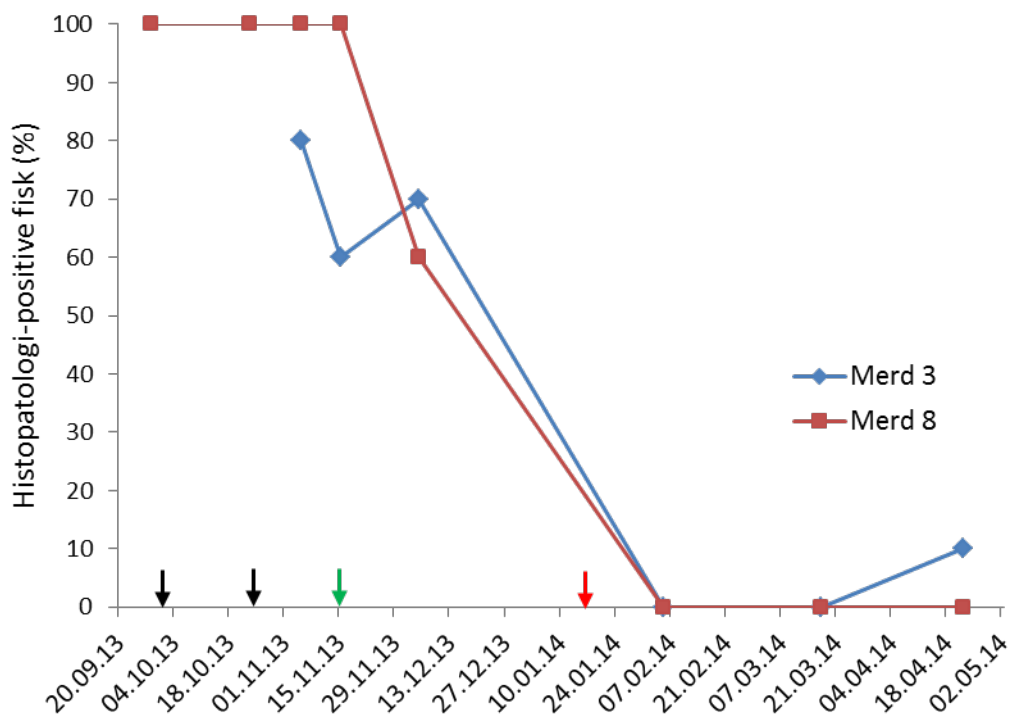
Figur 13. Utvikling av gjennomsnittlig gjellescore i merd 3 og merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.



Figur 14. Utvikling i andel PCR-positive laks i merd 3 og merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

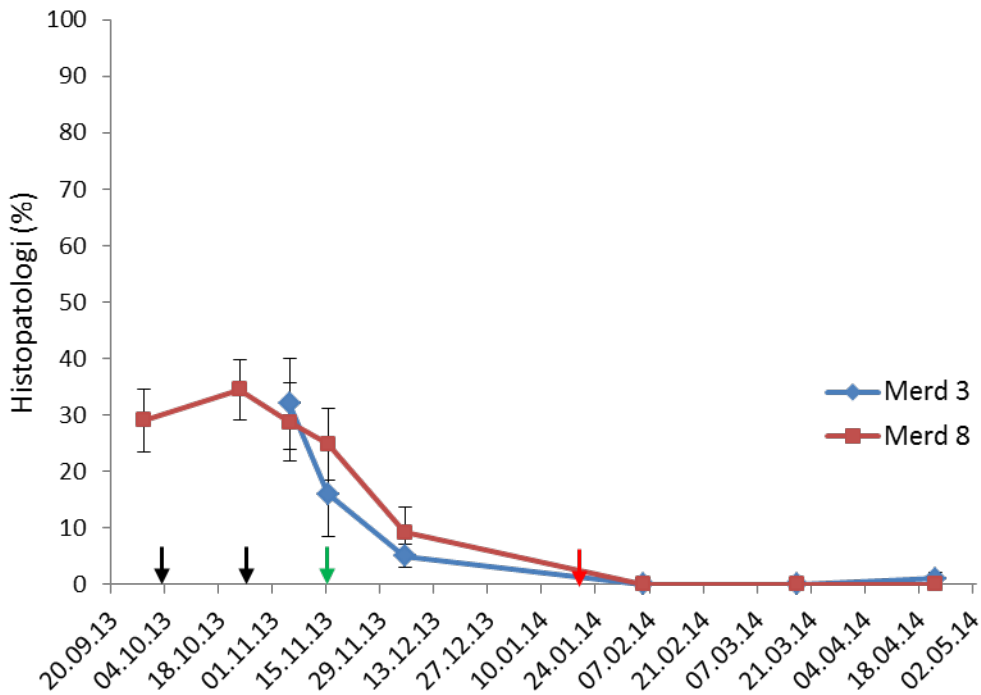
Alle undersøkte fisk i både merd 3 og 8 var PCR-positive ved første prøveuttak den 23. oktober 2013 (Figur 14). Merd 3 viste deretter en skarp nedadgående trend i resten av prosjektperioden og *P. perurans* ble ikke påvist i denne merden etter 5. februar 2014. I merd 8 falt andelen positive fra 100 % til 30 % i slutten av november, men økte til 80 % i midten av desember. Ved neste prøveuttak, den 5. februar, var all fisk i merd 8 PCR-negativ for *P. perurans*. Resultatene fra PCR-analysene viser ingen tydelig effekt av de to første hydrogenperoksidbehandlingene mot amøben, men det observeres generelt en nedgang i andel amøbesmittede fisk etter ferskvannsbehandlingen medio november (Figur 14).

Andelen histopatologi-positive fisk viser generelt samme trend som for PCR-positive, med unntak av stigningen i PCR-positive som ble observert i merd 8 mellom 3. og 4. uttak (Figur 15). Generelt viser begge merder en skarp nedadgående trend fra midten/slutten av november og til 5. februar hvor det ikke ble registrert noen positive fisk ved hjelp av histopatologi. Ved prosjektperiodens slutt i midten av april var 1 fisk fra merd 3 positiv på histopatologi. På samme måte som for PCR-analysene, observeres det en generell nedgang i andel histopatologi-positive fisk i etterkant av den tredje behandlingen.



Figur 15. Utvikling av andel laks med AGD-typisk histopatologi i merd 3 og merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

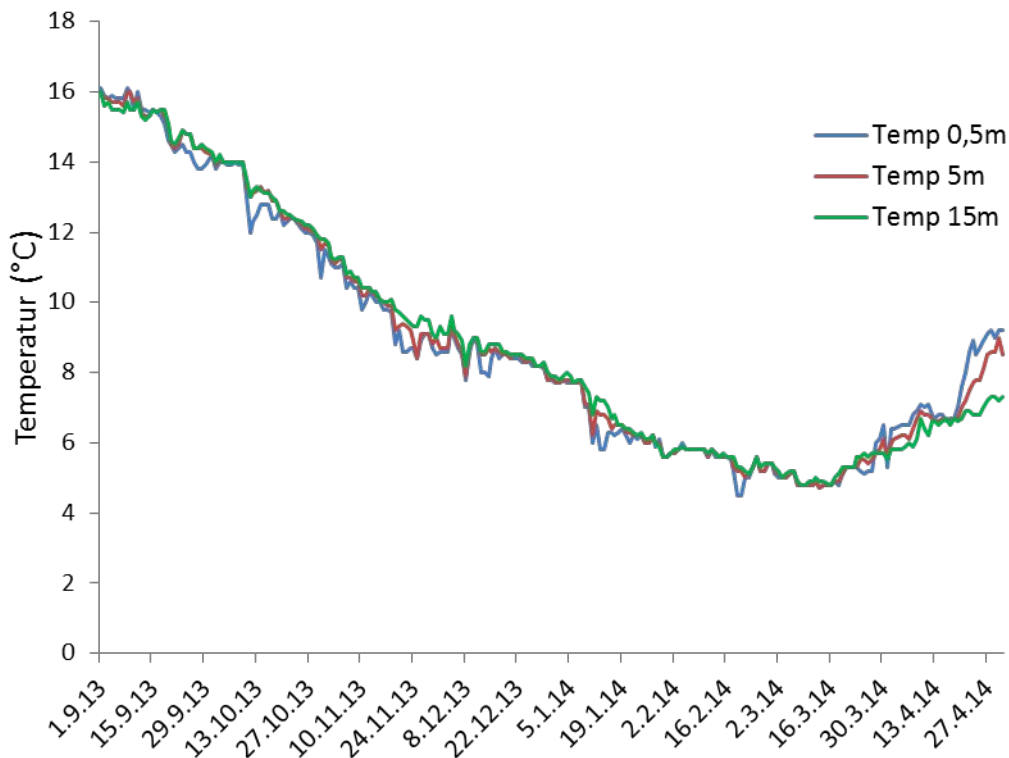
Prosentandelen av AGD-affisert gjellevev var generelt sett mye høyere i anlegg 3 enn i de to andre anleggene, og gjennomsnittet var på ca. 30 % i merd 8 ved første prøveuttak den 28. september (Figur 16). Merd 8 ble prøvetatt en gang til den 23. oktober før begge merder ble prøvetatt den 5. november, Da var gjennomsnittlig andel affisert gjellevev fortsatt ca. 30 % i begge merder. Deretter ble det observert en nedgang i omfanget av affisert gjellevev i begge merder og det ble så å si ikke observert affisert gjellevev i noen av merdene etter 5. februar.



Figur 16. Utvikling av histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellelev) i merd 3 og merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

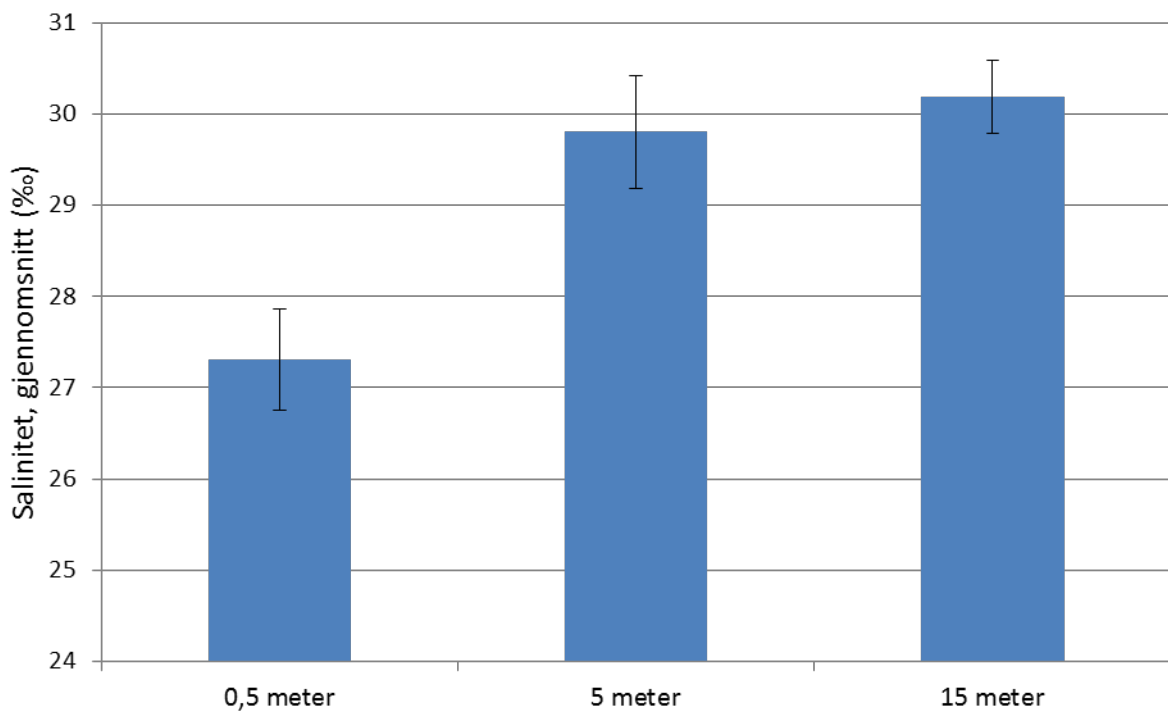
6.6. Vanntemperatur og salinitet i anlegg 3

I perioden 1. september 2013 til medio mars 2014 var vanntemperaturen generelt synkende i anlegg 3 (Figur 17). Den 1. september 2013 var temperaturen 16,0 °C og lik på de tre måledypene. Frem til første prøveuttak den 28. september hadde temperaturen sunket til 13,8 °C, 14,4 °C og 14,5 °C på henholdsvis 0,5, 5, og 15 meter. Sjøtemperaturen var på det laveste (4,8 °C på alle dyp) i medio mars 2014, og frem til siste prøveuttak den 22. april 2014, steg vanntemperaturen på de tre måledypene til henholdsvis 8,6 °C, 7,5 °C og 6,9 °C.



Figur 17. Vanntemperatur målt ved 0,5, 5 og 15 meters dyp i anlegg 3 i perioden 1. september 2013 til 1. mai 2014.

Gjennomsnittlig salinitet (\pm standardavvik) i anlegg 3, målt i perioden 28.10.2013 til 26.1.2014 var $27,3 \pm 0,6$ ‰, $29,8 \pm 0,6$ ‰ og $30,2 \pm 0,4$ ‰ ved henholdsvis 0,5, 5 og 15 meters dyp (Figur 18). Variansen i salinitet var, som standardavviket viser, liten på alle de tre dypene. Saliniteten var lavere på 0,5 meter, sammenlignet med salinitetene ved de andre dypene.



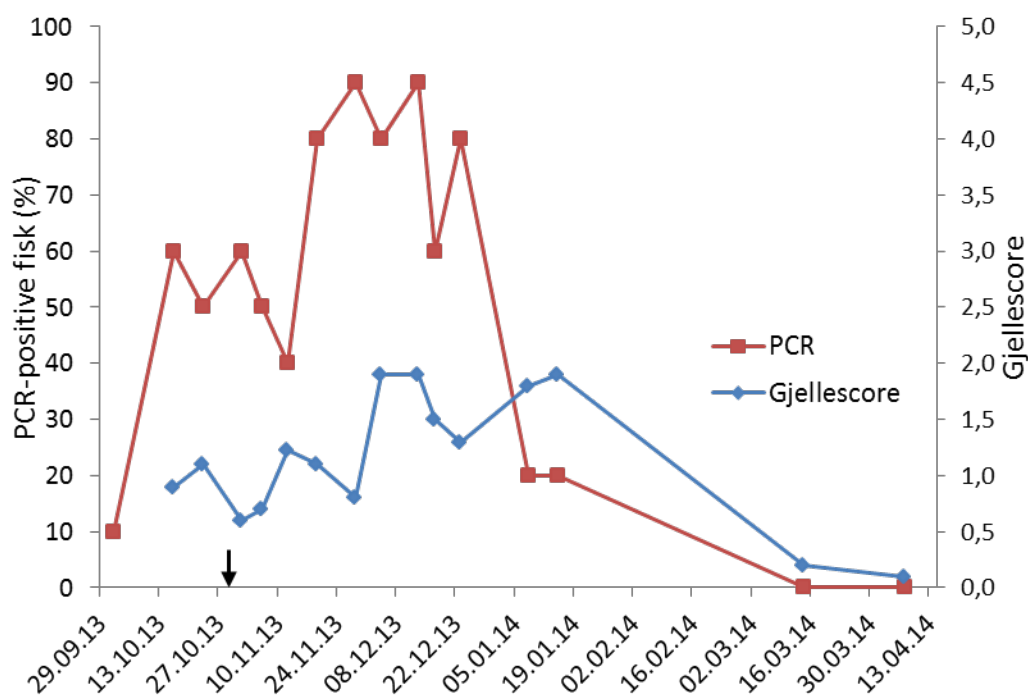
Figur 18. Gjennomsnittlig salinitet med standard avvik målt ved 0,5, 5 og 15 meters dyp i anlegg 3 i perioden 28. oktober 2013 til 26. januar 2014.

7. Diskusjon

7.1. Anlegg 1

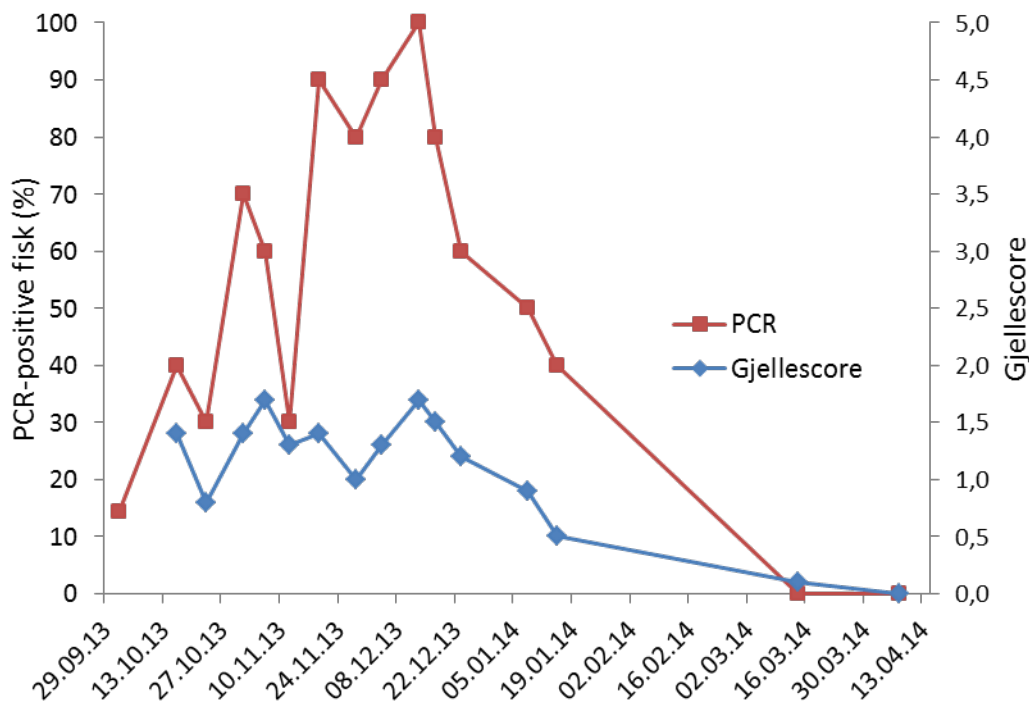
7.1.1. Utvikling i gjellescore versus PCR

Fra midten av oktober 2013 og ut året var andelen PCR-positive laks i merd 5 forholdsvis høy. I den samme perioden var utviklingen i gjennomsnittlig gjellescore forholdsvis moderat. Basert på erfaring fra andre oppdrettslokaliteter, kan dette betraktes som uventet fordi en høy prosentandel PCR-positive fisk som regel resulterer i økt intensitet av amøber og en kraftigere økning i gjennomsnittlig gjellescore. Anlegg 1 hadde en gjennomsnittlig salinitet på 28,0 ‰. Dette kan være en årsak til at gjellescore forble forholdsvis lav. Ved miljøbetingelsene som var i anlegg 1, overlevde amøben og AGD ble utviklet, men ikke til et uttalt nivå. En liten økning i gjellescore i merd 5 i midten av januar 2014 var negativt korrelert med andel PCR-positive fisk og var derfor trolig ikke forårsaket av *P. perurans* (Figur 19). Det er grunn til å tro at andel PCR-positive fisk ble redusert gjennom vinteren som følge av synkende vanntemperatur og at dette førte til en reduksjon i gjennomsnittlig gjellescore.



Figur 19. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 5. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

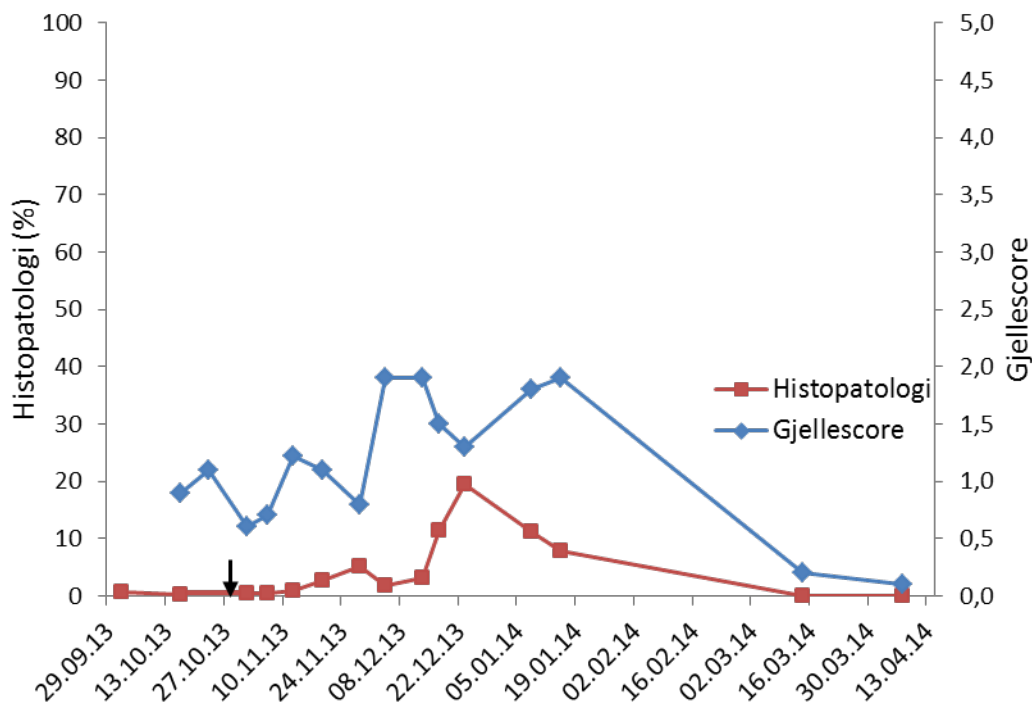
Andelen PCR-positive fisk og gjennomsnittlig gjellescore i merd 9 (Figur 20) utvikler seg relativt likt som i merd 5. Selv om merd 9 ikke ble behandlet med hydrogenperoksid forble gjennomsnittlig gjellescore lav gjennom hele prosjektperioden til tross for at andelen PCR-positive fisk var høy i en periode sent på høsten. Som for merd 5 ble amøbene trolig faset ut gjennom vinteren som følge av synkende vanntemperatur.



Figur 20. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 9.

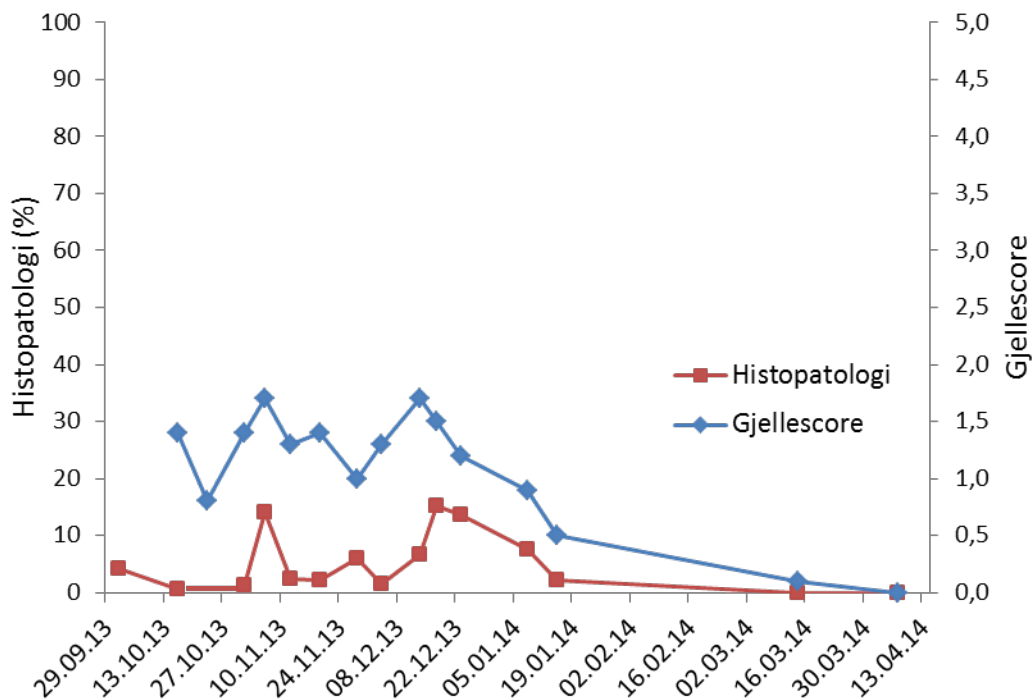
7.1.2. Utvikling i gjellescore versus histopatologi

Gjennomsnittlig gjellescore og andel AGD-affisert gjellelev i merd 5 hadde en forholdsvis ulik utvikling gjennom prosjektperioden (Figur 21). Gjellescore varierte mye gjennom hele prosjektperioden, mens omfanget av AGD-affisert gjellelev derimot var generelt lavt, men hadde en markert økning mot slutten av desember 2013 for deretter å fase ut. Den observerte økningen i gjellescore i januar 2014 resulterte ikke i en økning i AGD-typiske histopatologiske gjelleforandringer.



Figur 21. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellelev) i merd 5. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

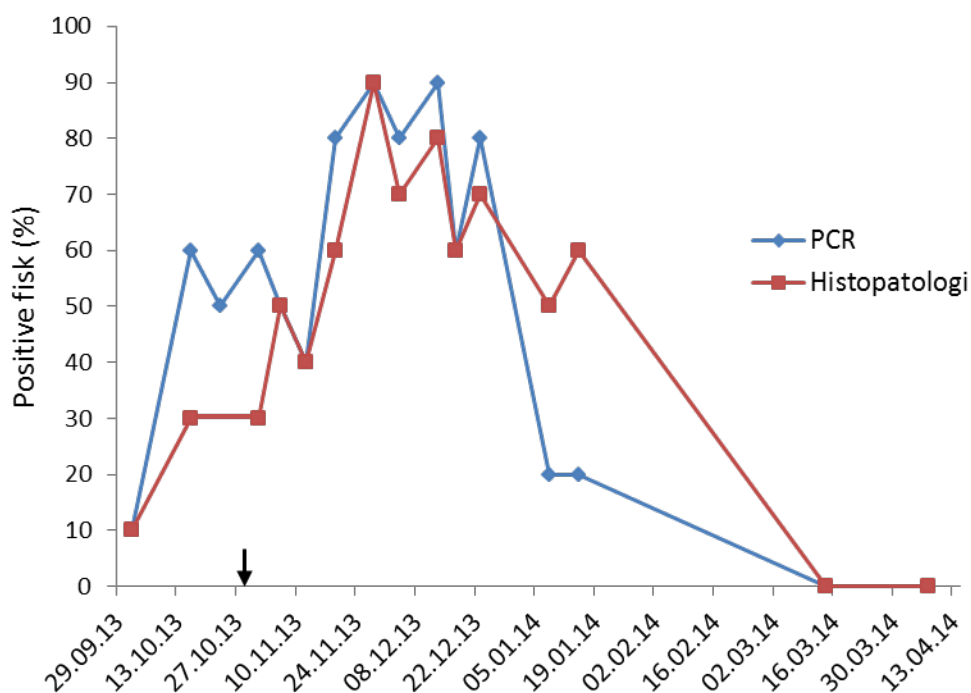
Gjennomsnittlig gjellescore og andel AGD-affisert gjellelev i merd 9 hadde forholdsvis lik utvikling gjennom hele prosjektperioden (Figur 22).



Figur 22. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellelev) i merd 9.

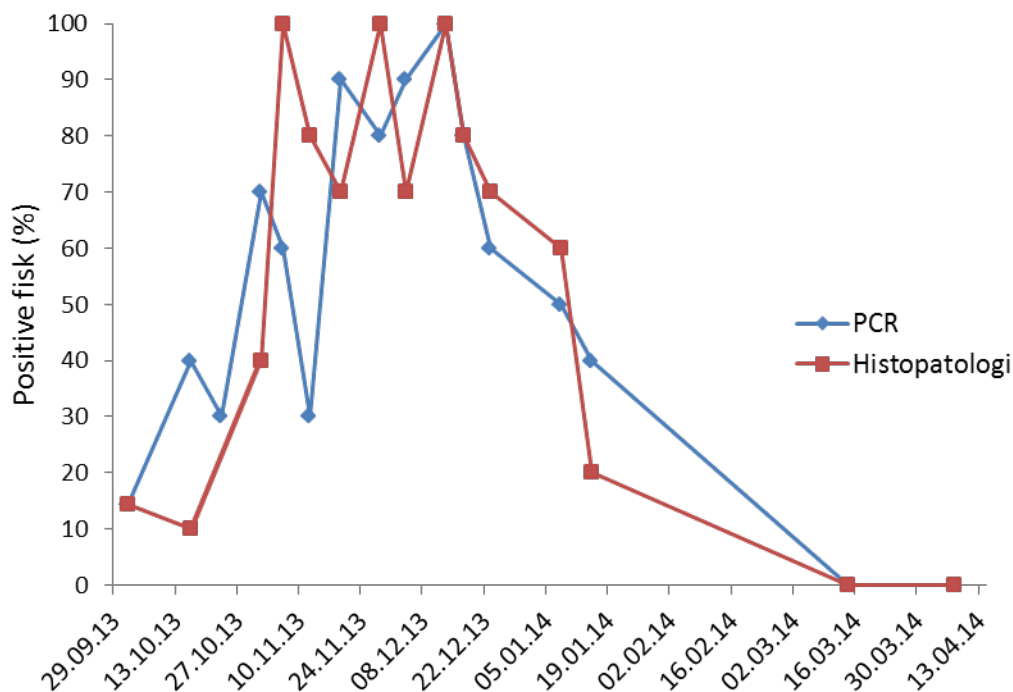
7.1.3. Utvikling i PCR versus histopatologi

Andel PCR-positive fisk og andel histopatologi-positive fisk i merd 5 hadde en god samvariasjon bortsett fra i begynnelsen og mot slutten av prosjektperioden (Figur 23). Andelen PCR-positive fisk økte raskere enn andelen histopatologi-positive fisk i begynnelsen av perioden. Mot slutten av perioden sank andelen PCR-positive raskere enn andelen histopatologi-positive. Dette mønsteret er som forventet. I begynnelsen påvises amøben før den forårsaker AGD-patologi, og mot slutten forsvinner amøben (trolig på grunn av redusert vanntemperatur), mens fisken bruker lengre tid på å reparere gjelle-skadene.



Figur 23. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positive laks i merd 5. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

I merd 9 var samvariasjonen mellom andel PCR-positive fisk og andelen histopatologi-positive fisk også god (Figur 24), men ikke like sterk som i merd 5. Det var også tendens til utviklingsforsinkelser mellom amøbeforekomst og gjellepatologi i merd 9 på samme måte som i merd 5.



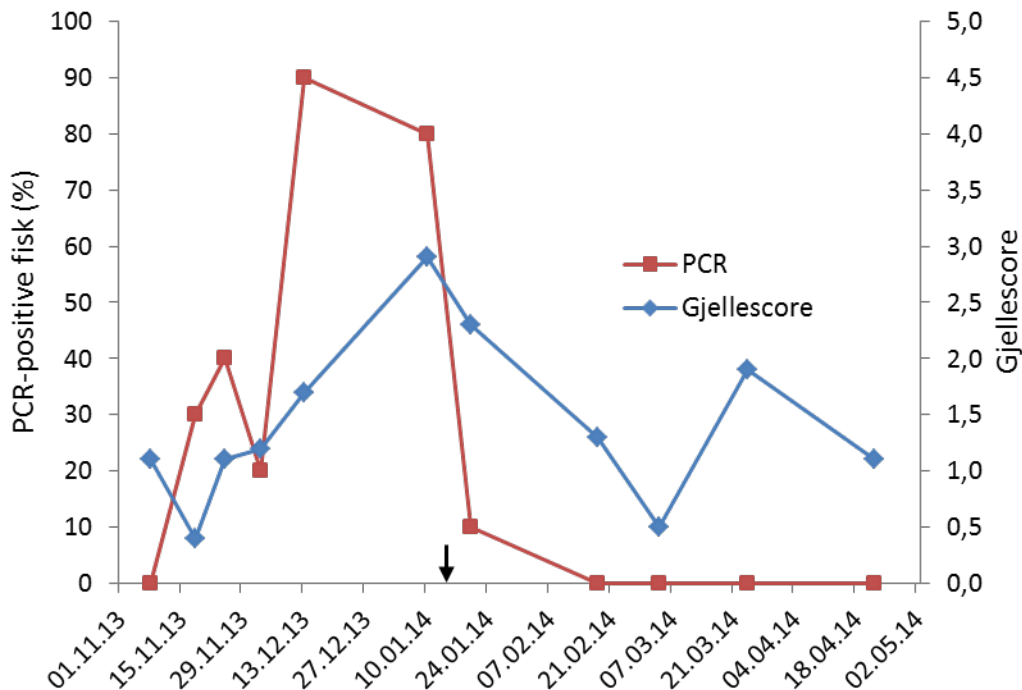
Figur 24. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positive laks i merd 9.

7.2. Anlegg 2

7.2.1. Utvikling i gjellescore versus PCR

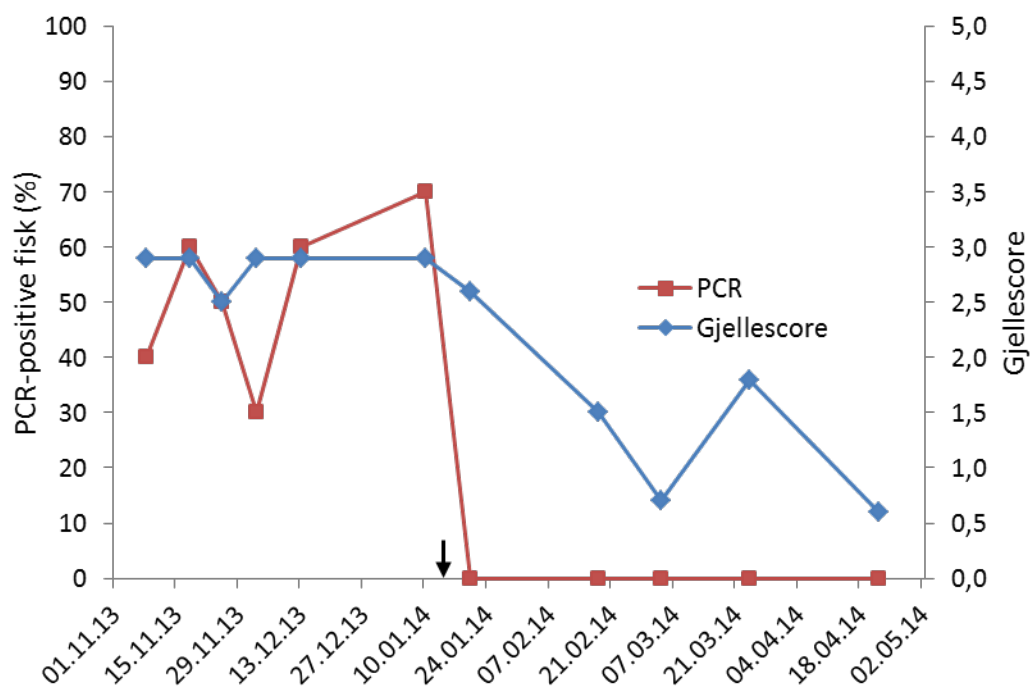
Merd 1 ble behandlet med hydrogenperoksid den 30. oktober 2013, dvs. 9 dager før første prøveuttak. Dette kan forklare hvorfor det ikke ble påvist PCR-positive fisk i første prøveuttak. Deretter økte andelen

PCR-positive fisk i de to første månedene av prosjektperioden (Figur 25) som ble fulgt av en forholdsvis rask økning i gjennomsnittlig gjellescore. Hydrogenperoksid-behandlingen den 10. januar resulterte i en rask nedgang i andel PCR-positive fisk og en påfølgende reduksjon i gjennomsnittlig gjellescore. Det ble ikke påvist amøber i prøveuttaket den 18. februar 2014 eller ved senere uttak. En økning i gjennomsnittlig gjellescore mot slutten av prosjektperioden kan derfor neppe relateres til AGD.



Figur 25. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 1. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

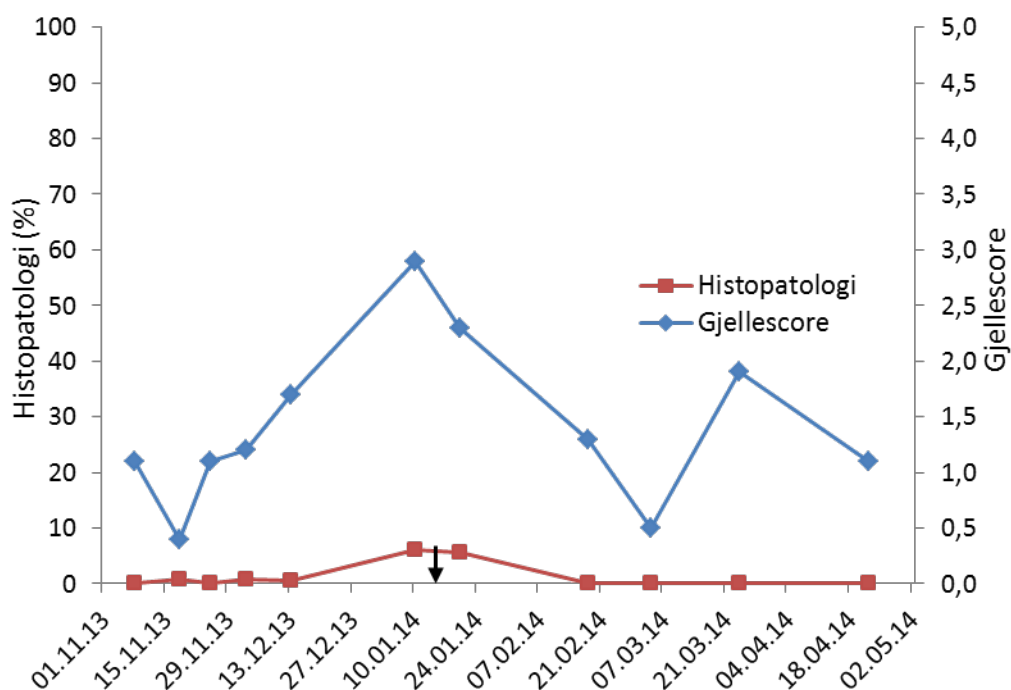
Merd 6 ble behandlet med hydrogenperoksid den 31. oktober 2013, dvs. 8 dager før første prøveuttak. Det ser imidlertid ikke ut til at denne behandlingen hadde reduserende effekt på gjellescore. I merd 6 var det flere PCR-positive fisk (40 %) og en høy gjennomsnittlig gjellescore (2,9) ved første prøveuttak (Figur 26). Gjennomsnittlig gjellescore og andelen PCR-positive fisk i merd 6 var stabil inntil den ble behandlet med hydrogenperoksid den 17. januar 2014. Dette resulterte i en rask nedgang i andel PCR-positive fisk og en påfølgende reduksjon i gjennomsnittlig gjellescore. Det ble ikke påvist amøber i prøveuttaket tre dager etter behandling, den 20. januar 2014 eller ved senere uttak i prosjektperioden. En økning i gjennomsnittlig gjellescore mot slutten av prosjektperioden kan derfor neppe relateres til AGD.



Figur 26. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

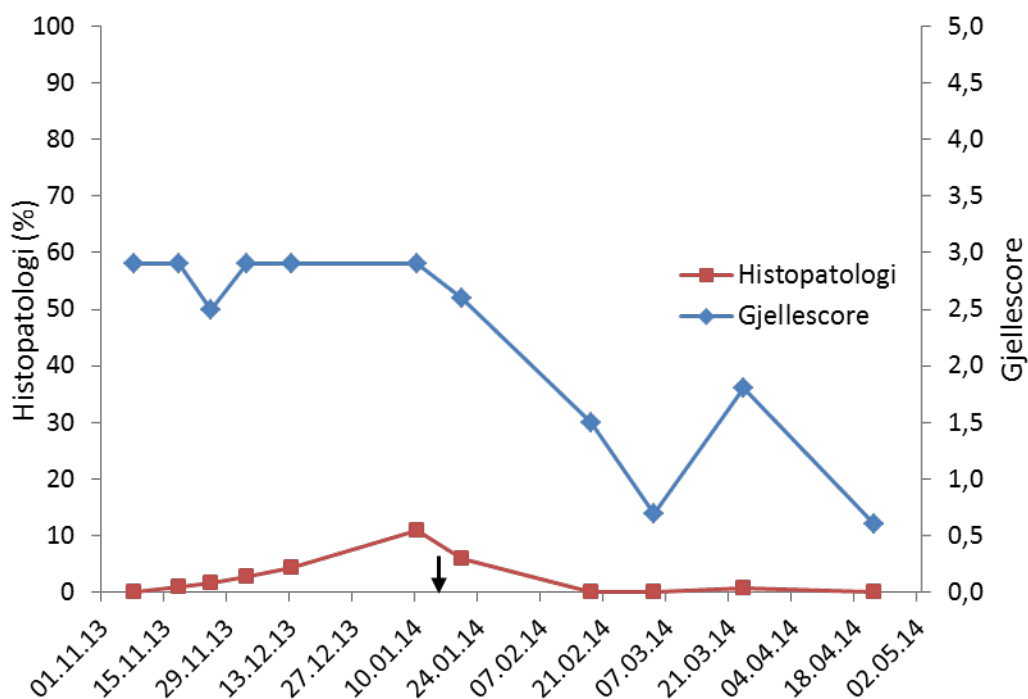
7.2.2. Utvikling i gjellescore versus histopatologi

Gjennomsnittlig gjellescore i merd 1 økte fra 0,4 den 18. november 2013 til 2,9 den 10. januar 2014. Samtidig var det bare en begrenset økning i andelen AGD-affisert gjellelev (Figur 27). Den reduserende effekten behandlingen den 16. januar hadde på amøben (Figur 26) resulterte i at gjennomsnittlig gjellescore ble redusert og at gjellelev som var mildt AGD-affisert ble restituert. Den observerte økningen i gjellescore i mars 2014 resulterte ikke i en økning i AGD-typiske histopatologiske gjelleforandringer (Figur 27).



Figur 27. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellelev) i merd 1. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

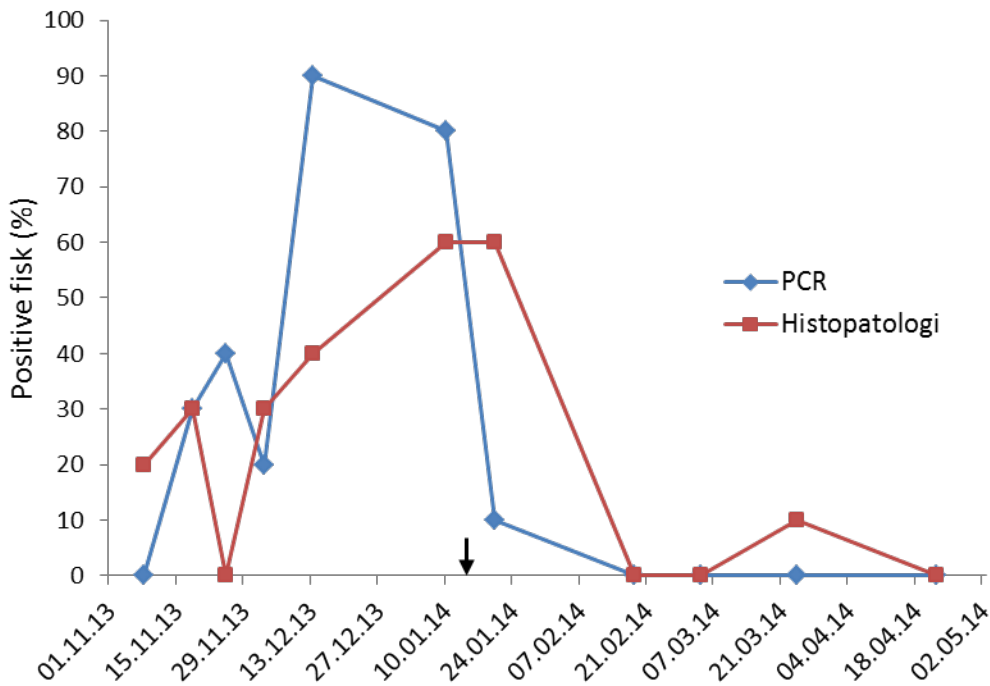
Til tross for høy gjennomsnittlig gjellescore (2,9) ved første prøveuttak var andelen AGD-affisert gjellevev lavt ved første prøveuttak i merd 6. Dette kan tyde på at andre gjellehelseproblemer enn AGD påvirket denne gjellescoren. PCR-analysene viser at gjennomsnittlig ca. 50 % av fisken var PCR-positive i de første to månedene av prosjektperioden (Figur 26). Andelen histopatologi-positive fisk for AGD var også lav ved de første prøveuttakene (Figur 28). Dette støtter antakelsen om at andre gjellehelseproblemer enn AGD bidro til den høye gjellescoren i merd 6. Gjennomsnittlig gjellescore forble like høy, mens det var en svak økning i histopatologi fram til hydrogenperoksidbehandlingen i midten av januar 2014. Den gode effekten av behandlingen i merd 1 ble også observert etter behandlingen i merd 6.



Figur 26. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellevev) i merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

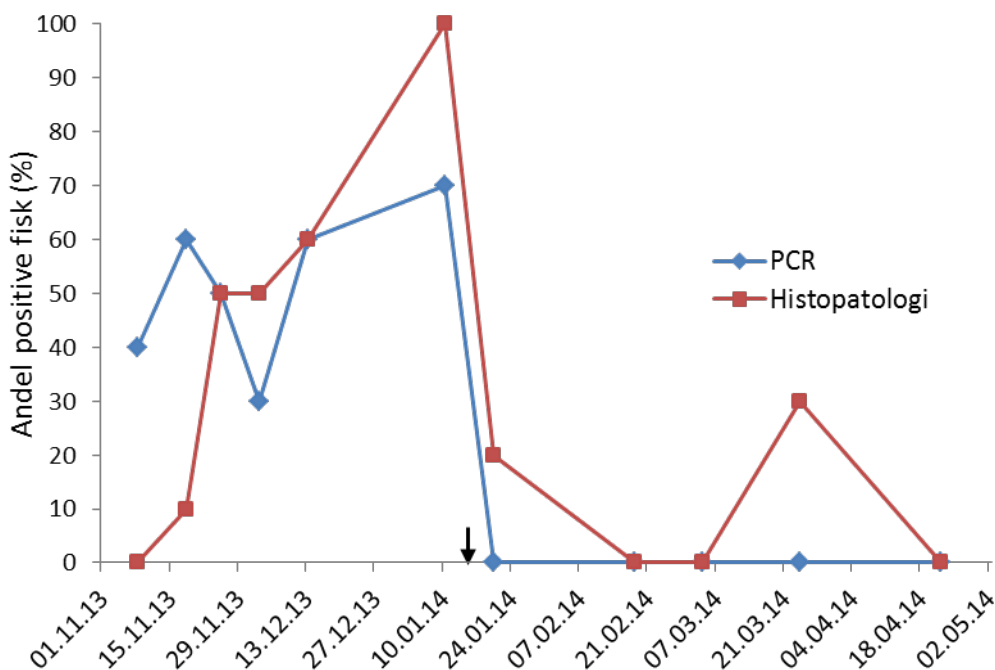
7.2.3. Utvikling i PCR versus histopatologi

Andelen PCR-positive fisk i merd 1 økte fra null ved første prøveuttak og var 80 % i begynnelsen av januar. Andel histopatologi-positive fisk økte også, men ikke like raskt og like mye (Figur 29). Etter hydrogenperoksidbehandlingen sank både andel PCR-positive og andel histopatologi-positive fisk raskt.



Figur 29. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positive laks i merd 1. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

Andelen PCR-positive fisk i merd 6 var 40 % ved første prøveuttak og 70 % i begynnelsen av januar. I den samme perioden økte andelen histopatologi-positive fra 0 % til 100 % (Figur 30). Etter hydrogenperoksidbehandlingen sank både andel PCR-positive og andel histopatologi-positive fisk raskt. Mot slutten av perioden ble det observert en økning i histopatologi, på lik linje med økning i gjellescore (Figur 28), på tross av at det ikke ble påvist amøber med PCR.

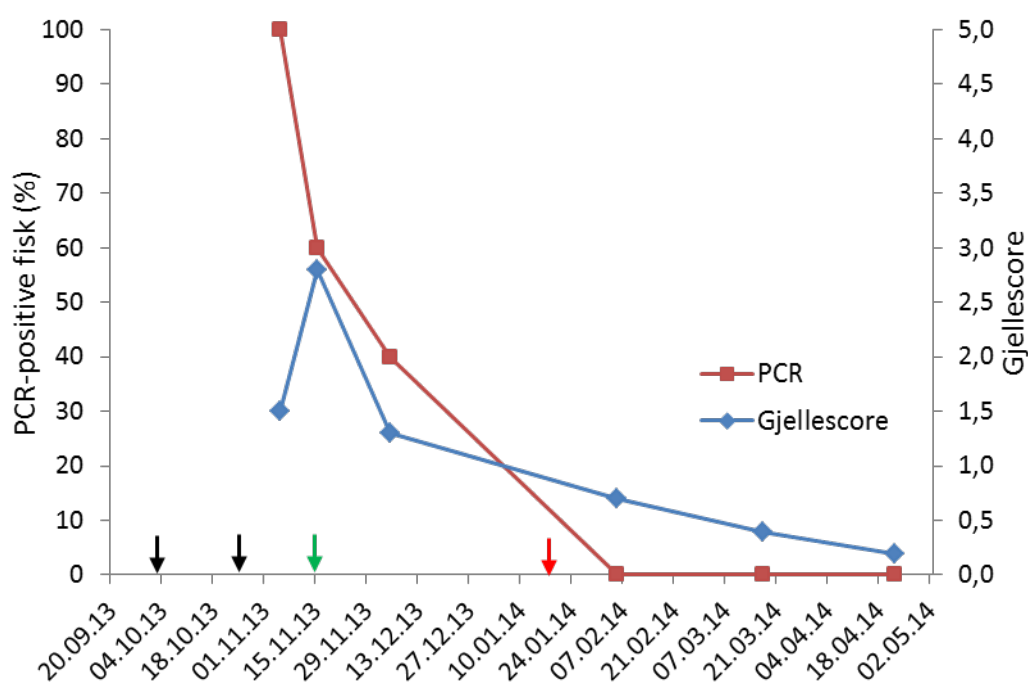


Figur 30. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positive laks i merd 6. Sort pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*.

7.3. Anlegg 3

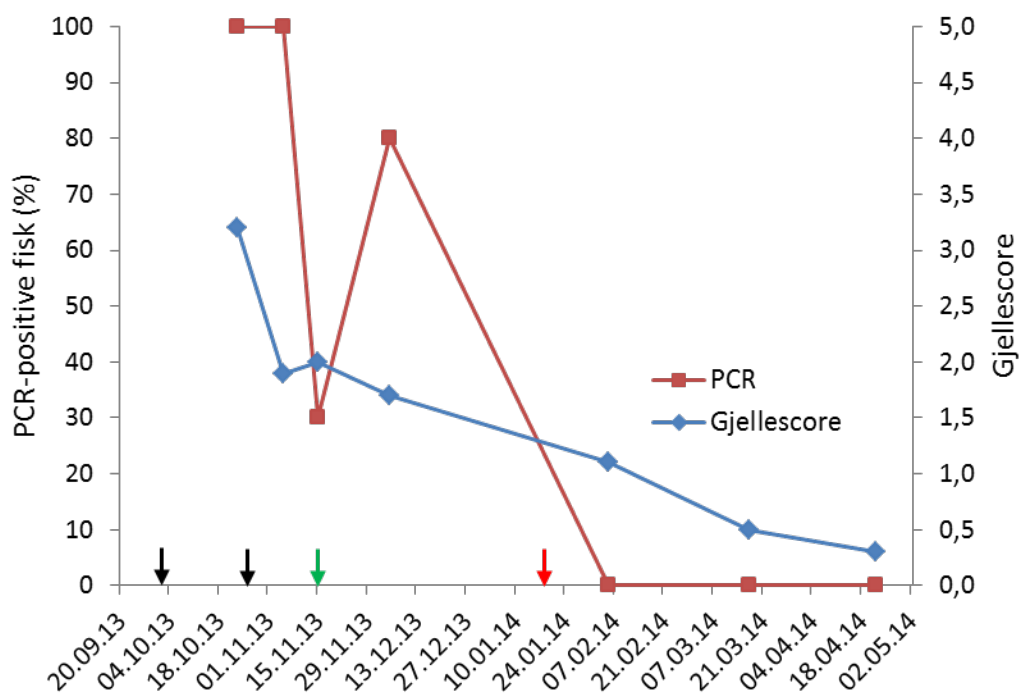
7.3.1. Utvikling i gjellescore versus PCR

Ved første prøveuttak av gjeller til PCR-analyse, den 5. november, var all fisk i merd 3 positiv for *P. perurans* (Figur 31), selv om det var gjennomført to behandlinger av merden med hydrogenperoksid, i perioden 1.-3. oktober og 23-27. oktober. Gjennomsnittlig gjellescore var 1,5 til tross for de to behandlingene. Ti dager senere hadde gjennomsnittlig gjellescore økt til 2,8. I perioden 13.-20. november ble merd 3 behandlet med ferskvann. Denne behandlingen hadde en god effekt på amøben, og drøye to uker etter ferskvannsbehandlingene var andelen PCR-positive fisk redusert til 40 %. Gjennomsnittlig gjellescore ble også redusert etter ferskvannsbehandlingen. I perioden 16.-20. januar ble merd 3 på nytt behandlet. Denne gangen med hydrogenperoksid, en behandling som først og fremst var rettet mot lakselus. Første prøveuttak etter denne behandlingen viste at all fisk var PCR-negativ for *P. perurans*, og amøben ble heller ikke påvist i de siste prøveuttakene i prosjekt-perioden. Gjennomsnittlig gjellescore sank mot slutten av prosjektperioden, men ble ikke redusert til null til tross for at fisken var PCR-negativ for amøben (Figur 31).

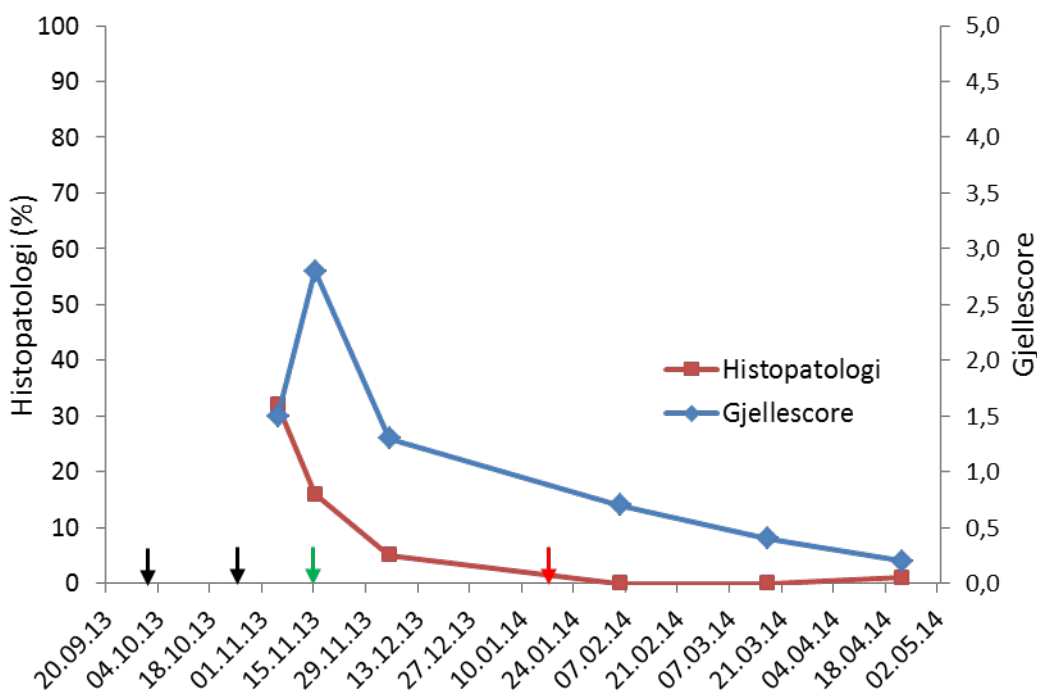


Figur 31. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 3. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

Ved de to første prøveuttak av gjeller til PCR-analyse, den 23. oktober og den 5. november, var all fisk i merd 8 positiv for *P. perurans* (Figur 32). Dette til tross for to behandlinger av merden med hydrogenperoksid, i perioden 1.-3. oktober og 23-27. oktober. Gjennomsnittlig gjellescore var også høy (3,2) tatt i betraktning de to behandlingene. Gjennomsnittlig gjellescore sank imidlertid gjennom hele prosjekt-perioden, men ble aldri redusert til null i merd 8 til tross for gjentatte behandlinger. Andelen PCR-positive fisk sank kraftig fra 100 % til 30 % etter ferskvannsbehandlingen (13.-20. november). Ved prøveuttak den 5. desember, ca. tre uker etter ferskvanns-behandlingen, var imidlertid andelen PCR-positive fisk 80 %. Den høye prosentandelen PCR-positive fisk ga ingen økning i gjellescore eller histopatologi (Figur 32 og 34) og er således vanskelig å tolke. Den siste hydrogenperoksidbehandling i merd 8 (mot lakselus) hadde tilnærmet samme effekt på amøben og på gjennomsnittlig gjellescore som beskrevet etter tilsvarende behandling i merd 3.



Figur 32. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med andel PCR-positive laks i merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

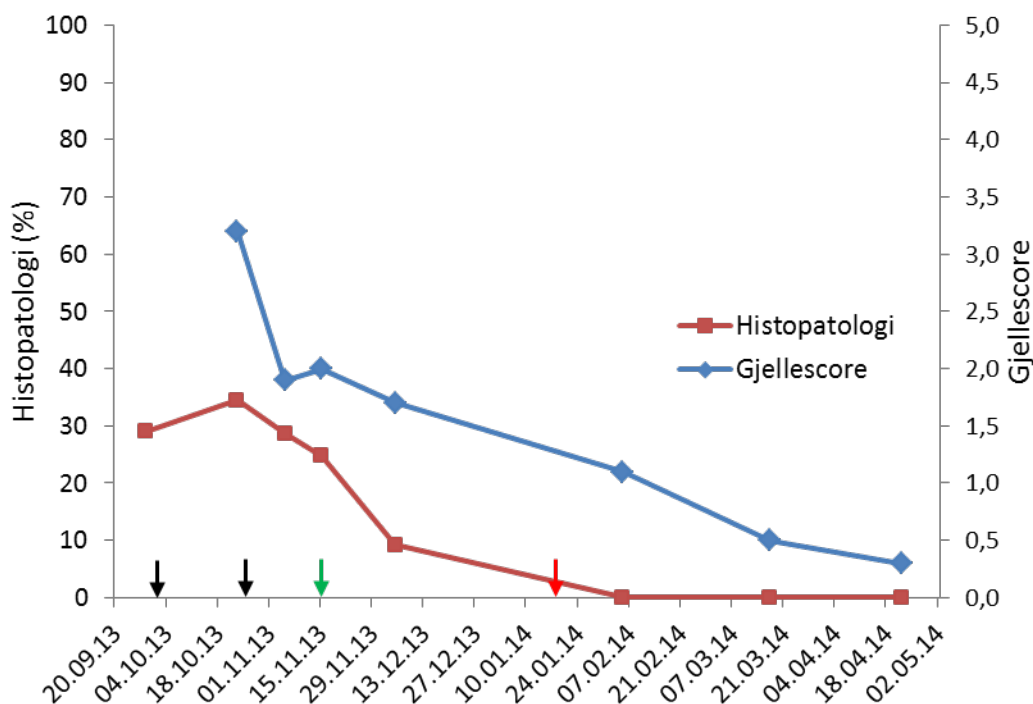


Figur 33. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellevev) i merd 3. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

7.3.2. Utvikling i gjellescore versus histopatologi

Ved første prøveuttak i merd 3 var en relativt høy prosentandel av fiskens gjellevev AGD-affisert (Figur 33) til tross for to hydrogenperoksidbehandlinger (beskrevet over) relativt kort før prøveuttaket.

Gjennomsnittlig gjellescore var som nevnt også forholdsvis høy (1,5) og den økte i tillegg til 2,8 ved neste prøveuttak, 10 dager senere. Ferskvanns-behandlingen i perioden 13.-20. november hadde god effekt i form av redusert andel affisert gjellevev og reduksjon i gjennomsnittlig gjellescore i de påfølgende prøveuttakene etter behandlingen. Etter hydrogenperoksidbehandlingen i perioden 16.-20. januar (mot lakselus) ble det ikke påvist AGD-affisert gjellevev, bortsett fra i siste uttak der 1 av 10 fisk var svakt affisert.

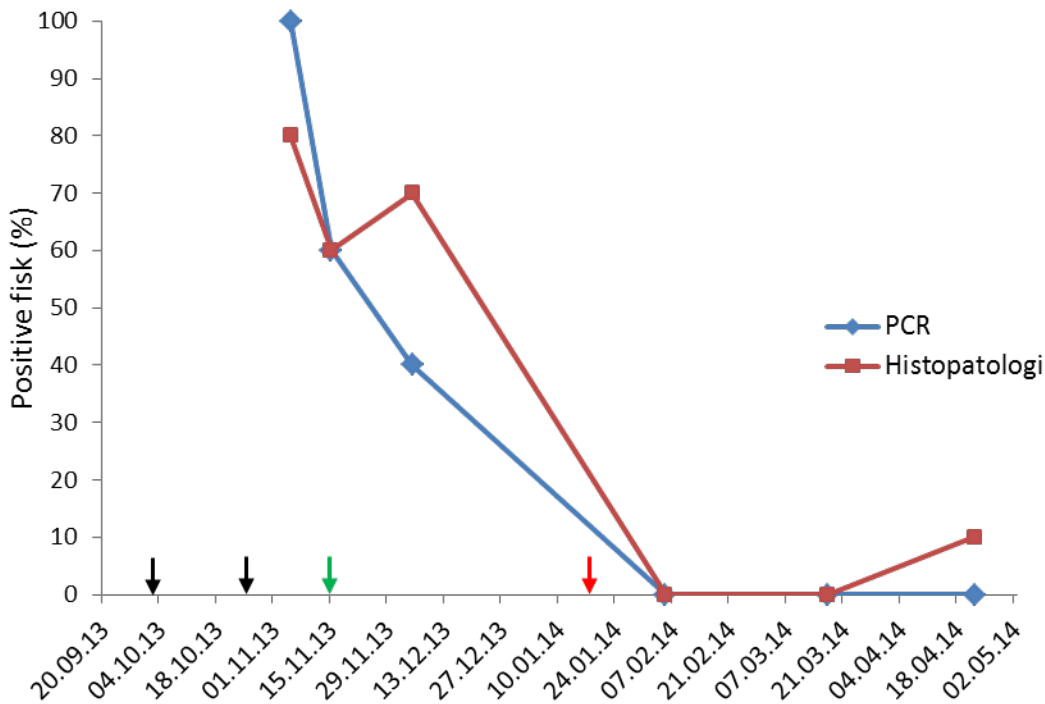


Figur 34. Sammenligning av gjennomsnittlig gjellescore med histopatologi (gjennomsnittlig prosentandel av affisert gjellevev) i merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot AGD, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *Paramoeba perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

Ved første prøveuttak i merd 8 var en relativt høy prosentandel av fiskens gjellevev AGD-affisert (Figur 34). Det var også en svak økning i andel affisert vev frem til neste prøveuttak til tross for at det ble behandlet med hydrogenperoksid i denne perioden. Det ser imidlertid ut til at andre hydrogenperoksidbehandling i merd 8, i perioden 23.-27. oktober, hadde en positiv effekt som gav reduserte gjellevevsskader. Gjennomsnittlig gjellescore var som nevnt høy ved første prøveuttak, men var generelt synkende gjennom hele prosjektperioden. Etter hydrogenperoksidbehandlingen i perioden 16.-20. januar ble det ikke påvist AGD-affisert gjellevev på prøvetatt fisk i merd 8 (Figur 34). Gjennomsnittlig gjellescore ble gradvis redusert, men prøvetatt fisk hadde fortsatt gjellescore ved siste uttak (0,3 i gjennomsnitt).

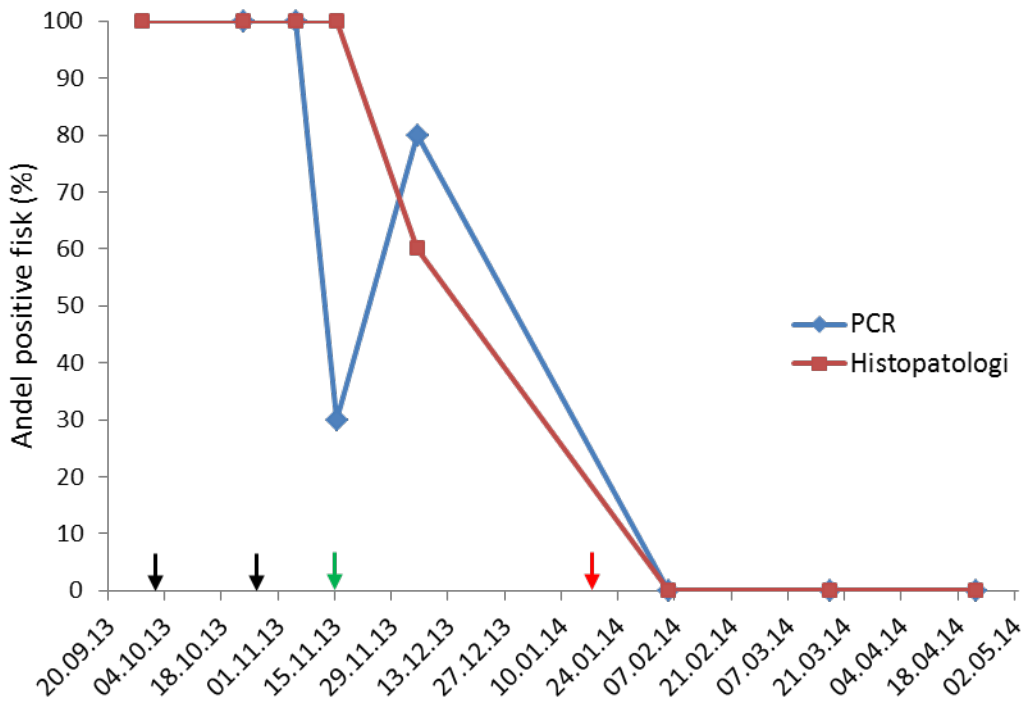
7.3.3. Utvikling i PCR versus histopatologi

Utviklingen i andel PCR-positive- og andel histopatologi-positive fisk i merd 3 var tilnærmet lik gjennom prosjektperioden (Figur 35). Ved ett prøveuttak, den 5. november 2013 var det en svak økning i andel histopatologi-positive fisk, mens andelen PCR-positive fortsatte å gå ned. Ved siste prøveuttak var 1 av 10 fisk histopatologi-positive, mens all fisk var PCR-negativ.



Figur 35. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positiv laks i merd 3. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

Utvikling i andel PCR-positive- og andel histopatologi-positiv fisk i merd 8 var relativt lik gjennom prosjektperioden (Figur 36). Ved de første fire prøveuttakene, i perioden 28. september til 15. november 2013, var alle undersøkte fisk histopatologi-positiv i merd 8. Dette til tross for to hydrogenperoksidbehandlinger i denne perioden. Andel PCR-positiv fisk var også 100 % ved de to første prøveuttakene, men sank til 30 % ved prøveuttak den 15. november. Ved dette prøveuttaket var andelen histopatologi-positiv fisk 100 %. Årsaken til denne forskjellen kan være at ferskvannsbehandlingen (13.-20. november) var gjennomført i merd 8 i forkant av uttaket den 15. november, og at behandlingen hadde en kraftig reduserende effekt på amøben, mens andel histopatologien-positiv fortsatt var høy fordi skadene på gjellene tar tid å reparere etter at amøben er borte. Ved prøveuttaket den 5. februar og ut prosjektperioden var alle fiskene PCR- og histopatologi-negative.



Figur 36. Sammenligning av andel PCR-positive laks med andel histopatologi-positiv laks i merd 8. Sorte piler angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot *Paramoeba perurans*, grønn pil angir tidspunkt for ferskvannsbehandling mot *P. perurans* og rød pil angir tidspunkt for hydrogenperoksidbehandling mot lakselus.

8. Konklusjoner

8.1. Anlegg 1

I anlegg 1 var det relativt lik utvikling av AGD-sykdomsforløp i begge merder (merd 5 og 9). En noe uventet AGD-utvikling i form av en stabil sykdomstilstand var karakteristisk for dette anlegget. Dette til tross for at en høy andel av fisk i begge merdene var PCR-positive for amøben over en relativ lang tidsperiode. Andel histopatologi-positiv fisk var også høy, mens andel AGD-affisert gjellevev aldri ble stor, selv om resultatene viser en liten økning i AGD-affisert gjellevev mot slutten av desember 2013 i begge merder. Denne økningen samsvarer godt med at andel PCR-positive fisk var høyest i denne perioden.

Det ble gjennomført hydrogenperoksidbehandling i merd 5 i uke 44. Resultatene fra de påfølgende prøveuttakene i merd 5 viser ingen markant forbedring i AGD-situasjonen eller en nedgang i antall PCR-positive fisk. Dette gir grunnlag for å vurdere behandlingen som lite effektiv mot *P. perurans* i og med at det var tilnærmet lik AGD-utvikling i den merden i anlegget som ikke ble behandlet. Det var imidlertid en liten nedgang i andel PCR-positiv fisk like etter behandlingen, men denne nedgangen var lik i begge merder til tross for at bare den ene ble behandlet. Årsaken til dette kan være at merdene lå så nært hverandre at begge ble påvirket av kjemikaliebehandlingen. Alternativt så hadde reduksjonen i andel PCR-positive fisk andre årsaker enn behandling.

Anlegg 1 hadde en gjennomsnittlig saltholdighet på 28 ‰ i prosjektperioden. Saliniteten var nede i 22 ‰ på det laveste, mens den aldri var høyere enn 32,4 ‰. I *in vitro*-forsøk har flere laboratorier vist at amøben kan overleve ved lave saliniteter (upubliseret), men disse studiene er ikke egnet til å si noe om *P. perurans* kan overleve på laks ved slike miljøbetingelser. Det er derfor en interessant observasjon at fisk i anlegg kan være positive for *P. perurans* ved saliniteter lavere enn den oppgitte grenseverdien på 32 ‰ i litteraturen (Nowak 2012). Den relativt lave gjennomsnittlige saliniteten i anlegg 1 kan være forklaringen på at den infiserte fisken ikke utviklet en mer alvorlig grad av AGD. Disse observasjonene understreker behovet for studier av AGD-utvikling hos laks ved reduserte saltholdigheter. En hypotese som bør undersøkes nærmere vil i denne sammenheng være om *P. perurans* kan infisere laks ved lave saltholdigheter selv om AGD ikke nødvendigvis utvikles til et uttalt nivå under slike miljøbetingelser. Vanntemperaturdata fra anlegg 1 viser at det var en jevn reduksjon i temperatur fra det første prøveuttaket i september 2013 og frem til begynnelsen av mars 2014 da temperaturen var på det laveste. Etter prøveuttaket den 13.12.2013, da henholdsvis 100 % og 90 % av fisken i merd 9 og 5 var PCR-positive

for *P. perurans*, var det en generell reduksjon i andel PCR-positive fisk. Ved dette uttaket var temperaturen (gjennomsnitt på 3, 10 og 15 meter) 8,3 °C. Ca. en måned senere, ved prøveuttak den 15.1.2014, var andelen PCR-positive fisk fortsatt 40 % i merd 9 og 20 % i merd 5 til tross for at temperaturen hadde sunket til 5,9 °C (gjennomsnitt fra de tre dypene). Dette viser at amøben kan leve på laksegjeller ved temperaturer lavere enn 6 °C. Det var et langt opphold fra prøveuttaket den 15.1.2015 til neste uttak den 14.3.2014. På de to månedene sank temperaturen ytterligere til ca. 4 °C. Ingen av fisken som ble prøvetatt ved dette tidspunktet var PCR-positive for *P. perurans* og det er grunn til å anta at lav temperatur over tid er hovedårsaken til at amøben forsvant og at AGD faset ut.

8.2. Anlegg 2

I anlegg 2 ble begge merdene (merd 1 og 6) behandlet med hydrogenperoksid like før anlegget ble inkludert i denne studien. Resultatene fra PCR- og histopatologi-analysene viser at behandlingen hadde god effekt mot AGD i begge merder. Gjennomsnittlig gjellescore var imidlertid svært forskjellig i de to merdene i første halvdel av studien. I merd 6 var gjennomsnittlig gjellescore høy ved første prøveuttak med små variasjoner rundt gjennomsnittet, og gjellescore forble høy frem til behandling med hydrogenperoksid i midten av januar. I merd 1 derimot var gjennomsnittlig gjellescore relativt lav ved de første prøveuttakene. Den initielt høye gjellescoren i merd 6 kan skyldes andre gjellehelseproblemer enn AGD. PCR-analysene viser at kun halvparten av den prøvetatte fisken var PCR-positive i de første to månedene av prosjektperioden og at andelen histopatologi-positive fisk også var lav i de første prøveuttakene. Den histopatologi-positive fisken var kun svakt AGD-affisert. PCR- og histopatologi-resultatene støtter derfor antakelsen om at andre gjellehelseproblemer enn AGD bidro til den initielt høye gjellescoren i merd 6. Behandlingen med hydrogenperoksid i midten av januar 2014 ser ut til å ha hatt svært god virkning mot amøben. Like etter behandlingen var det kun en fisk i merd 1 som var PCR-positiv for *P. perurans*, mens all fisk i merd 6 var negativ. Gjellescore i de to merdene ble også redusert etter hydrogenperoksidbehandlingen, men hadde en økning igjen i begge merder den 24. mars 2014. Gjellescore ble aldri redusert til null i løpet av prosjektperioden i de to merdene. Dette til tross for at all fisk var PCR-negativ for amøben fra og med prøveuttaket den 21. januar 2014 i merd 6 og uttaket den 18. februar 2014 i merd 1. De histopatologiske undersøkelsene viste også at AGD-symptomene faset ut i siste halvdel av behandlingen, noe som indikerer at gjellescoren i siste halvdel av prosjektperioden trolig var påvirket av andre gjellehelseproblemer.

Ved første prøveuttak i anlegg 2 den 8.11.2013 var vanntemperaturen 11,1 °C. Ved dette prøveuttaket var andelen PCR-positive- og histopatologi-positive fisk henholdsvis 0 % og 20 % i merd 1. Den lave andelen positive fisk skyldes trolig behandling med H₂O₂ som ble gjennomført i uken før. Ved prøveuttaket den 10.1.2014 hadde andelen PCR-positive og histopatologi-positive fisk økt til henholdsvis 80 % og 60 % i merd 1, til tross for at vanntemperaturen hadde sunket til 6,3 °C. Dette viser at *P. perurans* trives, det vil si infiserer fisk og forårsaker AGD, ved vanntemperaturer som er betydelig lavere enn det som tidligere er beskrevet som amøbens trivselstemperatur. Det er ikke mulig å diskutere utfasingen av AGD i forhold til reduksjon i vanntemperatur i anlegg 2, da H₂O₂-behandlingen som ble gjennomført medio mars ser ut til å ha redusert andelen amøber til null. Det er imidlertid interessant å merke seg at *P. perurans* ikke infiserer fisk, verken i merd 1 eller i merd 6, etter denne behandlingen. Det er grunn til å anta at dette skyldes den lave og fortsatt synkende temperaturen på og etter behandlingstidspunktet.

8.3. Anlegg 3

De to merdene i anlegg 3 ble behandlet tilsammen tre ganger med hydrogenperoksid før og i løpet av prosjektperioden. I tillegg ble det gjennomført en ferskvannsbehandling i begge merder i perioden 13.-20. november. AGD-utviklingen var relativt lik i begge merder og kan betraktes som alvorlig i begynnelsen av prosjektperioden, men med en tydelig og rask forbedring like etter at en ferskvannsbehandling ble gjennomført. Det var god korrelasjon mellom andel PCR-positive og andel histopatologi-positive fisk i begge merder bortsett fra i merd 8 den 15. november da all fisk var histopatologi-positive, mens kun 30 % var PCR-positive. Dette kan skyldes at ferskvannsbehandlingen like i forkant av prøveuttaket hadde reduserende effekt på amøben, men at fisken ikke hadde restituert seg fra de histopatologiske skadene. Andel histopatologiske skader på gjellene og gjennomsnittlig gjellescore var generelt synkende i begge merder gjennom hele prosjektperioden bortsett fra ett unntak i merd 3 der gjellescore økte kraftig mellom prøveuttakene den 5. og 15. november. Gjennomsnittlig gjellescore i denne merden sank raskt etter ferskvannsbehandlingen.

I hele perioden med AGD og PCR-positiv fisk, var vanntemperaturen jevnt synkende. Saliniteten i anlegget var stabil og lå rundt 30 ‰ ved 5 og 15 meters dyp. I overflate, ved 0,5 meters dyp, var gjennomsnittlig salinitet 27,3 ‰. Det er vanskelig å vurdere AGD-utvikling og amøbeforekomst i forhold til

miljøparametere i anlegg 3 på grunn av flere og hyppige behandlinger. Behandling med ferskvann hadde også som nevnt en kraftig reduserende effekt på amøben. Det kan imidlertid konkluderes med at det var gode miljøbetingelser for *P. perurans*, både med hensyn på vanntemperatur og salinitet frem til midten av november da ferskvannsbehandling ble gjennomført. Det er grunn til å tro at lav temperatur i siste halvdel av prosjektperioden, fra medio desember, var en viktig årsak til at fisken ikke utviklet AGD i perioden etter ferskvannsbehandlingen. En H₂O₂-behandling mot lakselus hadde også trolig reduserende effekt på eventuelt gjenværende amøber.

9. Referanser

- Fringuelli E, Gordon AW, Rodger H, Welsh MD and Graham DA (2012) Detection of *Neoparamoeba perurans* by duplex quantitative Taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded Atlantic salmonid gill tissues. *Journal of Fish Diseases* 35: 711-4.
- Mitchell SO, Baxter EJ, Holland C and Rodger HD (2012) Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International* 20: 813-25. DOI: 10.1007/s10499-012-9504-x
- Nowak B (2012) *Neoparamoeba perurans*. In: Woo PTK, Buchmann K (editors). Fish parasites: Pathobiology and Protection. CAB International; 2012. p. 1-18.
- Steinum T, Kvellestad A, Rønneberg LB, Nilsen H, Asheim A, Fjell K, Nygård SMR, Olsen AB and Dale OB (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of Fish Diseases* 31: 205-14. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00893.x
- Taylor R, Muller WJ, Cook MT, Kube PD and Elliott NG (2009) Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture* 290: 1-8.

10. Takk til

Vi takker FOMAS og fiskehelsepersonell hos oppdrettsselskapene for vurdering av gjellescore og uttak av prøver fra oppdrettslaksene. Henriette Kvalvik, Oda Teige Kalsaas, Torill Thoreby Jensen ved Veterinærinstituttet Bergen takkes for opparbeidelse av prøver til histopatologiske analyser, mens Saima Nasrin Mohammad ved Seksjon for parasittologi, Veterinærinstituttet i Oslo, takkes for opparbeidelse av prøver for molekylærbiologiske analyser.

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. 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. 330 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 27 · f 73 58 07 88
vitr@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

