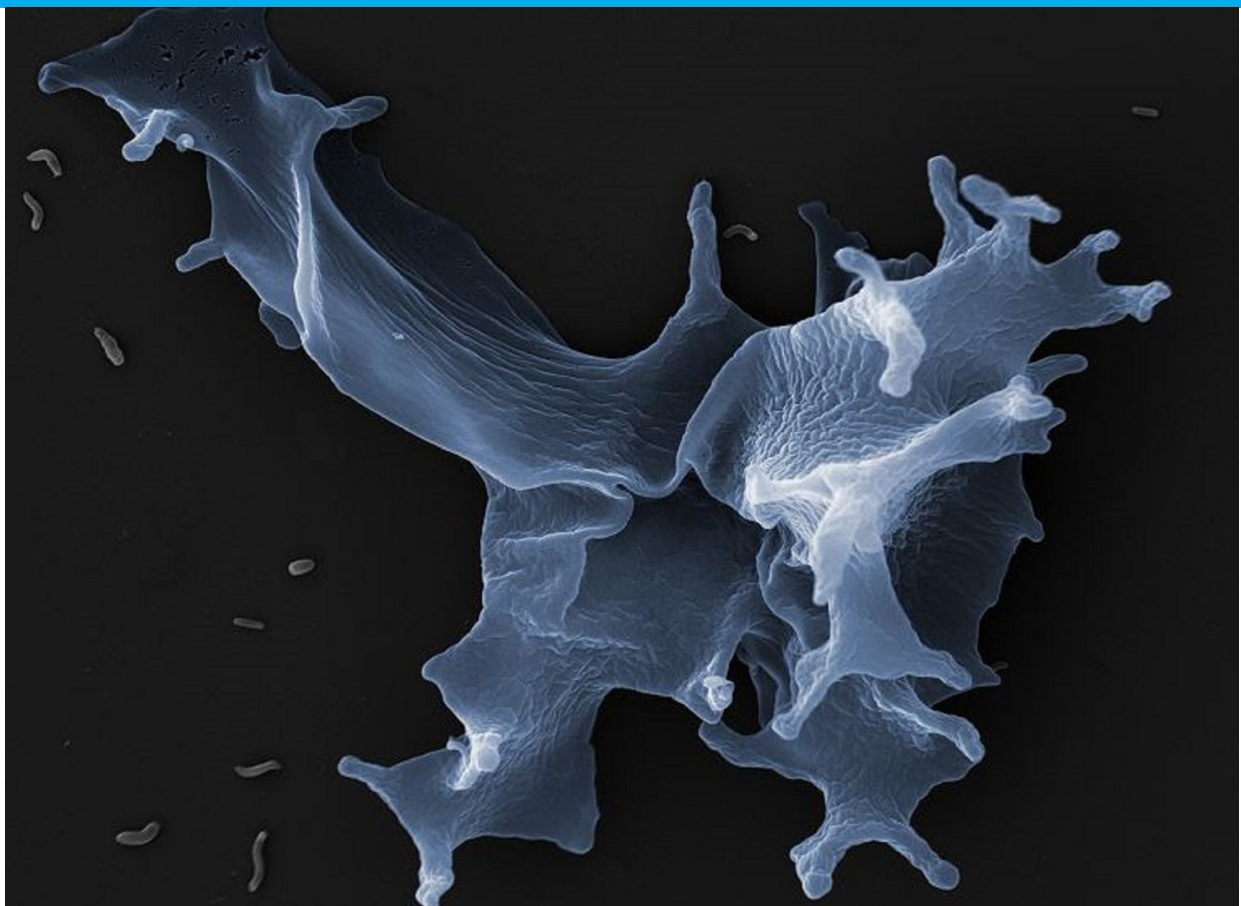


AGD-behandlingsstrategier - Dose-respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann



AGD-behandlingsstrategier -

Dose-respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann

Innhold

1. Sammendrag	3
2. Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov	5
3. Innledning	6
4. Material og metoder	7
4.1. Protokoll	7
4.2. Prøvetaking av fisk	8
4.2.1. Makroskopisk AGD-gjellescore	9
4.2.2. Real-time PCR	11
4.2.3. Gjeller til histologi	11
4.2.4. Analyse av H ₂ O ₂ -konsentrasjon	11
4.2.5. Vannkjemiske analyser	11
4.2.6. Statistikk	12
5. Resultater	12
5.1. AGD-beskrivelse av patologiske endringer i gjeller	12
5.2. Hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved behandling i forsøk 1 og 2	13
5.3. Vannkjemi i ferskvannet som ble brukt i behandlingen	15
5.4. Effekt av behandling på AGD	16
5.4.1. Forsøk 1: Ulike H ₂ O ₂ -konsentrasjoner - gjellescore	16
5.4.2. Forsøk 1: Ulike H ₂ O ₂ -doser - PCR	17
5.4.3. Forsøk 2: Ulike H ₂ O ₂ -doser ved forskjellige vanntemperaturer - gjellescore	17
5.4.4. Forsøk 2: Ulike H ₂ O ₂ -doser ved forskjellige vanntemperaturer - PCR	19
5.4.5. Forsøk 3: Effekt av H ₂ O ₂ - og ferskvannsbehandling ved ulik gjellescore - gjellescore	19
5.4.6. Forsøk 3: Effekt av H ₂ O ₂ - og ferskvannsbehandling ved ulik gjellescore - PCR	21
5.4.7. Forsøk 4: Effekt av ferskvannsbehandling med forskjellig varighet og ionestyrke - gjellescore	21
5.4.8. Forsøk 4: Effekt av ferskvannsbehandling med forskjellig varighet og ionestyrke - PCR	22
5.4.9. Forsøk 5: Effekt av brakkevann, lang behandlingstid og ferskvann tilsatt H ₂ O ₂ - gjellescore	22
5.4.10. Forsøk 5: Effekt av brakkevann, lang behandlingstid og ferskvann tilsatt H ₂ O ₂ - PCR	23
5.5. Effekter på fisk	23
6. Diskusjon	26
7. Takk til	29
8. Referanser	29
9. Appendiks	31

Forfattere / Authors

Sigurd Hytterød
Linda Andersen
Haakon Hansen
Steffen Hageselle Blindheim
Trygve Thomas Poppe
Anja Bråthen Kristoffersen
Tor Atle Mo

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2017

Oppdragsgiver

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond
(FHF)



Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Jannicke Wiik-Nielsen

1. Sammendrag

Amøbegjellesykdom (engelsk: AGD), forårsaket av amøben *Paramoeba perurans*, har etablert seg som en alvorlig sykdom i norsk lakseoppdrett, og det er et stort behov for behandling som kan redusere tapene. Behandling med ferskvann eller hydrogenperoksid (H_2O_2) er de metodene som er i bruk mot AGD, og begge metodene har dokumentert effekt mot amøben. Studier har imidlertid vist at ingen av metodene har en hundre prosent eliminerende effekt på amøben, og i mange tilfeller utvikler sykdommen seg på nytt etter behandling.

I denne rapporten presenteres resultater fra fem eksperimentelle forsøk der laks med AGD ble behandlet med H_2O_2 , ferskvann og brakkvann. Effekt av forskjellige H_2O_2 -doser (konsentrasjon og eksponeringstid) ved ulike vanntemperaturer ble studert for å finne kombinasjoner av H_2O_2 -konsentrasjoner og behandlingstid som ga best effekt mot sykdommen, og samtidig ivaretok fiskehelse på best mulig måte. Det var også et mål å undersøke effekten av ferskvann mot AGD ved forskjellige eksponeringstider; henholdsvis ved en-, to, og tre-timers behandling. I tillegg ble effekt av brakkvannseksponering med forskjellige saliniteter og behandlingstider studert.

Behandlingseffekten ble vurdert ut fra hvordan AGD utviklet seg over en periode på 21 dager etter eksponering for de ulike mediene, og hvordan behandlingene påvirket fisken under- og i tiden etter eksponering.

Alle behandlingene som ble testet i denne studien hadde en reduserende effekt på AGD.

Ferskvannsbehandling i tre timer hadde generelt en bedre effekt enn alle H_2O_2 -dosene som ble testet, og ferskvannsbehandling var i tillegg mer skånsomt for fisken. Ferskvannseksponering i én time ga imidlertid vesentlig dårligere behandlingseffekt enn to- og tre-timers eksponering, noe som viser at behandlingstiden er en viktig faktor ved ferskvannsbehandling.

Behandling med ulike doser H_2O_2 ga liten forskjell i reduserende effekt på AGD. Det var heller ingen tydelige forskjeller i reduserende effekt på sykdommen når lange og korte eksponeringstider ble sammenlignet innenfor tilnærmet like H_2O_2 konsentrasjoner. Lang eksponeringstid (det vil si 30-40 minutter) og høye temperaturer (over $12\text{ }^{\circ}\text{C}$), forårsaket imidlertid negative effekter på fisken, observert som atferdsendringer, gjelleblødninger og i flere tilfeller akutt dødelighet.

Behandling mot AGD ved lave vanntemperaturer ga en mer langvarig reduserende effekt på AGD enn det som var tilfellet etter behandling ved høyere temperaturer - både ved H_2O_2 -behandling og ferskvannsbehandling. Årsaken til dette kan være at behandlingseffekten er bedre ved lavere temperaturer, og/eller at overlevende amøber har bedre vekstbetingelser ved høyere temperaturer.

Behandling med H_2O_2 og ferskvann gjennomført på fisk med forskjellig gjellescore ved behandlingstidspunktet, henholdsvis ved score 1, 2 og 3 (basert på den mest affiserte gjellebuen), viste at behandling tidlig i sykdomsforløpet, det vil si ved score 1, gav den mest langvarige behandlingseffekten. Det er verdt å merke seg at ferskvannsbehandlingen ved gjellescore 1 reduserte prevalensen av *P. perurans* til null, og at amøben ikke ble påvist i de påfølgende prøveuttakene over en periode på 21 dager i denne forsøksgruppen.

Det var stor variasjon i behandlingseffekt ved behandling med brakkvann. To kombinasjoner pekte seg ut som svært effektive, nemlig 10 ‰ salinitet i 24 timer og 15 ‰ salinitet i 48 timer. Disse behandlingene hadde svært god reduserende effekt på AGD. Behandling ved 20 ‰ i tre dager og 25 ‰ i fire dager ga derimot liten reduserende effekt på AGD.

Innenfor de kombinasjoner av behandlingstider og konsentrasjoner som er testet i denne studien, kan det konkluderes med at ferskvannsbehandling i tre timer har bedre reduserende effekt enn H_2O_2 -behandling mot AGD. Av de H_2O_2 -dosene som ble testet, ser 1200 ppm H_2O_2 i 20 minutter ut til å være den beste kombinasjonen av konsentrasjon og tid, men det må utvises stor forsiktighet ved H_2O_2 -behandling ved temperaturer høyere enn $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kort eksponeringstid er derfor viktig for å ivareta god fiskevelferd.

Summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by the amoeba *Paramoeba perurans* is considered a serious disease in the Norwegian salmon farming industry, and there is a great need for development of treatment strategies. Treatment with freshwater or hydrogen peroxide (H₂O₂) are the methods applied against AGD, and both methods have proven effect against the amoeba. Studies have shown, however, that none of the methods completely eliminate the amoeba, and in many cases the disease progresses post treatment.

Here we present the results from five experimental studies where Atlantic salmon infected with *P. perurans* was treated with H₂O₂, freshwater and brackish water. Effect of different H₂O₂ concentrations and exposure times were studied at different water temperatures to find the H₂O₂ dose with the best reducing effect against AGD, while also being lenient to the fish. Another objective was to evaluate the effect of freshwater treatment against AGD at different exposure times; one-, two-, and three-hour treatment respectively. In addition, the treatment effect of brackish water with different salinities and treatment time was studied. The effect of treatments was evaluated by following the development of AGD on the gills over a period of 21 days post-exposure, and on how the fish responded to the treatments.

All treatment combinations included in this study had a reducing effect on the disease. Freshwater treatment for three hours had a better effect than all the H₂O₂-doses tested. In addition, freshwater treatment was shown to be gentler to the fish. Freshwater exposure for one hour gave considerably lower reducing effect on AGD than 2-3 -hour exposure, indicating that treatment time is an important factor when carrying out freshwater treatment.

There were no significant dose response correlations in the H₂O₂-treatments, neither from different concentrations nor from variation in exposure time. Treatment with H₂O₂ for 30 minutes or longer, however, led to gill bleeding, and in some cases significant fish mortalities, especially at water temperatures higher than 12 °C. Treatments at low water temperatures and at low macroscopic gill score (early AGD stage) significantly enhanced a prolonged reducing affect against AGD.

Treatment with H₂O₂ and freshwater conducted at different gill score levels (score 1, 2 and 3 respectively), demonstrated that treatment early in the disease progression (at score 1) caused the most long lasting treatment effect. It is worth noting that the freshwater treatment at gill score 1 reduced the prevalence of *P. perurans* to zero, and that the amoeba was not detected in subsequent sampling over a period of 21 days.

There was considerable variation in treatment efficacy when brackish water was applied. Two combinations of salinity and exposure time were highly effective, namely 10 ‰ salinity for 24 hours and 15 ‰ salinity for 48 hours. Treatment at 20 ‰ for three days and 25 ‰ for four days, however, were not that effective.

In conclusion, treatment with freshwater for three hours had a better reducing effect than H₂O₂-treatment against AGD. Of the H₂O₂-doses tested, 1200 ppm H₂O₂ for 20 minutes seems to be the best combination of concentration and time. However, considerable caution must be applied when H₂O₂-treatment is carried out at temperatures higher than 12 °C. Short term exposure to H₂O₂ is therefore important to safeguard fish welfare.

2. Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov

Hovedfunn

- Ferskvann har bedre reduserende effekt enn hydrogenperoksid (H_2O_2) mot AGD, og ferskvann er i tillegg betydelig mer skånsomt enn H_2O_2 for fisken
- Ferskvannsbehandling i én time er for kort til å gi god reduserende effekt mot AGD, mens det i disse forsøkene var liten forskjell i behandlingseffekt ved to-timers- og tre-timers behandling med ferskvann
- Tilsetning av kalsiumkarbonat ($CaCO_3$) for å bufre ferskvann ved AGD-behandlinger, reduserte ikke behandlingseffekten
- Behandling ved lav gjellescore ga en mer langvarig reduserende effekt sammenlignet med behandling ved høyere gjellescore
- Behandling ved lav vanntemperatur ga en mer langvarig reduserende effekt sammenlignet med behandling ved høy vanntemperatur
- Høye H_2O_2 -konsentrasjoner ga ikke vesentlig bedre behandlingseffekt mot AGD enn lave konsentrasjoner ved samme behandlingstid
- H_2O_2 -eksponering i 40 minutter ga ikke bedre behandlingseffekt mot AGD enn eksponering i 20 minutter, ved tilnærmet samme behandlingsskonsentrasjoner
- Eksponering for H_2O_2 -konsentrasjoner over 1400 ppm ga negative effekter på fisken, særlig ved temperaturer høyere enn 12 °C
- Behandling med H_2O_2 lengre enn 20 minutter ga negative effekter på fisken, særlig ved temperaturer høyere enn 12 °C
- Brakkvannsbehandling med 10 ‰ og 15 ‰ salinitet i henholdsvis 24 timer og 48 timer, hadde kraftig reduserende effekt på AGD

Anbefalinger

- Ferskvann bør velges fremfor H_2O_2 til behandling mot AGD, særlig ved vanntemperaturer høyere enn 12 °C
- Lokalteter med høy salinitet og stigende vanntemperatur bør behandle tidlig i sykdomsutviklingen, gjerne før sykdommen har utviklet seg til gjellescore 1
- 1200 ppm H_2O_2 i 20 minutter er en god behandlingssdose mot AGD, men det må utvises stor forsiktighet ved behandling på vanntemperatur høyere enn 12 °C
- Ved bruk av H_2O_2 er kort eksponeringstid, det vil si ikke lenger enn 20 minutter, viktig for å ivareta god fiskevelferd
- AGD-gjellescore er en god metode for å vurdere behandlingseffekt, men det forutsetter at man beregner gjellescoreverdi ut fra en vurdering av begge sider på alle de åtte gjellebuene

Kunnskapsbehov

- Effekt av ferskvannsbehandling med varighet utover tre timer bør undersøkes
- Effekt av behandling med brakkvann og lang eksponeringstid virker svært lovende og bør undersøkes nærmere.

3. Innledning

Amøbegjellesykdom (engelsk: AGD) forårsaket av amøben *Paramoeba perurans*, etablerte seg som en alvorlig sykdom i norsk lakseoppdrett i 2012, og allerede i 2013 og 2014 forårsaket sykdommen store tap for næringen. Selv om amøben kan være tilstede på fisk i oppdrettsanlegg gjennom hele året, synes AGD å være en sesongbetont sykdom i Norge. De fleste utbruddene observeres i perioden august-november, men sesongen kan starte allerede i juni og vare helt til februar-mars året etter (17). De viktigste risikofaktorene for AGD-utbrudd er høy salinitet og høy vanntemperatur (10). AGD kan forårsake høy dødelighet hvis fisken ikke behandles.

Kort tid etter etableringen av lakseoppdrett i Tasmania (Australia) på 1980-tallet manifesterte AGD seg som en alvorlig laksesykdom. Foster og Percival (12, 13) anbefalte en behandling med rent ferskvann i 2-6 timer og denne metoden ble raskt etablert i næringen. Ferskvann er fortsatt det dominerende behandlingstiltaket i Tasmania. Senere er det vist at bløtt vann (lite kalsiumkarbonat) har bedre behandlingseffekt både på amøben og gjellene enn hardt vann (mye kalsiumkarbonat) (19, 21, 22). Årsaken til forskjellen er imidlertid ikke kjent.

På begynnelsen av 1990-tallet undersøkte australske forskere effekten av en rekke kjemikalier og behandlingsmidler på amøben og AGD, blant annet hydrogenperoksid (H_2O_2) (5, 6, 7, 15). Metoden for bruk av hydrogenperoksid har senere blitt videreutviklet (3), men ferskvann har likevel fortsatt å være det viktige behandlingstiltaket i Australia.

Da *P. perurans* ble påvist, og forårsaket de første alvorlige AGD-utbruddene i Europa og Norge, var H_2O_2 -behandling en etablert metode mot lakselus, samtidig som det ville ta lang tid å etablere den omfattende infrastrukturen knyttet til ferskvannsbehandlinger. Det var et akutt behov for behandling mot AGD, og det var derfor mest hensiktsmessig å behandle de første AGD-utbruddene i Norge med H_2O_2 . Etter hvert har behandlinger med ferskvann, både i brønnbåter og med presenninger, blitt mer vanlig mot AGD i Norge, men H_2O_2 benyttes fortsatt. Verken ferskvann- eller H_2O_2 -behandling er imidlertid hundre prosent effektivt og enkelte amøber overlever (9, 17, 18). I en del tilfeller utvikles AGD på nytt etter behandling, enten på grunn av for dårlig behandlingseffekt eller fordi fisken smittes på nytt. Behandlinger må derfor ofte gjentas.

Ved behandling mot AGD i anlegg vil fisken potensielt være utsatt for et smittepress fra miljøet like etter behandlingen, og den reelle behandlingseffekten kan være vanskelig å dokumentere. Veterinærinstituttet (VI) og Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB) har derfor, på oppdrag fra FHF, gjennomført laboratorieforsøk under kontrollerte forsøksbetingelser der laks med AGD har blitt behandlet med H_2O_2 og ferskvann. Det er gjennomført fem eksperimentelle forsøk for å studere effekt av forskjellige H_2O_2 -konsentrasjoner og behandlingstider, ferskvannsbehandling med forskjellig varighet og ved ulike vanntemperaturer, og H_2O_2 - og ferskvannsbehandling ved forskjellig gjellescore. Effekt av brakkvannsbehandling ved forskjellige saliniteter og ferskvannsbehandling med tilsetning av H_2O_2 er også studert.

Følgende fem forsøk ble gjennomført:

Forsøk 1: H_2O_2 , konsentrasjon og behandlingstid (dose), der hensikten har vært å:

Undersøke behandlingseffekt ved utvalgte kombinasjoner av konsentrasjon og behandlingstid.

Undersøke effekten av lavere H_2O_2 -konsentrasjoner og lengre behandlingstider enn det som vanligvis brukes i felt.

Finne den mest optimale kombinasjon av H_2O_2 -konsentrasjone og behandlingstid med hensyn på effekt mot AGD og som ivaretar god fiskevelferd.

Forsøk 2: H_2O_2 , dose og vanntemperatur, der hensikten har vært å:

Undersøke behandlingseffekt av ulike kombinasjoner av H_2O_2 -konsentrasjon og tid ved 8 °C, 12 °C og 16 °C.

Finne gode kombinasjoner av H_2O_2 -konsentrasjon og behandlingstid ved de forskjellige temperaturene.

Forsøk 3: Ferskvann og H₂O₂, behandling ved forskjellig gjellescore, der hensikten har vært å:
Undersøke AGD-utvikling etter behandling ved ulike gjellescore.
Sammenligne effekten av ferskvann- og H₂O₂-behandling.

Forsøk 4: Ferskvann, behandlingstid, vanntemperatur og ionestyrke, der hensikten har vært å:
Sammenligne effekt av ferskvannsbehandling i 1 og 2 timer med (standard) 3-timers behandling.
Undersøke effekt av ferskvannsbehandling ved to vanntemperaturer.
Undersøke om tilsetning av CaCO₃ reduserer effekten av ferskvannsbehandlingen.

Forsøk 5: Ferskvann og H₂O₂, behandlingstid ved ulike sjøvannsblandinger, der hensikten har vært å:
Undersøke effekt av ferskvannsbehandling ved innblanding av små sjøvannsmengder.
Undersøke effekt av behandling med brakkevann over lang tid.
Undersøke effekt av behandling med ferskvann og H₂O₂ i kombinasjon.
Undersøke effekten av behandling med brakkevann og H₂O₂ i kombinasjon.

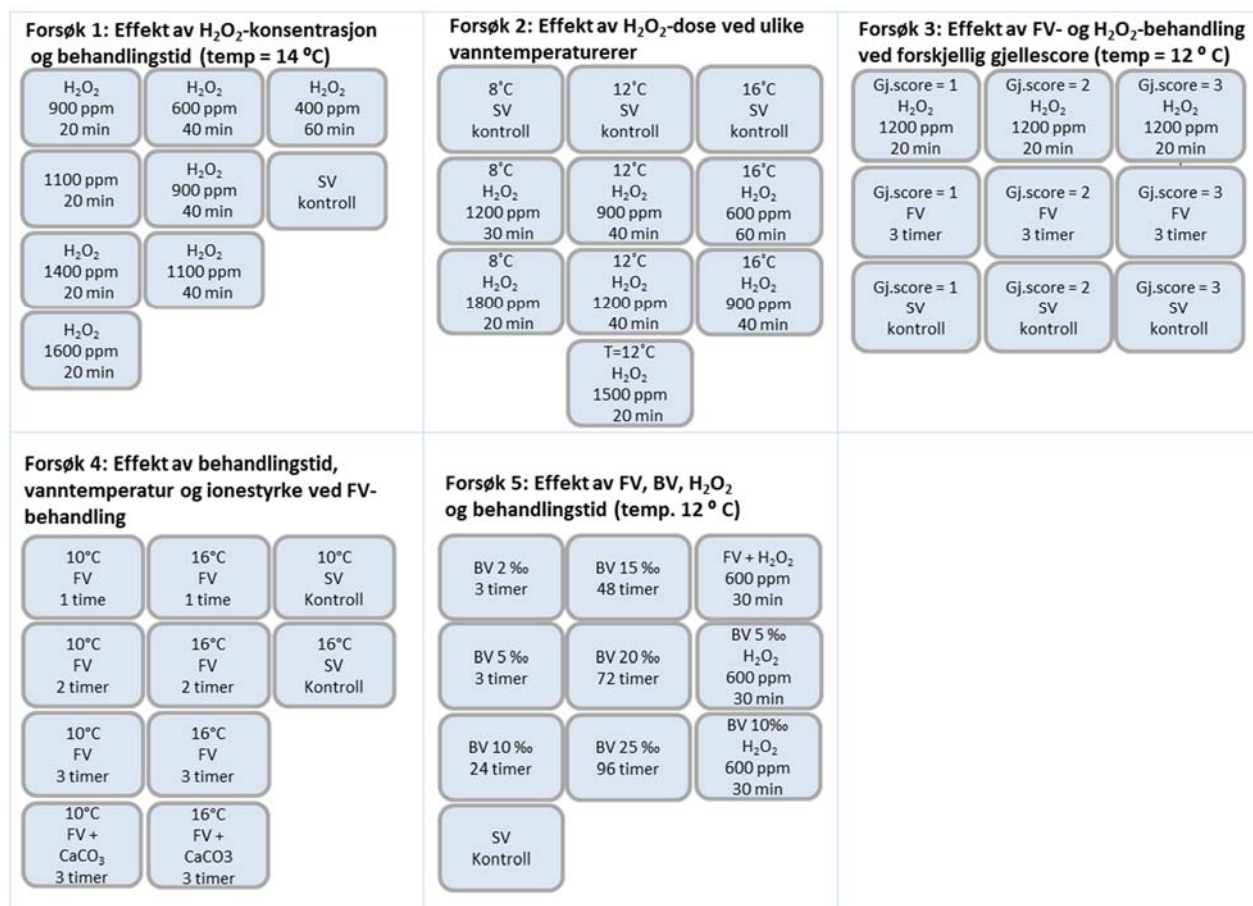
Hovedmålet med prosjektet var å finne de mest effektive og skånsomme kombinasjonene av H₂O₂-konsentrasjon og behandlingstid, samt å utrede effekter av ferskvanns- og brakkevannsbehandlinger ved forskjellige behandlingstider og vanntemperaturer innenfor miljøbetingelser som er relevante for norsk akvakultur.

4. Material og metoder

4.1. Protokoll

De fem eksperimentelle forsøkene ble gjennomført i perioden februar 2015 til mai 2016. Det ble benyttet 650 individer ± 50 i hvert forsøk (gjennomsnittsvekt fra 110 ± 16 gram i forsøk 1, til 390 ± 100 gram i forsøk 5). Fiskene ble akklimatisert til gjennomstrømmende sjøvann med 34 ‰ salinitet og 12-14 °C før smitte. I forsøk 1-3 ble alle fiskene smittet samtidig i et stort kar (2000L) før de så ble overført til 9-10 500L kar. I forsøk 4 ble fiskene fordelt i 10 stk 500L kar før smitte, og i forsøk 5 ble fiskene smittet i 2 store kar før de så ble fordelt i 10 stk 500L kar.

Fisken ble smittet med *P. perurans* ved å tilsette en amøbekultur til et gitt vannvolum. Smittedosen var på 1000 levende amøber per liter vann. Fisken ble eksponert for denne smittedosen i én time. Etter smitte ble AGD-sykdomsutviklingen vurdert ukentlig ved makroskopisk, ikke-dødelig gjellescoreing av minimum 10 bedøvede fisk. I de fleste forsøkene ble behandlingene gjennomført ved gjellescore 2, men i forsøk 3 ble fiskene behandlet ved forskjellige stadier i sykdomsutviklingen, henholdsvis ved gjellescore 1, 2 og 3 (vurdert ut ifra den mest affiserte gjellebuen). I forsøk 2-5 ble behandlingene gjennomført i egne behandlingskar, hvor fiskene ble håvet over i behandlingskaret og tilbake til forsøkskaret etter endt eksponeringstid. I forsøk 1 ble fisken behandlet med H₂O₂ direkte i forsøkskarene. I forsøk 5, i gruppene med lang behandlingstid (1-4 dager), ble vannkvaliteten justert i forsøkskarene der fisken oppholdt seg. Det ble tatt referanseprøver av 10 fisk fra samme fiskegruppe før forsøksstart for å dokumentere at fisken var frisk. Det ble videre tatt prøver av minimum 10 smittede fisk like før behandling (tid før) for å dokumentere AGD-status ved behandlingstidspunktet. Deretter ble det tatt prøver av 10 fisk fra hvert forsøkskar umiddelbart etter behandling (tid 0), etter 24 timer, 7 dager, 14 dager og 21 dager etter behandling, for å dokumentere behandlingseffekt og restitusjon av eventuelle skader som følge av behandlingene. En skjematisk fremstilling av de fem forsøksoppsettene med forsøksbetingelser er presentert i figur 1.



Figur 1. Forsøksoppsett i behandlingsforsøk 1-5. FV=ferskvann, BV= brakkevann og SV=sjøvann med 34 ‰. Alle kontrollgrupper var ubehandlede fisk, smittet med *P. perurans*, og disse ble holdt i sjøvann med 34 ‰ gjennom forsøksperioden.

4.2. Prøvetaking av fisk

Ved alle prøveuttak ble det fortrinnsvis tatt prøver fra 10 tilfeldig valgte fisker fra hvert kar. I forsøk 1 og 5 ble det imidlertid tatt prøver av henholdsvis 30 og 20 fisk før behandling.

Fisken ble avlivet med en overdose bedøvelsesmiddel (Finquel Vet. 1000 mg/g, metacain). Avliving med et slag mot hodet ble unngått fordi dette kan forårsake gjelleblødninger. Fiskens hud og gjeller ble visuelt vurdert med tanke på eventuelle synlige skader fra behandlingene. Makroskopisk gjellescore ble registrert (se 4.2.1.) etter at fisken var målt, veid og tappet for blod. Fisken ble tappet for blod ved punktering av caudal venen, og i forsøk 1, 2 og 4 ble blodkjemiske parametere analysert ved hjelp av i-STAT blodanalysator. I forsøk 2 ble det i tillegg gjort hematokritanalyse ved bruk av hematokritskive. Prøve til real time PCR-analyse (se 4.2.2) ble tatt fra gjellebue nr. 2 på fiskens høyre side. Et areal av gjellen på ca. 0,5 cm² ble kappet ut med skalpell, delt i to, og begge biter ble konserverert på RNA-later (figur 2).



Foto: T. Poppe

Figur 2. Prøvetaking av gjeller til PCR-analyse. Grønne linjer angir området som ble tatt ut til PCR-analyse.

Hele gjellebue nr. 2 på fiskens venstre side ble fiksert på formalin for histologi (se 4.4.3.). Et utvalg av prøver fra forsøk 2, 3 og 5 ble opparbeidet for histopatologiske vurderinger.

Saks, skalpell og pinsett ble sterilisert med etanol (96 %) og gassbrenner før prøvetaking av neste fisk. I forsøk 1 og 5 ble det gjort forsøk på å re-isolere og dyrke *P. perurans* fra gjeller ved forsøkets slutt, 22 dager etter behandling.

4.2.1. Makroskopisk AGD-gjellescore

Makroskopisk gjellescore ble vurdert umiddelbart etter at fisken ble avlivet og tappet for blod. Dette ble gjennomført ved at man vurderte score på alle 16 gjelleflater etter scoreinndelingen beskrevet av Taylor mfl. (2009), der gjellelesjonene graderes etter en skala fra 0-5 (tabell 1).

Tabell 1. Kriterier for makroskopisk AGD-gjellescorevurdering, etter Taylor mfl. 2009

Infection level	Gill score	Gross descripton
Clear 0	0	No sign of infection and healthy red colour
Very light	1	1 white spot, light scarring or undefined necrotic streaking
Light	2	2-3 spots/small mucus patch
Moderate	3	Established thickened mucus patch or spot grouping up to 20% of gill area
Advanced	4	Established lesions covering up to 50% of gill area
Heavy	5	Extensive lesions covering most of the gill surface

I forsøk 1 ble gjellescoreverdien satt/bestemt utfra en vurdering av den mest affiserte gjellebuen hos fisken. Etter behandlingen med H₂O₂ var det imidlertid tydelig at en gjellescoreverdi basert på den mest affiserte gjellebuen ikke ga et godt mål på hvordan gjellescoren fra alle de 16 gjelleflatene (to sider på hver av de 8 gjellebuene) hadde endret seg som følge av behandlingen. Dette fordi fisken i flere tilfeller hadde tilnærmet samme score før og etter behandling, basert på den mest affiserte gjellebuen, mens det helhetlige bildet var at langt flere gjelleflater var rene for lesjoner/patcher etter behandlingen. I forsøk

2-5 ble det derfor foretatt en mer detaljert gjellescoring, der de individuelle scorene for hver av de 16 gjelleflatene ble notert for hvert individ (se figur 3). Gjellescoreverdi som kriterium for når fisken skulle behandles i de ulike forsøkene, ble bestemt basert på den mest affiserte gjellebuen (gjennomsnitt av 10 fisk).

Fisk nr	Dato	Gruppe	Tid	Gjellescore venstre side								Gjellescore høyre side							
				bue 1		bue 2		bue 3		bue 4		bue 1		bue 2		bue 3		bue 4	
				vs	hs	vs	hs	s	hs	vs	hs	hs	vs	hs	vs	hs	vs	hs	
355	25.9.15	12-1200-40	8d	2	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	1	2
356	25.9.15	12-1200-40	8d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
357	25.9.15	12-1200-40	8d	2	2	2	1	2	2	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1
358	25.9.15	12-1200-40	8d	1	0	2	0	1	2	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
359	25.9.15	12-1200-40	8d	0	0	1	1	0	2	1	0	0	1	1	0	2	1	1	1
360	25.9.15	12-1200-40	8d	0	0	2	1	2	2	1	2	1	1	0	1	2	2	0	1
361	25.9.15	12-1200-40	8d	0	0	2	1	1	1	0	2	0	0	1	1	2	1	0	1
362	25.9.15	12-1200-40	8d	1	2	2	1	2	2	2	0	2	0	2	1	2	0	2	0
363	25.9.15	12-1200-40	8d	0	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	0	2	2	1	0
364	25.9.15	12-1200-40	8d	0	0	1	0	1	2	0	1	0	0	0	1	2	2	1	2
325	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	2	2	3	2	3	2	3	1	2	2	2	2	2	1	2
326	25.9.15	12-Kontr.	8d	1	2	1	0	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0
327	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	3	2	3
328	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
329	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	2	1	2	2	1	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2
330	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	2	0	0	2	2	2	2	1	0	2	2	2	2	1	2
331	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	3	2	2	2	3
332	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	2	2	1	0	2	1	2	2	1	2	2	0	2	2	2
333	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2	0	2
334	25.9.15	12-Kontr.	8d	2	2	2	1	2	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2	1

Figur 3. Figur som viser hvordan gjellescore ble notert i forsøk 2-5, her ved tid 8 «dager etter behandling» for en gruppe eksponert for 1200 ppm H₂O₂ ved 12 °C i 40 minutter, og ubehandlet kontrollgruppe ved 12 °C. Gjellebuene på fiskens venstre og høyre side ble nummerert fra 1 til 4. Det ble notert en gjellescore for begge sider/flater (vs og hs) av hver gjellebue. Dette tilsvarer da 160 scoringer for gruppen på 10 fisk.

Denne fremgangsmåten for beregning av gjellescore ga et godt grunnlag for å fange opp forskjeller mellom individer og grupper etter de ulike behandlingene.



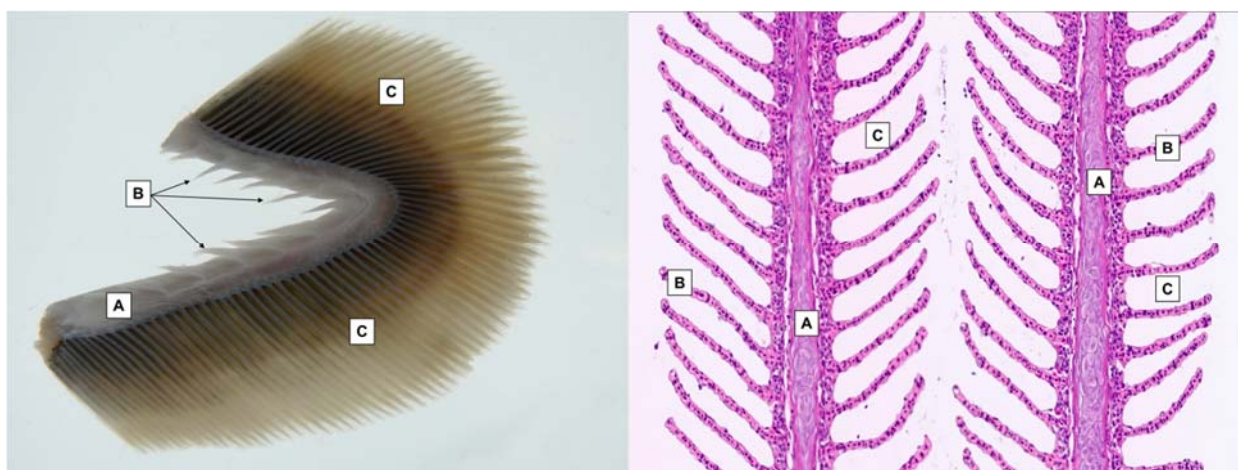
Figur 4. Scoring av gjeller på ILABs laboratorium.

4.2.2. Real-time PCR

DNA ble ekstrahert fra en av de to gjellebitene som var konservert i RNA-later. Ekstraksjonen ble gjort med DNeasy® Tissue Kit protocol (Qiagen) på en QiaCube robot (Qiagen). Påvisning av *P. perurans* på laksegjellene ble gjort ved bruk av et spesifikt real-time-PCR assay (11). Prøver med Ct-verdi høyere enn 40 ble ansett som negative (11).

4.2.3. Gjeller til histologi

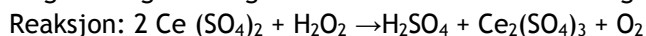
Histopatologiske vurderinger ble gjort på HE-fargede gjellelevssnitt, fremstilt etter standard prosedyrer. Prosentvis andel av gjellefilamenter med vevsforandringer typisk for AGD ble beregnet for hvert preparat, og antall synlige amøber i vevssnittet ble notert. Eventuelle gjelleskader fra behandlingene ble også notert. Se figur 5 for en forklaring av begreper som brukes i denne rapporten.



Figur 5. Til venstre; A: Gjellebuen, B: Gjelligitterstaver, C: Filamenter. Til høyre: HE farget gjellelevssnitt fra en frisk gjelle. A: Filament med brukstaver, B: Lameller og C: Interlamellært rom.

4.2.4. Analyse av H₂O₂-konsentrasjon

Konsentrasjonen av H₂O₂ i behandlingsvannet ble målt ved omvendt titrering med ceriumsulfat og svovelsyre ved start-, midtveis- og ved behandlingens slutt (metode fra Aqua Pharma). Fem ml 2,5M (5N) svovelsyre og 7,5 ml 0,1N (0,1M) Cerium IV sulfat ble blandet i et beger og titrert med behandlingsvann til fargeomslag. En magnetrører ble brukt for omrøring.



Konsentrasjon av hydrogenperoksid (mg/liter) i vannet ble regnet ut fra mengden tilsatt behandlingsvann ved titrering etter følgende formel:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ konsentrasjon (mg/L)} = (7,5 \times 0,1 \times 1000 \times 34) / (2 \times \text{antall ml behandlingsvann})$$

4.2.5. Vannkjemiske analyser

I forsøkene med ferskvannsbehandling ble pH og ledningsevne målt før og etter behandling. Det ble også gjort full vannkjemianalyse av ferskvannet som ble benyttet. Fullkjemianalysene ble utført av Nedre Romerike Vannverk. Tabell 2 viser vannkjemisk sammensetning i ferskvannet i ILABs forsøksavdeling som ble brukt som ferskvannskilde ved behandling i forsøkene.

Tabell 2. Vannkjemisk sammensetning i ferskvannet fra ILABs forsøksdyravdeling.

Vannkjemi ILABs driftsvann			
Parameter	Res	Enhet	+/-
Surhetsgrad	6,7	pH	0,2
Tot Alk	0,06	Mmol/l	0,00
Turb	0,19	FNU	0,1
Ledningsevne	4,9	mS/cm	0,2
Fargetall	8	mg Pt/l	2
Al	89	µg/l	13
Kalsium	0,78	mg/l	0,12
Kobber	<1	µg/l	-
Jern	7	µg/l	1
Magnesium	0,67	mg/l	0,1
Silisium	3,1	mg/l	0,6
Sink	5	µg/l	1
Tot org karbon	1,6	µg/l	0,4

4.2.6. Statistikk

Utviklingen av gjellescore er vist i plot hvor hver fisk med tilhørende gjellescoreverdi (gjennomsnitt av gjellescore på alle 16 gjelleflater) og tid er markert i figurene som et punkt. Regresjon mellom fisker som har vært under samme behandling ble brukt for å vise utviklingen av gjellescore over tid. Regresjonen ble gjort ved bruk av kubisk spline i funksjonen gam i programmeringsspråket R. Prediksjoner fra regresjonene vises som heltrukket linje med 95 % konfidensintervall, vist som stiplet linje.

Det ble i tillegg gjort en t-test som sammenlikner gjennomsnittlig gjellescore mellom fisk fra to forskjellige behandlingsgrupper ved samme tidspunkt. Resultater av t-testene er angitt som p-verdier i teksten der dette er relevant.

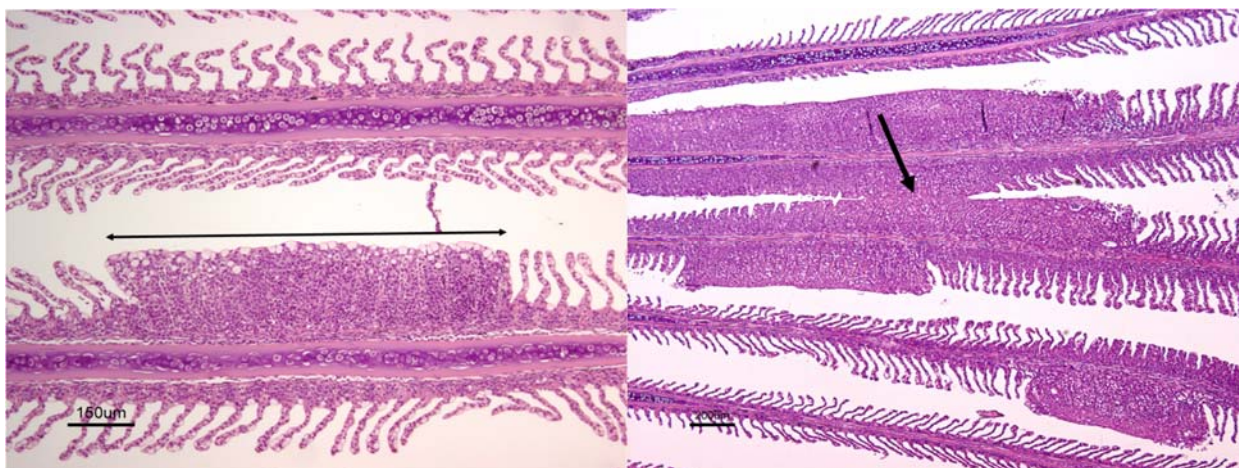
5. Resultater

5.1. AGD-beskrivelse av patologiske endringer i gjeller

Gjellelesjonene som ble observert ved histologiske undersøkelser av fisk fra disse forsøkene var typiske for AGD, og avviker ikke nevneverdig fra det som tidligere er beskrevet (1, 2, 8). Det er mange gjellesykdommer i dagens lakseoppdrett, og flere av sykdommene kan ha fellestrekk. Det er heller ikke uvanlig at det forekommer flere gjellesykdommer samtidig, og da kan det være vanskelig å vurdere årsaksforholdene. Dette forsøket er gjort under kontrollerte forsøksbetingelser der fiskens helsestatus er kjent ved forsøksstart. Dette innebærer at de beskrevne lesjonene er å betrakte som AGD.

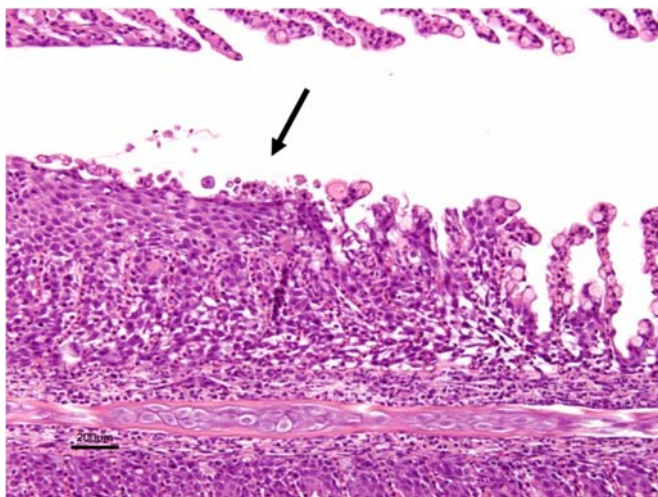
Segmental hyperplasi var typisk for AGD-lesjonene. Dette vil si at lesjonene hadde skarp avgrensning mot normalt eller ikke-affisert vev, både innenfor det enkelte filament og mellom filamenter. Figur 5 viser et godt eksempel på dette. Forandringene består i uttalt hyperplasi av respiratorisk epitel slik at mellomrommet mellom lamellene fylles ut av ikke-funksjonelt vev. Dermed reduseres arealet av gjelleoverflaten som er tilgjengelig for gassutveksling. Lesjonene ble observert over hele gjellebuen, både på enkelte, isolerte filamenter, og på flere nabofilamenter. Et spesielt forhold ved de patologiske forandringer ved AGD er sammenvoksinger mellom filamenter (figur 6). Dette er noe som svært sjelden

sees ved andre gjellesykdommer. Disse forandringene ble kun observert hos fisk i ubehandlede kontrollgrupper, sent i forsøksperioden.



Figur 6. Til venstre: Segmental lesjon (pilens lengde). Bemerk den skarpe overgangen til normale lameller på begge sider. Til høyre: Alvorlige og omfattende segmentale forandringer. Bemerk sammenvoksning også mellom to filamenter (pil).

Amøber var ikke alltid observerbare i snittene i forbindelse med de histologiske lesjonene. Årsakene kan være at de hadde falt av i forbindelse med fiksering av gjellene. I disse forsøkene var det en klar tendens til at amøben hadde forårsaket patologiske forandringer i gjellevevet, uten at amøben var synlig i de histologiske snittene. Amøben var lettest å oppdage på «skulderen» av de hyperplastiske lesjonene (figur 7) og der to affiserte filamenter lå tett inntil hverandre.



Figur 7. Amøber (pil) på overgangen mellom alvorlige hyperplastiske forandringer (til venstre) og mere normalt vev (til høyre).

5.2. Hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved behandling i forsøk 1 og 2

De målte H_2O_2 -konsentrasjonene i forsøk 1, var relativt like som de beregnede konsentrasjonene, unntatt for eksponeringene 1300 og 1500 ppm. Årsaken til dette var en liten forskjell i karutforming sammenlignet med de andre karene, som førte til en underestimering av vannvolumet. I disse to gruppene ble det målt ca. 100 ppm høyere H_2O_2 -konsentrasjon enn det som var beregnet (tabell 3). Resultatene viser også at H_2O_2 -konsentrasjonene ved behandlingens slutt var relativt like som ved behandlingsstart, og at H_2O_2 -konsentrasjonen dermed ikke ble vesentlig redusert under behandlingen.

Tabell 3. Beregnede og målte H₂O₂-konsentrasjoner i forsøk 1. Målingen ved behandlings start ble gjort 2 minutter etter tilsetning av H₂O₂-løsningen og målingen ved behandlingens slutt ble gjort 2 minutter før avsluttet behandling.

Gruppe	Beregnet H ₂ O ₂ -kons (ppm)	Målt H ₂ O ₂ -kons (ppm) ved start-slutt
Kontroll	0	0
900 ppm/20 min	900	917 - 944
1100 ppm/20 min	1100	1170 - 1138
1300 ppm/20 min	1300	1417 - 1417
1500 ppm/20 min	1500	1594 - 1614
600 ppm/40 min	600	631 - 610
900 ppm/40 min	900	911 - 904
1100 ppm/40 min	1100	1128 - 1081
600 ppm/60 min*	400	421 - 402
900 ppm/60 min**	Utgikk	Utgikk

*Planlagt dose på 600 ppm/60 min ble endret til 400 ppm/60 min på grunn av observert dødelighet i gruppen eksponert for 600 ppm/40 min. ** Gruppen 900 ppm/60 min utgikk pga. høy dødelighet i gruppen 900 ppm/40 min.

Analyser av H₂O₂-konsentrasjonen i vannet under forsøk 2 viste at de målte H₂O₂-konsentrasjonene var svært like de beregnede H₂O₂-konsentrasjonene (tabell 4). Som i forsøk 1, var det ingen betydelig reduksjon i H₂O₂-konsentrasjonene gjennom eksponeringsperiodene.

Tabell 4. Beregnede og målte H₂O₂-konsentrasjoner i forsøk 2. Målingen ved behandlingsstart ble gjort 2 minutter etter tilsetning av H₂O₂-løsningen og målingen ved behandlingens slutt ble gjort 2 minutter før avsluttet behandling.

Gruppe	Beregnet H ₂ O ₂ -kons (ppm)	Målt H ₂ O ₂ -kons (ppm) ved start og slutt
8 °C - Kontroll	0	0
8 °C - 1200 ppm - 30 min	1200	1214 - 1181
8 °C - 1800 ppm - 30 min	1800	1796 - 1771
12 °C - Kontroll	0	0
12 °C - 900 ppm - 40 min	900	891 - 867
12 °C - 1200 ppm - 40 min	1200	1191 - 1128
12 °C - 1500 ppm - 20 min	1500	1555 - 1449
16 °C - Kontroll	0	0
16 °C - 600 ppm - 60 min	600	601 - 590
16 °C - 900 ppm - 40 min	900	904 - 879

5.3. Vannkjemi i ferskvannet som ble brukt i behandlingene

pH i ferskvannet som ble brukt til behandling lå rundt 7,0. Ved tilsetning av fisk sank pH til 6,5-6,6, trolig som følge av CO₂-utskillelse fra fisken. Det ble observert en økning i ledningsevne fra ca. 50 µS/cm til 600-1150 µS/cm etter tilsetning av fisk. Økningen i ledningsevne skyldes trolig små mengder sjøvann som fulgte med fisken ved håving fra sjøvann til ferskvann. pH økte fra 7,0 til 8,3 og fra 7,0 til 7,7 ved henholdsvis 10 °C og 16 °C etter tilsetning av 1,0 g CaCO₃/100L. pH i behandlingsvannet ble redusert fra 8,3 til 7,1 ved behandling av fisk i 3 timer ved 10 °C og fra 7,7 til 6,8 ved behandling av fisk i 3 timer ved 16 °C (se tabell 5 og 6).

Tabell 5. pH og ledningsevne i ferskvannet som ble brukt til behandling i forsøk 4, før, under og etter behandlingen ved 16 °C.

Tid	FV + CaCO ₃ 3 timer		FV 1 time		FV 2 timer		FV 3 timer	
	pH	µS/cm	pH	µS/cm	pH	µS/cm	pH	µS/cm
Før CaCO ₃	7,0	45,8	7,0	45	6,9	45	6,9	46,8
Etter CaCO ₃	7,7	56,7						
30 min behandling			6,3	683				
1 time behandling	6,6	650	6,4	1149	6,3	616	6,5	652
2 timer behandling	6,8	686			6,4	1036	6,8	681
3 timer behandling	6,8	705					6,8	702

Tabell 6. pH og ledningsevne i ferskvannet som ble brukt til behandling i forsøk 4, før, under og etter behandlingen ved 10 °C.

Tid	FV + CaCO ₃ 3 timer		FV 1 time		FV 2 timer		FV 3 timer	
	pH	µS/cm	pH	µS/cm	pH	µS/cm	pH	µS/cm
Før CaCO ₃	7,0	50	7,0	50	7,0	50	6,9	50,3
Etter CaCO ₃	8,3	65						
30 min behandling			6,5	602				
1 time behandling	6,8	717	6,6	600	6,6	534	6,6	857
2 timer behandling	6,9	734			6,6	560	6,8	882
3 timer behandling	7,1	747					7,0	910

Kalsium økte fra 0,78 mg/L til 4,0 mg/L ved tilsetning av 10 gram CaCO₃/m³. Tilsetningen av CaCO₃ ga også en økning i vannets totale alkalitet (se tabell 7A og B). pH- og ledningsevneøkningen som ble målt i totalkjemianalysen var i samsvar med den som ble målt ved ILABs forsøksavdeling under forsøkene.

Tabell 7. A) Vannkjemi i ferskvannet fra ILABs forsøksdyravdeling. B) Vannkjemi fra ferskvannet i ILABs forsøksdyravdeling tilsatt 1,0 g CaCO₃/100L.

A	Vannkjemi ILABs driftsvann		
Parameter	Res	Enhet	+/-
Surhetsgrad	6,7	pH	0,2
Tot Alk	0,06	mmol/l	0,00
Turb	0,19	FNU	0,1
Ledningsevne	4,9	mS/cm	0,2
Fargetall	8	mg Pt/l	2
Al	89	µg/l	13
Kalsium	0,78	mg/l	0,12
Kobber	<1	µg/l	-
Jern	7	µg/l	1
Magnesium	0,67	mg/l	0,1
Silisium	3,1	mg/l	0,6
Sink	5	µg/l	1
Tot org karbon	1,6	µg/l	0,4

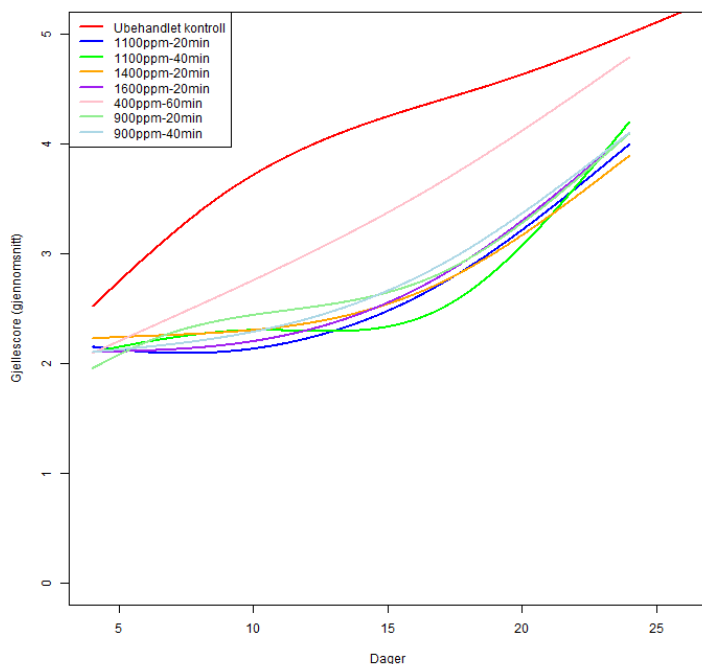
B	Vannkjemi ILABs driftsvann		
Parameter	Res	Enhet	+/-
Surhetsgrad	7,5	pH	0,2
Tot Alk	0,22	mmol/l	0,01
Turb	0,27	FNU	0,1
Ledningsevne	6,2	mS/cm	0,3
Fargetall	8	mg Pt/l	2
Al	89	µg/l	13
Kalsium	4,00	mg/l	0,6
Kobber	2	µg/l	1
Jern	10	µg/l	1
Magnesium	0,62	mg/l	0,1
Silisium	3,4	mg/l	0,7
Sink	5	µg/l	1
Tot org karbon	2,1	µg/l	0,5

5.4. Effekt av behandling på AGD

Alle behandlinger med H₂O₂ og ferskvann/brakkvann i denne studien hadde en reduserende effekt på AGD, sammenlignet med ubehandlede kontrollgrupper.

5.4.1. Forsøk 1: Ulike H₂O₂-konsentrasjoner - gjellescore

Det var små forskjeller i effekt på makroskopisk gjellescore ved eksponering for ulike H₂O₂-doser i forsøk 1, og gjellescore utviklet seg relativt likt etter behandling uavhengig av H₂O₂-dose (figur 8). Det var kun ved den laveste H₂O₂-dosen, 400 ppm H₂O₂ i 60 minutter, at gjellescore utviklet seg forskjellig fra de andre H₂O₂-dosene etter behandling, og da med en mindre reduserende effekt på gjellescoren (figur 8).



Figur 8. Utvikling i gjellescore (gjennomsnitt av den mest affiserte buen) fra tid før behandling til tid 21 dager etter behandling med H₂O₂. N=30 i det første prøveuttaket, mens n=10 i de påfølgende prøveuttakene.

I prøveuttaket før behandling var gjennomsnittlig gjellescore 1,93, og de fleste gjellebuene hos enkeltfisk var affiserte. Etter behandlingen ble det registrert flere gjellebuer uten hvite flekker. Det ble også observert at slimdannelse var redusert. Det var imidlertid fortsatt flere gjellebuer med gjellescore på ca. 2, og gjellescore ble derfor vurdert til å være tilnærmet lik som før behandling. I etterkant av forsøk 1 ble det konkludert med at denne scoringsmetoden ikke hadde fanget opp endringene i gjellescore etter behandling på en tilfredsstillende måte, og beregning av gjellescoreverdi ble gjort på en annen måte fra og med forsøk 2 (beskrevet i materialer og metodekapittelet).

5.4.2. Forsøk 1: Ulike H₂O₂-doser - PCR

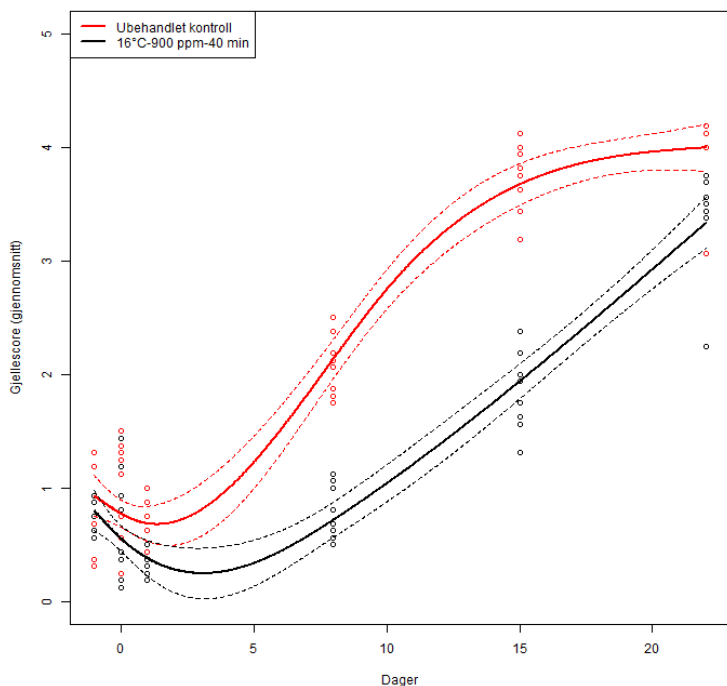
I prøveuttaket like før behandling var 28 av 30 fisker PCR-positive for *P. perurans*. Behandlingene med H₂O₂ reduserte andelen PCR-positive fisk, og prevalensen varierte fra 30 % til 90 % mellom de eksponerte gruppene (24 timer og tre dager etter behandling). Allerede syv dager etter H₂O₂-behandlingen var prevalensen 100 % i de fleste gruppene. Dette betyr at alle behandlingsdosene hadde en initiell reduserende effekt på forekomsten av amøber på gjellene, men at gjenlevende amøber prolifererte og førte til en økt amøbeforekomst på gjellene i perioden fra 3-21 dager etter behandling.

Det lyktes å re-isolere amøber fra gjellene til laks i alle de behandlede gruppene. Re-isoleringen bekreftet at amøber hadde overlevd behandlingene.

5.4.3. Forsøk 2: Ulike H₂O₂-doser ved forskjellige vanntemperaturer - gjellescore

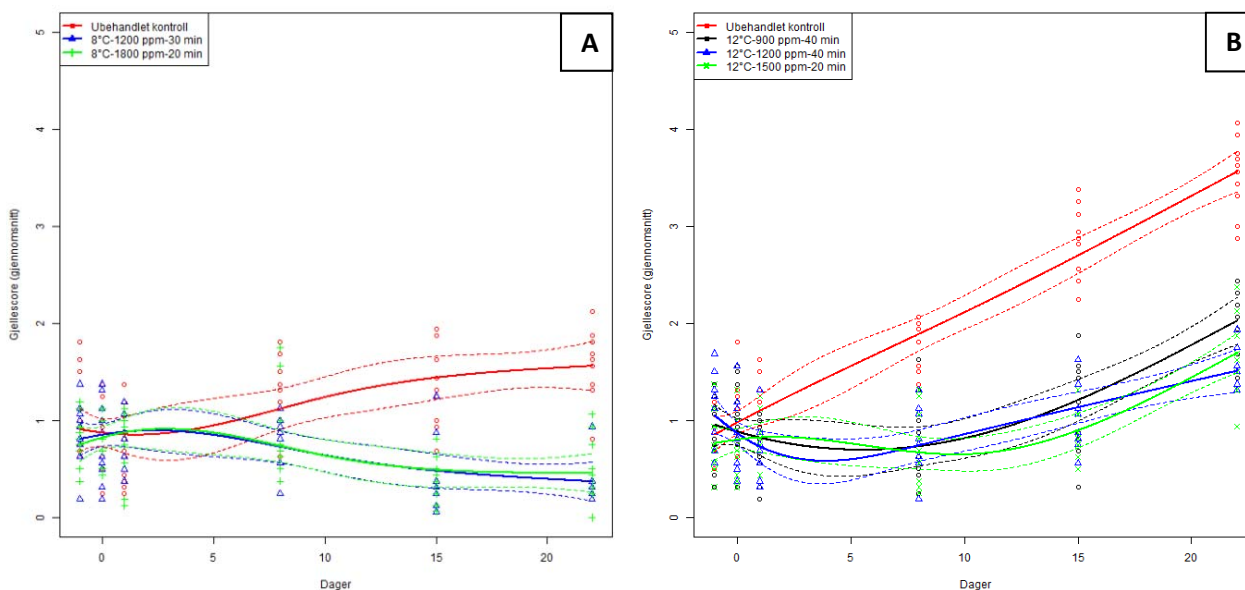
I forsøk 2 var det som i forsøk 1 små forskjeller i effekt ved behandling med ulike H₂O₂-doser innenfor samme temperatur. Ved behandling på 8 °C var det ikke signifikant forskjell i gjellescore ved noen av prøveuttakene mellom gruppene som ble behandlet med 1200 ppm H₂O₂ i 30 minutter og 1800 ppm H₂O₂ i 20 minutter. Det var imidlertid signifikant lavere gjellescore i begge de behandlede gruppene sammenlignet med kontrollgruppen ($p < 0,01$). I gruppene som ble behandlet ved 12 °C var det ikke signifikante forskjeller i gjellescore før ved siste prøveuttak, 21 dager etter behandling, men da var gjellescore signifikant lavere i gruppen 1200 ppm, 40 minutter sammenlignet med 900 ppm i 40 minutter ($p < 0,01$). Gjellescore i gruppen som ble behandlet med 1500 ppm i 20 minutter var imidlertid ikke signifikant forskjellig fra scorene i de to andre behandlingsgruppene ($p < 0,01$). Resultatene gir støtte til observasjonene i forsøk 1, nemlig at behandlingseffekten ikke er direkte doseavhengig.

Gjellescore utviklet seg svært forskjellig etter behandling med H₂O₂ ved 8 °C, 12 °C og 16 °C (figur 9 og 10). Etter behandling ved 16 °C var det en initiell reduksjon i gjellescore, men fra og med 7 dager etter behandling utviklet gjellescore seg raskt (figur 9).



Figur 9. Gjellescoreutvikling etter behandling med H₂O₂ ved 16 °C. Hvert punkt i figuren (○,○) representerer gjellescoreverdien fra én fisk. Hvert punkt i figurene (○, ○) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

Etter behandling ved 8 °C var det ingen gjellescoreutvikling de tre første dagene etter behandling, og deretter en reduksjon i gjellescore sammenlignet med før behandling (figur 10A). Etter behandling ved 12 °C var det en økning i gjellescore, og ved 21 dager etter behandling var gjellescore høyere enn ved prøveuttaket før behandling i denne gruppen (figur 10B).

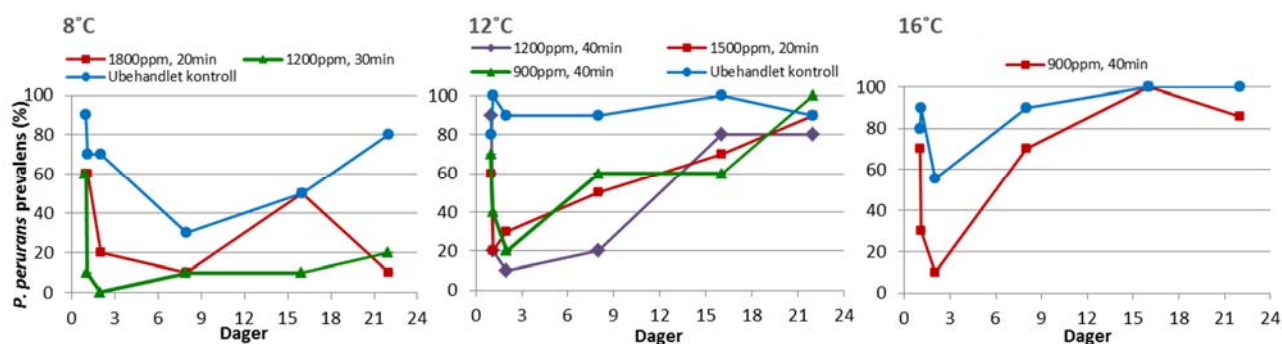


Figur 10. A: Gjellescoreutvikling etter behandling med H₂O₂ ved 8 °C. B: Gjellescoreutvikling etter behandling med H₂O₂ ved 12 °C. Hvert punkt i figurene (○, Δ, x) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

I kontrollgruppene ved 8 °C og 16 °C ble det registrert en liten nedgang i gjellescore rundt behandlingstidspunktene (figur 9 og 10A). Det kan være flere årsaker til dette, som for eksempel små individuelle forskjeller i scoring fra gang til gang hos personen som utfører analysen, eller naturlige individvariasjoner innenfor gruppene på 10 fisk i hvert prøveuttak. Det tre første prøveuttakene ble gjennomført innenfor et tidsrom på tre dager.

5.4.4. Forsøk 2: Ulike H₂O₂-doser ved forskjellige vanntemperaturer - PCR

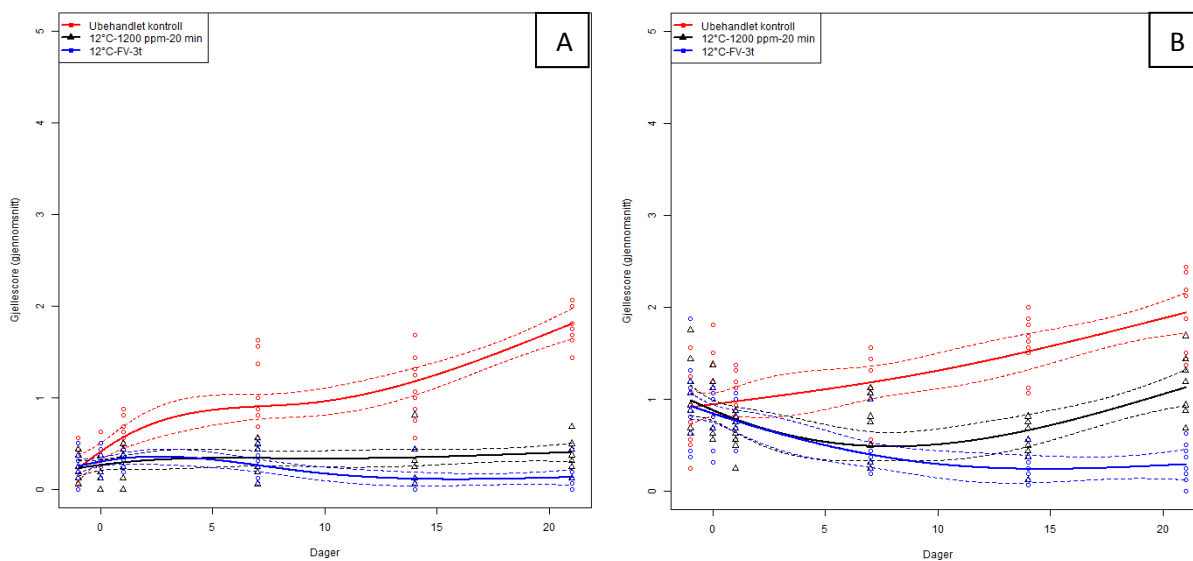
Behandlingene reduserte prevalensen av *P. perurans* ved alle vanntemperaturene (figur 11). PCR-dataene viser at amøber overlevde behandlingen, da andelen fisk som var positive for amøber økte i forsøksgruppene over 21-dagersperioden etter behandling, særlig ved de to høyeste temperaturene (12 °C og 16 °C). Ved 8 °C var imidlertid prevalensen lav gjennom hele 21-dagersperioden etter behandling, og kun en av ti, og to av ti fisk var PCR-positive ved siste prøveuttak etter eksponering for henholdsvis 1800 ppm H₂O₂ i 20 minutter og 1200 ppm H₂O₂ i 30 minutter (figur 11). Basert på *P. perurans*-prevalens etter behandling kan det se ut til at behandling med 900 ppm H₂O₂ i 40 minutter har tilnærmete lik effekt ved 12 °C og 16 °C grader.



Figur 11. Utvikling i prevalens for *P. perurans* etter H₂O₂-behandling ved vanntemperatur 8 °C (figur til venstre), 12 °C (figur i midten) og 16 °C (figur til høyre).

5.4.5. Forsøk 3: Effekt av H₂O₂- og ferskvannsbehandling ved ulik gjellescore - gjellescore

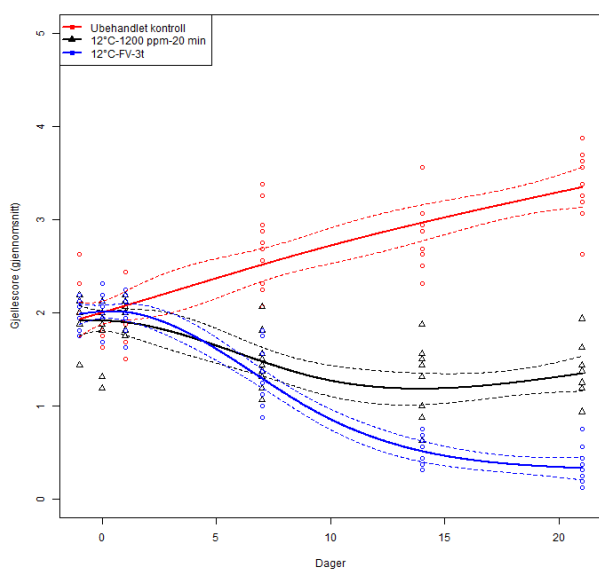
Etter behandling med ferskvann i tre timer, og med 1200 ppm H₂O₂ i 20 minutter, ved gjellescore 1 (gjennomsnitt basert på den mest affiserte gjellebuen), holdt gjellescoren seg stabilt lav i begge grupper over en periode på 21-dager etter eksponering (figur 12A). Det var imidlertid en liten økning i gjellescore i gruppen som ble eksponert for H₂O₂, 21 dager etter behandling sammenlignet med før behandling, mens det var lavere gjennomsnittlig gjellescore i ferskvanngruppen 21 dager etter behandling sammenlignet med før behandlingen. Det var signifikant lavere gjellescore i ferskvannsgruppen sammenlignet med H₂O₂-gruppen 14 og 21 dager etter behandling ($p < 0,01$ ved begge tider).



Figur 12. A: Gjellescoreutvikling etter behandling med H_2O_2 , 20 min og ferskvann i tre timer ved gjellescore 1. B: Gjellescoreutvikling etter behandling med H_2O_2 , 20 min og ferskvann i tre timer ved gjellescore 2. Hvert punkt i figurene (\circ , \circ , Δ) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

Behandling med ferskvann i tre timer og med 1200 ppm H_2O_2 i 20 minutter ved gjellescore 2, ga en initiell reduksjon i gjellescore ved begge behandlingene (figur 12B). Gjellescore utviklet seg imidlertid forskjellig i de to behandlingsgruppene over en periode på 21 dager, og det var en signifikant bedre reduserende effekt ved ferskvannsbehandling sammenlignet med H_2O_2 -behandling (figur 12B). Det var en betydelig raskere utvikling av gjellescore mellom prøveuttakene 7 dager og 21 dager etter behandling med H_2O_2 ved score 2, sammenlignet med etter tilsvarende behandling ved score 1.

Ved behandling med ferskvann i tre timer og med H_2O_2 , 1200 ppm i 20 minutter ved gjellescore 3, viser resultatene en tilsvarende utvikling som ved behandling på gjellescore 2. Det var en initiell reduksjon i gjellescore etter begge behandlingene, og det var en tendens til økning i gjellescore mellom tid 14 dager og tid 21 dager i H_2O_2 -gruppen (figur 13). Gjellescoreutviklingen i gruppen eksponert for ferskvann var imidlertid avtagende gjennom hele forsøket, og det var en signifikant bedre reduserende effekt ved ferskvannsbehandling sammenlignet med ved H_2O_2 -behandling ($p < 0,01$).

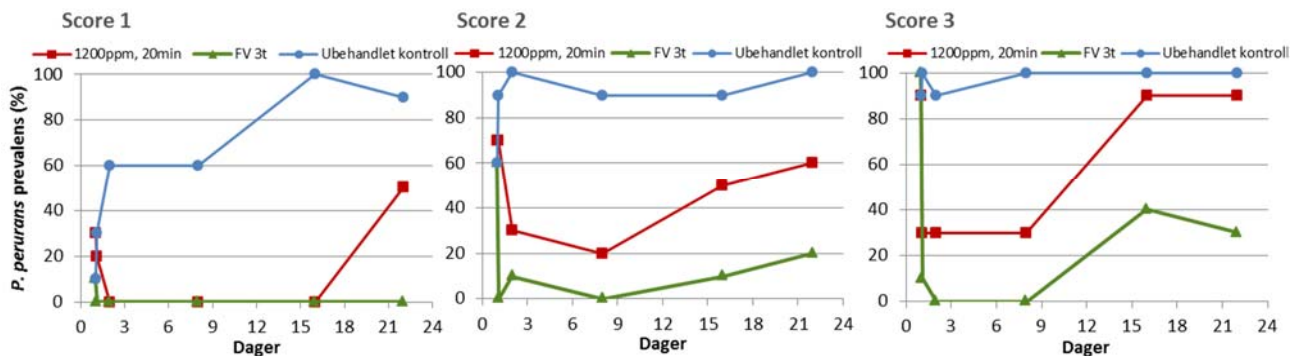


Figur 13. Gjellescore like før- og ved utvalgte tider etter behandling med 1200 ppm H_2O_2 , 20 min og ferskvann i tre timer ved gjellescore 3. Hvert punkt i figurene (\circ , \circ , Δ) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

5.4.6. Forsøk 3: Effekt av H₂O₂- og ferskvannsbehandling ved ulike gjellescore - PCR

Behandlingene ved gjellescore 2 og 3 førte til en reduksjon i prevalens av *P. perurans*, og det var ferskvannsbehandlingen som hadde den beste reduserende effekten (figur 14). Resultatene viser at amøber overlevde behandlingene ved score 2 og 3 og det var en økning i andel PCR-positive fisk utover i forsøksperioden (figur 14). Utviklingen i amøbeinfeksjon samsvarer godt med gjellescoreutviklingen (se figur 12B og 13).

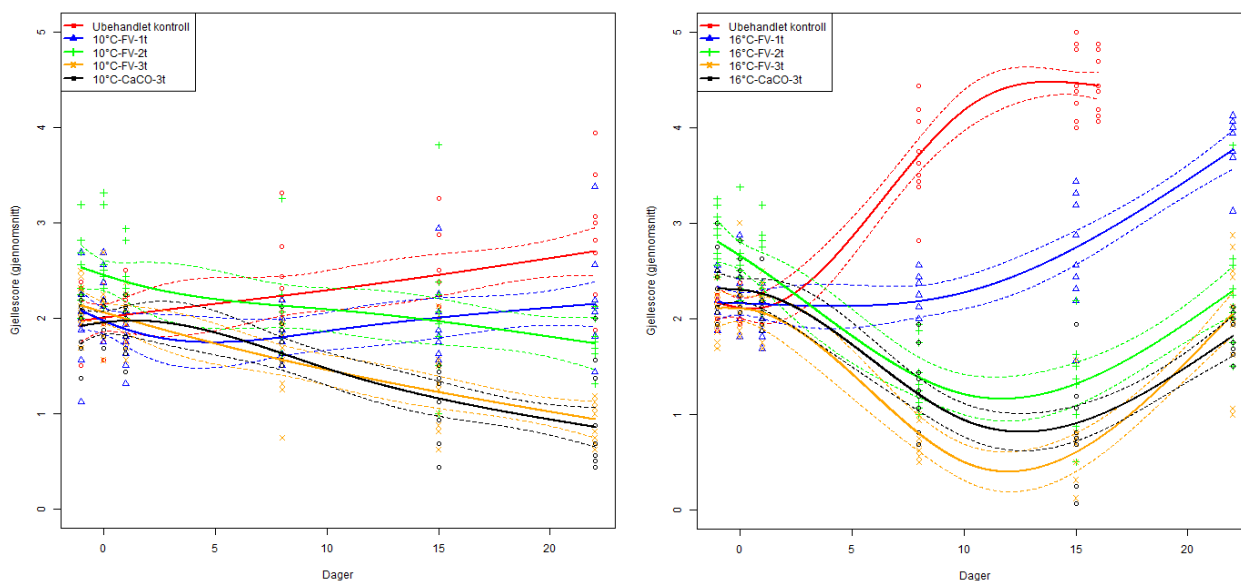
I behandlingene ved gjellescore 1 var andelen infiserte fisk lav ved behandlingstidspunktet, henholdsvis 2/10 fisk i H₂O₂-gruppen og 1/10 fisk i ferskvannsgruppen. Her reduserte behandlingen prevalensen slik at all fisk i ferskvannsgruppen var negativ for *P. perurans* i de resterende prøveuttakene, mens det ble påvist amøber på fisken ved prøveuttak 21 dager etter behandling i H₂O₂-gruppen. Da var 5/10 fisk positive for *P. perurans* (figur 14).



Figur 14. Utvikling i prevalens for *P. perurans* etter behandling med ferskvann i tre timer (FV 3t) og med H₂O₂, 1200 ppm i 20 minutter (1200ppm, 20min) ved gjellescore 1 (figur til venstre), 2 (figur i midten) og 3 (figur til høyre).

5.4.7. Forsøk 4: Effekt av ferskvannsbehandling med forskjellig varighet og ionestyrke - gjellescore

Behandling med ferskvann i en time ga vesentlig mindre reduserende effekt på gjellescore enn det som var tilfellet ved behandling i to timer og tre timer ved 10 °C og 16 °C (figur 15). Ferskvannsbehandling i to timer ga tilnærmet like god reduserende effekt på gjellescore som tre-timers behandling. Scoren lå imidlertid litt høyere gjennom hele forsøket i to-timers gruppen, også ved tid før behandling. Tilsetningen av CaCO₃ hadde ingen signifikant reduserende effekt på utvikling av gjellescore etter behandling, sammenlignet med eksponering for ferskvann uten CaCO₃-tilsetning. Dette var tilfellet ved både 10 °C og 16 °C (p = 0,77, og P=0,41 ved tid 21 dager etter behandling).



Figur 15. Gjellescoreutvikling etter behandling med ferskvann i 1, 2 og 3 timer og med ferskvann tilsatt CaCO_3 ved 10 °C (til venstre). Gjellescoreutvikling etter behandling med ferskvann i 1, 2 og 3 timer og med ferskvann tilsatt CaCO_3 ved 16 °C (til høyre). Hvert punkt i figurene (○, Δ, +) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

Det var stor forskjell i gjellescoreutvikling i kontrollgruppene ved 10 °C og 16 °C, og gjellescore økte raskest ved 16 °C, som forventet. Etter behandling, ved begge vanntemperaturer, var det en initiell reduksjon i gjellescore ved to- og tre-timers behandlingene. Mot slutten av forsøksperioden utviklet gjellescore seg forskjellig ved de to temperaturer, og det var en økning i score ved 16 °C, mens scoren var synkende i 10 °C-gruppene ved tid 21 dager etter behandling.

5.4.8. Forsøk 4: Effekt av ferskvannsbehandling med forskjellig varighet og ionestyrke - PCR

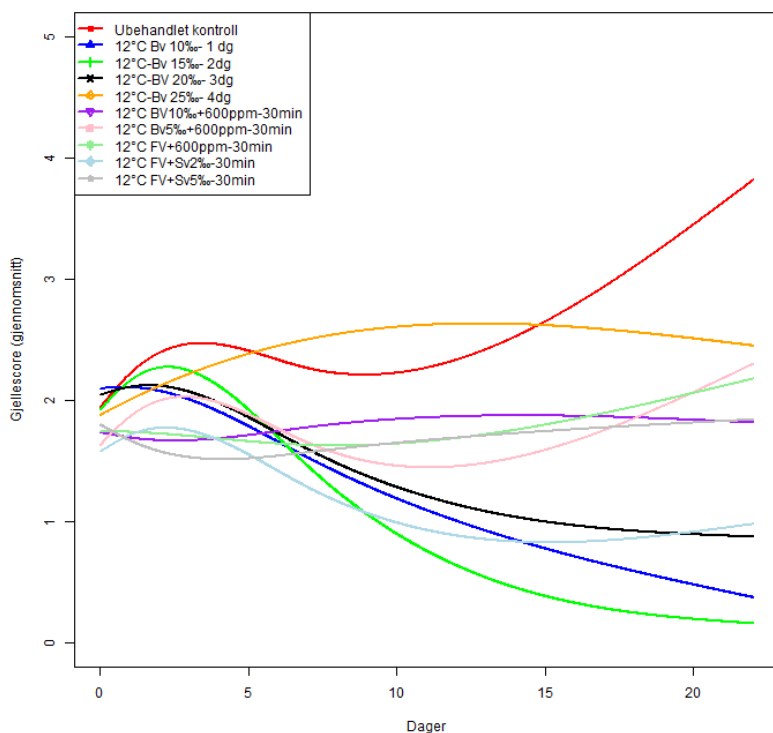
I forsøket med ferskvann ved 10 °C var det best reduserende effekt på prevalensen av *P. perurans* i gruppen som ble eksponert for ferskvann uten tilsatt CaCO_3 . Her ble prevalensen redusert til 0 like etter behandling. Amøben ble ikke påvist i denne gruppen i perioden på 22 dager etter behandling, bortsett fra på én av ti fisk ved tid 15 dager. Ved de øvrige behandlingene ved 10 °C ble amøben påvist ved alle prøveuttakene. Relativt stor variasjon i infeksjonsforløp gjennom forsøksperioden gjør det vanskelig å tolke om det var forskjeller i effekt på amøben mellom en-timers og to-timers behandling med ferskvann, og tre-timersbehandling med ferskvann tilsatt slurry ved 10 °C. Det var også noe variasjon i antall PCR-positive kontrollfisk ved 10 °C.

I forsøket med ferskvann ved 16 °C var begge tre-timersgruppene PCR-negative for *P. perurans* like etter behandling. Behandlingene hadde også reduserende effekt på prevalens i to-timersgruppen, der kun tre av ti fisk var PCR-positive like etter eksponering. I motsetning til ved 10 °C, økte prevalensen for *P. perurans* i alle behandlingsgruppene ved 16 °C gjennom forsøksperioden.

5.4.9. Forsøk 5: Effekt av brakkvann, lang behandlingstid og ferskvann tilsatt H_2O_2 - gjellescore

Alle behandlingene med brakkvann og med ferskvann/brakkvann tilsatt H_2O_2 reduserte gjellescore sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det var imidlertid stor variasjon i behandlingseffekt målt som reduksjon i gjellescore, fra svakest reduserende effekt ved behandling med brakkvann 25 ‰ i fire dager, til størst effekt ved behandling med brakkvann 15 ‰ i to dager (figur 16). Ved behandling med brakkvann 15 ‰ i to dager og brakkvann 10 ‰ i 24 timer ble gjellescore redusert fra 2,4 ved behandlingstidspunktet til hhv 0,35 og 0,75 i løpet av 21 dager. Ved forsøkets slutt var gjellescore fortsatt synkende i begge disse gruppene (figur 16). Behandlingene med brakkvann, 5 ‰, og 10 ‰, begge tilsatt 600 ppm H_2O_2 i 30 min, og behandling med ferskvann tilsatt 600 ppm H_2O_2 i 30 minutter, ga tilnærmet lik effekt på

gjellescoreutvikling. Behandling i tre timer med ferskvann og 2 ‰ sjøvannsinnblanding ga relativt god reduserende effekt på gjellescore, tilsvarende den som ble observert for rent ferskvann i forsøk 3 og 4 (se figur 11, 12 og 14). Ved innblanding av 5 ‰ sjøvann ble behandlingseffektene noe redusert sammenlignet med ved 2 ‰ sjøvannsinnblanding.



Figur 16. Gjellescoreutvikling etter behandling med forskjellige konsentrasjoner av brakkvann, brakkvann og H₂O₂, ferskvann og H₂O₂ ved ulike eksponeringstider.

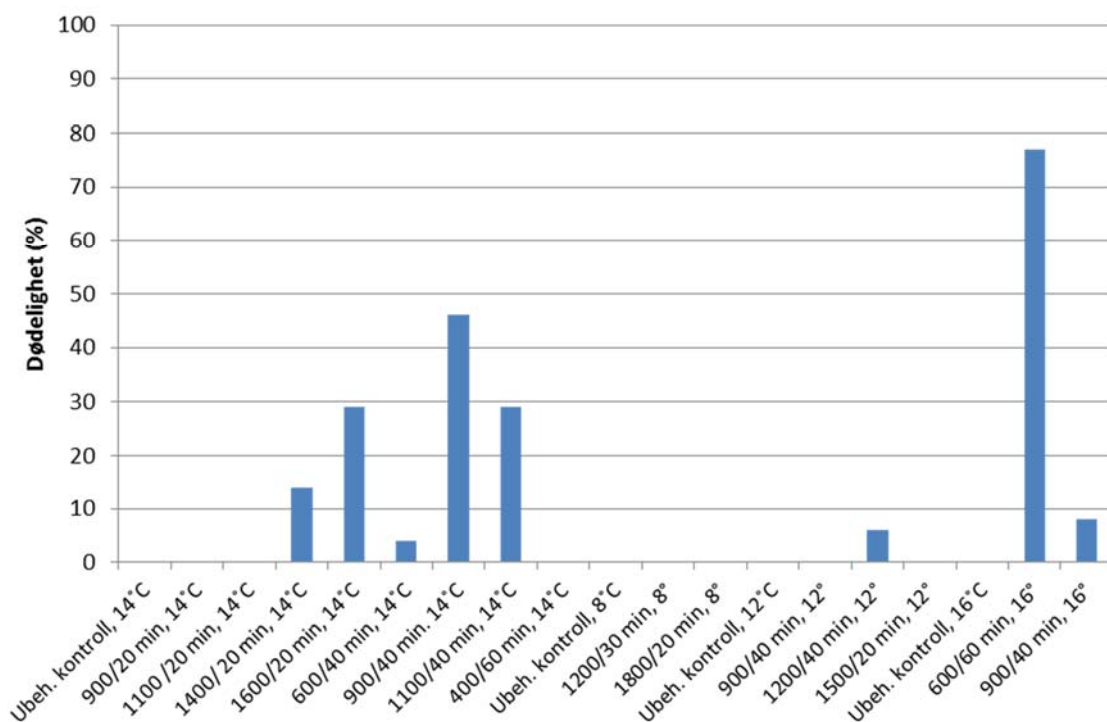
5.4.10 Forsøk 5: Effekt av brakkvann, lang behandlingstid og ferskvann tilsatt H₂O₂ - PCR

Prevalensen for *P. perurans* ble redusert i alle behandlingsgruppene, og reduksjonen i prevalens varierte fra 20 % i gruppen eksponert for brakkvann 25 ‰ i fire dager, til 100 % i gruppen eksponert for brakkvann 15 ‰ i to dager.

Det lyktes å re-isolere amøber fra gjellene til laks i de fleste behandlede gruppene, bortsett fra i gruppene eksponert for brakkvann 10 ‰ 24 timer og i brakkvann 15 ‰ to dager. De to gruppene, der amøben ikke lot seg re-isolere, var også de to gruppene med lavest prevalens for *P. perurans* og størst reduksjon i gjellescore etter behandling.

5.5. Effekter på fisk

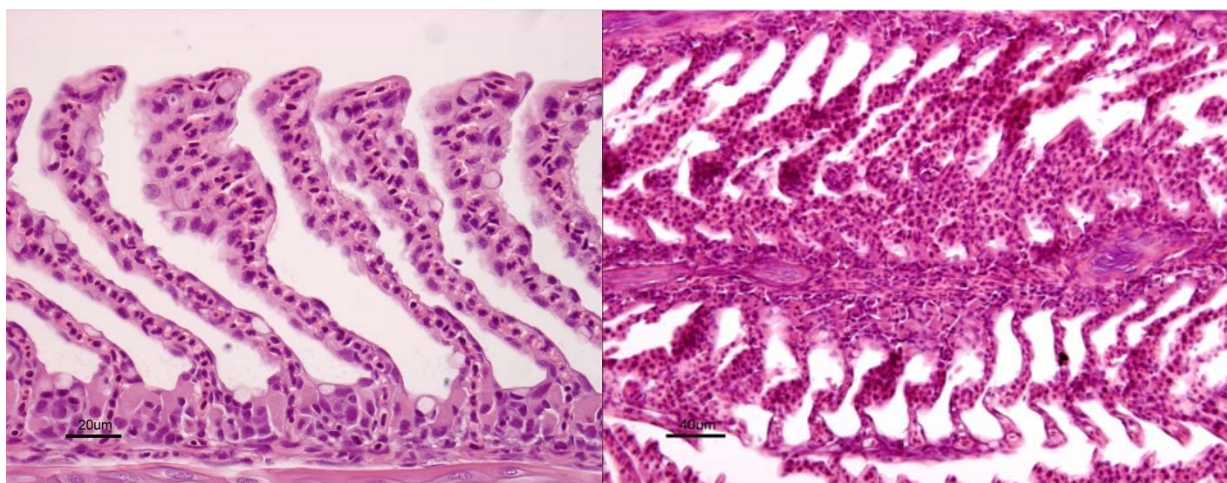
Ved flere av H₂O₂-behandlingene ble det observert negative effekter på fisken i form av atferdsendringer, gjelleblødninger og dødelighet. All observert dødelighet var akutt, det vil si at den ble registrert under eller umiddelbart etter behandlingene. Det var en klar sammenheng mellom behandlingstid, vanntemperatur og dødelighet. Behandling ved 14 °C og 16 °C ga dødelighet, selv ved så lave H₂O₂-konsentrasjoner som 600 ppm i 40 minutter (figur 17). Det døde også fisk ved behandling med 1200 ppm i 40 minutter ved 12 °C, mens det ikke ble observert dødelighet ved 1500 ppm i 20 minutter ved samme temperatur. Ved 8 °C ble det ikke observert dødelighet ved behandling med 1200 ppm i 30 minutter eller med 1800 ppm i 20 minutter (figur 17).



Figur 17. Total dødelighet ved behandling med forskjellige H₂O₂-doser og vanntemperaturer i forsøk 1 og 2.

Det ble også registrert negative effekter av H₂O₂-behandlingene i enkelte av forsøksgruppene der det ikke var dødelighet. Her ble det observert atferdsendringer der fisken gikk fra å være aktiv med normal fluktkrespons til å være passiv uten å vise tegn til fluktkrespons. Det ble også observert fargeendringer i fiskens hud, fra lysegrå til mørkeblå områder, særlig på ryggen. I prøveuttaket like etter behandling ble det observert gjelleblødninger hos fisk i flere av gruppene som var eksponert for H₂O₂.

Histopatologiske vurderinger av fargede gjelleevvsnitt bekreftet gjelleblødninger i flere av de H₂O₂-eksponerte gruppene etter behandling. Blødningene varierte fra aneurismer (små punktformede blødninger) ytterst på lamellene, til mer diffuse blødninger som omfatter større deler av filamentet. Det ble også påvist skader med trombedannelse på kapillærene i lamellene. I en del tilfeller ble det registrert hyperemi, dvs. forøkt blodtilstrømning til lamellene og dilatering (utvidelse) av karene ytterst på lamellene (figur 18).



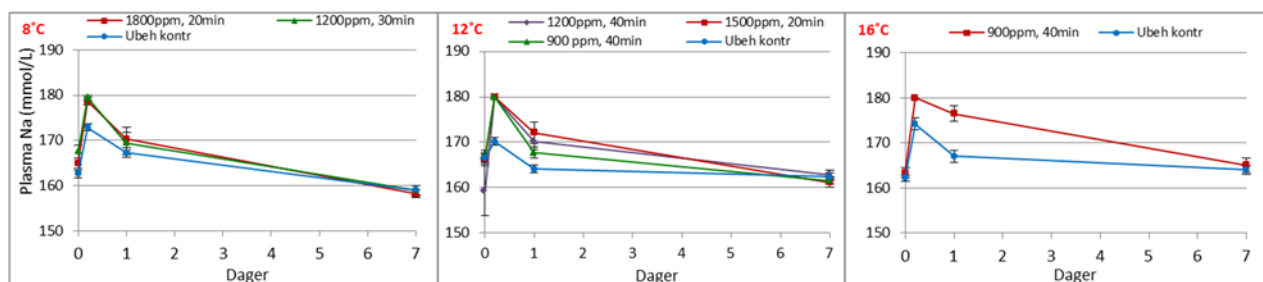
Figur 18. Bildet til venstre viser hyperemi, mens bildet til høyre viser lamellære blødninger etter H₂O₂ behandling.

Under arbeidet med å vurdere de histologiske snittene ble det gjort forsøk på å utarbeide en «histoscore» for å kunne presentere histologiske vurderinger med numeriske verdier. Dette ble imidlertid ikke gjort på grunn av stor variasjon i andelen synlige gjellefilamenter mellom preparatene, og på grunn av kvalitetsforskjeller mellom snitten innenfor de ulike gruppene. I tillegg var det stor variasjon i histopatologiske forandringer forenlige med AGD mellom enkeltindivider. Resultatene fremstilles derfor som beskrivelse av observasjoner og ikke som numeriske verdier.

Det var godt samsvar mellom observasjonene i de histologiske snittene, og resultatene fra de andre analysemetodene (gjellescore og PCR). Som eksempel kan det nevnes at det ikke ble observert AGD-patologi ved siste prøveuttak i forsøksgruppen som ble behandlet med ferskvann i 3 timer i forsøk 3. I denne gruppen var også makroskopisk gjellescore avtagende gjennom hele forsøksperioden etter behandlingen. Lignende observasjoner ble gjort i de histologiske snittene fra gruppene som ble behandlet med brakkevann ved 10 ‰ og 15 ‰ i henholdsvis 24 og 48 timer. I begge grupper var snittene negative for lesjoner allerede syv dager etter behandling. Histologireultatene bekrefter dermed den reduserende effekten av behandlingen som ble observert i form av avtagende gjellescore.

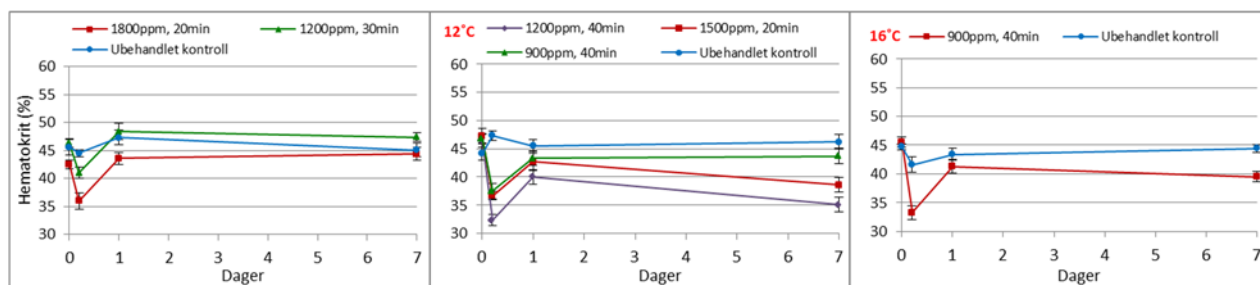
De histopatologiske vurderingen viser også at de AGD-relaterte skadene i gjellene (som segmental hyperplasi) kan restitueres raskt når fisken gjennomgår en behandling med god reduserende effekt på makroskopisk gjellescore. I noen av de undersøkte gruppene var det betydelig gjellepatologi forenlig med AGD før behandling, men allerede 7 dager etter behandling var gjellene frie for AGD-patologi. Ved behandlinger som hadde dårligere reduserende effekt på makroskopisk gjellescore var det også synlig AGD-patologi i de seneste prøveuttakene.

Behandling med H₂O₂ førte til fysiologiske endringer hos fisken. Ved prøveuttaket like etter behandling ble det registrert en økning i natriumkonsentrasjonen (Na) i plasma. Det var også en økning i plasma Na i ubehandlet kontrollgruppe ved samme tid, men økningen var større i de H₂O₂-behandlede gruppene (figur 19). Økningen i plasma Na i kontrollgruppene er trolig stressrelatert og en følge av håndtering (håving på samme måte som i de behandlede gruppene). Plasma Na økte til 180 mmol/L (gjennomsnitt) som følge av H₂O₂-eksponeringene ved 12 °C og 16 °C (figur 19), men reelle verdier var trolig høyere. Dette fordi øvre grenseverdien i analysemetoden for plasma Na var 180 mmol/L, og plasma Na verdiene for fiskene i disse gruppene viste >180 mmol/L. Konsentrasjon av plasma Na gikk tilbake til normalnivå i løpet av den første uken etter H₂O₂-behandlingen, men det kan se ut til at restitusjonen var noe langsommere ved 16 °C enn ved 8 °C (figur 19). Det ble observert lignende endringer i plasma Na etter H₂O₂-behandlingene i forsøk 1, se verdier i Appendix.



Figur 19. Utvikling i konsentrasjon av plasma natrium (gjennomsnitt ± SE) ved behandling med ulike konsentrasjoner av H₂O₂ ved 8 °C, 12 °C og 16 °C.

Det ble observert en reduksjon i hematokrit i prøveuttaket like etter behandling, og reduksjonen var større i de H₂O₂-eksponerte gruppene enn i kontrollgruppene (figur 20). På samme måte som for plasma Na, viste hematokrit en rask restitusjon, og verdiene var tilbake rundt hematokritnivået til kontrollgruppene 24 timer etter behandling. Ved 12 °C og 16 °C var imidlertid hematokritnivåene fortsatt lavere enn i de respektive kontrollgruppene, syv dager etter behandling (figur 20).



Figur 20. Utvikling i hematokritnivå (gjennomsnitt ± SE) ved behandling med ulike konsentrasjoner av H₂O₂ ved 8 °C, 12 °C og 16 °C.

Det ble ikke observert dødelighet eller andre negative effekter på fisken ved noen av ferskvannsbehandlingene eller ved langtidsbehandling med brakkvann og med ferskvann/brakkvann tilsatt H₂O₂. Blodanalysene fra forsøk 4, som var et rent ferskvannsforsøk, viser også at ferskvannsbehandlingene ikke førte til fysiologiske endringer, sammenlignet med ubehandlede kontrollgrupper.

6. Diskusjon

Ferskvannsbehandling hadde bedre reduserende effekt enn H₂O₂-behandling mot AGD, og ferskvann var i tillegg betydelig mer skånsomt for fisken enn det som var tilfellet for H₂O₂-behandling.

Det var små effektforskjeller på AGD ved behandling med ulike H₂O₂-doser. Innenfor samme eksponeringsforsøk ble det observert tilnærmet lik gjellescoreutvikling etter eksponering for H₂O₂-doser fra 600 ppm i 40 min til 1600 ppm i 20 minutter. Det var også små forskjeller i effekt på prevalensen av amøben innenfor disse dosene. Disse resultatene ble bekreftet i det neste smitteforsøket der effekten av ulike H₂O₂-doser var tilnærmet lik når fisk ble eksponert ved samme vanntemperatur. Effekten av H₂O₂-eksponering, målt som utvikling av AGD over en periode på 21 dager etter behandling, var imidlertid svært temperaturavhengig. Behandling ved 8 °C ga bedre/mer langvarig effekt enn behandling ved 12 °C og 16 °C. Det er god grunn til å anta at amøben har bedre vekstvilkår ved høy temperatur enn ved lav temperatur, og at dette er hovedforklaringen på at AGD utviklet seg raskere etter behandling ved 16 °C, sammenlignet med 8 °C. God korrelasjon mellom AGD-utvikling og vanntemperatur ble også dokumentert i de ubehandlede kontrollgruppene i flere av forsøkene i denne studien.

Ingen av H₂O₂-dosene som ble testet i denne studien eliminerte amøben 100 %. Dette gjaldt ved behandling på temperaturene 8 °C, 12 °C, 14 °C og 16 °C. Resultatet er i samsvar med tidligere studier, både in vivo og in vitro, som også viser at amøber overlever H₂O₂-behandling (16, 20).

Til tross for manglende dose-respons-sammenheng mellom H₂O₂-dose og effekt på AGD og prevalens av amøben, var det store effektforskjeller på fisken ved behandling med ulike H₂O₂-doser og ved behandling på forskjellig vanntemperaturer. Det var en klar sammenheng mellom behandlingstid, vanntemperatur og negativ effekt på fisken, der behandling ved 14 °C og 16 °C ga dødelighet, selv ved så lave H₂O₂-konsentrasjoner som 600 ppm i 40 minutter. Det ble imidlertid ikke observert dødelighet ved behandling med 1800 ppm H₂O₂ i 20 minutter ved 8 °C.

Det var en markert større andel av fisk med gjelleblødninger i gruppene som ble behandlet ved 16 °C sammenlignet med i 8 °C- og 12 °C-gruppene. Dette til tross for at H₂O₂-konsentrasjonene var lavere ved 16 °C. I gruppen som ble behandlet ved 16 °C med 600 ppm H₂O₂ i 60 minutter overlevde kun 4 fisk, og det var også store gjelleskader på fisk i den andre gruppen som ble eksponert ved 16 °C. Våre resultater er i samsvar med tidligere studier som har vist at H₂O₂-behandling kan forårsake blødninger i gjellene (23). Innenfor de doser og temperaturer som ble testet i forsøkene, var negative effekter av behandlingen mer relatert til eksponeringens varighet og temperatur enn til konsentrasjonen av H₂O₂.

Etter uttesting av til sammen 16 ulike H₂O₂-doser, flere ved forskjellige vanntemperaturer, ble konsentrasjon-tid-kombinasjonen på 1200 ppm H₂O₂ i 20 minutter vurdert til å være den mest skånsomme og effektive H₂O₂-behandling. Denne dosen ble brukt i det påfølgende forsøket i prosjektet, ved 12 °C,

uten vesentlig negative effekter på fisken. Vi konkluderer derfor med at 1200 ppm H₂O₂ i 20 minutter er en god behandlingsdose mot AGD, men at det må utvises stor forsiktighet ved behandling på vanntemperatur høyere enn 12 °C. Dette samsvarer godt med forsiktighetsreglene i produktdatabladet for H₂O₂-løsningen som ble brukt i forsøkene.

Det var ingen observerbare negative effekter på fisken ved behandling med ferskvann, eller med ferskvann tilsatt CaCO₃ i denne studien. Det kan dermed konkluderes med at ferskvannsbehandling er betydelig mer skånsomt enn H₂O₂-behandling mot AGD.

Ved en direkte sammenligning av behandlingseffekt ved H₂O₂-behandling (1200 ppm i 20 min) og ferskvannsbehandling (tre timer), hadde ferskvannsbehandlingen også best reduserende effekt mot AGD. I dette forsøket ble behandlingene gjennomført ved tre ulike tidspunkt i AGD-sykdomsutviklingen, ved gjellescore 1, 2 og 3 (basert på den mest affiserte buen), og ferskvann ga en signifikant bedre behandlingseffekt enn H₂O₂ ved alle de tre gjellescoreutgangspunktene. PCR-analysene viste også at ferskvann hadde bedre reduserende effekt enn H₂O₂ på selve amøben.

Etter noen års erfaring med AGD i norsk lakseoppdrett har næringen stort fokus på å oppdage sykdommen på et tidlig tidspunkt, og AGD-utviklingen følges tett ved påvisning. Behandlingene mot AGD er kostbare og ved bruk av H₂O₂ er behandlingen også risikabel med hensyn på fare for økt dødelighet. Det er derfor svært viktig å gjøre gode vurderinger for om behandling faktisk skal iverksettes, og eventuelt når i AGD-utviklingen behandlingen bør gjennomføres. Resultatene fra våre forsøk viser at det kan oppnås en mer langvarig effekt hvis det behandles på et tidlig stadium i sykdomsutviklingen, ved gjellescore ≤ 1, enn hvis man venter til gjellescore har utviklet seg ytterligere. Dette samsvarer med næringens egne erfaringer, og det anbefales derfor å iverksette behandling på et tidlig stadium når AGD påvises på lokaliteter med høy risiko for AGD-utvikling. Dette vil si på lokaliteter med stabilt høy salinitet, og samtidig utsikter for stigende vanntemperatur.

Ved ferskvannsbehandling med ulik eksponeringstid viste resultatene at behandling i én time ga vesentlig dårligere reduserende effekt på gjellescore enn ved to- og tre-timers behandling. Det var imidlertid liten forskjell i effekt mellom to- og tre-timers behandlingene. PCR-analysene viste også at behandling i én time hadde dårligere reduserende effekt på selve amøben enn ved to- og tretimers behandling. Disse resultatene viser at effekt av ferskvannsbehandling er tidsavhengig. Én time synes å være for kort behandlingstid til å gi tilfredsstillende behandlingseffekt, mens to- og tre-timers behandling gir en bedre reduserende effekt. Det understrekes imidlertid at denne testen er gjennomført med kun én forsøksgruppe for hver eksponeringstid, og sammenhengen mellom eksponeringstid og effekt av ferskvannsbehandling bør derfor studeres nærmere.

Gjellescore utviklet seg forskjellig etter ferskvannsbehandlingene ved 10 °C og 16 °C. Som for H₂O₂-behandling ved ulike temperaturer, kan trolig forskjellen i AGD-utvikling forklares med at vekstvilkårene for amøben er bedre ved 16 °C enn ved 10 °C. Det kan imidlertid ikke utelukkes at den akutte effekten av behandlingen også er bedre ved den laveste temperaturen. Et forsøk der fisken behandles ved forskjellige vanntemperaturer, og der sykdomsutviklingen observeres ved samme temperatur etter behandling, kan bidra til å utrede denne problemstillingen.

I forsøket med ferskvannsbehandling (forsøk 4) var det en relativt kraftig økning i gjellescore mellom prøveuttakene 14 dager og 21 dager etter behandling ved 16 °C. Dette indikerer relativt god overlevelse av amøber etter behandling, og at behandlingen hadde utilstrekkelig effekt mot amøben. PCR-resultatene støtter denne antakelsen, og det kunne derfor være interessant å teste ferskvannsbehandling utover tre timer for å se om forlenget behandlingstid gir en enda bedre effekt mot amøben.

I tidligere studier er det vist at vann med høy ionestyrke har redusert effekt mot *P. perurans*, sammenlignet med vann med lav ionestyrke (19, 21, 22). I våre forsøk kunne det imidlertid ikke dokumenteres at CaCO₃, i en konsentrasjon som brukes ved ferskvannsbehandlinger i felt (10 kg CaCO₃/1000m³), hadde en bedre behandlingseffekt mot amøben. Det var ikke signifikante forskjeller i behandlingseffekt på amøben ved ferskvannsbehandling i tre timer med- og uten tilsetning av CaCO₃. Testen ble gjort ved to temperaturer, men det understrekes igjen at våre forsøk ble gjennomført med kun én forsøksgruppe for hver behandling, og det må derfor tas visse forbehold ved denne observasjonen. Det var ingen observerbare negative effekter på fisken ved langtidsbehandling med brakkvann eller ved behandling med ferskvann og brakkvann tilsatt 600 ppm H₂O₂ i 30 minutter ved 12 °C. Disse behandlingene kan derfor betraktes som skånsomme for fisken. De to mest effektive behandlingene i dette forsøket var brakkvann 10 % i 24 timer og brakkvann 15 % i 48 timer. I begge disse gruppene var gjellescoreverdiene

som ble registrert fortsatt avtagende ved prøveuttaket 21 dager etter behandling. Resultater fra PCR-analysene bekrefter at behandlingene hadde en svært god reduserende effekt på amøben ved at alle prøver etter behandling var negative for *P. perurans*, bortsett fra i det siste prøveuttaket i gruppen eksponert for 15 ‰ i 48 timer, der én av fem fisker var PCR-positive. De to langtidsbehandlingene med brakkvann skilte seg også fra de andre behandlingsgruppene ved at forsøk på å re-isolere amøben ikke lyktes her, mens re-isolering av amøben var vellykket i de andre behandlingsgruppene og i ubehandlet kontrollgruppe.

Det konkluderes derfor med at langtidsbehandling med brakkvann, det vil si 24-48 timer ved saliniteter rundt 10-15 ‰ er svært effektivt mot AGD.

Ferskvannsbehandling med innblanding av små mengder sjøvann slik at behandlingsvannet holdt en salinitet på 2 ‰ hadde tilsynelatende lik behandlingseffekt som eksponering for rent ferskvann i tre timer. Behandlingseffekten ble redusert ved innblanding av sjøvann til 5 ‰ salinitet. Dette viser at små mengder sjøvann kan redusere effekten av ferskvannsbehandling, men at behandlingsvann med saliniteter opp til 2 ‰ gir tilnærmet like god effekt som rent ferskvann mot AGD.

Behandling med ferskvann og brakkvann tilsatt 600 ppm H₂O₂ over en periode på 30 minutter hadde reduserende effekt på AGD, sammenlignet med kontrollgruppen, men det er grunn til å anta at disse behandlingene vil ha kortvarig effekt basert på gjellescoreutvikling og infeksjon med *P. perurans* over forsøksperioden på 21 dager etter behandling.

Det var generelt godt samsvar mellom PCR-resultatene og resultater fra de andre analysemetodene, men i noen tilfeller var det avvik fra forventede resultater og det var tilfeller der vi forventet en høyere andel PCR-positive prøver (se for eksempel kontrollgruppen ved 8 grader i forsøk 2, figur 10). Flere forhold kan forklare hvorfor tilsynelatende positiv fisk, for eksempel enkeltfisk med påvist makroskopisk gjellescore, ikke var positive i PCR analysene. Det kan skyldes både måten prøvene ble tatt ut på, og sensitiviteten til real-time PCR-assayet. Enhver metode for å påvise eller kvantifisere patogener i eller på vev er avhengig av representative prøveuttak. Når hele organer ikke kan analyseres så vil sannsynligheten for deteksjon påvirkes av om patogenene er jevnt fordelt i prøvene, eller flekkvis distribuert. Amøbene er ikke jevnt fordelt på gjellebuer og -flater, noe som både gjellescore og de histologiske analysene viser i denne studien. Dette kan være årsaken til at en høyere andel av gjelleprøvene enn forventet var PCR-negative for *P. perurans*. For fremtidige forsøk kan det være nyttig å undersøke om annen prøvetakingsmetodikk, for eksempel bruk av svaber, kan gi flere påvisninger for amøben.

Real-time PCR assayet som ble benyttet her (11) har vist seg å være mer sensitivt enn tidligere publiserte assay (14) og er etablert og utprøvd gjennom sammenlignende prøver mellom Veterinærinstituttet og andre forskningsinstitusjoner i utlandet. Assayet er basert på amplifikasjon av DNA fra prøven og ikke RNA/cDNA, og det er kjent at DNA-assay er mindre sensitive enn RNA assay på grunn av tilstedeværelse av færre kopier av målsekvenser (4) Bruk av et mer sensitivt assay kunne trolig ha gitt flere positive PCR-påvisninger, spesielt ved lav gjellescore. PCR-resultatene er ikke normaliserte og ikke oppgitt som mengde amøber, men er presentert som positive eller negative påvisninger.

Hovedkonklusjonene fra denne studien er at ferskvannsbehandling har en bedre effekt enn H₂O₂-behandling mot AGD. Ved ferskvannsbehandling var eksponeringstiden viktig for behandlingseffekten mot AGD, mens forlenget H₂O₂-behandling (utover 20 minutter) var mer skadelig for laksen enn effektivt mot sykdommen. Behandling ved lav gjellescore ga en mer langvarig reduserende effekt på AGD enn hvis behandling ble gjennomført ved høyere gjellescore. Det kan også konkluderes med at behandling ved lave vanntemperaturer ga en mer langvarig reduserende effekt på AGD enn det som var tilfellet ved behandling ved høyere temperaturer.

7. Takk til

Takk til Julie Bugge ved Aqua Pharma for bidrag med oppskrifter og framgangsmåte for omvendt titrering av hydrogenperoksid.

Takk til Styringsgruppa i prosjektet, ved Per Helge Bergtun (Marine Harvest), Bjarne Reinert (Lerøy) og Tor Eirik Homme (Grieg) for faglige diskusjoner og verdifulle innspill fra et næringsperspektiv.

Vi takker også Susanne Håvardstun Eide ved ILAB, samt Saima Nasrin Mohammad og Mari Darrud ved Veterinærinstituttet for gjennomføring av eksperimentelle forsøk og laboratoriearbeid.

Mari Darrud har i tillegg bidratt med redigering av sluttrapport.

8. Referanser

1. Adams, M.B. & Nowak, B.F. (2001). Distribution and structure of lesions in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease. *Journal of Fish Diseases* 24, 535-542.
2. Adams, M.B. & Nowak, B.F. (2003). Amoebic gill disease (AGD): sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 26, 601-614.
3. Adams, M.B., Crosbie, P.B.B. & Nowak, B.F. (2012). Preliminary success using hydrogen peroxide to treat Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with experimentally induced amoebic gill disease (AGD). *Journal of Fish Diseases* 35, 839-848.
4. Backstedt, B.T., Buyuktanir, O., Lindow, J., Wunder, E.A., Jr., Reis, M.G., Usmani-Brown, S., Ledizet, M., Ko, A. & Pal, U. (2015). Efficient Detection of Pathogenic Leptospire Using 16S Ribosomal RNA. *PLoS ONE*, 10 (6): e0128913.
5. Cameron, D.E. (1994a). AGD Field Research 1993/94. I. Inactivation of hydrogen peroxide in seawater. In: *SALTAS Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania.
6. Cameron, D.E. (1994b). AGD Field Research 1993/94. II. Evaluation of toxicity of hydrogen peroxide to Atlantic salmon. In: *SALTAS Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania.
7. Cameron, D.E. (1994c). AGD Field Research 1993/94. III. Field testing of hydrogen peroxide with AGD-infected Atlantic salmon - Efficacy and toxicity. In: *SALTAS Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania.
8. Clark, A. & Nowak, B.F. (1999). Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases* 22, 433-443.
9. Clark, G., Powell, M. & Nowak, B. (2003). Effects of commercial freshwater bathing on reinfection of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with Amoebic Gill Disease. *Aquaculture* 219, 135-142.
10. Douglas-Helders, M., Saksida, S., Raverty, S. & Nowak, B.F. (2001). Temperature as a risk factor for outbreaks of amoebic gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 21, 114-116.
11. Downes, J.K., Henshilwood, K., Collins, E.M., Ryan, A., O'Connor, I., Rodger, H.D., MacCarthy, E., Ruane, N.M. (2015). A longitudinal study of amoebic gill disease on a marine Atlantic salmon farm utilising a real-time PCR assay for the detection of *Neoparamoeba perurans*. *Aquac. Environ. Interaction* 7, 239-251.
12. Foster, C. & Percival, S. (1988a). Treatment of Paramoebic gill disease in salmon and trout. *SALTAS Aquanote* No. 14, 1-4, Salmon Enterprises of Tasmania, Dover, Tasmania, Australia.
13. Foster, C. & Percival, S. (1988b). Paramoebic gill disease. Occurrence of *Paramoeba* in Tasmania. *SALTAS Aquanote* No. 15, May, Salmon Enterprises of Tasmania, Dover, Tasmania, Australia.
14. Fringuelli, E., Gordon, A.W., Rodger, H., Welsh, M.D. & Graham, D.A. (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.
15. Howard, T. & Carson, J. (1993). Progress Report: are there alternatives to freshwater treatment of AGD? In: Seeking a SOLVING: *SALTAS Research and Development Review Seminar*, pp. 81-87, Hobart, Tasmania.
16. McCarthy, U., Hall, M., Schrittwieser, M., Ho, Y.M., Collins, C., Feehan, L., Simons, J. & White, P.

- (2015). Assessment of the viability of *Neoparamoeba perurans* following exposure to hydrogen peroxide. A study commissioned by the *Scottish Aquaculture Research Forum (SARF)*. 65s.
17. Mo, T.A., Hytterød, S., Olsen, A.B., Hansen, H. (2015). Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014. *Veterinærinstituttets rapportserie* 9, 36s.
 18. Parsons, H., Nowak, B., Fisk, D. & Powell, M. (2001). Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture* 195, 205-210.
 19. Powell, M.D. & Clark, G.A. (2003). In vitro survival and the effect of water chemistry and oxidative chemical treatments on isolated gill amoebae from AGD-affected Atlantic salmon. *Aquaculture* 220, 135-144.
 20. Powell, M. & Clark, G.A. (2004). Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater. *Aquaculture* 35, 112-123.
 21. Powell, M.D., Reynolds, P. & Kristensen, T. (2015). Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: Considerations of water chemistry and fish welfare in Norway. *Aquaculture* 448, 18-28.
 22. Roberts, S.D. & Powell, M.D. (2003). Reduced total hardness of fresh water enhances the efficacy of bathing as a treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 26, 591-599.
 23. Speare, D.J., Carvajal, V. & Horney, B.S. (1999). Growth Suppression and Branchitis in Trout Exposed to Hydrogen Peroxide. *Journal of Comparative Pathology* 120, 391-402.
 24. Taylor, R., Muller, W.J., Cook, M.T., Kube, P.D. & Elliott, N.G. (2009). Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture* 290, 1-8.

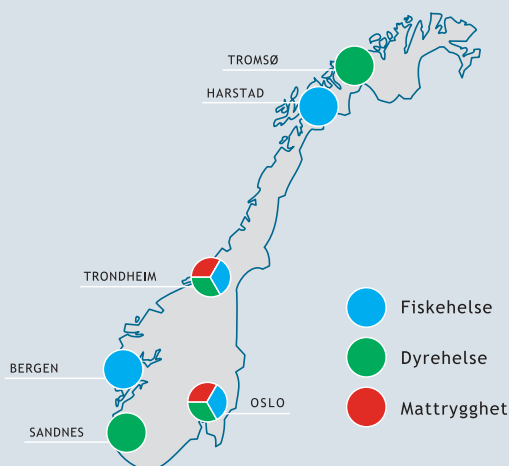
Table with 65 columns containing data points such as IDs, values, and status indicators. The table is organized into columns with varying widths, likely representing different attributes or categories. Some columns contain numerical values, while others contain text labels or status indicators like 'Pos', 'Neg', 'Pos', 'Neg', etc. The data is presented in a dense grid format.

Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primær oppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute