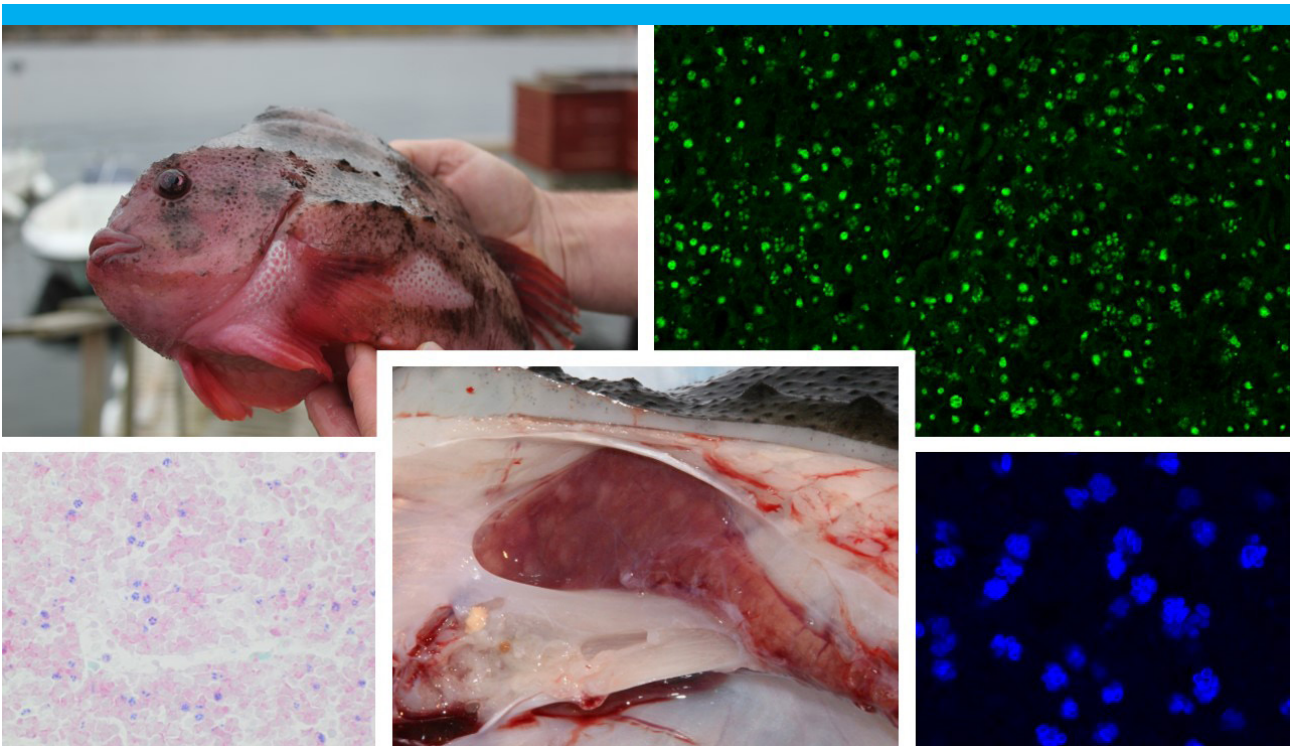


# Infeksjoner med parasitten *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) i rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*



# Infeksjoner med parasitten *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) i rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*.

## Innhold

Sammendrag .....	3
Summary .....	4
Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov.....	5
Bakgrunn.....	6
Materiale og metode.....	7
Prøvetaking og fisk .....	7
Fisk og lokaliteter .....	7
Disseksjon og prøvetaking .....	8
Etablering av smittet og usmittet fiskegruppe til studier av fisk fra rogn til oppdrett .....	8
Prøveopparbeiding, metoder, metodeutvikling og analyser .....	9
Screening vha. Real-time PCR.....	9
Standard histologiske metoder og normalhistologi hos rognkjeks (M. Sc.- thesis 3) .....	9
Fargemetoder for påvisning av mikrosporidier og <i>Nucleospora cyclopteri</i> . .....	9
Analyser av skottelus, <i>Caligus elongatus</i> som mulig vert for <i>Nucleospora cyclopteri</i> .....	11
Prosjektgjennomføring og personell involvert .....	12
Resultater og diskusjon.....	13
Kartlegging og påvisning <i>Nucleospora cyclopteri</i> og andre agens i vill og oppdrettet rognkjeks .....	13
Optimal prøvetaking for påvisning av <i>Nucleospora cyclopteri</i> (M. Sc.-thesis 1) .....	13
Kartlegging av <i>Nucleospora cyclopteri</i> og andre agens i rognkjeks (M. Sc. - thesis 2 og andre prøver)....	16
Kartlegging av <i>Nucleospora cyclopteri</i> i oppdrettsfisk fra rogn til utsett (yngelfasen).....	20
Kartlegging av <i>Nucleospora cyclopteri</i> i rognkjeks fra merd.....	20
Smitteveier for <i>Nucleospora cyclopteri</i> .....	21
Normalhistologi hos klinisk frisk rognkjeks (M. Sc.-thesis 3).....	22
Fargemetoder for påvisning av <i>Nucleospora cyclopteri</i> testet og utviklet i prosjektet .....	23
Standard fargemetodikk brukt i prosjektet .....	23
Utvikling og bruk av in situ hybridiseringsmetodikk for påvisning av <i>Nucleospora cyclopteri</i> .....	24
Klinisk betydning av infeksjoner med <i>Nucleospora cyclopteri</i> .....	26
Presentasjoner og publikasjoner som er levert eller planlagt å leveres fra prosjektet .....	28
Liste over figurer .....	29
Referanser .....	30

### Forfattere

Haakon Hansen, Even Thoen, Marta Alarcón,  
Magnus Devold, Oda Klingenberg, Kathrine  
Nilsen, Benedicte Warland, Turhan Markussen,  
Randi Faller, Saima N. Mohammad, Tore  
Seternes, Simon Welii, Egil Karlsbakk

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2019

### Oppdragsgiver

Fiskeri- og havbruksnæringens  
forskningsfinansiering (FHF),  
FHF prosjektnummer: 901320

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Egil Karlsbakk, Haakon Hansen,  
Even Thoen, Marta Alarcón

Øverst, venstre: rognkjeks, øverst, høyre:  
*Nucleospora cyclopteri* farget med FISH, nederst,  
venstre: *N. cyclopteri* farget med Gram-Twort,  
nederst, midten: svulne nyrer hos rognkjeks,  
nederst, høyre: *N. cyclopteri* farget med calco-  
fluor-white.

## Sammendrag

Parasitten *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) er en av mange parasittiske agens som infiserer rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Den har flere ganger forårsaket sykdom og dødelighet hos rognkjeks i oppdrett, men er også alminnelig forekommende i frisk fisk. Betydningen av infeksjoner med denne parasitten er derfor uklar og den forekommer ofte også sammen med flere andre agens. Sykdom hos rognkjeks, kan resultere i nedsatt helse og appetitt og påvirke rognkjeksens evne som lusespiser. Det er derfor viktig med kunnskap om de forskjellige agens som infiserer rognkjeks for å kunne si noe om betydningen for fiskens helse.

Dette prosjektet hadde som hovedmål å identifisere hvordan man kunne sikre en populasjon av rognkjeks i landanlegg som var fri for smitte med *N. cyclopteri* og å finne ut hvilken betydning parasitten har for helsen til rognkjeks og dermed på fiskens effekt som lusespiser. Prosjektet hadde derfor som mål å kartlegge *N. cyclopteri* og andre agens i stamfisk, rogn/melke, yngel og rognkjeks i merd, skulle studere mulige smitteveier for parasitten, og skulle kartlegge den kliniske betydningen av parasitten.

Det lyktes ikke å eksperimentelt indukere vertikal smitte og dermed følge en gruppe rognkjeks smittet med *N. cyclopteri* fra yngel eller etter sjøsetting. Det var dermed ikke mulig å studere patogenese, smittedynamikk, eller om *Nucleospora*-infeksjon pre-disponerer for andre infeksjoner. Ko-infeksjoner, optimal prøvetaking og vevstropisme hos villfanget rognkjeks ble undersøkt. *Nucleospora cyclopteri* forekom i 60% av voksen vill rognkjeks fra områdene rundt Averøy, Nordmøre. Disse fiskene ble analysert for en rekke agens (virus, bakterier og parasitter) som er alminnelige i andre fiskearter eller påvist i rognkjeks i oppdrett, men ingen viktige patogener ble påvist. Noen antatt lite patogene mikroparasitter var derimot vanlige, deriblant *Kudoa islandica* (Myxozoa) i muskulatur og koksidier i tarmen.

*Nucleospora cyclopteri* ble påvist i alle undersøkte vev: for-, midt- og baknyre, milt, hjerte, gjeller, hjerne, muskel, lever og blod, noe som tilsier at infeksjonen er systemisk. Mengden av *N. cyclopteri* var høyest i hodenyre, fulgt av midt- og baknyre, milt, hjerte og gjeller. Parasitten viste høyest prevalens i hjertets ventrikkel. Det ble gjort observasjoner som tyder på at parasitten frigjøres fra infiserte fisk gjennom urin og galle.

Resultatene viser at parasitten kan påvises ved svabring av hud, gjellebiopser og blodprøver, noe som kan gi mulighet for å påvise parasitten uten å ta livet av fisken. Et problem kan være kontaminering, hvis en har holdt fisk i kar sammen med parasittfrigjørende vertsindivider (sheddere).

Gjennom prosjektet ble det laget en bildedatabase for normalhistologi og patologiske agens som vil være åpent tilgjengelig. En slik bildedatabase vil være viktig for diagnostikere og forskere når de skal vurdere patologiske funn hos rognkjeks.

Resultatene fra dette prosjektet tilsier ikke at vertikal smitte er en dominerende smittevei, men det kan ikke utelukkes. Uansett bør det være naturlig å følge «føre var-prinsippet» og unngå bruk av positive individer til stamfisk.

I og med at *N. cyclopteri* utvilsomt ødelegger leukocytter i til dels høyt antall og i store områder, mener vi det er naturlig å tro at parasitten har en påvirkning på fiskens immunkompetanse.

## Summary

*Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) is one of many parasites infecting lumpfish, *Cyclopterus lumpus*, and has been shown to cause disease and mortality in lumpfish. Infections in fish are often multifactorial and the impact of one agent on the development of disease can be difficult to elucidate. In addition to mortality, infections in lumpfish can lead to diseases with subsequently lowered appetite. This is of particular importance since lumpfish are used as a biological control agent, eating salmon lice, *Lepeophtherius salmonis*, off the salmon. Knowledge on the different disease agents of lumpfish is therefore of utmost importance.

The main aim of this project was to identify how to obtain an infection-free lumpfish in land-based hatcheries and to study the impact that *N. cyclopteri* has on the health of the lumpfish and thereby its effect as a biological control agent. The project therefore aimed to map the presence of *N. cyclopteri* and other disease agents in wild caught lumpfish and in eggs/sperm, in fry and in farmed lumpfish stocked in the sea. In addition, we wanted to study the transmission pathways and clinical significance of the parasite.

Unfortunately, we were not able to obtain a group of lumpfish fry infected with *N. cyclopteri* that we intended to follow through the land phase. The study of pathogenesis, infection dynamics, or whether an infection with *N. cyclopteri* pre-disposes for secondary infections, was therefore abandoned.

We studied the presence of co-infections, methods for optimal sampling and tissue tropism in wild caught lumpfish in this project. *Nucleospora cyclopteri* was present in 60% of the sampled individuals from the waters around Averøy, in county Møre og Romsdal. The fish were analysed with regard to a range of infectious agents (viruses, bacteria and parasites) commonly found in other fish species, or previously recorded in lumpfish. No viral agents or other important pathogens were detected, but supposedly non-pathogenic microparasites, like *Kudoa islandica* (Myxozoa) in the muscle tissue and coccidians in the intestine, were frequently found.

*Nucleospora cyclopteri* was detected in all tissues examined: anterior, mid and posterior kidney, spleen, heart, gills, brain, muscle liver and blood, thus indicating that the infection is systemic. The density of *N. cyclopteri* was highest in the anterior kidney, followed by mid and posterior kidney, spleen and gills, while the prevalence was highest in the ventricle of the heart. Observations from this study indicate that the parasite is released through urine and bile.

We also show that *N. cyclopteri* can be detected using swabs from the skin, gill and vent, and by blood samples and gill biopsies, thus demonstrating the possibility of non-lethal detection of *N. cyclopteri* in lumpfish. Amongst these, the most promising non-lethal samples for detection were gill biopsies and leukocyte fractions from blood samples.

Images normal histology and pathological agents from this project is included in an openly available online image database. This image database can be accessed by diagnosticians and researchers and used when evaluating pathological findings in lumpfish.

While vertical transmission cannot be excluded, the results from this project indicate that this is not the dominant route. It is in any case advisable to routinely screen broodfish for *N. cyclopteri* to avoid using positive individuals for the production of eggs and fry.

Given that *N. cyclopteri* undoubtedly destroys leukocytes in high numbers and over large areas of tissue, it is reasonable to assume that the parasite has an effect on the immune competence of the fish.

## Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov

### Hovedfunn

- 60% av villfanget voksen rognkjeks var positive for *Nucleospora cyclopteri*.
- Vertikal smitte er sannsynligvis ikke en dominerende smittevei for *Nucleospora cyclopteri*, men kan ikke utelukkes.
- Resultatene tyder ikke på at skottelus, *Caligus elongatus*, er vert for *N. cyclopteri*.
- Enkelte rognkjeks kan ha store mengder parasitter i hematopoietisk vev uten tydelig patologi.
- Dagens metoder brukt i rutinediagnostikk er ikke sensitive nok til effektiv påvisning av infeksjoner med *Nucleospora cyclopteri*
- *In situ* hybridiseringsmetodikk, og da spesielt ved bruk av fluorescerende LNA-modifiserte oligonukleotidprober, er et effektivt verktøy til bruk i diagnostikken og i studier av vevstropisme.
- Svaber- og blodprøver og gjellebiopsier er mulige å benytte som ikke-letale påvisningsmetoder for *Nucleospora cyclopteri*.

### Anbefalinger

- Det anbefales å fortsette med screening av villfanget stamfisk slik at positive individer ikke benyttes i yngelproduksjon.
- Metodikken for rutinediagnostikk bør utvikles videre slik at infeksjoner med *Nucleospora cyclopteri* påvises.

### Kunnskapsbehov

- Hva er triggere for klinisk nucleosporose?
- Etablering av *in vitro* kultur for *Nucleospora cyclopteri*.
- Etablering av en smittemodell for *Nucleospora cyclopteri* for å kunne studere
  - smittedynamikk
  - immunologiske effekter
- Studier av smittetidspunkt i sjø.
- Kvantitative studier av ko-infeksjoner hos fisk med klinisk nucleosporose.



## Bakgrunn

Rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, har i de siste årene blitt en svært viktig art som rensefisk for lakselus i oppdrett, men rognkjeks selv har vist seg å være infisert av en rekke sykdomsagens [1]. Kunnskap om sykdomsagens (parasitter, bakterier og virus) generelt er avgjørende kunnskap ved utvikling av oppdrett av nye arter slik som rognkjeks. Vekst og bærekraft er avhengig av kontroll av sykdommer, og erfaringer fra oppdrett av laksefisk viser at de største miljøproblemene er knyttet til overføring av parasitter og andre sykdomsagens mellom vill og oppdrettet fisk. I dag, når oppdrett av rognkjeks baseres på villfanget stamfisk er det viktig å etablere en grunnleggende kunnskap om parasittær smittestatus hos vill og oppdrettet rognkjeks, da denne kunnskapen er mangelfull [2, 3]. En grunnleggende kjennskap til smittestatus er viktig i forhold til vurderinger av hva som er årsak til sykdom og dødelighet, hva som er risikoen ved bruk av villfanget stamfisk, om hvordan smittedynamikken er i merd, for diagnostikken, og for smitteinteraksjon mellom villfisk og oppdrettsfisk.

I en case-studie fra Norge [4] viste det seg at flere arter parasitter, blant annet mikrosporidien *Nucleospora cyclopteri*, kan være et stort sykdomsproblem og føre til dødelighet hos rognkjeks i oppdrett. Denne parasitten ble første gang observert i oppdrett av rognkjeks i Canada, hvor de syke og døende fiskene hadde ekstremt svulne nyrer og var anemiske [5, 6]. Ville populasjoner er naturlige reservoarer for parasitter som kan smitte til oppdrettsfisk i åpne merder og forårsake sykdom der, og det er et behov for økt kunnskap om mulig smitteoverføring av agens mellom vill og oppdrettet rognkjeks og fra rognkjeks til laksefisk og omvendt. I tillegg til direkte mortalitet som følge av sykdom så kan infeksjoner i rognkjeks gi generelt nedsatt helse og appetitt, noe som igjen kan påvirke rognkjeksens evne som lusespiser.

*Nucleospora cyclopteri* ble første gang påvist i vill rognkjeks fra Hordaland i mai 2004 og i oppdrettet rognkjeks fra nord-Norge i 2015 [1, 4]. Den er fra før påvist på Island [7], på østkysten av Canada [5, 6] og i Storbritannia. *Nucleospora*-artene er viktige patogener i oppdrettet fisk. En ubeskrevet art, *Nucleospora* sp., er satt i forbindelse med dødelighet hos kveiteyngel i Norge [8], og *Nucleospora salmonis* med kronisk dødelighet hos 8 arter laksefisk i nord- og Sør-Amerika og i deler av Europa (ikke i Norge). *Nucleospora salmonis* er best studert, og forårsaker en leukemi-lignende tilstand hos noen arter stillehavslaks (*Onchorhynchus* spp.), med voldsom oppformering av en type umodne hvite blodceller (lymfoblastose) og for øvrig anemi [9, 10, 11]. Det er det store antallet lymfoblast-lignende hvite blodceller som kan forårsake svulne nyrer. *Nucleospora cyclopteri* er flere ganger funnet hos villfanget rognkjeks langs norskekysten, men prevalensen både i oppdrett og hos villfisk er ukjent. På Island ble den imidlertid påvist hos nesten 100 % av undersøkte villfangede store rognkjeks. Også denne parasitten utvikler seg inne i kjernene til noen typer hvite blodlegemer, vanligvis identifisert som lymfocytter eller lymfoblaster. De parasiterte cellene forekommer systemisk i fisken, men særlig i nyrene som kan bli voldsomt oppsvulmet (renomegali) [7]. Histopatologisk sees områder dominert av disse cellene, som enten har parasittforstadier i kjernene eller 4-8 sporer. En kan ved sporeopptreden se nekrotiske områder, med frie sporer og fagocytter med sporer i cytoplasma. Alle påvisninger i oppdrettet rognkjeks (Canada, Norge, Storbritannia) har vært i forbindelse med lignende klinikk og indre forandringer, og alltid med kronisk dødelighet.

Livssyklusen til *N. cyclopteri* er ukjent, men de fleste mikrosporidier som finnes i akvatisk miljø har direkte syklus. Den beslektede *N. salmonis* smitter ved kohabitering og ved spising av smittet vev [12] og dette kan også gjelde for *N. cyclopteri*. Mikrosporidien *Desmozoon lepeophtherii* (syn. *Paranucleospora theridion*) som infiserer laks har imidlertid en komplisert livssyklus med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) som hovedvert [13]. Det kan vise seg at flere mikrosporidier i denne gruppen (Enterocytozoonidae) har kompliserte to-verts livssykluser [7, 14]. Skottelus, *Caligus elongatus*, som er svært vanlig forekommende på rognkjeks, har vist seg å bestå av to forskjellige genotyper [15], og den ene av disse har rognkjeks som sin viktigste vert. Det er blitt spekulert på at denne kan være vert for *N. cyclopteri* [7].

Det er også usikkert om *N. cyclopteri* smitter vertikalt. Flere varianter av den beslektede *N. salmonis* har dukket opp blant laksefisk i oppdrett i Chile og noen av disse variantene er kanadiske, sannsynligvis

importert med egg til Chile fra Canada [16]. En form for vertikal smitte synes derfor å kunne skje. Hos rognkjeks er parasitten påvist i sperm, egg og rognvæske fra smittede foreldrefisk [17, 18] og det er observert at yngelgrupper med opphav i gameter fra smittede foreldrefisk har vært positive for parasitten (Kui 2017). *Nucleospora cyclopteri* antas å være vertsspesifikk for rognkjeks. Det synes nå svært usannsynlig at parasitten kan smitte laks (Alarcon et al. 2016, Johansen et al. 2016; Marcos-Lopez et al. 2016).

Produksjonen av oppdrettet rognkjeks i Norge hadde økt kraftig de siste årene frem til prosjektet ble igangsatt (ca 3,5 millioner fisk i 2014 til nesten 12 millioner i 2015) og det har vært en stor økning siden (over 30 millioner i 2017)[19]. En slik økning må forventes å følges av nye sykdomsproblemer, og ett av de viktigste tiltakene for å redusere risiko for sykdom vil være å bruke kun oppdrettet, vaksinert rognkjeks. Men, for de fleste patogener, og spesielt for parasitter, så finnes det ikke vaksiner og de er antatt å være vanskelige å utvikle.

Hittil har det altså vært brukt villfanget stamfisk for produksjon av rognkjeks, men det er anbefalt å benytte oppdrettet stamfisk i fremtiden. Det er startet avlsarbeid på rognkjeks og det er et mål å bli uavhengig av villfanget stamfisk. *Nucleospora cyclopteri* har imidlertid vist seg å være en vanlig forekommende parasitt i nyrer fra vill stamfisk og ved dette prosjektets oppstart var det også rapportert at parasitten var vanlig å påvise i egg og rognvæske, og hos yngel i landanlegg. Uansett infeksjonsbakgrunn, så vil rognkjeks i åpne merder kunne bli infisert av parasitter fra miljøet rundt og kunne utvikle sykdom. Det er derfor et stort behov for økt kunnskap om hvilken betydning *N. cyclopteri* har for rognkjeks.

Basert på den kunnskapen som var kjent ved prosjektstart hadde vi som hovedmål å 1) identifisere hvordan man kunne sikre en populasjon av rognkjeks i landanlegg som var fri for smitte med *N. cyclopteri* og 2) finne ut hvilken betydning parasitten har for helsen til rognkjeks og dermed på fiskens effekt som lusespiser. For å studere dette ble prosjektet inndelt i deler som henholdsvis som skulle a) kartlegge *N. cyclopteri* i villfanget i stamfisk, rogn/melke, yngel og rognkjeks i merd, b) studere mulige smitteveier for parasitten, og c) kartlegge den kliniske betydningen av parasitten.

Kartlegging og screening er avhengig av gode metoder for prøveuttak og det ble derfor gjennomført en mastergrads-studie som fokuserte på optimal prøvetaking. For å si noe om betydningen til *N. cyclopteri* må man også vite status for andre infeksjoner. Det ble derfor også gjennomført en mastergrads-studie av ko-infeksjoner i villfanget rognkjeks. For å studere betydningen av infeksjoner i vev er kjennskap normalhistologien til en art viktig. Vi kartla derfor normalhistologien til rognkjeks gjennom et tredje mastergradsstudie, studerte vevsprøver med standard diagnostiske metoder og utviklet to separate *in situ* hybridiseringsprotokoller for spesifikk påvisning av *N. cyclopteri*.

## Materiale og metode

### Prøvetaking og fisk

#### *Fisk og lokaliteter*

Fisken tatt ut som forsøksfisk i dette prosjektet kom fra én settefisklokalitet og én sjølokalitet i Møre og Romsdal, én sjølokalitet i Rogaland og fra Akvaplan Niva's settefisklokalitet, Kraknes, Tromsø (kun uttak til normalhistologi). Villfisk fanget i garn fra havområdene rundt Averøy, Møre og Romsdal, ble kjøpt fra yrkesfiskere og levert på Skjerneset Fisk, Ekkilsøy, Møre og Romsdal. Alle uttak av fisk ble gjort mellom juni 2017 - mars 2019.

Den ville rognkjeks fra Averøy-området var voksen gytefisk. Disse ble oppbevart i tanker (500 l) med vanngjennomstrømning på Skjerneset Fisk, Ekkilsøy (Figur 1) inntil de ble avlivet, dissekert, undersøkt og prøvetatt (se under). Yngel og større fisk fra settefiskanlegget ble samlet med håv og avlivet før de ble prøvetatt og prøvene fiksert i enten EtOH eller RNA-later til molekylærbiologiske analyser eller i 10%

bufret formalin til histologiske analyser. Prøver ble enten sendt til Veterinærinstituttet eller til PatoGen AS for videre analyse. Generelt ble større hel fisk større først snittet med en skalpell i buken for å bedre inntrenging av fikseringsmedium.



Figur 1. Holdetanker for rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, ved Skjerneset fisk, Møre og Romsdal

Fisk fra Akvaplan Niva ble avlivet med en overdose Finquel vet. «Scan Aqua», pulver til bad, før fiksering i egnet medium og senere undersøkelse ved Universitetet i Tromsø (se under).

Se flere detaljer under og i masteroppgaver for uttak til hver av delstudiene.

#### *Disseksjon og prøvetaking*

##### Uttak til studier av optimal prøvetaking (M.Sc.-thesis 1)

Det ble tatt prøver fra totalt 41 voksne rognkjeks til masteroppgaven som omhandlet optimal prøvetaking. Vevsprøver for RNA ekstraksjon ble tatt fra fram-, midt- og baknyre, milt, lever, hjerte, hjerne, muskulatur og gjeller. Det ble også tatt prøver av sentrifugat fra galle og urin, helblod, blod og hvite blodceller fra separert blod. Det ble tatt seks forskjellige svaberprøver fra overflaten av fiskene [20].

##### Uttak til studier av ko-infeksjoner (M. Sc.- thesis 2)

Det ble tatt prøver fra totalt 85 voksne rognkjeks til masteroppgaven som omhandlet ko-infeksjoner. Det ble podet til blodagar med salt fra hodenyren (i framnyren), og tatt analyseprøver for RNA fra framnyre, gjelle, lever og hjerne. Det ble tatt spritprøver for DNA-ekstraksjon fra en pylorusblindsekk og fra muskulaturen rett over bukhulen. Det ble tatt prøver for histologi fra framnyre, blindsekkene og muskulaturen som ble fiksert i buffret formalin [21]. Infeksjoner med andre agens i de villfangede rognkjeks ble også undersøkt ved histologiske analyser utført ved Veterinærinstituttet.

##### Uttak til normal histologi (M.Sc.-thesis 3)

Totalt 50 klinisk friske fisk ble tatt ut som forsøksfisk til masteroppgaven om normal histologi i dette prosjektet. Fisken ble avlivet med en overdose Finquel vet. «Scan Aqua», pulver til bad. Størrelsen på fisken var fra <5g (yngel) til 132g. All fisk som ble benyttet i studier av normal histologi, bortsett fra de 5 fiskene som ble tatt ut på AkvaPlan NIVA i Tromsø, ble testet med real-time PCR og funnet negative for for *N. cyclopteri* og andre patogener kjent fra rognkjeks; Lumpfish flavivirus (LFV/CLuV), *Pasteurella* sp., og *Aeromonas salmonicida* spp.

#### *Etablering av smittet og usmittet fiskegruppe til studier av fisk fra rogn til oppdrett*

For å kunne få kunnskap om patologi forårsaket av *N. cyclopteri* hos juvenile rognkjeks og om den normale histologi/anatomi hos uinfiserte individer ble det gjort forsøk på å etablere en smittet og en usmittet gruppe ved settefisklokaliteten slik at disse kunne studeres/følges videre i produksjonssyklusen. Basert på tidligere resultater fra screening for *N. cyclopteri* som viste at yngel ofte var smittet av parasitten så skulle smittede hanner og hunner brukes som foreldre for å få en populasjon av smittet yngel. Avkommet etter smittede hanner og hunner ble analysert ved hjelp av real-time PCR for påvisning av *N. cyclopteri*.



Det lyktes å lage en *Nucleospora*-fri gruppe på basis av *Nucleospora*-negative foreldrefisk. Det ble undersøkt fire (4) grupper av yngel som var avkom av smittede foreldrefisk. Ingen av disse gruppene ble funnet å inkludere *Nucleospora*-positive yngel. For hvert av de fire forsøkene ble det tatt ut 30 fisk til real-time-analyser både ca 4 uker etter klekking og ca 8 uker etter klekking, i alt 240 fisk. Det lot seg altså ikke gjøre å etablere en smittet populasjon fra smittede foreldre dyr (vertikal smitte) og den oppfølgende studien av en smittet ungfiskpopulasjon ble følgelig ikke gjennomført etter planen.

Planen var å fokusere på å karakterisere helsestatus, patologi og mortalitet hos rognkjeks fra en smittet og en usmittet gruppe fra de ble klekket og frem til de ble klare til å settes i sjø (20-30 grams størrelse). Da dette eksperimentet ikke kunne gjennomføres, ble det bestemt å i stedet følge en rognkjeksgruppe, som var screenet *Nucleospora*-negative i landanlegg, etter at de var satt i sjø. Formålet var å undersøke om disse ble smittet i merdsituasjon etter sjøsetting. To uttak av 30-35 fisker (klinisk friske og fersk dødfisk) ble gjort, i desember 2018 og mars 2019, fra en gruppe som var satt i sjø ved en lokalitet i Rogaland i oktober 2018. Prøver av hele fisk fra denne gruppen ble tatt ut av personell på anlegget og sendt på is til Veterinærinstituttet. Ved Veterinærinstituttet ble nyreprøver tatt ut og videresendt PatoGen AS for analyse med hensyn på *N. cyclopteri* som beskrevet over. Resten av fiskene ble fiksert på formalin for eventuell histologisk undersøkelse ved positiv PCR. Ytterligere uttak ble umuliggjort av at det i anlegget ble supplert med nye rognkjeks som vi ikke hadde smittestatus på i forkant av utsett.

## Prøveopparbeiding, metoder, metodeutvikling og analyser

### *Screening vha. Real-time PCR*

Prøver beregnet for analyse vha Real-time PCR ble undersøkt med det primer og probesett som PatoGen AS bruker i sin diagnostikk, men med forskjellige kit avhengig av hvor analysene ble utført (se detaljer under).

*UIB:* *Nucleospora cyclopteri* 16S RNA ble påvist med et real-time PCR assay utviklet av PatoGen AS (NC16S). Ekspresjonen av rognkjeks elongeringsfaktor 1a (RK Elfac) ble brukt som en kontroll på RNA kvaliteten og for å normalisere resultatene for *N. cyclopteri*. AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Albion) ble brukt ifølge produsentens protokoll i 96 brønners plater, men med et volum på 10 µL. Analysene ble utført på enten en Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System maskin eller i en QuantStudio 3 (Applied Biosystems, USA) med standard AgPath PCR oppsett. Primere og prober er gitt i [21].

*VI Oslo:* DNA ble ekstrahert fra vev vha Qiagen DNEasy kit med protokollen som følger kit'et (Qiagen). Real-time RT-PCR for *N. cyclopteri* 16S rDNA/rRNA ble utført med 2 µl DNA/RNA templat og Takara Premix ex-taq med *N. cyclopteri* - 16S-assayet [21]. Analysen ble utført på en Stratagene Mx3005P maskin med følgende syklus; 95°C/60 sec, etterfulgt av 50 sykluser med 94°C/15 sekunder og 60°C/60 sekunder.

### *Standard histologiske metoder og normalhistologi hos rognkjeks (M. Sc.- thesis 3)*

Ved prosjektets oppstart var det ansett å være et stort behov i næringen for kunnskap om normal anatomi/histologi hos rognkjeks til bruk i diagnostikken. Normalhistologien til rognkjeks ble kartlagt gjennom et mastergradsstudie ved Universitetet i Tromsø og gjennom analyser gjort ved Veterinærinstituttet. I mastergradsstudiet ble forskjellig fargemetodikk og systematisk makroskjæring av organer etc. testet ut spesielt. Metoder andre enn standard diagnostiske metoder benyttet i masteroppgaven var ikke en del av dette prosjektet som sådan og blir ikke beskrevet i detalj i denne rapporten, men står beskrevet i selve oppgaven [22]. Standard metodikk for fremføring av preparater ble brukt og de fleste snittene ble farget med Hematoxylin og Eosin (HE) som er standard for rutinemessige fiskehistopatologiske analyser.

### *Fargemetoder for påvisning av mikrosporidier og Nucleospora cyclopteri.*

I og med at mikrosporidier er små parasitter er de vanskelige å påvise histologisk på HE-fargede snitt som undersøkes ved 400 ganger forstørrelse (Figur 16). Selv ved 1000 ganger forstørrelse (Figur 16) kan de være vanskelig å påvise og disse analysene er i tillegg veldig tidkrevende. I dette prosjektet testet vi derfor også tre andre fargemetoder som er bedre egnet til å påvise *N. cyclopteri*/mikrosporidier; Gram-Twort, calco-fluor white (CFW) og *in situ* hybridisering (ISH/FISH). *In situ* hybridiseringsmetoden ble utviklet innenfor dette prosjektet (se under).

### Gram-Twort-farging

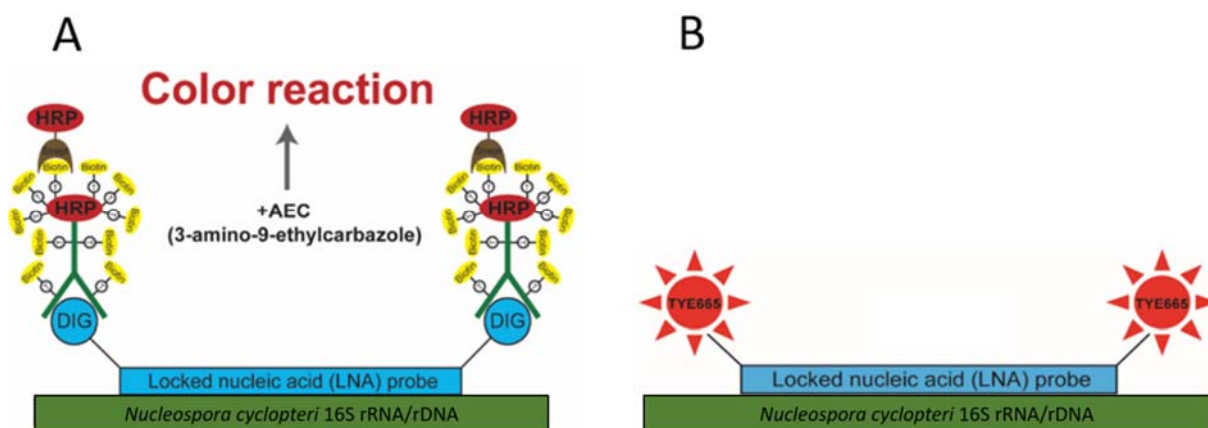
Gram-Twort er en variasjon av standard Gram-farging og er brukt i histopatogiske analyser til å påvise Gram-positive og Gram-negative bakterier i formalin-fikserte snitt. Gram-Twort har også vært brukt til farging av mikrosporidiesporer, blant annet *Desmozoon lepeophtherii* [23].

### Calco-fluor-white (CFW)

Calco-fluor-white er en fargemetode som binder seg til kitin, som blant annet finnes i skallet til sporer av mikrosporidier og sopp. Metoden er ikke spesifikk og farger kun sporer med kitinskall. Farging med CFW ble i dette prosjektet gjennomført som følger: paraffinsnitt ble deparaffinert i xylene, rehydrert gjennom fortynningsrekke med alkohol og vasket i destillert vann. Snittene ble så behandlet med lut, 10% kaliumhydroksid, KOH, i destillert vann i 2 min og farget med 0.05% Calcofluor white farge (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) i 2 min. De fargede snittene ble deretter umiddelbart undersøkt med et epi-fluorescens mikroskop for å se etter fargede sporer. Calco-fluor har også vært brukt til farging av andre mikrosporidier som finnes i oppdrettsfisk, blant annet *Desmozoon lepeophtherii* [24].

### Utvikling av in situ hybridiseringsmetodikk ISH)

*In situ* hybridiseringsprotokollen som ble utviklet med den DIG-merkede proben (Figur 2) tok utgangspunkt i en metode vi tidligere har utviklet for myxozoen *Parvicapsula pseudobranchicola* [25]. Alle 16S rDNA/rRNA sekvenser fra *N. cyclopteri* og nært beslektede arter ble lastet ned fra GenBank (NCBI), og forskjeller undersøkt vha. sekvenssammenstilling med programmet AlignX (en del av programpakken Vector NTI Advance 11.0). Beslektede arter benyttet i sammenstillingen inkluderte *Nucleospora salmonis* (HQ418210), *Nucleospora* sp. (JN938583), *Enterocytozoonidae* gen. sp. (AF201911), *Desmozoon lepeophtherii* (AJ431366), *Paranucleospora theridion* (FJ389667), *Desmozoon lepeophtherii* (HM800847) og *Tetramicra brevifilum* (AF364303). En oligonukleotid probesekvens på 20 nukleotider og 100% spesifikk for *N. cyclopteri* (5'-TCACCTTTGTCGCTCGACAT-3') ble valgt ut fra et område med høyest sekvensavvik til de nærmest beslektede artene. Siden proben er relativt kort, noe som ble valgt for bedre penetreringsevne, ble den bestilt i delvis modifisert form inneholdende flere «locked nucleic acid» (LNA) nukleotider for å øke både smeltepunktet (til 85°C for RNA, 74°C for DNA) og spesifisiteten. Siden *Nucleospora salmonis* (HQ418210) kun avviker fra *N. cyclopteri* med tre nukleotider i probesekvensen ble minst én av LNA modifikasjonene plassert i en posisjon der de avvek fra hverandre. Dette for å ytterligere redusere muligheten for kryssreaksjon. Proben ble merket i begge ender med enten Digoxigenin eller fluoroforen TYE665 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) slik at man fikk to ulike reportersystemer for utvikling av to forskjellige *in situ* hybridiseringsprotokoller. Det ble først søkt å optimalisere protokollen med hensyn på påvisning og deretter ble flere av trinnene i protokollen optimalisert med hensyn på tidsbruk. Optimalisering ble gjort med hensyn på probekonsentrasjon og inkuberingstid med proteinase K (15 minutter til 2 timer).

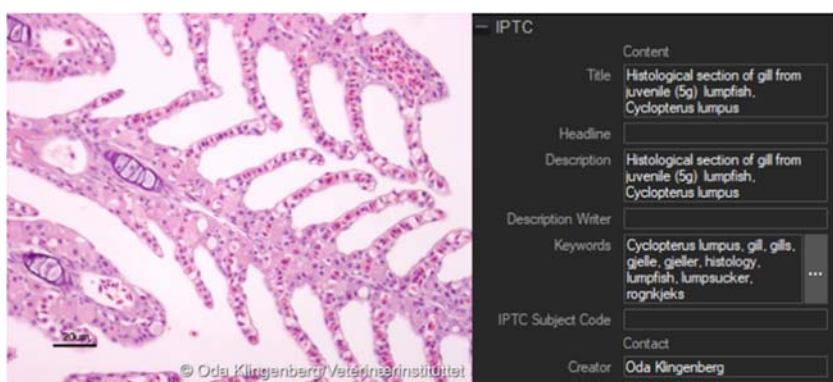


Figur 2. Ulike reportersystemer benyttet i *in situ* hybridisering (ISH). A) Digoxigenin (DIG) -merket oligonukleotid probe. B) Oligonukleotid probe merket med fluoroforen TYE665 (FISH). Begge probene har samme sekvens og er LNA-modifisert i samme posisjoner.

*In situ* hybridiseringsprotokollen med TYE665-merket probe (Figur 2 B) ble utviklet for å kunne gjennomføres gjennom på bortimot halve tiden sammenlignet med protokollen over, noe som var et av målene med å utvikle en FISH-metode. En LNA-modifisert polyT-probe ble benyttet som positiv kontroll på RNA-kvaliteten (binder all mRNA i snittet) og negativ kontroll var snitt fra uinfisert fisk (fisk testet negativ med real-time PCR). Infeksjoner påvist med *in situ* metodikk ble bekreftet under lysmikroskop eller konfokal-mikroskop og forsøkt sammenlignet med snitt fra samme blokker som var farget med HE. Metoden og resultater vil bli publisert i detalj i en egen vitenskapelig artikkel.

### Bildekatalog for histologi

I løpet av prosjektet ble det tatt et stort antall bilder som vil inngå i en bildekatalog av makroskopiske og mikroskopiske bilder av normal anatomi og patologiske funn fra rognkjeks. Bildekatalogen gjøres først tilgjengelig på Flickr (<https://www.flickr.com/photos/184951734@N08/albums>) og senere (i slutten av 2019/starten av 2020) på <https://foto.vetinst.no/fotoweb/>. Det er meningen at denne basen bygges ut videre fremover. Bildene vil følges av en beskrivelse og være søkbare gjennom merking (tags) som blant sier hvilket vev de er fra (Figur 3) og vil være åpent tilgjengelig for alle.



Figur 3. Eksempel på bilde og merking (tagging) av bilder til bildedatabasen.

### Analyser av skottelus, *Caligus elongatus* som mulig vert for *Nucleospora cyclopteri*

I tillegg til at rognkjeks kan smittes direkte, så er det også en mulighet for at *N. cyclopteri* kan smitte via en vektor [7]. Den beslektede mikrosporidien *Desmozoon lepeophtherii* har vist seg å infisere både lakselus og laks. I og med at rognkjeks er viktigste vert for én genotype av skottelus, *Caligus elongatus* [15, 26], som er svært alminnelig på villfangede fisk, så er det en reell mulighet for at *C. elongatus* er involvert i livssyklusen til *N. cyclopteri*. For å undersøke dette ble DNA-ekstrakter fra skottelus fra tidligere prosjekter [27] og fra villfisk som ble samlet inn i inneværende prosjekt, undersøkt vha. real-time PCR (se over for metode). Skottelus ble delt i to på langs ved hjelp av en skalpell og den ene delen ble benyttet til real-time-PCR-analyser og den andre delen til påfølgende histologiske undersøkelser.

Ved positiv real-time-PCR-analyse er det en mulighet for at det kun er tarminnholdet i skottelusa som inneholder parasitter. Dette vil ikke være et bevis for at lusa fungerer som vektor, da det bare kan skyldes at lusa nylig har spist på en infisert rognkjeks. Det vil derfor være behov for tilleggsundersøkelser som kan bekrefte at skottelus er vektor. Den andre halvdel av skottelus som ble funnet positive ved real-time PCR ble derfor undersøkt ved hjelp av histologi for å eventuelt påvise hvor i lusa infeksjonen var lokalisert. Både histologiske snitt som var farget med standard metoder og med *in situ* hybridisering ble analysert.

## Prosjektgjennomføring og personell involvert

### Prosjektgruppe:

Haakon Hansen (prosjektleder) og Even Thoen\*, Veterinærinstituttet i Oslo (VIO).

Marta Alarcón\*\* og Geir Bornø, Veterinærinstituttet i Harstad (VIH).

Egil Karlsbakk, Universitetet i Bergen/Havforskningsinstituttet (UIB).

Magnus Devold, Patogen AS

\*Even Thoen er nå ansatt i Patogen AS

\*\*Marta Alarcón er nå ansatt i FishVetGroup Norway

### Styringsgruppe:

Henriette Glosvik (Marine Harvest)

Torkjell Bruheim, AquaGen

Mads Kristiansen, Bjørøya Fiskeoppdrett.

FHF-ansvarlig: Eirik Sigstastø

Prosjektet ble i hovedsak utført ved Veterinærinstituttet i Oslo og Harstad og ved Universitetet i Bergen. Tre mastergrader ble gjennomført i prosjektet; to studenter ble uteksaminert ved Universitetet i Bergen og én ble uteksaminert ved Universitetet i Tromsø.

Feltarbeid på Ekkilsøy ble gjennomført av Haakon Hansen, Marta Alarcón (VI), Egil Karlsbakk (UiB/HI), og masterstudentene Kathrine Nilsen og Benedicte Warland fra UiB. Uttak på Vanylven/Sighaug ble gjort av personell på anlegget, Even Thoen (VI) og masterstudenten Oda Klingenberg, Universitetet i Tromsø, og av Sunniva W. Kui og Morten Lund, PatoGen AS. Oda Klingenberg og Tore Seternes tok ut prøver ved Akvaplan Nivas settefisklokalitet i Tromsø.

Real-time-PCR- analyser ble utført av Patogen AS, av studentene Kathrine Nilsen og Benedicte Warland ved Universitetet i Bergen og av Saima N. Mohammad/Haakon Hansen ved Veterinærinstituttet. Parasittologiske analyser ble gjennomført enten i felt, ved UiB, VI Harstad og/eller VI Oslo.

*In-situ* metodikken ble utviklet av VI i samarbeid med UiB av Haakon Hansen, Turhan Markussen (NMBU), Simon Weli (VI), Even Thoen, Randi Faller (VI) og Egil Karlsbakk (UiB/HI).

Arbeidet med normalhistologien til rognkjeks ble gjennomført som en mastergrad for Oda Klingenberg ved Universitetet i Tromsø og ble utført ved UiT og VI Oslo. Hovedveileder ved Universitetet i Tromsø var Tore Seternes, mens arbeidet ble ledet fra VI Oslo ved Even Thoen og Haakon Hansen, som også var medveiledere på masteroppgaven.

Prosjektet har i tillegg til materiale som ble innsamlet i prosjektet også hatt tilgang til materiale fra VI's diagnostiske innsendelser og Øivind Øines (VI) har bidratt med prøver av skottelus, *Caligus elongatus*, fra tidligere prosjekter. Studentene ved UiB har også hatt tilgang til materiale av *Nucleospora*-infisert rognkjeks tidligere innsamlet av Egil Karlsbakk i Hordaland.

## Resultater og diskusjon

Hovedmålet med dette prosjektet var å 1) identifisere hvordan man kunne sikre en populasjon av rognkjeks i landanlegg som var fri for smitte med *N. cyclopteri* og 2) finne ut hvilken betydning parasitten har for helsen til rognkjeks og dermed på fiskens effekt som lusespiser. For å studere dette ble prosjektet inndelt i deler som skulle a) kartlegge *N. cyclopteri* i villfanget i stamfisk, rogn/melke, yngel og rognkjeks i merd, b) studere mulige smitteveier for parasitten, og c) kartlegge den kliniske betydningen av parasitten.

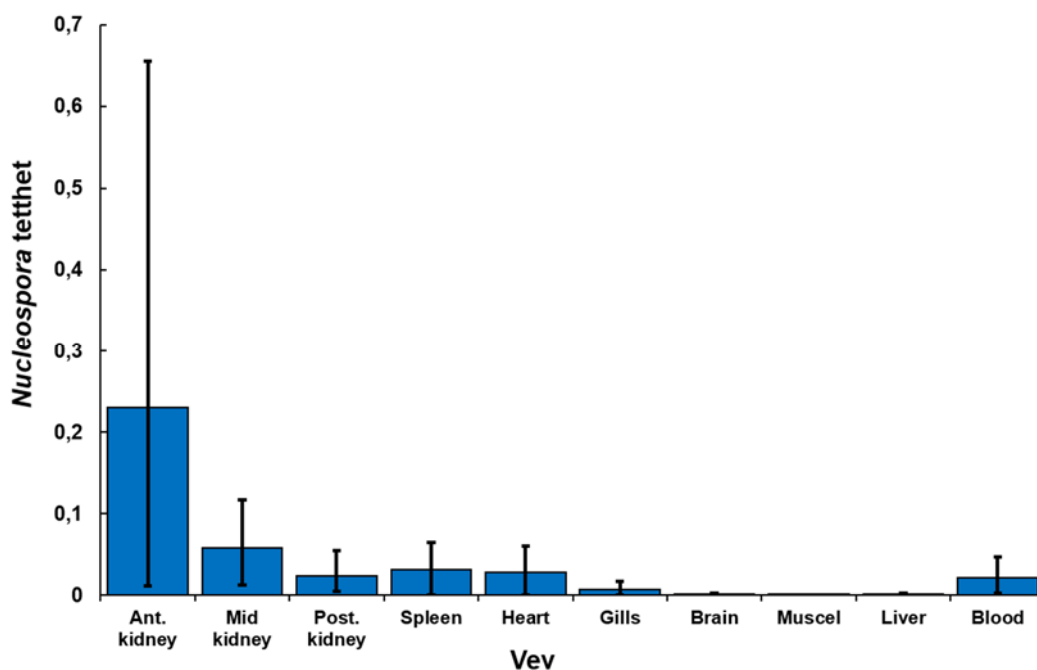
### Kartlegging og påvisning *Nucleospora cyclopteri* og andre agens i vill og oppdrettet rognkjeks

Prosjektet har gjennomført to planlagte undersøkelser av villfanget voksen rognkjeks fra Averøy, Møre og Romsdal. I første uttak (juni 2017) ble det undersøkt 25 fisk, kun hunner, mens det i andre uttak (november 2017) ble undersøkt 60 fisk (13 hanner og 47 hunner). To studenter fra UiB, Benedicte R. E. Warland og Kathrine Nilsen deltok på feltarbeidet og ble ferdig med sine masteroppgaver i 2018, basert på materialet samlet inn fra Averøy. Sammen gir masteroppgavene et godt innblikk i vevstropismen til *N. cyclopteri*, i hvilke biopsier og ikke-letale prøvetakingsmetoder som kan brukes for å påvise *N. cyclopteri*, i tillegg til en detaljert analyse av andre patogener (ko-infeksjoner) som er tilstede hos villfanget voksen rognkjeks fra denne populasjonen.

*Optimal prøvetaking for påvisning av Nucleospora cyclopteri* (M. Sc.-thesis 1)

Tittel: Tissue tropism and non-lethal detection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). Benedicte Rebecca Endresen Warland, juni 2018 [20].

Vevsfordelingen til *N. cyclopteri* i villfanget kjønnsmoden rognkjeks og rognkall ble undersøkt. Formålet var å påvise de beste vevsprøvene for å avsløre infeksjon med molekylære metoder, og å undersøke muligheten for å utvikle ikke-dødelige (biopsi)-baserte deteksjonsmåter. Biopsibasert deteksjon vil være viktig når en skal etablere *Nucleospora*-frie stamfiskpopulasjoner, som i forbindelse med avl. Mengden *N. cyclopteri* RNA ble undersøkt i en rekke vevsprøver, i blod, og i svaberprøver fra flere steder på fiskenes overflate, med real-time RT-PCR.

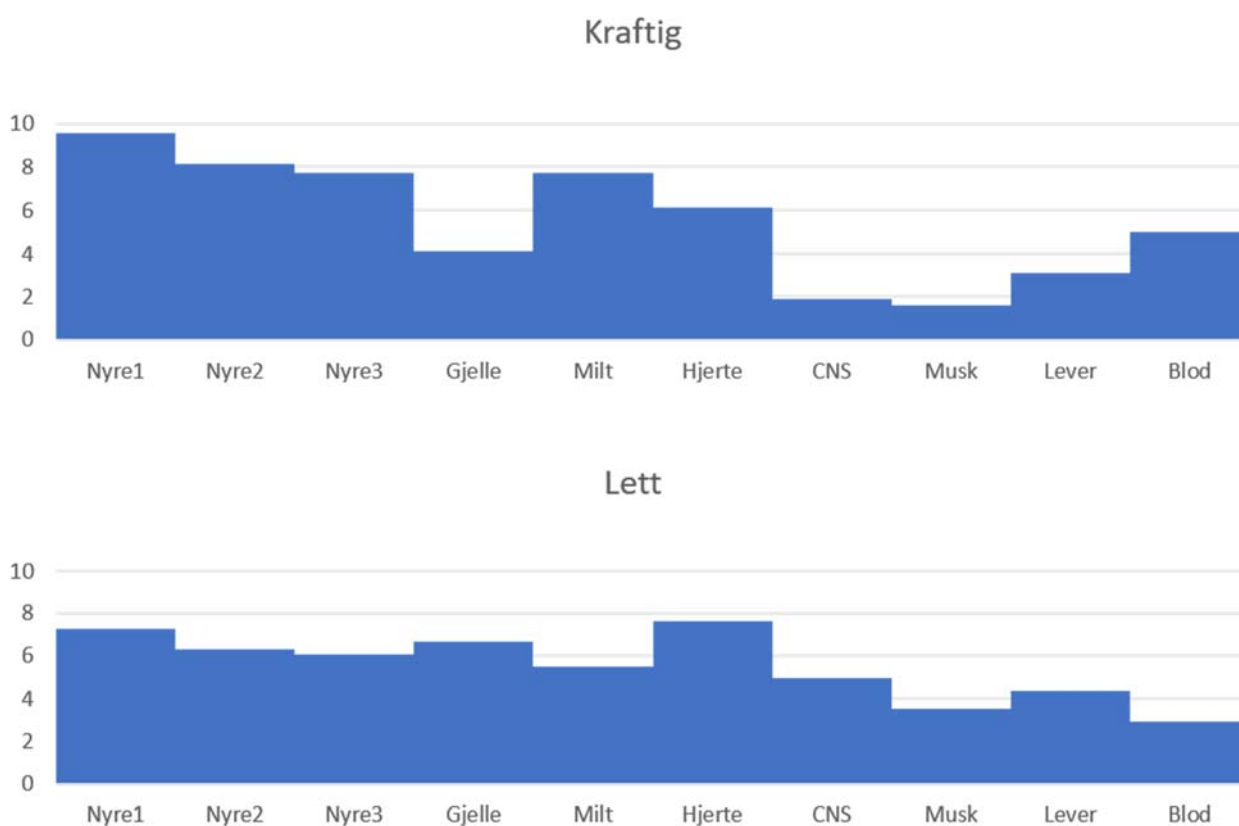


Figur 4. Tettheter (normalisert ekspresjon) av *Nucleospora cyclopteri* i forskjellige vev hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*.



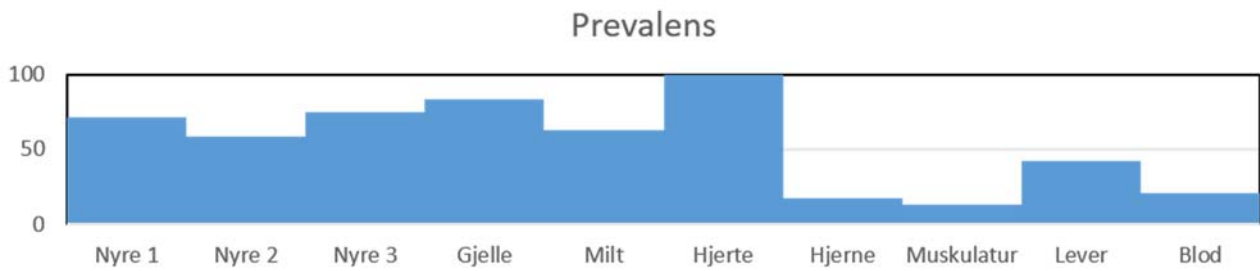
Parasitten ble påvist i alle undersøkte vev; fram- midt- og baknyre, milt, hjerte, gjeller, hjerne, muskulatur, lever og blod. Dette tyder på at infeksjonen er systemisk, at de infiserte cellene i noen grad forekommer i alle vev og organer. De høyeste tetthetene til parasitten ble sett i framnyren (Figur 4), som hovedsakelig utgjøres av hodenyrevev. Det var svært stor variasjon i mengde, og noen få kraftig infiserte fisk hadde stor innflytelse på det observerte mønsteret. Innflytelsen til slike kraftig infiserte fisker ble fjernet ved å studere vevstropismen på basis av tetthetsrangering, fra 1 til 10, hvor 10 er høyeste tetthet (Figur 5).

I kraftig infiserte fisk hadde nyren de høyeste tetthetene, fulgt av milt og hjerte. Nivåene i blod kan ikke direkte sammenlignes med de andre vevsprøvene på grunn av at en noe annen metode ble brukt i RNA rensingene, men rangeringen av blod var relativt høy hos de kraftig infiserte fiskene. I lett infisert fisk var blodet vanligvis negativt for *N. cyclopteri*. På basis av vevsprøver fra lette infeksjoner var mønsteret ikke så klart, men hjertet hadde ofte de høyeste tetthetene.



Figur 5. Vevsfordeling av *Nucleospora cyclopteri* i rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, basert på rangering av parasittens tettheter i vevene (NE). Tetthetene i vevsprøvene fra hver fisk ble rangert fra 1 til 10, der vevet med høyest tetthet fikk rangering 10. (Nyre 1,2,3 er fram, midt og baknyre, CNS er hjerne).

Når en ser på hvilke vev som oftest var positive i infiserte fisk, hadde hjertet klart høyest prevalens, fulgt av gjelle nyre og milt (Figur 6).

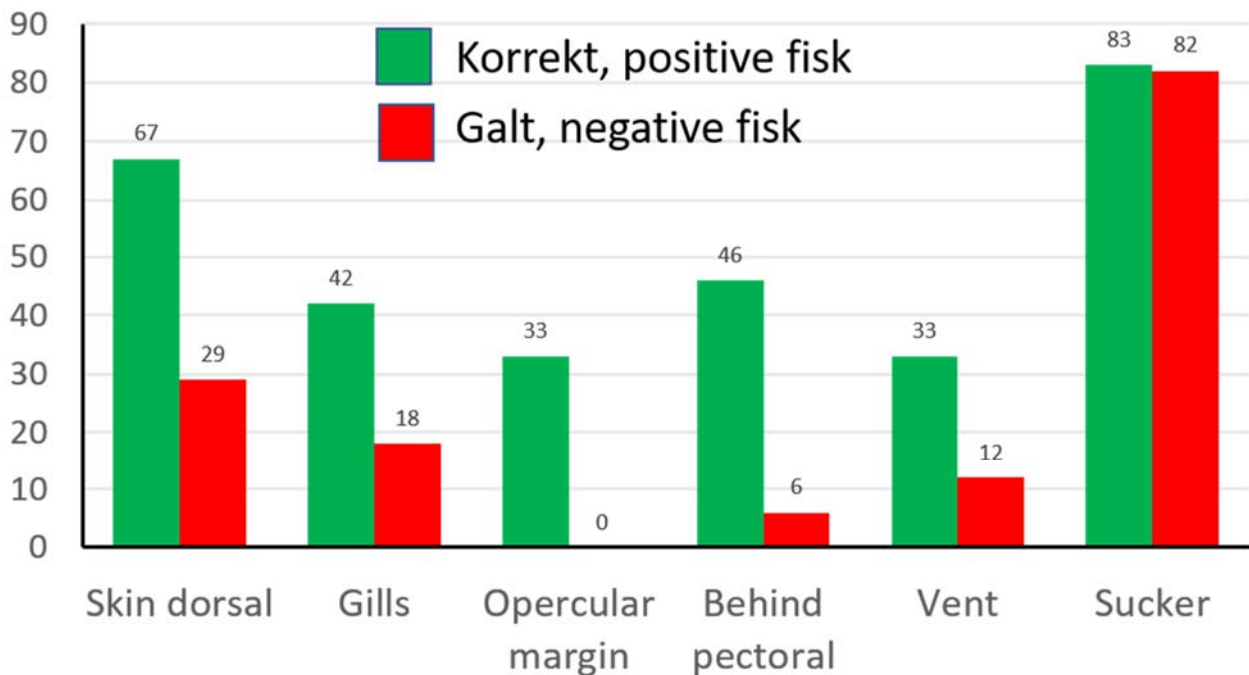


Figur 6. Prevalens av *Nucleospora cyclopteri* i forskjellige vevsprøver fra rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Hjertet var alltid positivt i infiserte fisk, nyreprøver avslørte 58-75%.

Parasitten ble også påvist i urin, inklusivt de kraftigst infiserte fiskene som hadde sporer i nyrene. Flere fisk viste også positiv galle. Det er derfor mulig at parasitten frigjøres som sporer gjennom disse kroppsvæskene.

Av de mulige ikke-letale prøvene (svabre, gjellebiopsi og blodprøver), er det kun blodprøvene som ikke vil påvirkes av overflatekontaminering for eksempel fra sporer frigjort gjennom urin.

I karene hvor fisken ble holdt, foregikk det også spontan gyting, og parasitt-RNA kan ha blitt frigjort i karmiljøet også gjennom kjønnsprodukter. Det ble påvist *N. cyclopteri* i svaberprøver fra karveggene der fisken ble holdt før prøvetaking. Derimot var svabre dypet i karvannet alltid negative.



Figur 7. Sammenhengen mellom positive svaberprøver fra overflaten av rognkjeks og faktisk infeksjon. Sugeskålen, som er i kontakt med karveggen er ofte kontaminert av parasitt i biofilmen i karet. Svaberprøver fra beskyttede steder som bak brystfinnen og under kanten av gjellelokket var best med hensyn på å gi færrest falske positive, men mange infeksjoner avsløres ikke av svaberprøven fra disse stedene.

Svaberprøver fra sugekoppen, som var i kontakt med karveggen var svært ofte positive, og like ofte i infiserte og uinfiserte fisk (Figur 7). De svaberprøvene som syntes mest effektive i å avsløre infiserte individer var kombinasjonen kanten på gjellelokk og bak brystfinnen. Et bifunn her er at parasitten synes å være til stede i hudens epidermis. Gjellebiopsiprøver var oftest positive i infisert fisk (83%), men også i mange uinfiserte fisk (47%) og er således ubrukelige i kontaminert miljø. Blodprøver derimot, var aldri positive i uinfiserte fisk. Helblod avslørte kun 25% av infeksjonene, men disse inkluderte alle rognkjeksene der infeksjonen hadde resultert i sporer i nyrene. Hvis en analyserte på basis av leukocytfraksjonen (separert blod) økte andelen til 42%. Alle fiskene med makroskopiske indre forandringer (nyren) ble avslørt.

Det antas at nyreforandringene, inklusivt hevelsen, er knyttet til proliferasjonen av infiserte celler (lymfoblaster, hemoblaster) som så bidrar til positivt signal i blodet. Det er særlig hodenyren som svulmer opp, og både histologi og imprint viser at sporedannelsen hovedsakelig skjer i nyren. Nyrens hematopoietiske deler, og trolig særlige lymfoide deler synes derfor å være parasittens viktigste site. Infiserte blodceller kan frigjøres fra nyren og transporteres med blodet til andre vev og organer. Muligens forekommer det få eller ingen celler med parasitten i blodet til lett infiserte fisk, da blodprøvene fra disse vanligvis ble funnet å være negative. I utviklingen til den beslektede *Desmozoon lepeoptherii* i laks er der en ytterligere sporedannelse (sporogoni) i leukocytter før det dannes sporer inne i kjernene til epitelceller [28]. En mulighet synes derfor å være at det også i *N. cyclopteri* er et proliferasjonsstadium forut for sporedannelsen i nyrene, og resultatene her antyder at hjertet bør studeres nærmere i denne sammenheng.

Den beste ikke dødelige deteksjonsmåten synes å være blodprøvetaking. Det kan tas relativt store blodvolum (3-5 ml) fra disse fiskene, som kan separeres på mer avanserte måter enn testet her, og leukocytfraksjonen undersøkes med real-time-PCR. I en potensiell fremtidig stamfiskpopulasjon må dette repeteres over tid, for å øke sannsynligheten for at bærere detekteres.

Vi har vist at tilstedeværelsen av enkelte tungt infiserte individer i et kar medfører et kontamineringsproblem, som ødelegger for svabertesting og gjellebiopsier. På den andre siden vil slik testing faktisk avsløre at det er sheddere i populasjonen, og kan slik være nyttig i utvelgelse av aktuelle fiskegrupper (kar).

*Kartlegging av Nucleospora cyclopteri og andre agens i rognkjeks (M. Sc. - thesis 2 og andre prøver).*  
Title: The occurrence of important pathogens in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) from a wild population fished for brood fish. Kathrine Nilsen, juni 2018 [21].

Infeksjoner med *Nucleospora cyclopteri* i voksen rognkjeks som vandrer inn til kysten av Island for å gyte er ofte omfattende, og mange fisk har store forandringer i nyrene [7]. Siden parasitten infiserer immunceller, er det mulig at infiserte fisk har høyere innslag av ko-infeksjoner av andre agens (facilitering), eventuelt kraftigere infeksjoner (synergi). Fiskene (n=85) som det ble tatt rogn (og melke) av på Ekkilsøy ble derfor også analysert for et bredt spekter av koinfiserende agens som er alminnelige i andre fiskearter eller påvist i rognkjeks i oppdrett (Tabell 1)

Tabell 1. Oversikt over agens det ble analysert for i villfanget rognkjeks (se detaljer i Nilsen 2018).

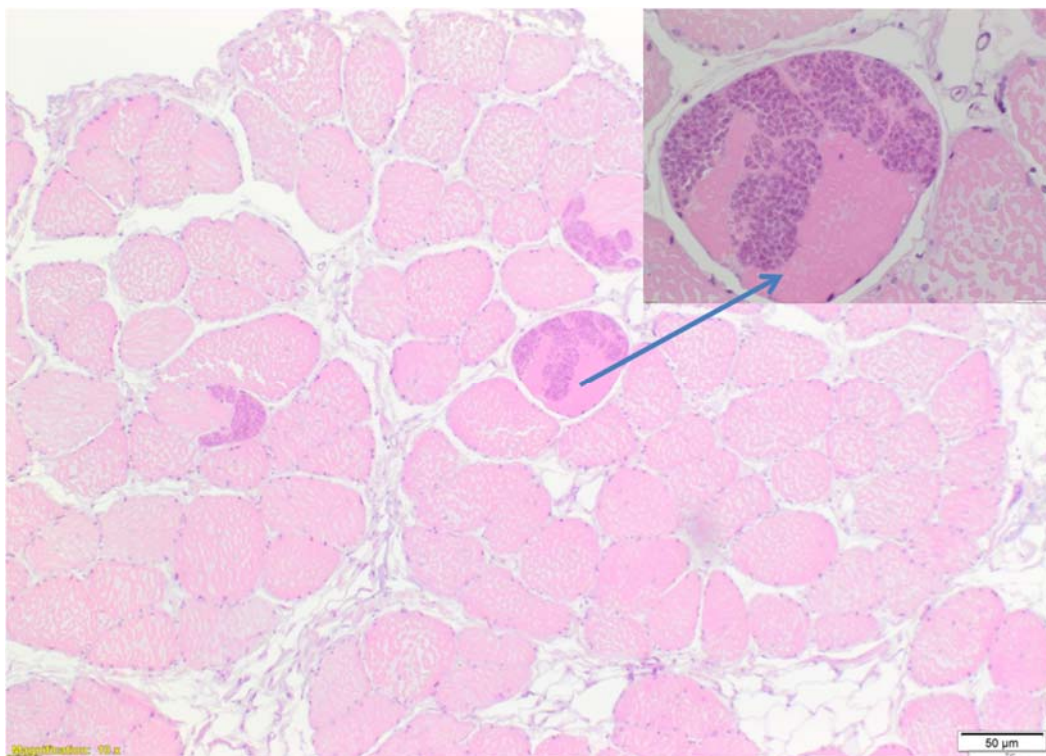
Gruppe	Agens/Art	Vev undersøkt
Virus	Infectious Pancreas Necrosis Virus (IPNV)	lever
	Nervous necrosis virus (NNV)	hjerne
	Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)	gjelle
	Lumpfish flavivirus (LFV/CLuV)	lever
Bakterier	BAS-dyrkbare bakterier	nyre
Parasitter	<i>Nucleospora cyclopteri</i>	nyre
	<i>Kudoa islandica</i>	muskel
	Koksidier	blindsekker

Virusene og *N. cyclopteri* ble testet med real-time rt-PCR på RNA-ekstrakter, det ble dyrket fra nyren med blodagar med salt (BAS) og DNA fra de øvrige parasittene ble påvist med konvensjonell PCR [se 21].

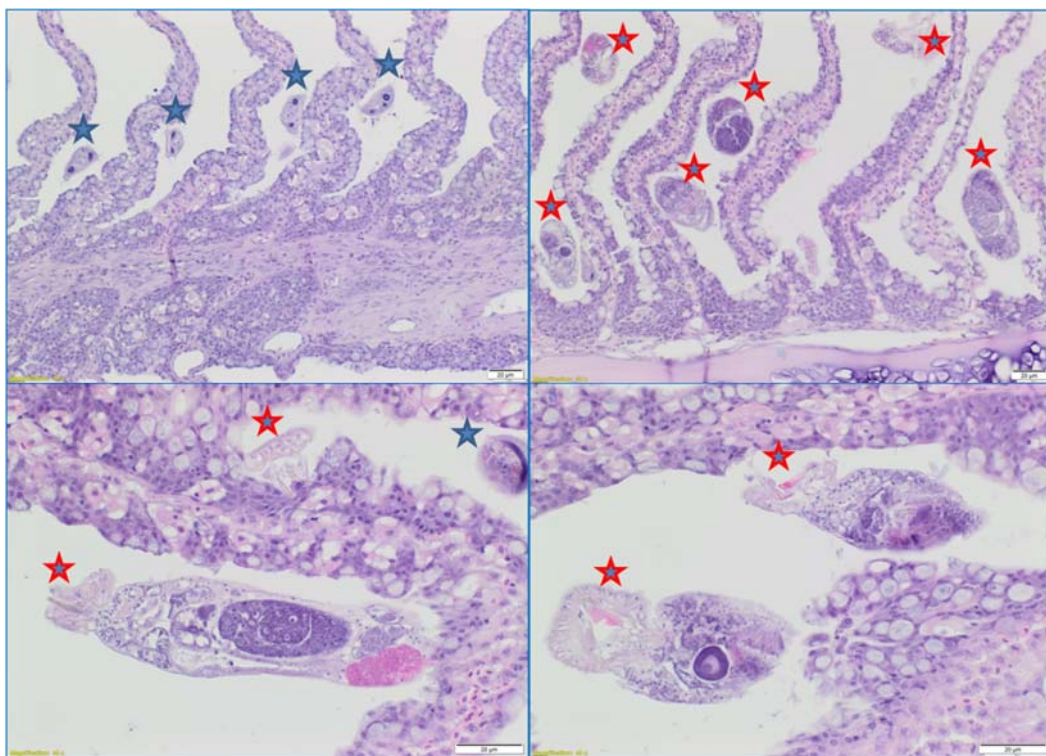
Virusinfeksjoner ble ikke påvist. Det er vist at rognkjeks er mottagelig for IPNV fra laks [3], og det har senere blitt påvist NNV i oppdrettsrognkjeks i Norge. LFV/CLuV infiserer primært rognkjeks, men prevalensen i villfisk er lav [29, 30]. En ny VHSV variant, VHSV-IVd ble påvist hos Islandsk rognkjeks holdt i kar, for bruk som stamfisk [31]. Det er så langt ikke påvist VHSV i rognkjeks fra norske farvann [21, 32, 33]. Det var bakterievekst fra kun to fisk (*Vibrio splendidus* og *Psychrobacter* sp.), antagelig opportunistiske infeksjoner.

*Nucleospora cyclopteri* ble påvist i 60% av rognkjeksene (N=85). Det var ikke forskjell i prevalens eller parasittmengde i nyre (tetthet) mellom fisk tatt i juni og november, eller mellom hanner og hunner. Det var heller ikke en sammenheng mellom infeksjon og fiskestørrelse i materialet undersøkt. Koksidier forekom i 99% av fiskene, og myxozoen *Kudoa islandica* i 21%. Det ble ikke observert assosiasjon med infeksjoner med *N. cyclopteri*, men dette kan ha med de generelt svært lette infeksjonene som ble observert. Ingen av fiskene kan klassifiseres som syke. Aspektet kan bedre testes på rognkjeks fra et klinisk utbrudd med *N. cyclopteri*.

Resultatene underbygger en god helsestatus hos rognkjeksene fisket ved Averøy som er fra en populasjon brukt som kilde til egg og sperm for yngelproduksjon. Av parasittene er det kun *N. cyclopteri* som muligens kan spres vertikalt gjennom kjønnsprodukter (se under). Funnene fra våre undersøkelser av rognkjeks sammenfaller med diagnostiske funn som gjøres i rutinediagnostikken [34] og fra det tidligere nevnte case-studiet [4]. I figurene under vises et utvalg av histologiske bilder av parasittologiske agens som ble påvist på villfanget rognkjeks; *Kudoa islandica* (Figur 8), gjelleparasitter i slekten *Gyrodactylus* og *Trichodina* (Figur 9), trematoder og flagellater i mage- tarmkanalen (Figur 10), koksidier i tarmepitel (Figur 11), og myxozoeer i nyre (Figur 12).

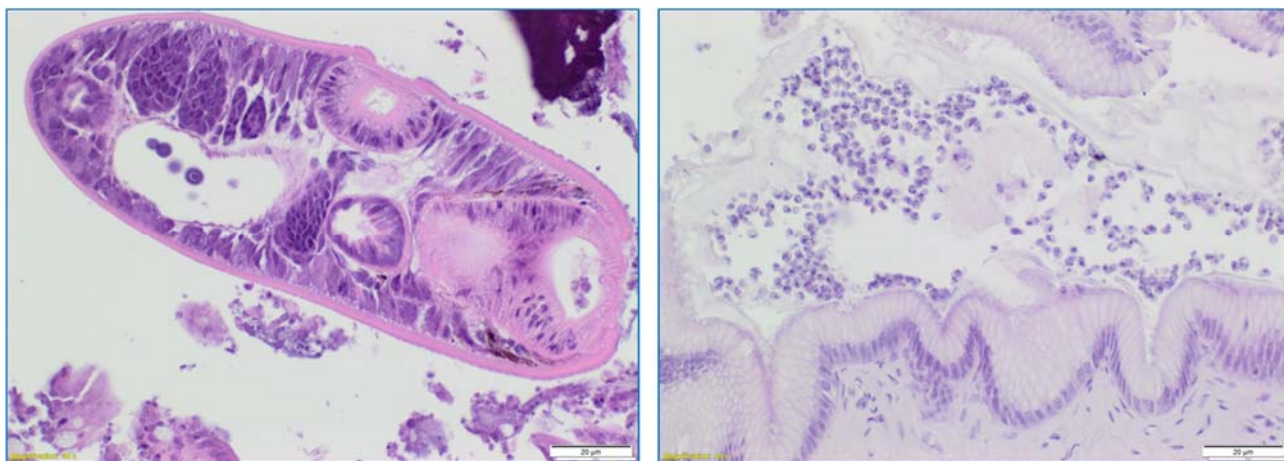


Figur 8. *Kudoa islandica* (Myxozoa) i skjelettmuskulatur hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Foto: Marta Alarcón.

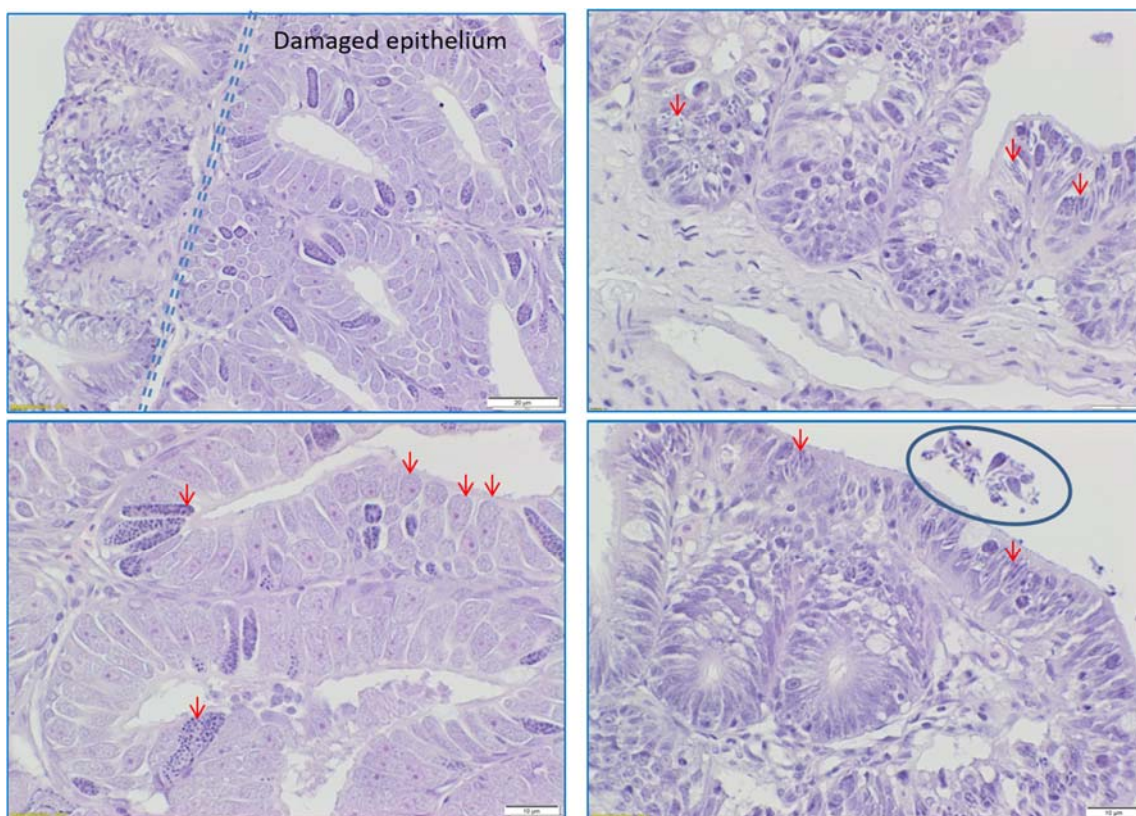


Figur 9. Parasitter på gjellen til rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Øverst til venstre; *Trichodina* sp. Resten: *Gyrodactylus* sp. (Monogenea). Foto: Marta Alarcón

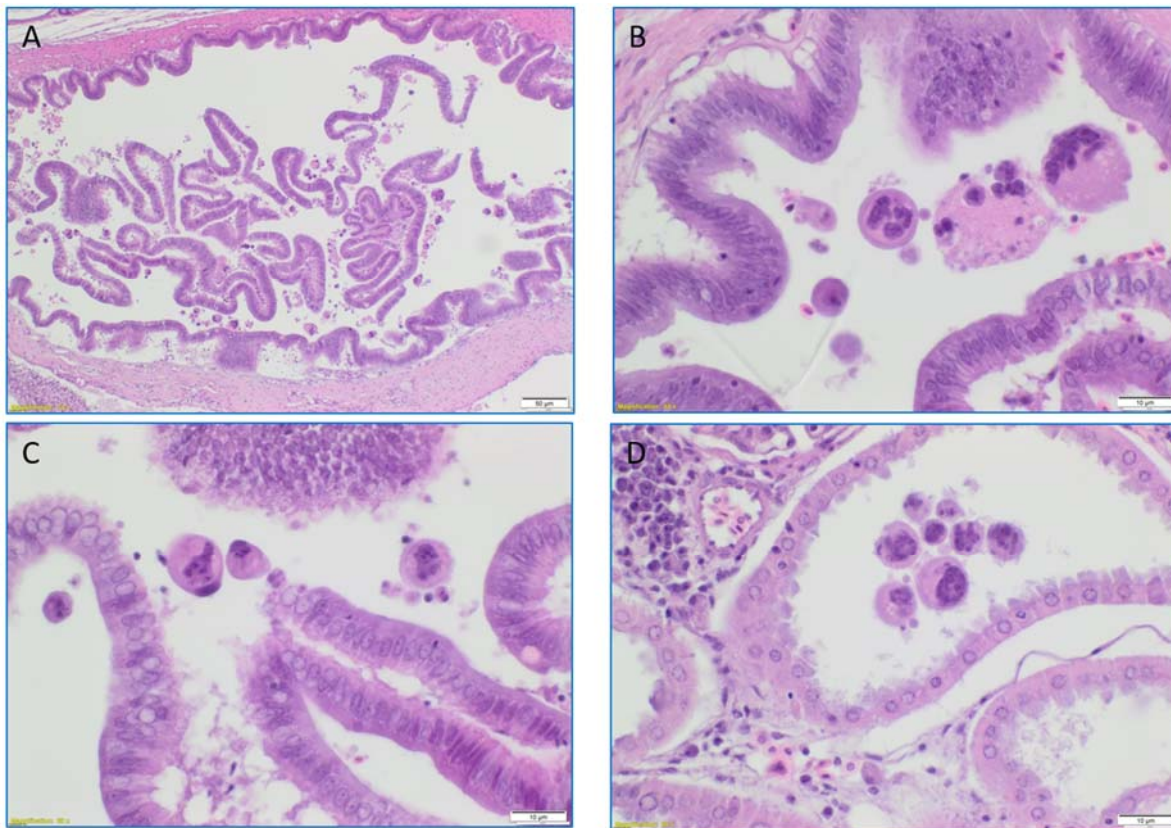




Figur 10. Parasitter i mage- tarmkanalen hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Venstre: trematode- Høyre: flagellater, sannsynlig *Cryptobia dahlii*. Foto: Marta Alarcón



Figur 11. Koksidier og koksidiøse i tarmepitel hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Foto: Marta Alarcón



Figur 12. Myxozoeer i nyre hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. Foto: Marta Alarcón

#### *Kartlegging av Nucleospora cyclopteri i oppdrettsfisk fra rogn til utsett (yngelfasen)*

I denne delen av AP1 skulle vi følge en smittet og en usmittet populasjon på land. Dessverre resulterte ingen av hele fire (4) forsøk på etablering av en smittet populasjon i at yngelen ble smittet og forsøket som sådan ble ikke gjennomført etter planen.

#### *Kartlegging av Nucleospora cyclopteri i rognkjeks fra merd*

Dette var ikke mulig å gjennomføre som planlagt (se forrige punkt). Som et siste forsøk på å følge smittet fisk i sjø, ble fisk som var satt ut på et anlegg i Rogaland, oktober 2018, fulgt i sjø. Nyreprøver fra 60 fisk fra to uttak, desember 2018 og mars 2019, ble undersøkt med real-time PCR hos PatoGen AS, men alle disse var negative for *N. cyclopteri*.



## Smitteveier for *Nucleospora cyclopteri*

### Kan *Nucleospora cyclopteri* overføres vertikalt?

Totalt ble gonadevæske fra 40 fisk analysert med real-time-PCR for *N. cyclopteri*. Prøver av rogn- og rognvæske fra gytemoden rognkjeks fra Averøy fra både juni og november 2017 ble analysert ( $n_{\text{juni}}=10$ ,  $n_{\text{november}}=19$ ). I november ble også melke undersøkt, fra 11 rognkall. På basis av analyser av nyreprøver, var 13 hunner infisert med *N. cyclopteri*. Tre prøver av rognvæske var positive for *N. cyclopteri* (Ct 27-32), en i Juni og 2 i November. Disse tre fiskene hadde Ct 10-16 på hodenyreprøvene tatt for sammenligning, og representerte de kraftigst infiserte individene i denne testen. Disse tre individene hadde også *N. cyclopteri* - positive blodprøver (Ct 19-25). De 3 var også de eneste fiskene blant de 15 infiserte hannene og hunnene som viste *N. cyclopteri* sporer i nyrene (fargede imprint) [se 20]. På basis av nyreprøver ble to hanner funnet positive (Ct25-34), men alle melkeprøvene var negative.

De to mest sannsynlige forklaringene på den positive rognvæsken er kontaminering fra blod (infiserte blodceller) eller forekomst av parasittsporer i gonaden. Disse mulighetene vil kunne representere samme fenomen, siden blodet kan inneholde leukocytter med sporer. Derimot var det også fisk med positivt blod, men uten positiv rognvæske.

Lein *et al.* 2017 [17] analyserte 17 hanner og 20 hunner, men fant ikke parasitten i melke eller rognvæske. Noen av hannene hadde svært lav Ct på nyren (8,3 og 8,4). Parasitten ble påvist ved real-time PCR i rogn fra 1 av 29 hunner etter desinfeksjon, noe som kan tolkes som at parasitten kan være bundet til selve eggene. Antagelig er der fare for vertikal smitte fra kraftig infiserte hunner, via sporer som er assosiert med rogn, men ikke nødvendigvis i selve rogn. Mikrosporidiesporer kan overleve lenge i miljøet [35, 36], og sporene vil ganske sikkert overleve i eggbatcher frem til klekking, med mindre sporene drepes ved desinfisering. Levende sporer kan da potensielt infisere larver. Med bakgrunn i at vi i prosjektet har gjort fire forsøk på å overføre smitte vertikalt, ved å kombinere kjønnsprodukter fra positive foreldrefisk, virker det imidlertid ikke sannsynlig at dette er den dominerende smittevei. Vi mener likevel, ut i fra dagens kunnskap, at det bør være naturlig å følge «føre var-prinsippet» og unngå bruk av positive individer til stamfisk.

### Kan skottelus (*Caligus elongatus*) være mellomvert for *Nucleospora cyclopteri*

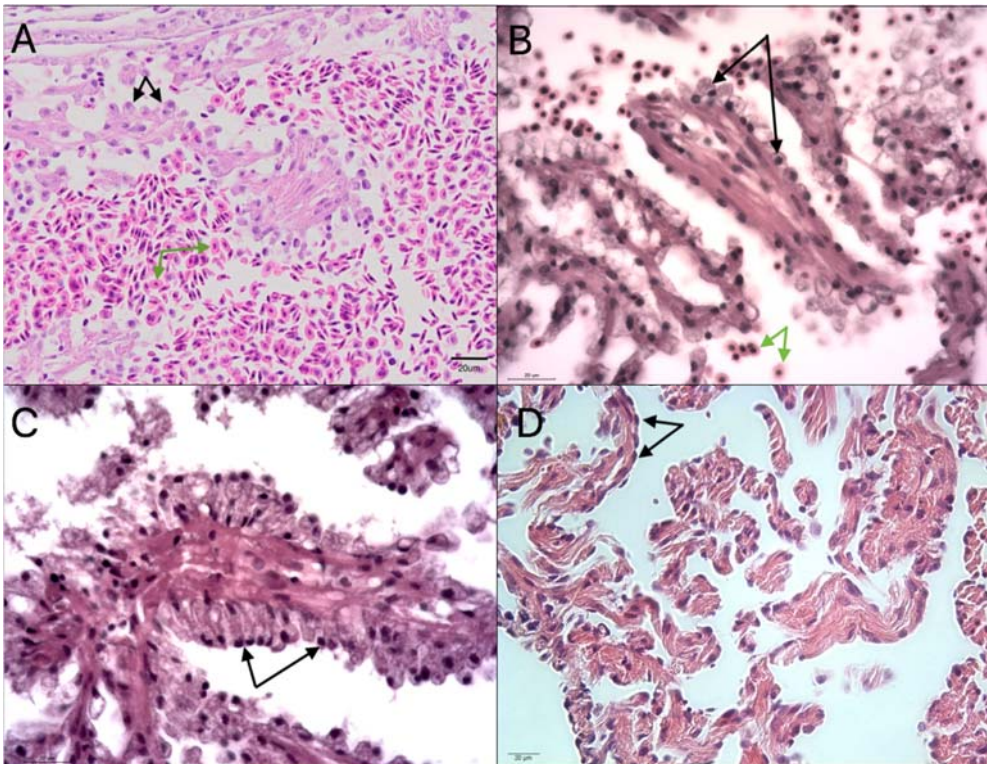
Prøver fra VI samlet inn i tidligere prosjekter og fra villfisk fra Averøy ble undersøkt vha. real-time PCR (se over for metode). Av de individene fra tidligere prosjekter som ble undersøkt så var fem (5) av totalt 60 individer av skottelus som var isolert fra rognkjeks positive for *N. cyclopteri*, men det var svært svake signaler (lite parasitt-DNA). I tillegg ble voksne skottelus ( $n=94$ ) isolert fra en rekke andre fiskearter også undersøkt, men disse var også negative. Skottelus ( $n=32$ ) samlet inn fra villfisk fra Averøy i juni 2017 ble analysert og funnet negative. Enda flere skottelus ( $n=56$ ) ble samlet inn fra villfisk fra Averøy i November 2017. Her var det også få positive individer ( $n=4$ ) og svake signaler. Det at det påvises noe DNA fra *N. cyclopteri* i skottelus er interessant, men kan ikke alene sies å støtte at denne parasitten kan overføre *N. cyclopteri*. De positive individene av skottelus kan skyldes at parasitten bare er tilstede i mucus fra fisken som skottelusa nylig har beitet på og ikke nødvendigvis at skottelusa er infisert av mikrosporidien. Det at vi kan påvise *N. cyclopteri* i svaberprøver fra hud viser at det er sannsynlig at de positive skottelusene skyldes nettopp påvisning av små mengder i mucus. Den skottelusa som inneholdt mest DNA fra *N. cyclopteri* var fra den rognkjeks som også hadde den høyeste tettheter med *N. cyclopteri* i hodenyren.

Histologiske preparater fra enkelte skottelus som var positive i real-time PCR ble farget med enten HE, calco-fluor-white, eller analysert vha FISH, men ingen parasitter ble påvist i disse preparatene. Det at ingen skottelus ble funnet å ha infeksjon indikerer at de ikke er involvert i livssyklusen til *N. cyclopteri* som biologiske vektorer (verter). Derimot kan de muligens fungere som mekaniske vektorer ved vertsskifte.

### Normalhistologi hos klinisk frisk rognkjeks (M. Sc.-thesis 3)

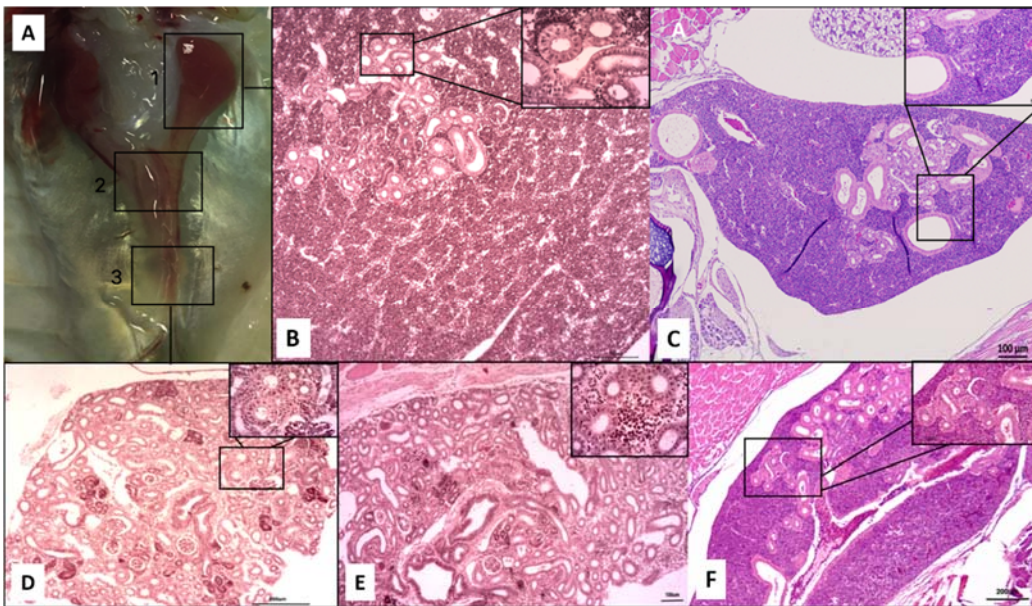
Tittel: Normalhistologi hos oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) med fokus på organene hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever. Oda Klingenberg, mai 2019 [22].

Normalhistologien til rognkjeks ble studert i fisk av størrelse 5 g til 132 g og alle resultatene finnes beskrevet i Klingenberg [22]. Her vises kun et utvalg av resultater og bilder fra oppgaven med eksempler fra studier av hjertet og nyren til rognkjeks (Figur 13). Bilder av alle studerte organer er tilgjengelig som en del av bildedatabasen: (<https://www.flickr.com/photos/184951734@N08/albums>) [og se 22] og på <https://foto.vetinst.no/fotoweb/> (f.o.m. 2020).

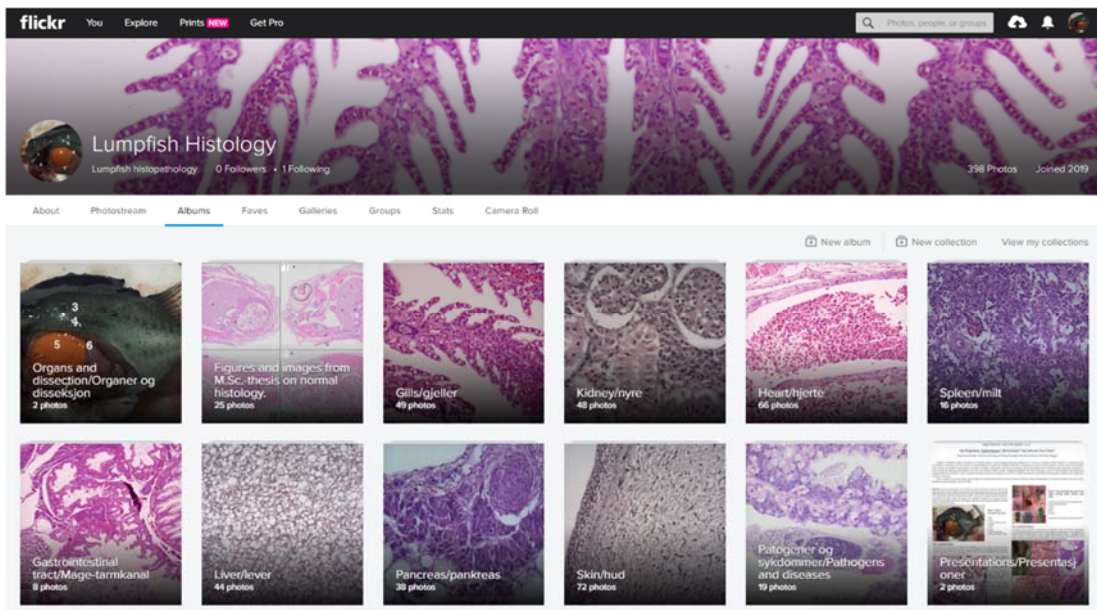


Figur 13. Hjerte hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus* (A, B, C) og laks, *Salmo salar* (D). Endotelceller fra hjertet fra forskjellige størrelser av rognkjeks (A, B, C) og Atlantisk laks (D), HE-fargede snitt, 400x. Svarte piler viser endotelceller, grønne piler viser røde blodceller. A: Atrium, rognkjeksyngel (<5g), med runde endotelceller med en rund/oval cellekjerne., B: Atrium fra rognkjeks (95 g), fra sjøfasen, med avrundede vakuoliserte endotelceller og en sirkulær cellekjerne sentralt. C: Atrium fra rognkjeks (75 g) med sylindriske endotelceller med sirkulær cellekjerne plassert apikalt. D: Atrium fra atlantisk laks, *Salmo salar*, med enkeltlaget flatt endotel. Alle foto: Oda Klingenberg.





Figur 14. Nyre hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*. A: makroskopisk bilde av nyre som viser henholdsvis hodenyre (1), midtnyre (2) og baknyre (3). B: Sagittalsnitt av hodenyre fra rognkjeks, 125 g. (målestokk=200µm), C: Sagittalsnitt av hodenyre fra yngel (<5 g). D: Tverrsnitt av baknyre fra rognkjeks 132 g. E og F viser midtnyre, hvor E er tverrsnitt av nyre hos rognkjeks 132 g (målestokk=100µm) og F er sagittalsnitt fra yngel, <5g. Alle foto: Oda Klingenberg.



Figur 15. Oppbyggingen av bildedatabase for histologiske preparater fra rognkjeks, *Cyclopterus lumpus* (<https://www.flickr.com/photos/184951734@N08/albums>)

## Fargemetoder for påvisning av *Nucleospora cyclopteri* testet og utviklet i prosjektet

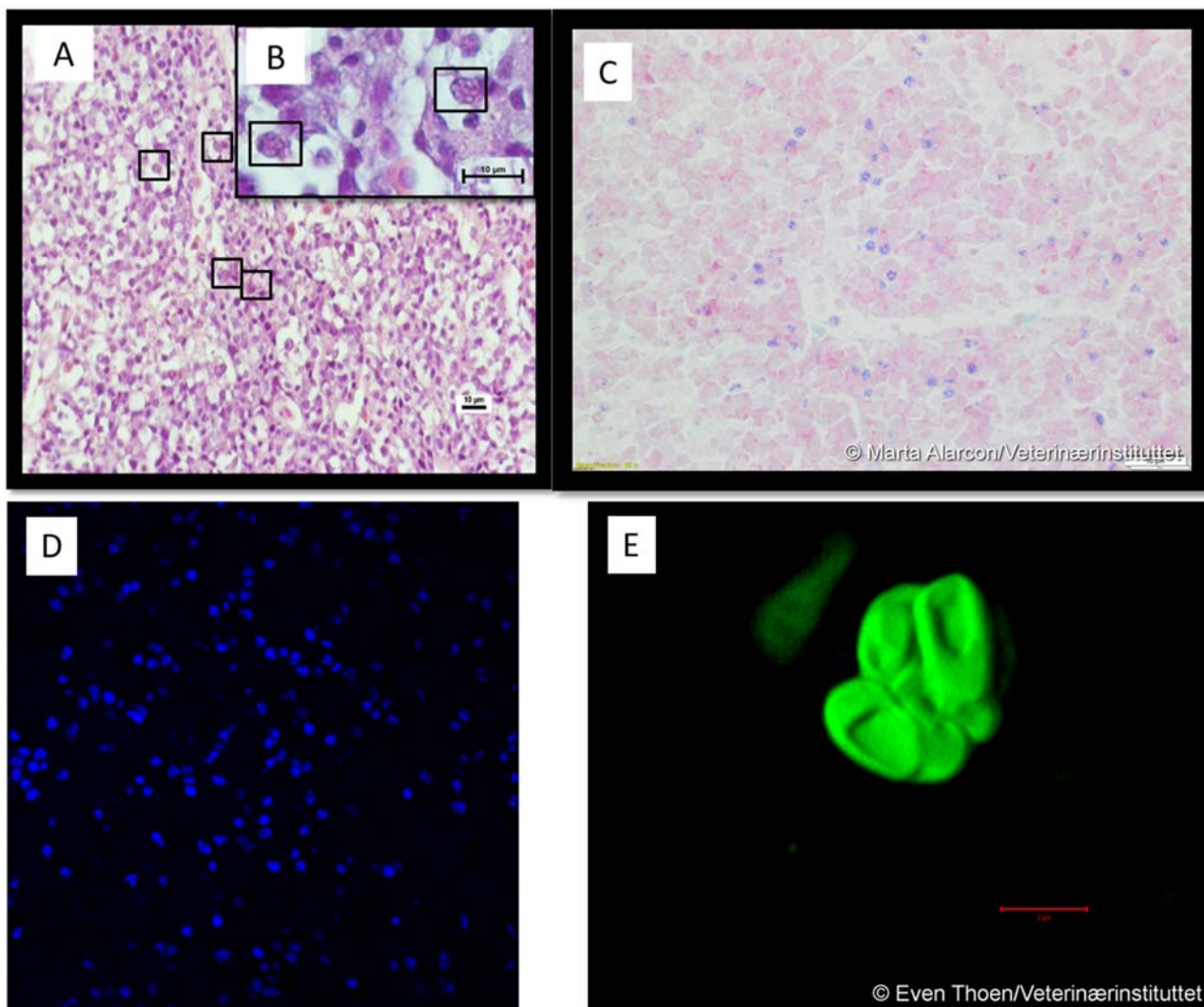
### Standard fargemetodikk brukt i prosjektet

Da det var kjent at det er det vanskelig å påvise parasitten i HE-fargede histologiske snitt ved 400 X forstørrelse, som er standard i rutinediagnostikk, ble flere andre fargemetoder prøvd ut i prosjektet. Eksempler på resultater fra disse testene vises under. Analyser ved 1000 x viser at parasittene er tydelige (Figur 16 B) og at de er mulige å påvise ved denne forstørrelsen, men analysene er tidkrevende. I våre analyser hadde vi eksempler på snitt som ikke viste patologi, men som ved undersøkelse ved 1000 x viste store mengder sporer.



Gram-Twort kan gi gode resultater (Figur 16 C), men farget ikke alltid sporene tilstede i våre prøver. Vi fokuserte på å utvikle ny og spesifikk påvisningsmetodikk (ISH) (se under).

Farging med Calco-Fluor-White fungerte godt (Figur 16 D og E) og farget godt sporer i infiserte individer.



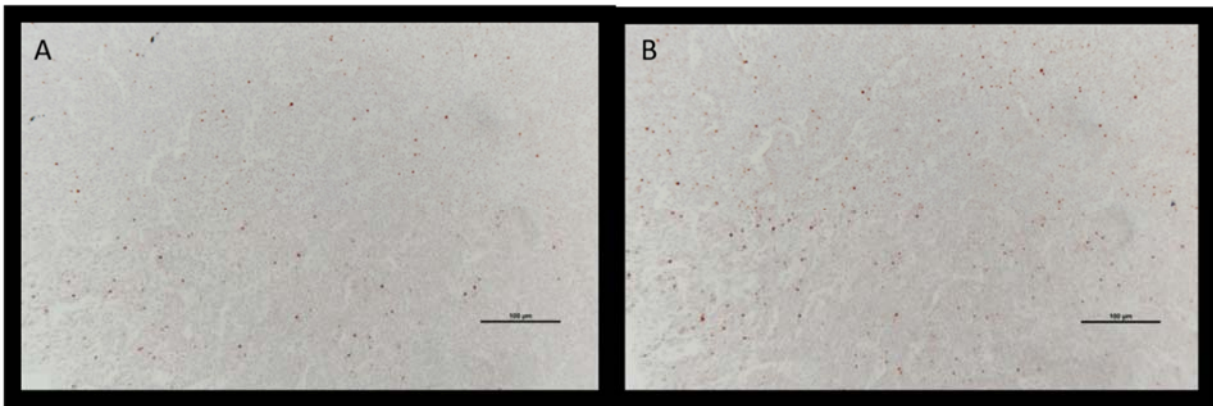
Figur 16. Fargemetoder for påvisning av *Nucleospora cyclopteri*. A og B. Hematoxylin-Eosin (HE) - farget nyrevev fra rognkjeks infisert med *Nucleospora cyclopteri*. C: Sporer av *Nucleospora cyclopteri* farget med Gram-Twort. D: Sporer av *Nucleospora cyclopteri* farget med Calco-Fluor-White (CFW). E: Detalj av sporer, sterkt forstørret (målestokk: 2µm). Foto: A og B: Even Thoen og Haakon Hansen, C: Marta Alarcón, D og E: Even Thoen.

#### *Utvikling og bruk av in situ hybridiseringsmetodikk for påvisning av Nucleospora cyclopteri*

To *in situ* hybridisering (ISH) metoder med ulikt reportersystem ble utviklet under prosjektet. Oligonukleotidsekvensene i probene er identiske både mhp sekvens og LNA-modifikasjoner for begge metoder, men avviker mhp hvilket reportersystem de benytter. Den ene proben er merket med Digoxigenin (DIG) den andre med fluoroforen TYE665 (FISH). Merkingen er i begge ender av probesekvensene. Protokollen for den DIG-merkede proben kan gjennomføres på tre dager, mens FISH kan gjennomføres på én og én halv dag. Ved å optimalisere ytterligere er det sannsynlig å kunne gjennomføre FISH innenfor en arbeidsdag.

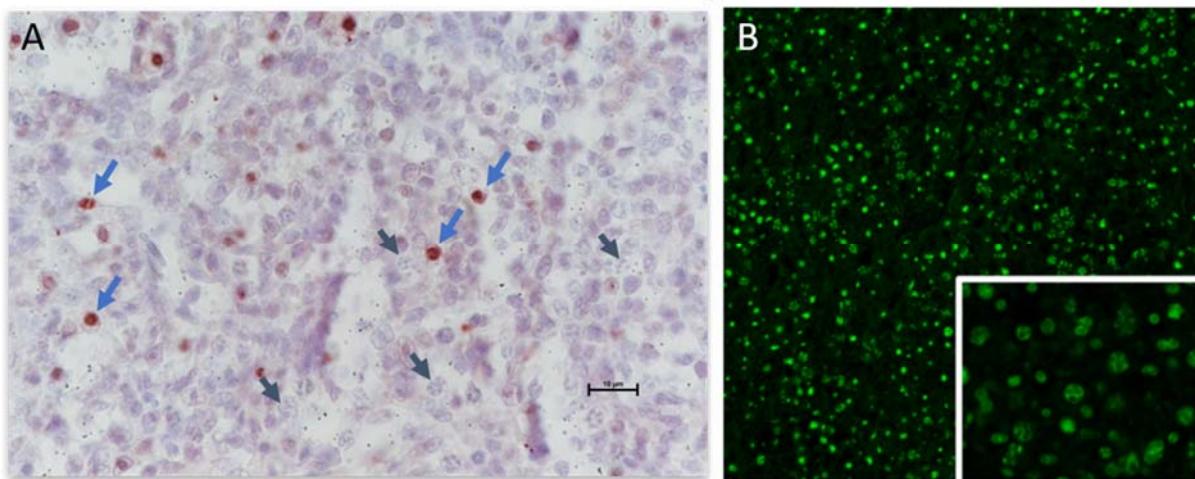
For å optimalisere metoden ved blant annet å optimalisere bindingen til DNA/RNA fra parasitten og få frem sterkest mulig signal ble forskjellige kombinasjoner av proteinase K-behandling testet ut. Resultatene viste at en større andel av parasittene ble farget når en 60 minutters proteinase K - behandling hadde vært gjennomført sammenlignet med bare 30 minutter (Figur 17). En ytterligere økning i lengden på eksponering til proteinase K økte ikke andelen fargede parasitter, men ga en økt

bakgrunnsfarging. Figur 18 viser farging med henholdsvis DIG-merket probe (A) og fluorescerende farget (TYE665) probe. Farging med DIG-merkede prober ser ut til å farge tidlige utviklingsstadier av parasitten (blå piler) og i mindre grad modne sporer (grå piler)(Figur 18, A). Den fluorescerende proben (FISH) farget flere parasitter totalt sett og også sporer (Figur 18, B).



Figur 17. Optimalisering av *in situ* hybridiseringsprotokoll med Digoxigenin (DIG) -merket LNA-probe. Figuren viser merkede parasitter etter proteinase K-behandling i henholdvis 30 minutter (A) og 60 minutter (B) .

Det ble oppnådd ulike fargingsprofiler med de to *in situ* hybridiseringsprotokollene. Siden både probesekvens og LNA-modifiseringer med begge reportersystemer er like, er det uklart hvorfor disse to probene farger ulikt. Videre er Digoxigenin og TYE665 ikke er så forskjellige i størrelse (MW DIG=390.51, MW TYE665=516.6) så penetreringsevnen burde ikke være så forskjellig dersom man kun ser på størrelse på disse. Muligens bunner forskjellen i at DIG-alternativet genereres indirekte gjennom å sekvensielt benytte anti-DIG-HRP antistoff, biotinylering og HRP-streptavidin. Selv om proben binder spesifikt kan manglende evne for antistoffet til å binde DIG-molekylet, eller at en av de andre trinnene i fargeprosessen hemmes, føre til at signalet uteblir. Alternativt kan ulike fysiokjemiske egenskaper ved DIG vs. TYE665 ha betydning den observerte forskjell i farging, muligens linket til ulik penetreringsevne av proben i snittet under hybridisering.



Figur 18. *In situ* hybridisering. A: ISH med digoxigenin (DIG) -merket probe. Denne metoden ser ut til å farge tidlige utviklingsstadier av parasitten (blå piler) og i mindre grad modne sporer (grå piler). B: FISH med TYE665-merket probe. Den fluorescerende proben farget flere parasitter totalt sett og ser også ut til å farge modne sporer (400 og 630 ganger forstørrelse). Foto: Even Thoen og Haakon Hansen

*In situ* hybridiseringsmetodikken, som utviklet her, kan benyttes i videre studier av denne parasitten, spesielt når det gjelder vevstropisme, og resultatene, som viser at den fluorescensfargede proben gir farging av flere parasitter og flere utviklingsstadier, er også viktige for studier av andre arter mikrosporidier i oppdrett.

## Klinisk betydning av infeksjoner med *Nucleospora cyclopteri*

De kliniske effektene av *Nucleospora*-infeksjon var ment å skulle studeres kontrollert i de eksperimentelt etablerte populasjonene med smittet og usmittet fisk ved anlegget på Sighaug, og senere i sjø. Da det ikke lot seg gjøre å overføre smitte fra foreldrefisk til avkom har det ikke vært mulig studere patogenese, patologi, dødelighet eller påvirkning på immunforsvaret som følge av *Nucleospora*-infeksjon på denne måten. Vi ble dermed henvist til å vurdere den kliniske betydningen på bakgrunn av ett tidligere diagnostisk kasus innsendt til Veterinærinstituttet, undersøkelser av villfanget stamfisk og historiske data (PatoGen AS og Veterinærinstituttet).

Basert på ca. 2500 analyser, utført av PatoGen AS i 2016 og 2017, er prevalensen av *N. cyclopteri* hos rognkjeks ca. 25%. Hovedandelen av analyser er utført på organer og kjønnsprodukter fra villfanget stamfisk. Når det gjelder settefisk/ungel er tallmateriale mer begrenset, men ut ifra analysene som foreligger er den totale prevalensen lavere - ca. 15%. I de fleste analyserte prøveuttakene er prevalensen hos ungel svært lav, men enkelte prøveserier skiller seg imidlertid ut med prevalens opp til 80%, og samtidig høy intensitet på enkelte fisker (ct<10). Disse variasjonene kan med dagens kunnskap ikke forklares, hverken med hensyn på smittevei eller smittedynamikk i populasjonen. Det kan imidlertid mistenkes at spesielle forhold eller situasjoner i produksjonskjeden, knyttet til smittekilde eller fiskens motstandskraft har spilt en rolle. I slike tilfeller mener vi det er naturlig å tro at *N. cyclopteri* er av betydning, enten i seg selv eller i samspill med andre infeksjoner.

I forkant av prosjektets start ble det ved Veterinærinstituttet utført diagnostikk på én sak bestående av ti rognkjeks fra et settefiskanlegg, hvor det var registrert øket dødelighet, men såvidt vi vet ikke tydelige makroskopiske forandringer. Metoden brukt var tradisjonell histopatologi med HE-preparater. Det ble i første omgang kun bemerket beskjedne, uspesifikke patologiske forandringer, men preparatene ble undersøkt på nytt da det ble klart at noen av fiskene hadde fått påvist *N. cyclopteri* med relativt lave ct-verdier. Det ble da påvist mikrosporidier både ved spesialfarging med gram-twort og undersøkelse av HE-snittene ved 1000x forstørrelse. Siden ble preparater fra saken undersøkt både med FISH og calco-fluor-white, hvorpå det ble påvist store mengder av parasitten i hematopoietisk vev i nyre, uten at det kunne sees betydelig patologi i organet. FISH-metoden viser at sporene forekommer flekkvis i vevene og at det kan være fare for å ikke få med berørte områder, både i histologiprøver og prøver til PCR. Dette betyr også at man kanskje må lete spesifikt etter parasitten for å finne den, slik som med ISH, fordi affiserte områder ikke oppdages i rutinediagnostikk. Det er derfor mulig det kan være «mørketall» når det gjelder forekomst av *N. cyclopteri*. Betydningen av «subkliniske» infeksjoner, i form av mulig korrelasjon med andre infeksjoner, blir også vanskelig å vurdere dersom bakenforliggende *Nucleospora*-infeksjoner ikke oppdages. Utvikling av en raskere ISH-metodikk for bruk i rutinediagnostikk, ville i så måte være et godt hjelpemiddel.

I et fåtall tidligere diagnostiske saker på settefisk eller rognkjeks i merd undersøkt ved Veterinærinstituttet er det sett store patologiske forandringer, spesielt i nyrer, bestående av degenerative forandringer og nekroser. Disse ble bekreftet eller sterkt mistenkt å være forårsaket av *N. cyclopteri*. I enkelte av disse tilfellene er det grunn til å tro at forandringene er direkte årsak til dødelighet som følge av organsvikt. I andre saker hos villfanget stamfisk består forandringene også ofte av kroniske betennelsesforandringer og nekroser, og er makroskopisk synlige i form av hevelser og knuter i berørte vev [4, 5, 6]. Fiskene virker imidlertid ikke å være spesielt affisert eller klinisk syke av infeksjonen. Det ser altså ut som at infeksjon med *N. cyclopteri* arter seg forskjellig på villfisk og fisk i oppdrett. Det har gjennom prosjektet ikke vært mulig å peke ut faktorer som gjør det mulig å si noe sikkert om hvorfor villfisk ser ut til å kunne leve og bli gammel med parasitten, mens infeksjonen i oppdrettssituasjoner, i hvert fall i enkelte tilfeller, utvikler seg raskere og ser ut til å medføre dødelighet. Det er likevel nærliggende, ut i fra generell infeksjonsbiologi, å tenke seg at produksjonsforhold, som foring, stress og høyt smittepress kan være faktorer av betydning. Mer konkret kunnskap om dette er trolig avhengig av kontrollerte smitteforsøk eller tett oppfølging av påvist smittede populasjoner i felt.

I og med at det fortsatt knytter seg stor usikkerhet til både smitteveier og effekter av smitte i populasjonene bør det fortsatt fokuseres på problemstillingen både i form av stamfiskutvelgelse, screening og diagnostikk. Dette vil være med å begrense utbredelse av organismen i oppdrett, samt generere ytterligere kunnskap om dens betydning.

Den sub-kliniske betydningen av parasitten, altså hvorvidt sub-kliniske infeksjonsnivåer reduserer fiskens motstandskraft mot andre infeksjoner, er fortsatt uklar. Vi mener likevel det er naturlig å tro at siden *N. cyclopteri* utvilsomt ødelegger leukocytter i til dels høyt antall og i store områder, vil parasitten ha påvirkning på fiskens immunkompetanse. Utredning av påvirkningsgrad vil kreve mer spesifikke immunologiske studier.



## Presentasjoner og publikasjoner som er levert eller planlagt å leveres fra prosjektet

### Foredrag

Thoen, E., Karlsbakk, E. og Hansen, H. Arbeidsmøte, produksjon av rensefisk. Hell 04.06.19

Warland, B.R.E., Nilsen, K., Moore, L., Trösse, C., Alarcón, M., Hansen, H., Devold, M., Karlsbakk, E. 2018. *Nucleospora cyclopteri* (Microsporida): Tissue Tropism, Shedding and Non-Lethal Detection. In 8th International Symposium on Aquatic Animal Health.

Warland, B. Skånsomme metoder for påvisning av *Nucleospora cyclopteri* hos rognkjeks. Dialogmøte for rensefisk. 13.03.18

Karlsbakk, E., Hansen, H., Thoen, E., Alarcón, M., Devold, M. 2018. Prosjektpresentasjon. Dialogmøte for rensefisk. 13.03.18

Hansen, H., Karlsbakk, E., Thoen, E., Alarcón, M., Devold, M. 2017. Prosjektpresentasjon. Dialogmøte for rensefisk. 28.08.17.

### Postere

Hansen, H., Markussen, T.A.D., Weli, S.C., Karlsbakk, E., Faller, R., Thoen, E. 2019. Detection of the microsporidian *Nucleospora cyclopteri* in tissue samples from lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) using *in situ* hybridization (ISH). In 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (Porto).

Klingenberg, O., Hansen, H., Karlsbakk, E., Seternes, T., Thoen, E. 2019. Histology and anatomy of clinically healthy Atlantic lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L.). In 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (Porto).

Hansen, H., Markussen, T., Weli, S.C., Karlsbakk, E., Faller, R., Thoen, E. 2019. Studier av parasitten *Nucleospora cyclopteri* i vev hos rognkjeks ved bruk av *in situ* hybridisering. In Frisk Fisk 2019 (Tromsø).

Klingenberg, O., Hansen, H., Karlsbakk, E., Seternes, T., Thoen, E. 2019. Normal histologi og anatomi hos rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, fra klekketidspunkt til utsett i sjø. In Frisk Fisk 2019 (Tromsø).

### Masteroppgaver

Nilsen, K., 2018. The occurrence of important pathogens in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) from a wild population fished for brood fish. University of Bergen

Warland, B., 2018. Tissue tropism and non-lethal detection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). University of Bergen

Klingenberg, O., 2019. Normalhistologi hos oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.). Med fokus på organene hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever. UiT The Arctic University of Norway/UiT Norges Arktiske universitet

### Planlagte artikler

Hansen, H., Markussen, T., Karlsbakk, E., Weli, S.C., Faller, R., Thoen, E., in prep. Detection of the microsporidian parasite *Nucleospora cyclopteri* in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) by *in situ* hybridization (ISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Warland, B. et al. In prep. Tissue tropism and non-lethal detection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.).

Nilsen K. et al. In prep. Microparasites in adult wild lumpfish, from a major broodfish fishery.



## Liste over figurer

Figur 1 Holdetanker for rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> , ved Skjerneset fisk, Møre og Romsdal .....	8
Figur 2 Ulike reportersystemer benyttet i <i>in situ</i> hybridisering (ISH). A) Digoxigenin (DIG) -merket oligonukleotid probe. B) Oligonukleotid probe merket med fluoroforen TYE665 (FISH). Begge probene har samme sekvens og er LNA-modifisert i samme posisjoner.....	10
Figur 3 Eksempel på bilde og merking (tagging) av bilder til bildedatabasen.....	11
Figur 4 Tettheter (normalisert ekspresjon) av <i>Nucleospora cyclopteri</i> i forskjellige vev hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> .....	13
Figur 5 Vevsfordeling av <i>Nucleospora cyclopteri</i> i rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> , basert på rangering av parasittens tettheter i vevene (NE). Tetthetene i vevsprøvene fra hver fisk ble rangert fra 1 til 10, der vevet med høyest tetthet fikk rangering 10. (Nyre 1,2,3 er fram, midt og baknyre, CNS er hjerne). .....	14
Figur 6 Prevalens av <i>Nucleospora cyclopteri</i> i forskjellige vevsprøver fra rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Hjertet var alltid positivt i infiserte fisk, nyreprøver avslørte 58-75%. .....	15
Figur 7 Sammenhengen mellom positive svaberprøver fra overflaten av rognkjeks og faktisk infeksjon. Sugeskålen, som er i kontakt med karveggen er ofte kontaminert av parasitt i biofilmen i karet. Svaberprøver fra beskyttede steder som bak brystfinnen og under kanten av gjellelokket var best med hensyn på å gi færrest falske positive, men mange infeksjoner avsløres ikke av svaberprøven fra disse stedene. ....	15
Figur 8 <i>Kudoa islandica</i> (Myxozoa) i skjelettmuskulatur hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Foto: Marta Alarcón.....	18
Figur 9 Parasitter på gjellen til rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Øverst til venstre; <i>Trichodina</i> sp. Resten: <i>Gyrodactylus</i> sp. (Monogenea). Foto: Marta Alarcón .....	18
Figur 10 Parasitter i mage- tarmkanalen hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Venstre: trematode- Høyre: flagellater, sannsynlig <i>Cryptobia dahlii</i> . Foto: Marta Alarcón .....	19
Figur 11 Koksidier og koksidiøse i tarmepitel hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Foto: Marta Alarcón .....	19
Figur 12 Myxozoaer i nyre hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . Foto: Marta Alarcón .....	20
Figur 13 Hjerte hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> (A, B, C) og laks, <i>Salmo salar</i> (D). Endotelceller fra hjertet fra forskjellige størrelser av rognkjeks (A, B, C) og Atlantisk laks (D), HE-fargede snitt, 400x. Svarte piler viser endotelceller, grønne piler viser røde blodceller. A: Atrium, rognkjeksyngel (<5g), med runde endotelceller med en rund/oval cellekjerne., B: Atrium fra rognkjeks (95 g), fra sjøfasen, med avrundede vakuoliserte endotelceller og en sirkulær cellekjerne sentralt. C: Atrium fra rognkjeks (75 g) med sylindriske endotelceller med sirkulær cellekjerne plassert apikalt. D: Atrium fra atlantisk laks, <i>Salmo salar</i> , med enkeltlaget flatt endotel. Alle foto: Oda Klingenberg. ....	22
Figur 14 Nyre hos rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> . A: makroskopisk bilde av nyre som viser henholdsvis hodenyre (1), midtnyre (2) og baknyre (3). B: Sagittalsnitt av hodenyre fra rognkjeks, 125 g. (målestokk=200µm), C: Sagittalsnitt av hodenyre fra yngel (<5 g). D: Tverrsnitt av baknyre fra rognkjeks 132 g. E og F viser midtnyre, hvor E er tverrsnitt av nyre hos rognkjeks 132 g (målestokk=100µm) og F er sagittalsnitt fra yngel, <5g. Alle foto: Oda Klingenberg.....	23
Figur 15 Oppbyggingen av bildedatabase for histologiske preparater fra rognkjeks, <i>Cyclopterus lumpus</i> ( <a href="https://www.flickr.com/photos/184951734@N08/albums">https://www.flickr.com/photos/184951734@N08/albums</a> ).....	23
Figur 16 Fargemetoder for påvisning av <i>Nucleospora cyclopteri</i> . A og B. Hematoxylin-Eosin (HE) – farget nyrevev fra rognkjeks infisert med <i>Nucleospora cyclopteri</i> . C: Sporer av <i>Nucleospora cyclopteri</i> farget med Gram-Twort. D: Sporer av <i>Nucleospora cyclopteri</i> farget med Calco-Fluor-White (CFW). E: Detalj av sporer, sterkt forstørret (målestokk: 2µm). Foto: A og B: Even Thoen og Haakon Hansen, C: Marta Alarcón, D og E: Even Thoen. ....	24

- Figur 17 Optimalisering av *in situ* hybridiseringsprotokoll med Digoxigenin (DIG) -merket LNA-probe. Figuren viser merkede parasitter etter proteinase K-behandling i henholdvis 30 minutter (A) og 60 minutter (B) . ..... 25
- Figur 18 *In situ* hybridisering. A: ISH med digoxigenin (DIG) -merket probe. Denne metoden ser ut til å farge tidlige utviklingsstadier av parasitten (blå piler) og i mindre grad modne sporer (grå piler). B: FISH med TYE665-merket probe. Den fluorescerende proben farget flere parasitter totalt sett og ser også ut til å farge modne sporer (400 og 630 ganger forstørrelse). Foto: Even Thoen og Haakon Hansen ..... 25

## Referanser

1. Karlsbakk E, Alarcón M, Hansen H, Nylund A. Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks [Diseases and parasites of lump sucker (*Cyclopterus lumpus*)]. Fisken og Havet. 2014;Særnr. 1:37-9.
2. Johansen L-H, Colquhoun D, Hansen H, Sindre H, Wergeland H, Mikalsen H: Analyse av sykdomsrelatert risiko forbundet med bruk av villfanget og oppdrettet renseskjell for kontroll av lakselus. In: *Nofima Rapport 9/16*: Nofima; 2016.
3. Bornø G, Alarcón M, Linaker M, Colquhoun DJ, Nilsen H, Gu J, et al: Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015. In: *Veterinærinstituttets rapportserie*, vol. 2: Norwegian Veterinary Institute; 2016.
4. Alarcón M, Thoen E, Poppe TT, Bornø G, Mohammad SN, Hansen H. Co-infection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) and *Kudoa islandica* (Myxozoa) in farmed lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Norway: a case report. *J Fish Dis*. 2016;39 4:411-8; doi: 10.1111/jfd.12372. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jfd.12372>.
5. Freeman MA, Kristmundsson Á. Ultrastructure of *Nucleospora cyclopteri*, an intranuclear microsporidian infecting the Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 2013;33 6:194-8.
6. Mullins JE, Powell M, Speare DJ, Cawthorn RJ. An intranuclear microsporidian in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Dis Aquat Organ*. 1994;20:7-13.
7. Freeman M, Kasper J, Kristmundsson A. *Nucleospora cyclopteri* n. sp., an intranuclear microsporidian infecting wild lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Icelandic waters. *Parasite Vector*. 2013;6 1:49. <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/49>.
8. Nilsen F, Ness A, Nylund A. Observations on an Intranuclear Microsporidian in Lymphoblasts from Farmed Atlantic Halibut Larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1995;42 2:131-5; doi: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb01553.x. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01553.x>.
9. Elston RA, Kent ML, Harrell LH. An intranuclear microsporidium associated with acute anemia in the chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Protozoology*. 1987;34:274-7.
10. Hedrick RP, Groff JM, McDowell TS, Willis M, Cox WT. Hedrick RP, Groff JM, McDowell TS, Willis M, Cox WT. Hematopoietic intranuclear microsporidian infections with features of leukemia in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis Aquat Organ* 1990; 8:189-197. *Dis Aquat Organ*. 1990;8:189-97.
11. Morrison JK, MacConnel E, Chapman PF, Westgard RL. Morrison JK, MacConnell E, Chapman PF, Westgard RL. A microsporidium-induced lymphoblastosis in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in freshwater. *Dis Aquat Organ*. 1990;8:99+104.
12. Baxa-Antonio D, Groff JM, Hedrick RP. Experimental Horizontal Transmission of *Enterocytozoon salmonis* to Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *The Journal of Protozoology*. 1992;39 6:699-702; doi: 10.1111/j.1550-7408.1992.tb04451.x.
13. Freeman MA, Sommerville C. *Desmozoon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasite Vector*. 2009;2. ISI:000272705200001.
14. Palenzuela O, Redondo MJ, Cali A, Takvorian PM, Alonso-Naveiro M, Alvarez-Pellitero P, et al. A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae. *Int J Parasitol*. 2014;44:189-203; doi: 10.1016/j.ijpara.2013.10.005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326177>.
15. Øines Ø, Heuch PA. *Caligus elongatus* Nordmann genotypes on wild and farmed fish. *J Fish Dis*. 2007;30 2:81-91. PM:17298563.

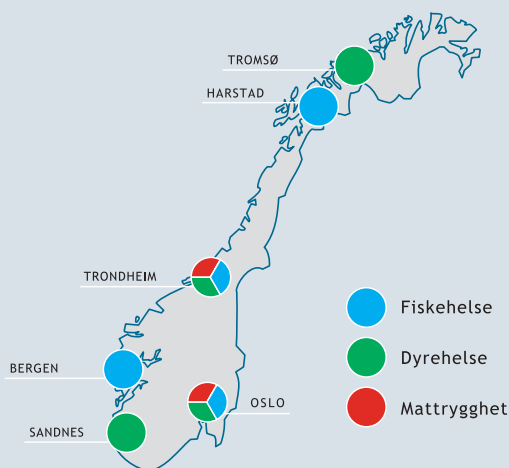
16. El Alaoui H, Gresoviac SJ, Vivares CP. Occurrence of the microsporidian parasite *Nucleospora salmonis* in four species of salmonids from the Massif Central of France. *Folia Parasitol (Praha)*. 2006;53:37-43.
17. Lein I, Bundsgaard D, Gjerde B: Hygienisk produksjon, desinfeksjon og transport av rogn og melke fra rognkjeks. vol. 16: Nofima; 2017: 27.
18. Kui S: Screening av stamfisk. In: *Rensefiskkonferansen 2017*. Clarion Hotel & Congress, Trondheim, Norway 2017.
19. Anonymous: Statistikk for rensefisk - Fiskeridirektoratet. <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk> (2019).
20. Warland B: Tissue tropism and non-lethal detection of *Nucleospora cyclopteri* (Microsporidia) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). University of Bergen; 2018.
21. Nilsen K: The occurrence of important pathogens in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) from a wild population fished for brood fish. University of Bergen; 2018.
22. Klingenberg O: Normalhistologi hos oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.). Med fokus på organene hud, gjeller, hjerte, nyre, milt, pankreas og lever. UiT The Arctic University of Norway/UiT Norges Arktiske universitet; 2019.
23. Matthews CG, Richards RH, Shinn AP, Cox DI. Gill pathology in Scottish farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., associated with the microsporidian *Desmozoon lepeophtherii* Freeman et Sommerville, 2009. *J Fish Dis*. 2013;36 10:861-9; doi: 10.1111/jfd.12084. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23444900>.
24. Weli SC, Dale OB, Hansen H, Gjessing MC, Rønneberg LB, Falk K. A case study of *Desmozoon lepeophtherii* infection in farmed Atlantic salmon associated with gill disease, peritonitis, intestinal infection, stunted growth, and increased mortality. *Parasit Vectors*. 2017;10 1:370; doi: 10.1186/s13071-017-2303-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28764744>.
25. Markussen T, Agusti C, Karlsbakk E, Nylund A, Brevik ØJ, Hansen H. Detection of the myxosporean parasite *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using *in situ* hybridization (ISH). *Parasite Vector*. 2015;8:105; doi: DOI 10.1186/s13071-015-0718-4.
26. Øines Ø, Simonsen JH, Knutsen JA, Heuch PA. Host preference of adult *Caligus elongatus* Nordmann in the laboratory and its implications for Atlantic cod aquaculture. *J Fish Dis*. 2006;29:167-74.
27. Øines Ø: Host selection and infection strategies in *Caligus elongatus*. Norwegian School of Veterinary Science; 2007.
28. Nylund S, Nylund A, Watanabe K, Arnesen CE, Karlsbakk E. *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2010;57 2:95-114.
29. Vestvik NF, Johansen R, Brudal E, Nylund S: Lumpfish Flavivirus - Kunnskap og utfordringer. <https://www.pharmaq-analytiq.com/kunnskap/rensefisk/lumpfish-flavivirus/>. (2017).
30. Scholz F, Glosvik H, Marcos-Lopez M. Cleaner fish health. In: Treasurer JW, editor. *Cleaner Fish Biology and Aquaculture Applications*: 5M Publishing; 2018. p. 526.
31. Guðmundsdóttir S, Vendramin N, Cuenca A, Sigurðardóttir H, Kristmundsson A, Iburg TM, et al. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *J Fish Dis*. 2019;42 1:47-62; doi: 10.1111/jfd.12910. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30397920>.
32. Brudeseth BE, Evensen Ø. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Dis Aquat Organ*. 2002;52:21-8.
33. Sandlund N, Gjerset B, Bergh Ø, Modahl I, Olesen NJ, Johansen R. Screening for viral hemorrhagic septicemia virus in marine fish along the Norwegian coastal line. *PLoS One*. 2014;9 9:e108529; doi: 10.1371/journal.pone.0108529. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25248078>.
34. Erkinharju T, Wüstner SC, Furnesvik L, Hansen M, Hansen A, Hansen H. Forekomst av ulike parasitter hos rognkjeks i oppdrett. *Norsk Veterinærtidsskrift*. 2019;8:520-5.
35. Fayer R. Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Seawater at Environmental Temperatures. *J Parasitol*. 2004;90 3:654-7. [www.jstor.org/stable/3286196](http://www.jstor.org/stable/3286196).
36. Cali A, Takvorian PM. Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: Wittner M, Weiss LM, editors. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1999. p. 85-128.

*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 primæroppgave.

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](http://www.vetinst.no)



**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute