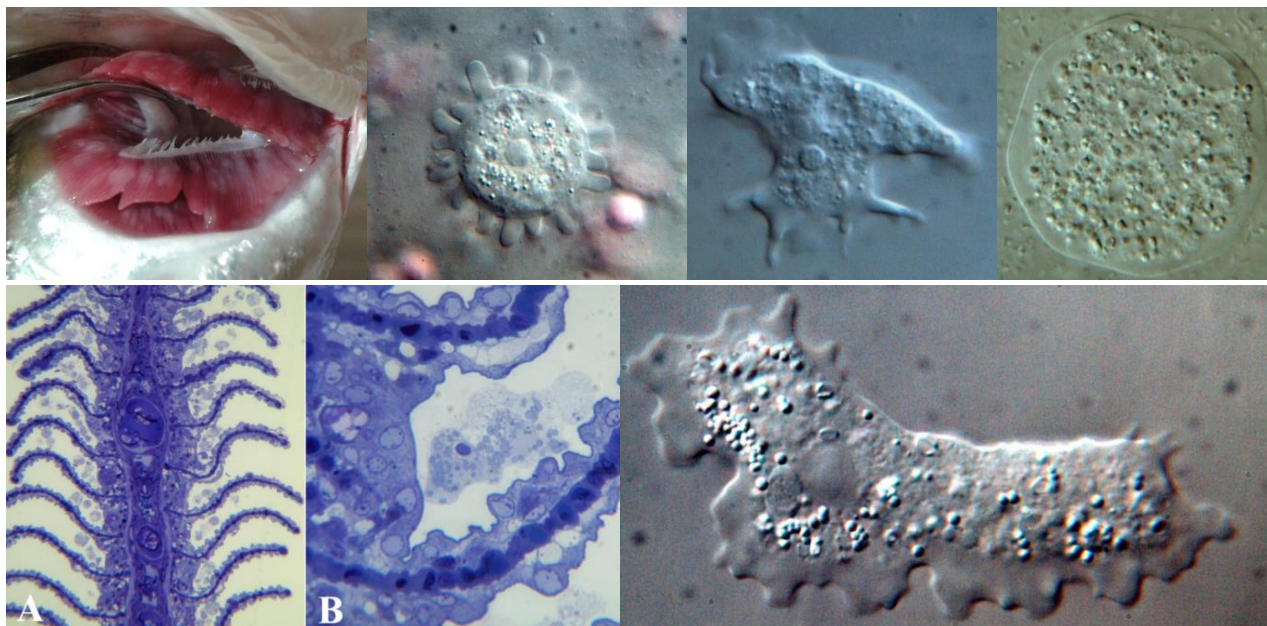


FAGLIG SLUTTRAPPORT



SLUTTRAPPORT FOR OPPFØLGING AV PROSJEKTET: ISOLERING OG KARAKTERISERING AV *PARAMOEBA PERURANS*: FENOTYPISK OG GENETISK KARAKTERISERING AV UTVALGTE KLONER FRA LAKS OG ANDRE VERTER.

RAPPORTDATO

17. desember 2021

FHF-PROSJEKTNUMMER

901053

UTFYLT AV

Are Nylund

Følgende har arbeidet på
prosjektet i perioden 2019 –
2021: Dr. Christiane Trosse & Dr.
Renate Skoge

1. SAMMENDRAG

Norsk sammendrag

Amøbisk gjellesykdom, AGD, forårsaket av *Paramoeba perurans* er i tillegg til en rekke andre patogener årsaker til gjellesykdommer (GS) hos laks i oppdrett på Vestlandet. FHF-prosjektet: 901053 hadde som mål å karakterisere (fenotypisk og genetisk) isolater av *P. perurans* for å fremskaffe nødvendige verktøy for studier av reservoar, spredning, historisk forekomst, identifisering av mulige virulensforskjeller, identifisering av virulensmarkører, temperaturtoleranse, salinitetstoleranse, og metoder for rask og sikker påvisning av parasitten. I sluttrapporten for dette

prosjektet (15 juni 2018) ble det vist betydelige forskjeller mellom isolater av *P. perurans* med henblikk på temperatortoleranse, salinitetstoleranse, veksthastighet, produksjon av spredningsstadier, morfologi, og virulens. Det var imidlertid ikke mulig å påvise genetiske forskjeller, som kunne forklare virulensforskjeller mellom kloner av *P. perurans*. Det ble foreslått at virulensvariasjon mellom kloner av *P. perurans* kunne være et resultat av epigenetiske mekanismer eller variasjon i mikrobiota på gjellene hos laks. De epigenetiske mekanismene kan tenkes utløst av ytre miljøfaktorer (salinitet, temperatur etc), mikrobiota på gjellene hos laks, eller variasjon i vertsresponser. For å se om det var mulig å gi svar på dette spørsmålet ble det søkt om å få bruke resterende midler på prosjektet til å undersøke en eventuell betydning av gjellemikrobiota og mikrobiota i dyrkingsmediene for virulens til kloner av *P. perurans*.

Karakterisering av mikrobiota i dyrkingsmediene til *P. perurans* kloner viser stor artsvariasjon og betydelig forskjeller i mikrobiota fra lav- og høyvirulente kloner av amøben. Endringer i mikrobiotasamfunnet kan føre til at *P. perurans* ikke er i stand til å etablere infeksjoner på gjellene hos laks. Det er vist at *P. perurans* dyrket på renkultur av *Vibrio splendidus* vokser i samme hastighet (oppformering) som i det opprinnelige mediet med et sammensatt mikrobiotasamfunn, men at amøben taper evnen til å etablere infeksjon på gjellene eller fører til redusert gjellescore.

I dette prosjektet er det vist at endringer i mikrobiota i amøbekulturmediene eller på gjellene til laks vil påvirke virulensen til kloner av *P. perurans*. Resultatet av endringer i mikrobiota kan observeres som reduksjon i gjelle score (reduserte patologi) uten at dette nødvendigvis fører til en reduksjon i tetthet av amøbene på gjellene. Tapet av virulens synes å være en konsekvens av endret sammensetning av bakterier på gjellene hos laks (og i dyrkingsmediene til amøbene).

English summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by *Paramoeba perurans*, is together with a range of other gill pathogens causing serious gill diseases in salmon farming in Western Norway. The FHF-project: 901053 focused on characterization (phenotypic and genetic) of isolates of *P. perurans* with the aim to provide necessary tools for studies of reservoirs, epizootic, historical presence, and identification of virulence differences, virulence markers, temperature tolerance, salinity tolerance, and methods for fast, sensitive, and specific detection of the parasite. Significant differences between isolates (clones) of *P. perurans* haven been documented with respect to temperature tolerance, salinity tolerance, growth speed, production of spreading stages, morphology, and virulence (report dated 15th June 2018). However, we were not able to identify genetical differences that could explain the observed variation in virulence and phenotypic variation between clones of *P. perurans*. We suggested that the variation in virulence could be due to epigenetic mechanisms (traits that may result from external or environmental factors) or variation in gill microbiota of the infected salmon. Examples of factors that may trigger the epigenetic mechanisms could be salinity, temperature, microbiota, or host responses.

Characterization of the microbiota present in the culture media from *P. perurans* clones shows a large species variation and significant differences in microbiota composition between low- and high virulent clones. It is shown that changes in the microbiota could lead to failure of *P. perurans* to establish infections on the gills of salmon. *P. perurans* cultured in a pure culture of *Vibrio splendidus* grows (multiply) at the same speed as when grown in the original media (mixed microbiota obtained from gill of salmon suffering from AGD) but the resulting amoeba culture will have a reduction in the ability to establish infections on the gill of salmon causing AGD.

This project has shown that changes in the microbiota in the amoeba culture media or on the gills of salmon will influence the virulence of different clone of *P. perurans*. The results of these changes can be observed as reduced gill score (reduction in gill pathology) although these changes are not necessarily related to reduced densities of the amoeba. Loss of virulence seem to be a result of changes in the bacterial community on the gills of the challenged salmon.

2. INNLEDNING

Faglig bakgrunn

Amøbisk gjellesykdom, AGD, forårsaket av *Paramoeba perurans* fremstod som et potensielt alvorlig problem for lakseoppdrett i Sør-Norge i 2013. Det første offisielle utbruddet ble registrert i Sogn og Fjordane i 2006 (senere påvist så tidlig som i 2003 i samme fylke, - Se sluttrapport fra 2018*). Denne parasitten kom i tillegg til en rekke andre årsaker til gjellesykdommer (GS) hos laks i oppdrett på Vestlandet. Selv om AGD var godt kjent fra lakseoppdrett i Tasmania førte den raske økning i AGD-tilfeller, forårsaket av *P. perurans*, til et omfattende behov for ny kunnskap om denne parasitten. FHF-prosjektet: 901053 hadde som mål å karakterisere (fenotypisk og genetisk) isolater av *P. perurans* for å fremskaffe nødvendige verktøy for studier av reservoar, spredning, historisk forekomst, identifisering av mulige virulensforskjeller, identifisering av virulensmarkører, temperaturløselighet, salinitetstoleranse, og metoder for rask og sikker påvisning av parasitten. I sluttrapporten for dette prosjektet (15 juni 2018*) ble det vist betydelige forskjeller mellom isolater av *P. perurans* med henblikk på temperaturløselighet, salinitetstoleranse, veksthastighet, produksjon av spredningsstadier, morfologi, og virulens. Det var imidlertid ikke mulig å påvise genetiske forskjeller, som kunne forklare virulensforskjeller mellom kloner av *P. perurans*. Det ble foreslått at virulensvariasjon mellom kloner av *P. perurans* kunne være et resultat av epigenetiske mekanismer eller variasjon i mikrobiota på gjellene hos laks. De epigenetiske mekanismene kan tenkes utløst av ytre miljøfaktorer (salinitet, temperatur etc), mikrobiota på gjellene hos laks, eller variasjon i vertsresponser. For å se om det var mulig å gi svar på dette spørsmålet ble det

søkt om å få bruke resterende midler på prosjektet til å undersøke en eventuell betydning av gjellemikrobiota og mikrobiota i dyrkingsmediene for virulens til kloner av *P. perurans*.

*SLUTTRAPPORT FOR PROSJEKTET: ISOLERING OG KARAKTERISERING AV *PARAMOEBA PERURANS*: FENOTYPISK OG GENETISK KARAKTERISERING AV UTVALGTE KLONER FRA LAKS OG ANDRE VERTER. 15 Juni 2018 (FHF 901053).

3. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Prosjektets effektmål

Hovedmålet med videreføringen av prosjektet var å undersøke betydningen av bakterier for overlevelse og virulens til *P. perurans*.

Spesifikt mål er:

Kan mikrobiota i dyrkingsmediene og på gjellene hos laks medvirke til utvikling av AGD etter smitte med *P. perurans*.

Prosjektets resultatmål

Prosjektet har følgende gjenstående leveranse:

- A. Identifisering av bakteriers betydning for at *P. perurans* skal kunne føre til AGD hos laks.
- B. Ny «Faglig sluttrapport» etter retningslinjene til FHF (med søkelys på mulig betydning av mikrobiota i amøbekulturene).

4. PROSJEKTGJENNOMFØRING

Beskrivelse av metodikk og gjennomføring av prosjektet

Bakteriers betydning for virulens til kloner av *P. perurans*

Tilstedeværelse av *P. perurans* resulterer ikke alltid i Amøbisk gjellesykdom (AGD) og det har ikke vært mulig å påvise genetiske forskjeller, som kan forklare virulensforskjeller mellom kloner av amøben. Det kan ikke utelukkes at virulensvariasjon mellom kloner av *P. perurans* kan være et resultat av epigenetiske mekanismer (mekanismer som styrer om en egenskap kommer til uttrykk eller ikke) eller variasjon i mikrobiota (bakterier) på gjellene hos laks. De epigenetiske mekanismene kan tenkes utløst av ytre miljøfaktorer (salinitet, temperatur etc), mikrobiota på gjellene hos laks, eller variasjon i vertsresponser. En rekke forskjellige arter bakterier påvises i mediene til kloner av *P. perurans* isolert fra gjellene til laks, og det er observert klare forskjeller i dette

mikrobiotasamfunnet i mediene til lav- og høyvirulente varianter av amøben (Rapporter til FHF901053, 2019, 2020). Gjennomføring av smitteforsøkene, i dette prosjektet, har derfor som mål å kartlegge mikrobiotasamfunnets eventuelle betydning for om *P. perurans* kan etablere infeksjon på gjellene hos laks og føre til utvikling av AGD. Hvis mikrobiotasamfunnet på gjellene hos laks er medvirkende årsak til utvikling av AGD så åpner dette for nye strategier for bekjempelse av sykdommen og dermed bedre fiskevelferd.

Følgende kloner av isolater av *P. perurans* har vært benyttet i smitteforsøk (**Tabell 1**).

Tabell 1: Kloner av *P. perurans* som har vært benyttet i smitteforsøk. Kode for klon, dato for isolering, vert som isolatene ble hentet fra, og geografisk opphav til fisken (Fylke).

Kode	Dato	vert	Fylke
H01/13Pp	25.11.2013	<i>Salmo salar</i>	Hordaland
H02/13Pp	Okt. 2013	<i>Salmo salar</i>	Hordaland
H03/14Pp	22.01.2014	<i>Salmo salar</i>	Hordaland
H04/14Pp	27.08.2014	<i>Labrus bergylta</i>	Hordaland
MR06/14Pp	18.11.2014	<i>Salmo salar</i>	Møre og Romsdal
SF07/14Pp	02.10.2014	<i>Salmo salar</i>	Sogn og Fjordane
SF08/14Pp	02.10.2014	<i>Salmo salar</i>	Sogn og Fjordane
SF11/15Pp	05.02.2015	<i>Salmo salar</i>	Sogn og Fjordane
SF15/15Pp	18.03.2015	<i>Salmo salar</i>	Sogn og Fjordane
H16/15Pp	10.08.2015	<i>Salmo salar</i>	Hordaland
R18/15Pp	04.09.2015	<i>Salmo salar</i>	Rogaland
ST19/15Pp	13.10.2015	<i>Salmo salar</i>	Sør-Trøndelag
H20/16Pp	05.02.2016	<i>Salmo salar</i>	Hordaland

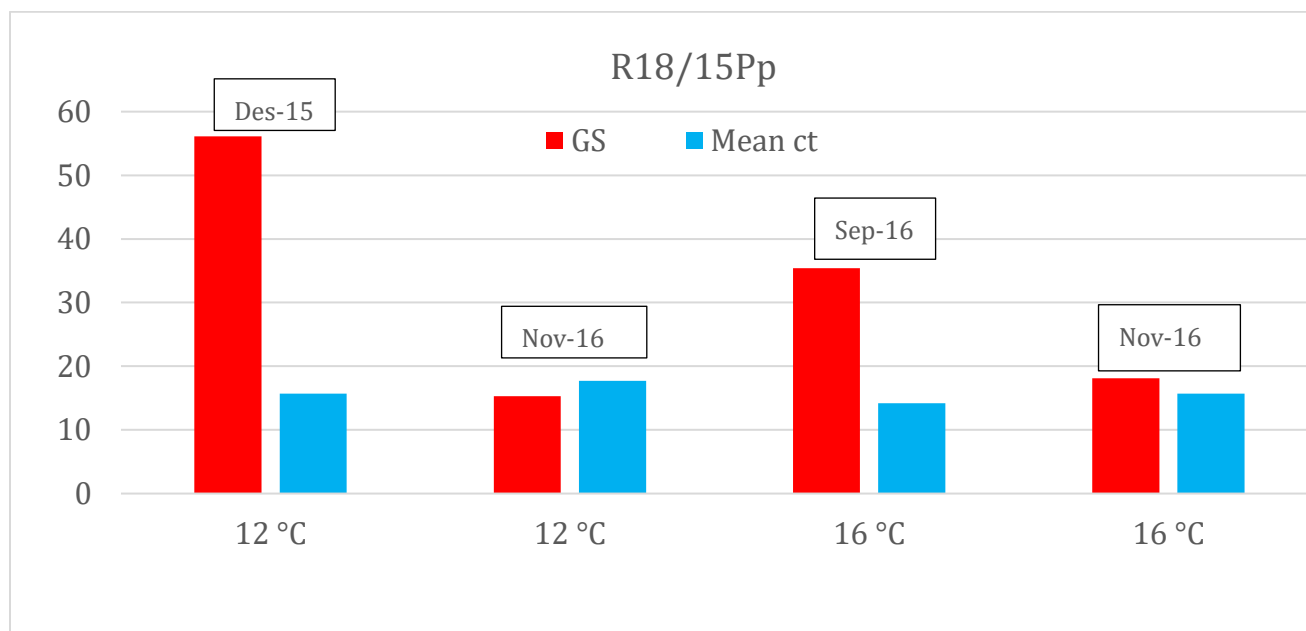
Basert på smitteforsøk ble det laget en virulensklassifisering (**Tabell 2**). Her fremgår det at ved 16 °C så hadde H20/16Pp høyest virulens (79,7 % av maksimal gjellescore - GS), mens H03/14Pp synes å være avirulent (dvs ingen gjellescore) ved denne temperaturen. Imidlertid ble det observert en svak økning i virulens fra 0,0 til 1.1 % av maksimal GS når amøben ble tilsatt bakteriemedium fra R18/15Pp (GS = 35,4 %). Tilsvarende ble også observert i et senere forsøk hvor ST9/15Pp økte i virulens fra 9,3 % til 17,8 % etter tilsetning av bakteriemedium fra H20/16Pp (GS = 79,7 %) (**Tabell 2**). Klon R18/15Pp synes å gradvis tape virulens over tid (**Figur 1**).

Tabell 2: Virulensklassifisering av kloner av *P. perurans* basert på forskjellige smitteforsøk. Temperatur gjennom smitteforsøk, smittetidspunkt (måned for gjennomføring), Dose med *P. perurans* benyttet, og registrering av gjellescore dager etter smitte. Virulens er oppgitt som prosent (%) av maksimal gjellescore (= 16 x 5 x antall fisk i uttak).

Temperatur	12 °C	12 °C	16 °C	16 °C	12 °C
Smitte tidspunkt	Nov-15	Dec-15	Sep-16	Nov-16	Nov-16
Dose <i>P. perurans</i>	1000/L	1000/L	1000/L	1000/L	1000/L
Dager etter smitte	20des	20des	22des	21des	21des
Kode:					
H01/13Pp	18,3				
H02/13Pp	24,1		60,5 / 50,0 / 51,6	41,9 / 16,0	
H03/14Pp		12,8	0,0 / 1,1*		
H04/14Pp	25,8				
MR06/14Pp		43,3			
SF07/14Pp	10,3				
SF11/15Pp	8,3				
R18/15Pp		56,1	35,4	24,2	19,1
ST19/15Pp		10,6		9,3/17,8**	
H20/16Pp			79,7		24,2

* Tilsetning av bakterier fra høy-virulent klon (R18/15Pp).

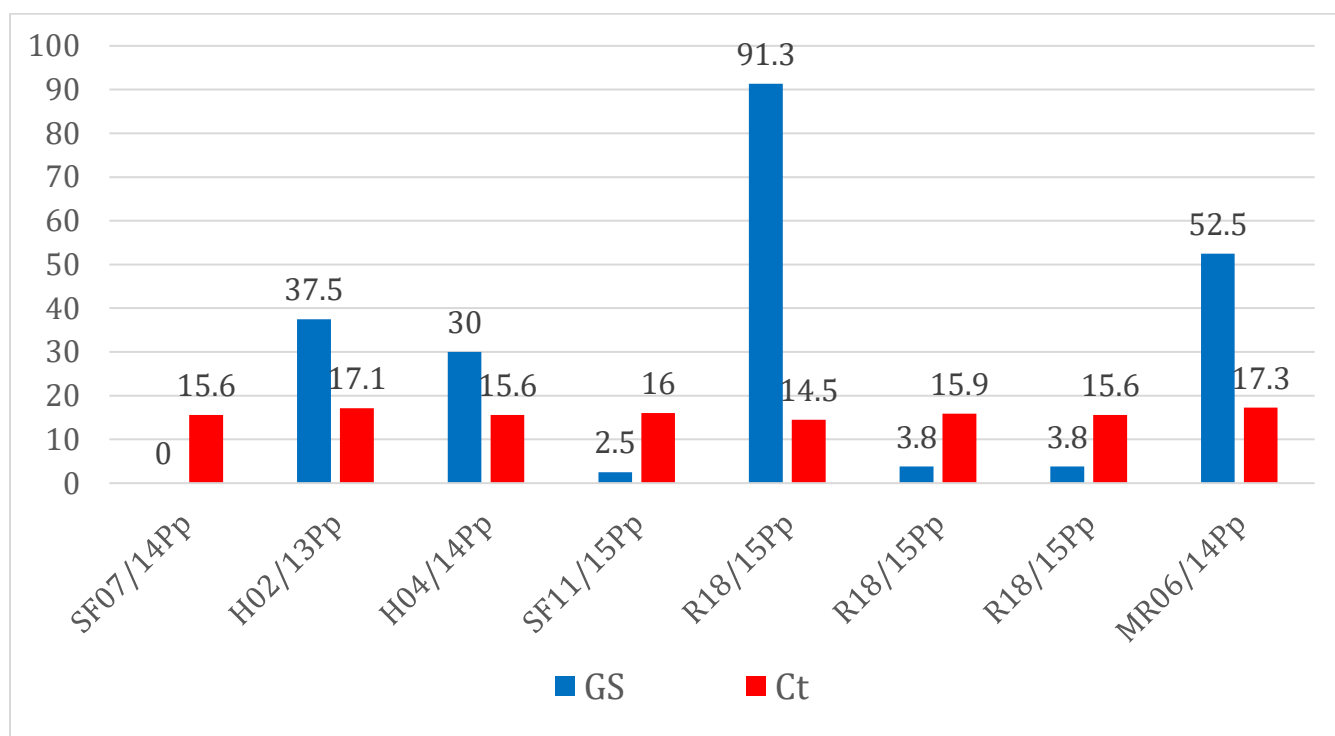
** Tilsetning av bakterier fra høy-virulent klon (H20716Pp).



Figur 1. Økt antall passasjer av klon R18/15Pp førte til redusert GS, men lite endringer i gjennomsnittlig Ct-verdi ved påvisning av amøben.

Det er allment akseptert at *P. perurans* beiter på bakterier og at en variasjon av disse utgjør føde for amøben når den holdes i kultur. Om det viktigste opptak av føde for amøben er opptak av bakterier som et resultat av fagocytose eller opptak via microfagocytose (opptak av makromolekyler etter ekstracellulær fordøyelse etter utskillelse av lipaser, proteaser og nukleaser) er ikke fullt ut kjent. Det er imidlertid vanlig å dyrke *P. perurans* i blandede bakteriekulturer som følger med ved isolasjon av amøben fra gjellene hos laks (Trösse et al 2020, Nylund et al 2018, 2021).

Tidligere forsøk har også vist at høy forekomst av *P. perurans* (basert på real time RT PCR analyser) ikke nødvendigvis fører til AGD eller en signifikant gjellescore (**Figur 2**). Det kan med andre ord være betydelige mengder med *P. perurans* på gjellene uten at dette fører til en registrerbar GS.



Figur 2. Gjellescore (GS) versus Ct verdi for *P. perurans*. Ct-verdiene varierer fra 14,5 til 17,3, men GS varierer fra 0,0 % til 91,3 % av maksimal gjellescore (dvs 100%).

De innledende smittforsøkene gjennomført i perioden 2015 – 2016 gav indikasjoner på at mikrobiotasamfunnet i kulturene er viktig for om smitte med *P. perurans* fører til AGD hos laks. I videreføringen/oppfølgingen av disse resultatene ble det testet i hvilken grad mikrobiotaen påvirker virulens og om det er mulig dyrke *P. perurans* på monokulturer av bakterier.

Smitteforsøk gjennomført høsten 2020

Høsten 2020 ble det gjennomført smitteforsøk med *P. perurans* kloner dyrket på monokulturer av *Vibrio splendidus*-liknende bakterier. Utførte forsøk har vist at amøben vokser like raskt og godt i dette rene bakteriemediet som i utgangskulturen (som består av mer enn 212 arter bakterier). Dette gav en mulighet til å undersøke om bakteriene er viktig for virulensen til de enkelte *P. perurans* klonene ved smitte av laks. I testing av bakteriers innvirkning på virulens ble hoved-uttaket gjennomført 27 dager etter smitte (des). Gjelle score hos den høyvirulente varianten (H20/16Pp) viste ingen klar forskjell mellom klon dyrket på «normalt medium» (bakterier som fulgte med isolatet fra gjellene hos laks) og klon dyrket på en renkultur av *V. splendidus* (V.spl.H20). Smitte med den lavvirulente klonen av *P. perurans* (ST19/15Pp) gav imidlertid en klar forskjell i gjelle score etter dyrking i «Normalt medium» versus dyrking i renkultur av *V. splendidus* (V.spl. ST19). I real time RT PCR analysene av uttaket fra 27 des var alle fiskene negative for tilstedeværelse av *P. perurans*, med unntak av laksen smittet med ST19/15Pp dyrket i «Normalt medium» (NM). Hos laksen smittet med ST19/15Pp-NM var 14 av 18 individer positive for *P. perurans* (**Tabell 3**). Forsøket viste at på tross av at det i alle karene smittet med *P. perurans* (Karene 1- 4) ble det tilsatt 1000 amøber /liter, så var den antatt høyvirulente varianten (H20/16Pp) ikke i stand til å etablere infeksjon på gjellene hos laks. Klonen har med andre ord; i perioden fra desember 2016 til oktober 2020, tapt evnen til i smitte laks og påføre gjelleskade.

Den andre klonen, ST19/15Pp-NM, var fortsatt i stand til å etablere infeksjon på gjellene hos laks, men denne evnen var ikke til stede hos samme klonen dyrket i en ren kultur av *V. splendidus* (V.spl.ST19). Dette viser at selv om *P. perurans* kan dyrkes og leve på en ren kultur av *V. splendidus* så synes den miste sin evne til å etablere infeksjon på gjellene hos laks. Det ansees ikke sannsynlig at *P. perurans* skal ha gjennomgått mutasjoner som gjør den avirulent etter dyrking.

Den, etter vår mening, mest sannsynlige forklaringen på at *P. perurans* taper evne til å påføre AGD hos laks er med andre ord knyttet til endringer i bakteriesammensetning i dyrkingsmediene til kloner av amøben.

Resultatene fra smitteforsøket som ble gjennomført høsten 2020 er publisert i Faglig Sluttrapport (16.12.2020. FHF: 901053) og i en Masteroppgave (Pernille Lyng (2021). *Paramoeba perurans* and AGD in Norwegian aquaculture: effect of freshwater treatment against AGD on gill health in commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and experimental testing of virulence of *Paramoeba perurans*. Master thesis, University of Bergen.) (**Tabell 3**).

Tabell 3. Gjennomsnittlig (Gsn) «range» av Ct-verdier, samt prevalens (Pre) av *P. perurans* ved hvert uttak 19, 25, 27 og 32 dager etter smitte (des). N = 10/tank 19des, N = 2/tank 25 des, N = 10/tank 27 des, og N = 20/tank 32 des.

	19 des			25 des			27 des			32 des		
	Ct-verdi		Pre	Ct-verdi		Pre	Ct-verdi		Pre	Ct-verdi		Pre
	Gsn	Range	%	Gsn	Range	%	Gsn	Range	%	Gsn	Range	%
V.spl.H2O	35.9	35.9 – 35.9	10	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
H2O/16Pp	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	neg	0
V.spl. ST19	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
ST19/15Pp	27.7	19.5 – 37.7.	100	30.4	30.4 – 30.4	50	31.5	28.4 – 34.6	70	Neg	Neg	0
V.spl.	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
NM-H2O	34.9	33.6 – 36.2	40	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
NM-ST19	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
MYA	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0

Som tabellen viser, var det kun klon ST19/15Pp dyrket i «normalt medium», som klarte å etablere infeksjon på gjellene hos laks i smitteforsøket, men ved siste uttak (32 des) så var også fisken i dette karet negativ for tilstedeværelse av *P. perurans*.

Nytt smitteforsøk gjennomført høsten 2021

Smitteforsøk, for testing av bakteriers påvirkning på virulensen til kloner av P. perurans.

Målet med smitteforsøket høsten 2021 var å testes om det er mulig å reversere prosessen, dvs ved tilføre bakteriemedium fra høyvirulent klon til H2O/16Pp klonen, dvs som i forsøket høsten 2020 ikke var i stand til å etablere infeksjon på laksegjeller.

Basert på tidligere smitteforsøk gjennomført på dette prosjektet ble følgende oppsett valgt for ny testing av bakteriers betydning for virulens til kloner av *P. perurans* (**Figur 3**).

Kar 1. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med høyvirulent klon (H02/13Pp) av *P. perurans* (testet i pilotforsøk høsten 2021) (5000 amøber/liter) dyrket på ren kultur av *Vibrio splendidus*. (Kode: **HV-Vspl**)

Kar 2. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med høyvirulent klon (H02/13Pp) av *P. perurans* (testet i pilotforsøk høsten 2021) (5000 amøber/liter) dyrket i det opprinnelige bakteriemediet (bakterier som fulgte med ved isolasjon av amøben fra gjellene) (Kode: **HV-HVBM**).

Kar 3. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med lav-virulent klon (H2O/16Pp) av *P. perurans* (5000 amøber/ liter) dyrket i det opprinnelige bakteriemediet ((bakterier som fulgte med ved isolasjon av amøben fra gjellene). Denne klonen ble også benyttet i smitteforsøket høsten 2020 og var da ikke i stand til å etablere infeksjon på gjellene til laks (dose: 1000 amøber/liter) (Kode: **LV-LVBM**).

Kar 4. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med lav-virulent klon (H20/16Pp) av *P. perurans* (5000 amøber/ liter) dyrket i medium fra høyvirulent klon (H02/13Pp) (samme mikrobiota som blir benyttet i kar 2) (Kode: **LV-HVBM**).

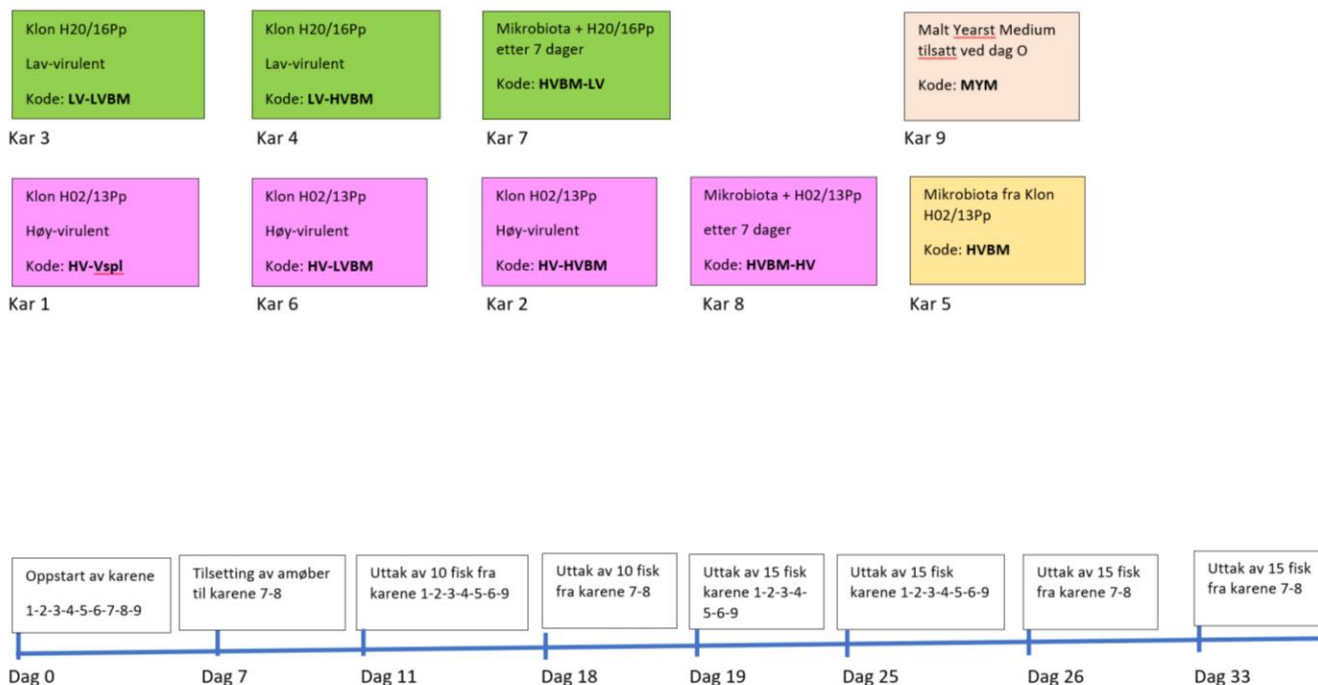
Kar 5. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med bakteriemediet fra høyvirulent klon (H02/13Pp) (amøbefritt med tilsvarende mengde bakterier som blir benyttet i kar 2) (Kode: **HVBM**).

Kar 6. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med høyvirulent klon (H02/13Pp) av *P. perurans* (5000 amøber/liter) dyrket i medium fra lav-virulent klon (H20/16Pp) (samme mikrobiota som benyttes i kar 3) (Kode: **HV-LVBM**).

Kar 7. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med bakteriemediet fra høyvirulent klon (H02/13Pp) (amøbefritt med tilsvarende mengde bakterier som i kar 2). Tilsetning av *P. perurans*, lav-virulent klon (H20/16Pp) uten medfølgende bakterier, 7 dager senere (Kode: **HVBM-LV**).

Kar 8. Smitte av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) med bakteriemediet fra høyvirulent klon (H02/13Pp) (amøbefritt med tilsvarende mengde bakterier som i kar 2). Tilsetning av *P. perurans*, høy-virulent klon (H02/13Pp) uten medfølgende bakterier, 7 dager senere (Kode: **HVBM-HV**).

Kar 9. Eksponering av 40 laksesmolt (*Salmo salar*) for bakterie- og amøbe-fritt medium (Malt Yeast Medium, Nylund et al. 2018) (Kode: **MYM**).

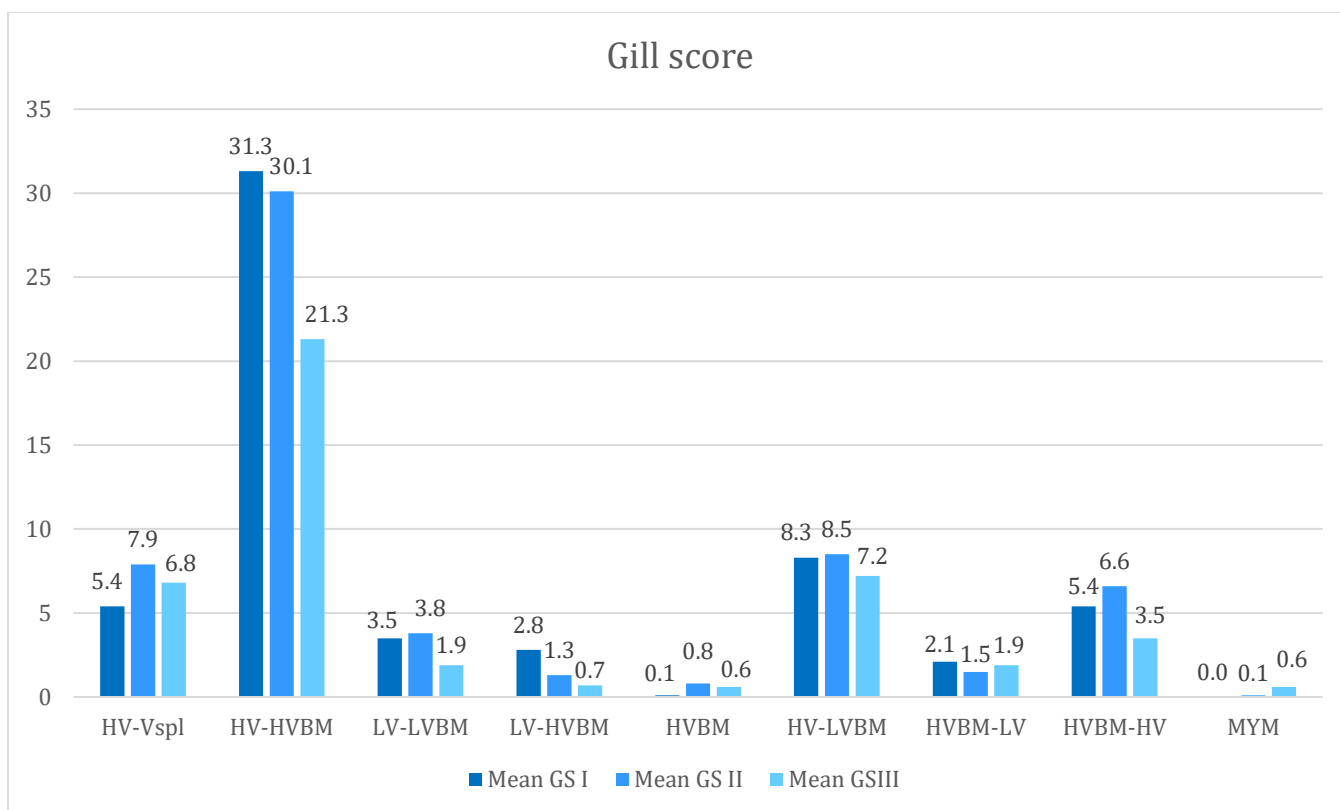


Figur 3. Grafisk fremstilling av forsøksoppsett. Temperaturen i forsøket ble holdt på 16 °C og saliniteten var 34 ‰. Fisk fra karene 7 og 8 ble tatt ut henholdsvis 11, 19 og 25 dager etter at *P. perurans* ble tilsatt disse karene ved dag 7.

5. OPPNÅDDE RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON

Resultater av smitteforsøk gjennomført høsten 2021.

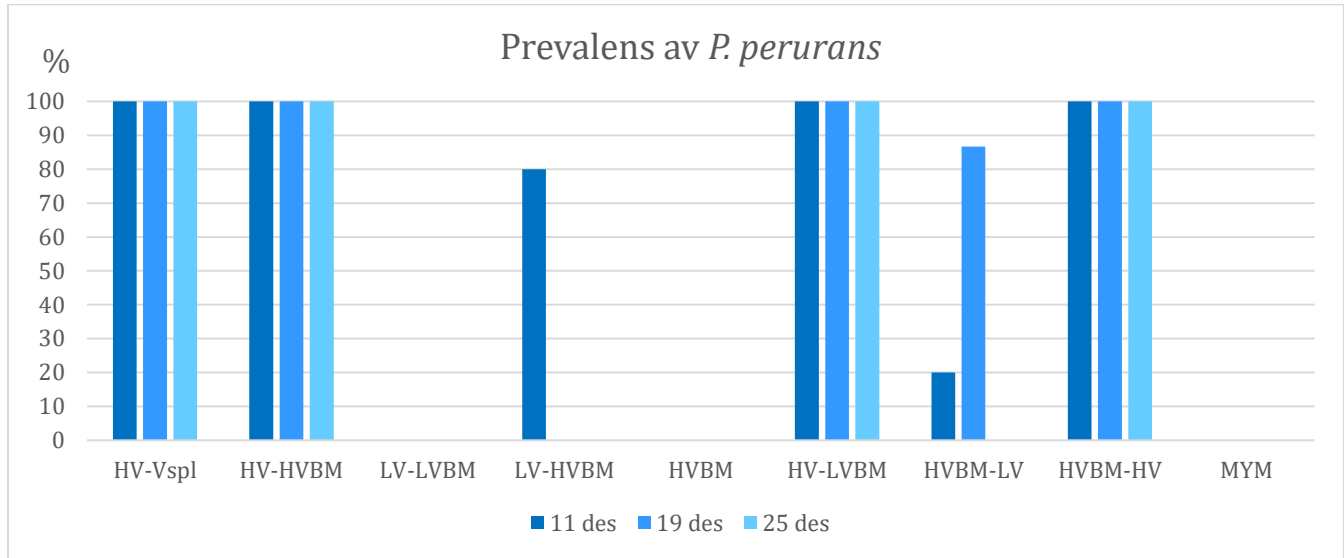
Det ble observert gjellescore i alle laksegruppene, men gruppen som kun ble eksponert for bakterier fra dyrkingsmediet til den høyvirulente klonen (**MVBM**) og gruppen som kun ble eksponert for mediet med Malt Yeast (**MYM**) hadde en gjellescore som en ofte finner hos frisk laks uten tilstedeværelse av amøber (**Figur 4**). Gruppene (**HV-Vspl**, **HV-HVBM**, **HV-LVBM**, **HVBM-HV**) som ble smittet med høyvirulent klon (H02/13Pp) av *P. perurans* hadde også høyest GS, hvor fiskegruppen smittet med høy-virulent klon dyrket i opprinnelig bakteriemedium (**HV-HVBM**) hadde en signifikant høyere GS enn de andre gruppene. GS i gruppene (**LV-LVBM**, **LV-HVBM**, **HVBM-LV**) smittet med den ikke-virulente klonen (H20/16Pp) hadde høyere GS enn de to kontroll gruppene, men signifikant lavere enn gruppene smittet med H02/13Pp. Det var ikke en signifikant forskjell i GS mellom gruppene smittet med H20/16Pp.



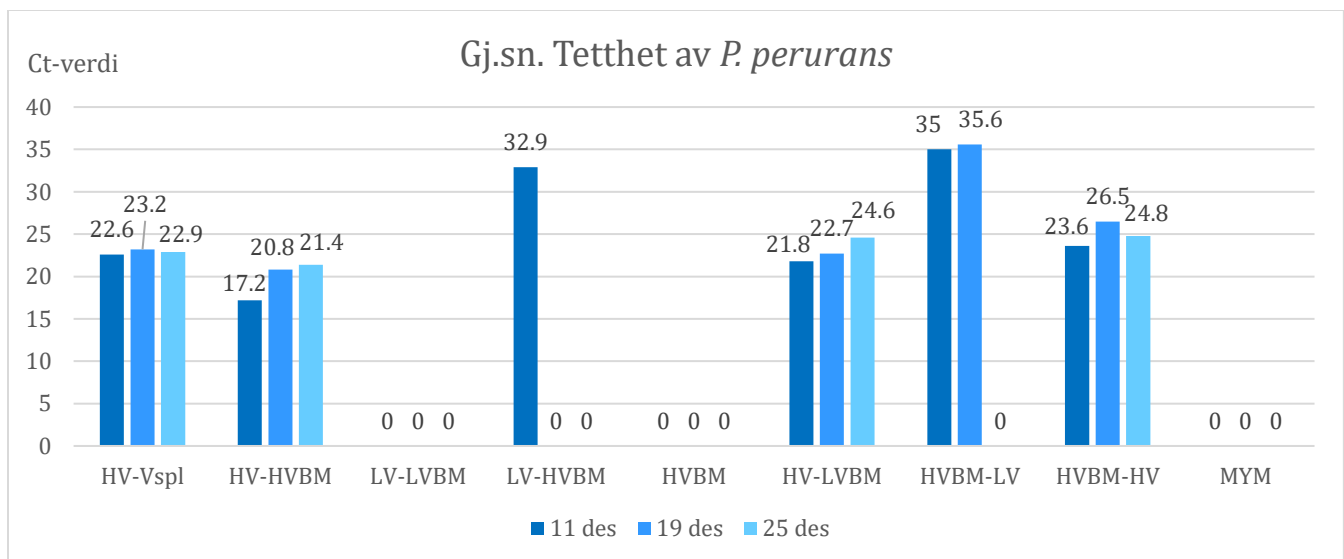
Figur 4. Gjellescore (GS) hos laks i all ni gruppene ved tre uttak: **GS I** = 11 dager etter smitte (des) med *P. perurans*, **GS II** = 19 des med *P. perurans*, **GS III** = 25 des med *P. perurans*. GS er oppgitt som prosent av maksimal GS.

Real time RT PCR analyser alle fisker fra de ni forsøksgruppene viste 100 % prevalens, gjennom hele forsøksperioden, i gruppene (**HV-Vspl**, **HV-HVBM**, **HV-LVBM**, **HVBM-HV**) smittet med H02/13Pp

(Figur 5). I gruppene (LV-LVBM, LV-HVBM, HVBM-LV) smittet med H20/16Pp ble det kun observert positive individer i de to gruppene som var tilsatt bakteriemedium fra høyvirulent klon (H02/13Pp). I siste uttak, 25 des, var alle disse gruppene negative for tilstedeværelse av *P. perurans*. Tilsetning av bakterier fra høy-virulent klon (HVBM) økte *P. perurans* mulighet til å etablere infeksjon på laksegjellene, med denne infeksjonen ble ikke permanent. En av årsakene til dette kan være at det ikke ble benyttet lang nok tid til å tilvenne *P. perurans* fra klon H20/16Pp til bakteriemediet fra høyvirulent klon i forkant av forsøket.



Figur 5. Prevalens av *P. perurans* i alle forsøksgruppene ved uttak etter 11, 19 og 25 dager etter smitte (des).



Figur 6. Den gjennomsnittlige tetthet av *P. perurans* angitt ved gjennomsnittlig Ct-verdi, i de enkelte gruppe ved de tre uttaks tidspunktene.

Det er videre klart at dyrking av H02/13Pp i bakteriemedium (LVBM) fra H20/16Pp og *Vibrio splendidus* (V.spl.) hadde en negativ effekt på tettheten av *P. perurans* på gjellene hos laks (**Figur 6**). Reduksjon i tetthet er imidlertid betydelig mindre enn hva en skulle forvente ut fra observert gjelle score (GS). Det kan derfor synes som om antallet amøber ikke er av sentral betydning for GS i dette forsøket, men at bakteriemediet som fulgte med den høy-virulente klon (H02/13Pp) har vært av betydning for utvikling av GS. Dette stemmer med tidligere observasjon fra smitteforsøk utført på dette prosjektet, dvs at tetthet av *P. perurans* ikke alltid er relatert til GS (eller gjellepatologi) (se **Figur 2**). Det synes rimelig klar at det som gir GS og gjellepatologi er en kombinasjon av *P. perurans* og mikrobiota til stede på gjellene.

Konklusjon

Ved å endre mikrobiotasammensetningen i dyrkingsmediet eller på gjellene hos laks så er det mulig å endre virulens til kloner av *P. perurans*. Forklaringen på hvorfor enkelte kloner taper virulens i forbindelse med dyrking over tid synes derfor å være knyttet til sammensetningen av bakterier i dyrkingsmediene. Det som gjenstår, er å identifisere hvilke bakterier/bakteriearter som er medvirkende årsak til at kloner av *P. perurans* fører til AGD med påfølgende dødelighet.

6. HOVEDFUNN

- *P. perurans* kan dyrkes in en ren kultur av en *Vibrio splendidus* variant og vokser i samme tempo som i den opprinnelige blandede kulturen.
- *P. perurans* dyrket på renkultur av *V. splendidus* var mindre virulent på gjellene hos laks (dvs lave GS/patologi).
- *P. perurans* dyrket i det originale blandingsmediet etablerer infeksjoner på gjellene hos laks og gir GS, men denne egenskapen kan gå tapt etter endringer i mikrobiotasamfunnet i kulturene.
- Tap av virulens, hos kloner av *P. perurans*, etter gjentatte passasjer skyldes sannsynligvis tap av bestemte bakteriearter i mediet.

7. LEVERANSER

Dyrking av *P. perurans* på renkultur av *Vibrio splendidus* fører til at amøben ikke klarer å etablere infeksjon på gjellene hos laks i motsetning til dyrking i et medium med blandet mikrobiota.

Endringer i mikrobiota vil påvirke *P. perurans* evne til å forårsake AGD.

«Faglig sluttrapport» etter retningslinjene til FHF (17.12.2021).

Rapporter

Framdriftsrapport datert 29.06.2015 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2015 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 31.12.2015 for arbeidspakke III fra prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 30.06.2016 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 30.06.2016 for arbeidspakke I fra prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2016 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 30.06.2017 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2017 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 15.06.2018 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 26.06.2019 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 20.12.2019 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 30.06.2020 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 20.12.2020 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 25.06.2021 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 17.12.2021 for prosjektet (FHF: 901053).

Publikasjoner fra prosjektet: 901053

Dahle OM (2015). Experimental infections with *Paramoeba perurans* and AGD development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). Are there host and *P. perurans* strain-related differences in infectivity and virulence? Master Thesis in Aquamedicine, University of Bergen, June 2015. Pp 1 - 69.

Røed M (2016). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og AGD utvikling hos Atlantisk laks (*Salmo salar*, L). En komparativ studie av virulens hos klonede isolater av *P. perurans*. Masteroppgave i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Kindt M (2017). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og utvikling av amøbisk gjellesykdom hos Atlantisk laks (*Salmo salar*, L). Påvirker vanntemperaturen virulensen

Nylund A, Pistone D, Trösse C, Blindheim S, Andersen L, Plarre H (2018). Genotyping av *Candidatus* *Syngnamydia salmonis* (Chlamydiales; Simkaniaceae) co-cultured in *Paramoeba perurans* (Amoebozoa; Paramoebidae). Arch Microbiol <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1488-0> (E-pub: Oct 2017).

Steigen A, Nylund A, Plarre H, Watanabe K, Karlsbakk E, Brevik Ø (2018). Gill associated Chlamydiae in five wrasse species in western Norway. Dis Aquat Org 128: 21-35.

Trösse C, Kindt MM, Blindheim S, Andersen L, Nylund A (2020). Method for cryopreservation of *Paramoeba perurans*. J Fish Dis. DOI: 10.1111/jfd.13295

Dahle OMV, Blindheim SH, Nylund A, Karlsbakk E, Breck O, Glosvik H, Andersen L (2020) Atlantic salmon *Salmo salar* and ballan wrasse *Labrus bergylta* display different susceptibility to clonal strains of *Paramoeba perurans*. Dis Aquat Org 140:55-72. <https://doi.org/10.3354/dao03483>.

Nylund A, Røed M, Blindheim S, Trösse C, Andersen L (2021). Experimental challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using clones of *Paramoeba perurans*, *P. pemaquidensis* and *Tetramitus* sp. Dis Aquat Org 145: 1 – 13. <https://doi.org/10.3354/dao03597>

Pernille L. Lyng (2021) *Paramoeba perurans* and AGD in Norwegian aquaculture: effect of freshwater treatment against AGD on gill health in commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and experimental testing of virulence of *Paramoeba perurans*. Master thesis, University of Bergen.

Blindheim S, Andersen L, Trösse C, Karlsbakk E, Nylund A (submitted). Phenotypic characterization of *Paramoeba perurans* clones obtained from different populations of Atlantic salmon *Salmo salar* L. and Ballan wrasse *Labrus bergylta*.