

Fenotyping av kloner av *Paramoeba perurans*



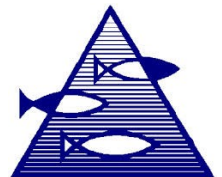
Industrilaboratoriet

Linda Andersen (*ph.d.*), ILAB



FHF-møte, Clarion hotell, Flesland, 02.sept 2015

PHARMAQ
Analytiq





Industrielaboratoriet



FHF-Prosjektnr. 901053:

«Isolering og karakterisering av *Paramoeba perurans* med vekt på fenotypisk og genetisk karakterisering av utvalgte kloner fra laks og andre verter»

Prosjektperiode: 01.02.2015- 01.03.2018

Prosjektarkiv | Kontakt oss | Om FHF | About FHF

FHF
FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS FORSKNINGSFOND

Havbruk Villfisk Tverrgående satsingsområder Slik arbeider FHF

Isolering og karakterisering av *Paramoeba perurans* med vekt på fenotypisk og genetisk karakterisering av utvalgte kloner fra laks og andre verter

Prosjektnr: 901053 Status: Pågår Startdato: 01.02.2015
Slutt dato: 01.03.2018
Fagfelt: Havbruk

Kontakt

Ansvarelig i FHF: Merete Bjørgan Schrøder
Ansvarelig organisasjon: Universitetet i Bergen (UIB)
Utførende prosjektleder: Are Nylund
Prosjektgruppe
Styringsgruppe
Budsjett

Budsjettallene viser den totale ressursinnsatsen i prosjektet, i form av økonomisk tilskudd fra FHF eller andre kilder og i form av egenandel fra f. eks. FOU-institusjoner

Bakgrunn

Et betydelig problem for produksjon av atlantisk laks i Norge har siden midten av 1990-tallet vært forekomst av gjellesykdommer (GD). Hovedvekten av disse tilfellene har vært lokalisert til Vestlandet.

En rekke med forskjellige patogener er knyttet til gjelleproblemer hos laks, og de siste to årene har flere anlegg hatt betydelige tap assosiert med tilstedeværelse av amøben, *Paramoeba perurans*. Flere av disse anleggene har fått diagnosen amøbisk gjellebetennelse (AGD – amoebic gill disease).

P. perurans forekommer i oppdrett av laksefisk i de fleste lakseproduserende land og ble først påvist i Norge i 2006 mens betydelige tap knyttet til denne parasitten har i hovedsak vært registrert høsten 2013 og 2014 (>50 tilfeller i året). I tillegg til laksefisk har amøben vært påvist på flere marine arter som berggytte, rødtnebb/blåstål, rognkjeks, sei og makrell. Det kan ikke utelukkes at alle disse artene kan være viktige for spredning av parasitten mellom oppdrettspopulasjoner, men det kan også være at det foreligger flere varianter av *P. perurans* hvor disse er

Totalt 6 291 000 kr



Industrilaboratoriet

WP1: Fenotypisk karakterisering av amøbekloner og etablering av nedfrysningssmetode



PHARMAQ
Analytiq

☀ *Prosjektgruppe:*

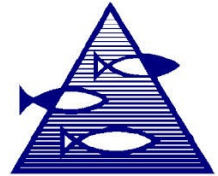
Linda Andersen (ILAB)

Steffen Blindheim (UiB)

Stian Nylund (Pharmaq analytiq)

Egil Karlsbakk (Havforskningsinstituttet / UiB)

Are Nylund (UIB-prosjektleder)



Industrilaboratoriet

☀ *Prosjektperiode: mars-desember 2015*

Genotype og fenotype

☀ *Definisjon:*

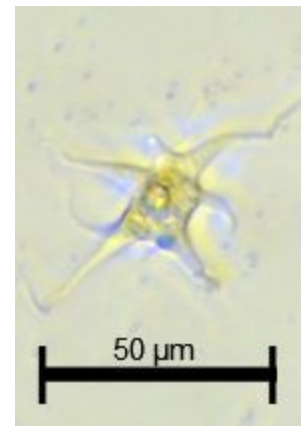
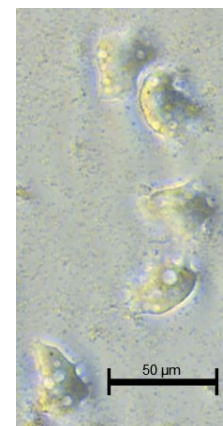
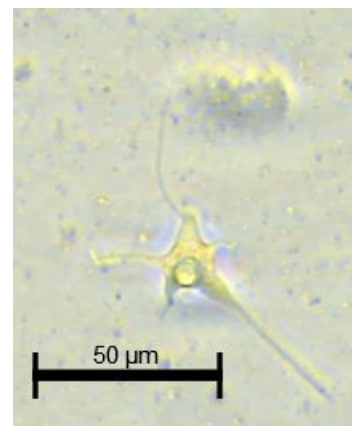
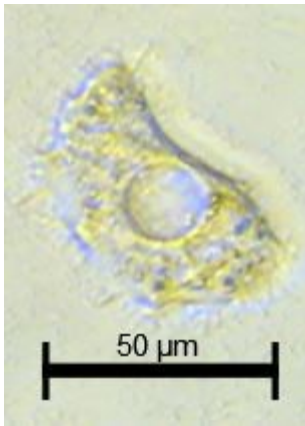
Genotype: hvilke gener / genvarianter en organisme bærer på

Fenotype:*

- i) Karakterene til en organisme, resultat av samspill genotype + miljø*
- ii) en gruppe individer som deler samme fenotype*

Her: amøbelinjer eller kloner som likner hverandre, og som skiller seg litt fra andre kloner pga ett eller flere observerbare karaktertrekk

*Kilde: Henderson's Dictionary of biological terms



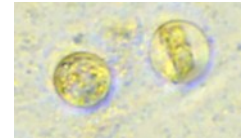


Industrielaboratoriet

Mål (WP1)



- ✦ Isolering, kloning og dyrking av *P.perurans* fra laks og andre fiskeverter
- ✦ Fenotypisk karakterisering av *P.perurans* og deres symbionter
 - Morfologisk (mikroskop/EM)
 - Effekt på lakseceller vha cellekultur
 - Effekt av ulike saliniteter og temperaturer
- ✦ Bakterier og symbiontens betydning for virulens
- ✦ Dannelse av hvilestadier /cyster
- ✦ Testing av ulike nedfrysningmetoder





IndustriLaboratoriet

Fenotypisk karakterisering -innledende studier



☀ Fem utvalgte isolater:

Navn	Årstall	Opprinnelse	Fiskeart isolert fra
ES301013 C2	2013	Sotra	Laks
St251113 B2	2013	Sotra	Laks
L290914 B2	2014	Sogn & Fjordane	Laks
4k220114E9	2014	Os	Laks
LB270814 F3	2014	Austevoll	Leppefisk

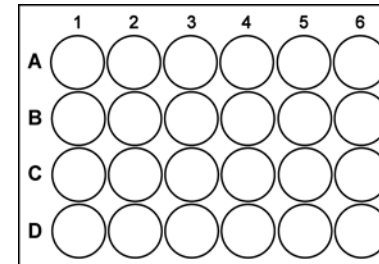
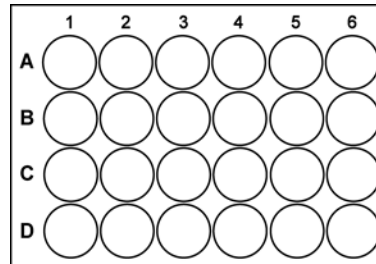
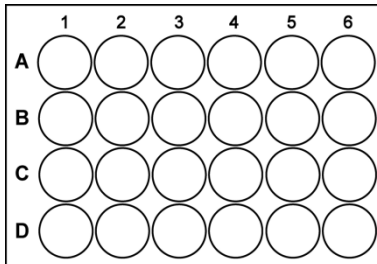


Industrilaboratoriet



Eksperimentelt oppsett

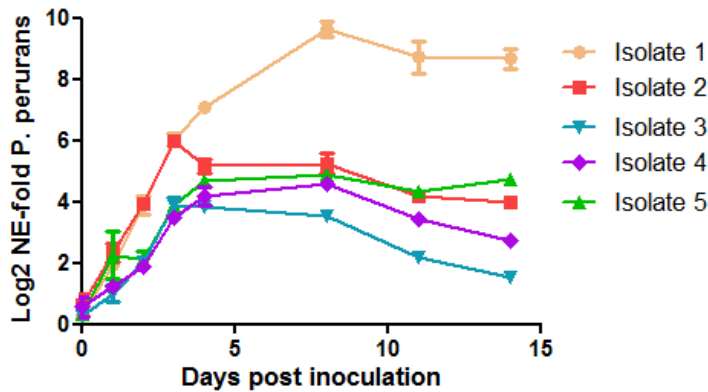
- ☀ Fem isolater av *Paramoeba perurans*
- ☀ 15°C i malt gjær buljong
- ☀ Isolatene studert over 14 dager (en ompodingsperiode)
 - Uttak etter 2 timer, 1-4 dager, 8, 11 og 14 dager
- ☀ 24 brønners brett (24 stk, 3 brett ved 8 tidspunkt)
 - TRIZOL (triplikate brønner): for RNA nivåer
 - Morfologi (triplikate brønner: mikroskop)
 - Ulike fiksativ (SEM, Karnovsky, formalin)
 - Celletelling (CASY eller tellekammer)
 - Cytospin



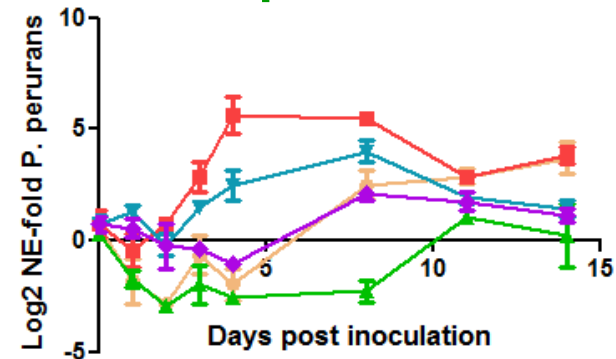
Vekstkurve for de ulike amøbeisolatene

RNA-nivåer

Adherente



Supernatant

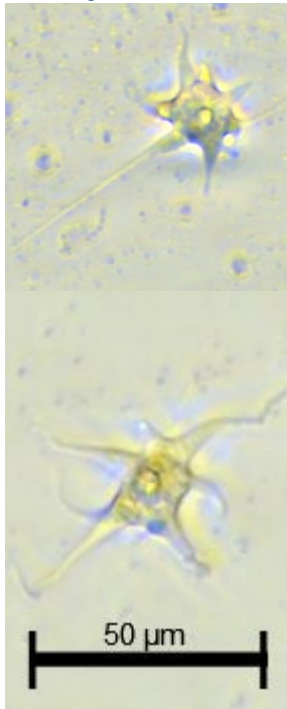


Tidspunkt der en så «flytere» var ulikt mellom isolatene



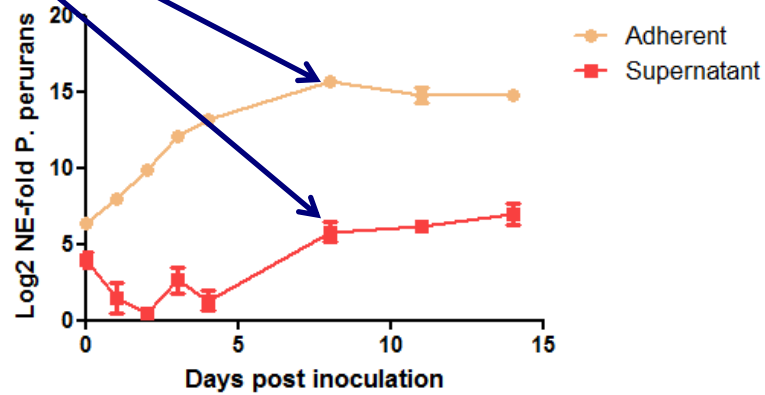
Isolat 1 (fra laks på Sotra 2013)

Flyteform

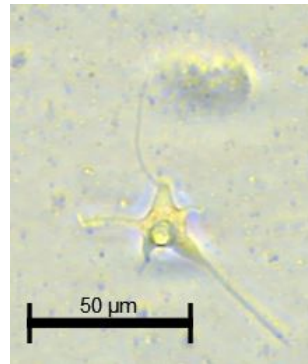
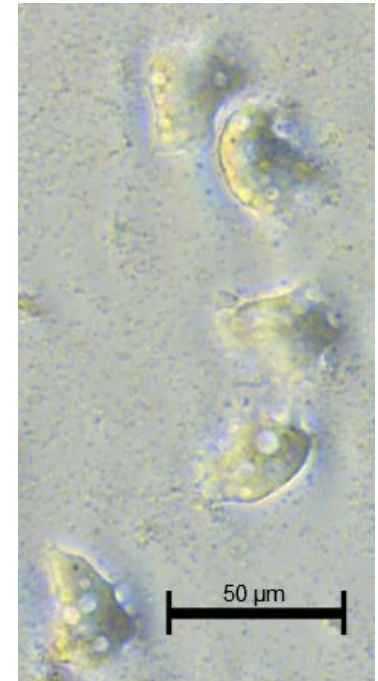


8 dager

Isolate 1

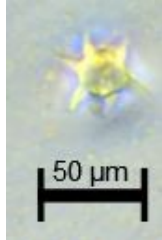
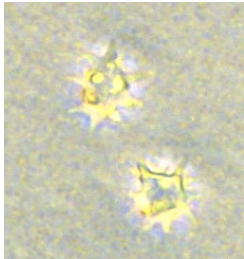


Adherente



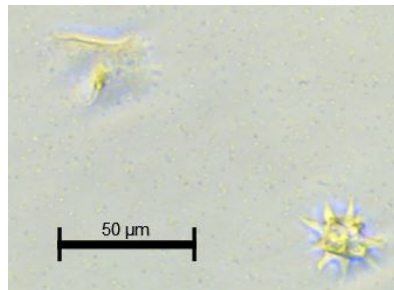
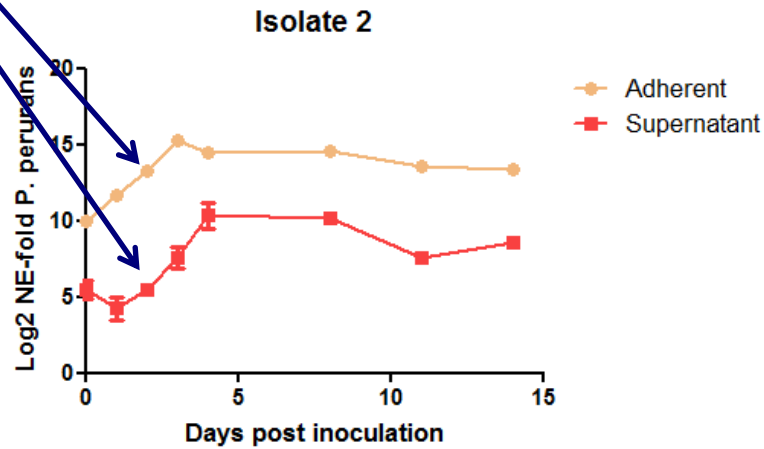
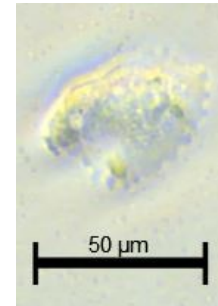
Isolat 2 (også fra laks på Sotra 2013)

Flyteform



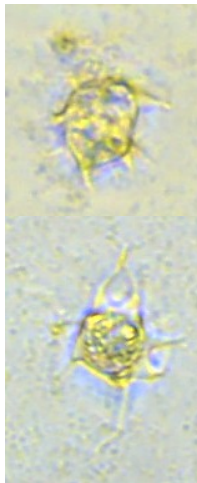
2 dager

Adherente



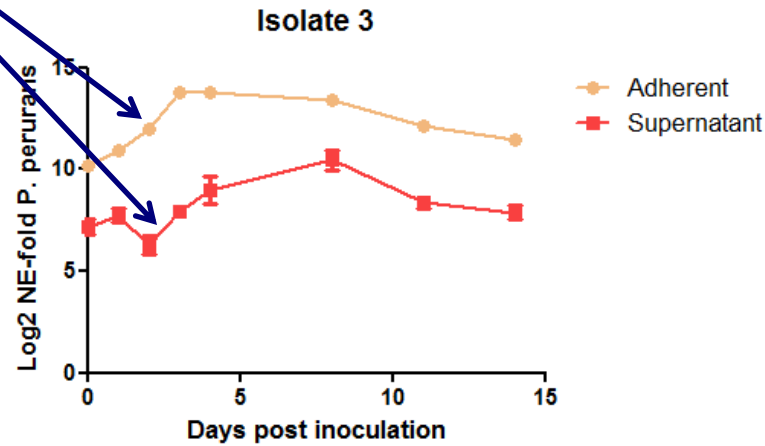
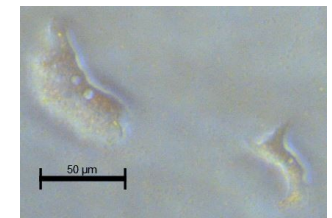
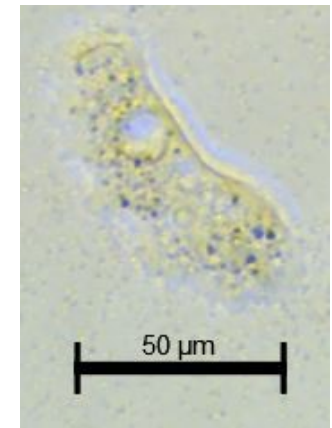
Isolat 3 (fra laks Sogn & Fjordane 2014)

Flyteform



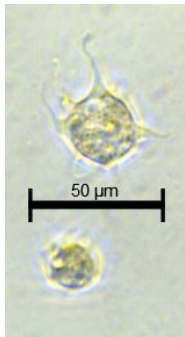
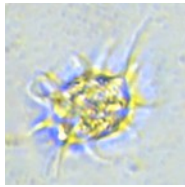
2 dager

Adherente

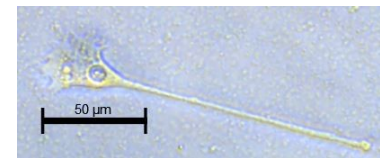
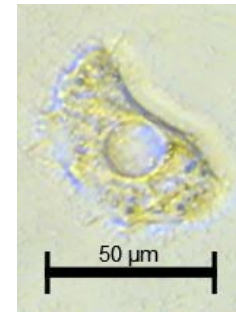
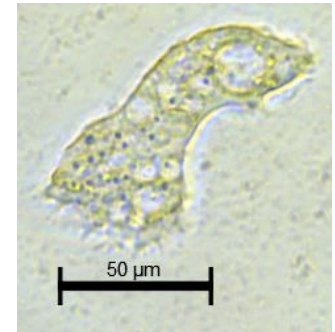
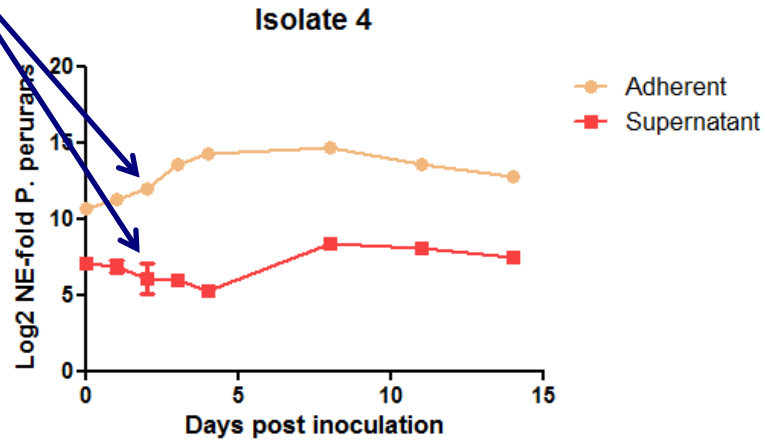


Isolat 4 (fra laks, Os 2014)

Flyteform

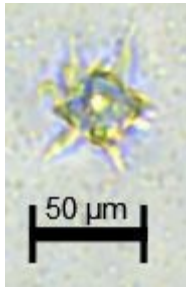


2 dager

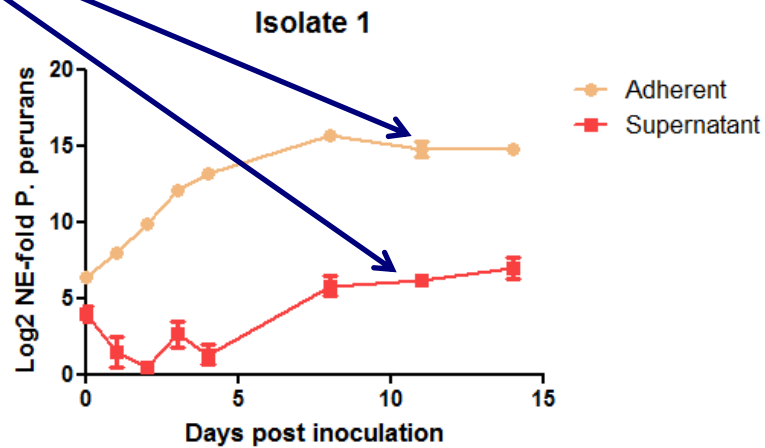


Isolat 5 (fra leppefisk, Austevoll 2014)

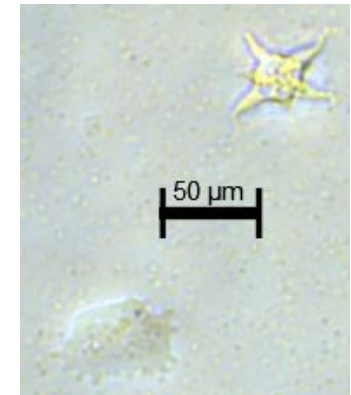
Flyteform



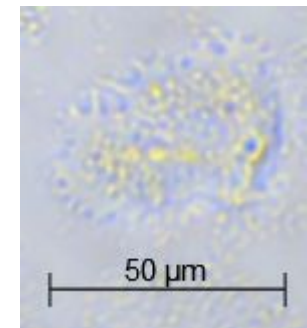
11 dager



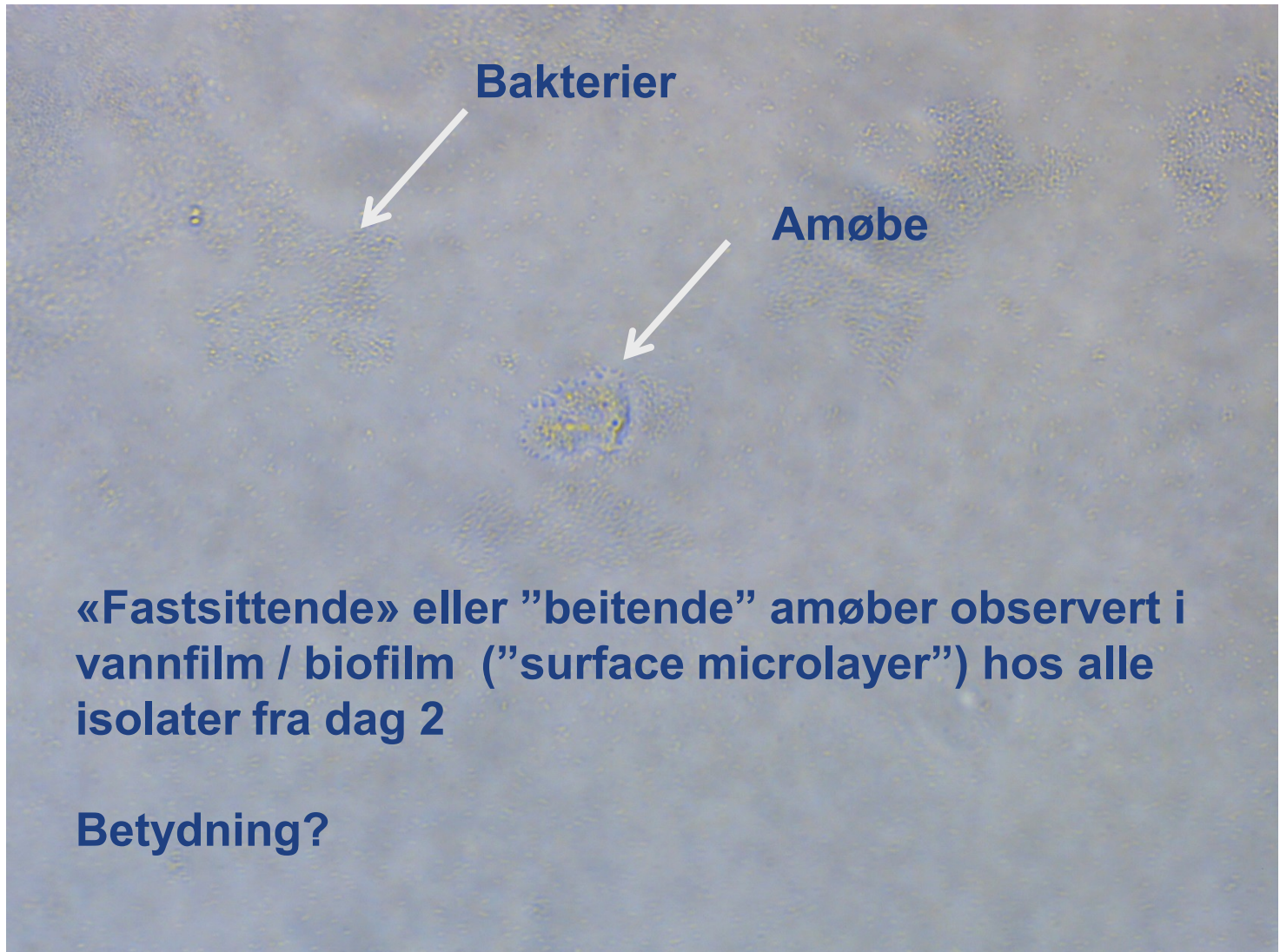
Adherente



Adherente, vannfilm



«Beitende» amøber i vannfilm

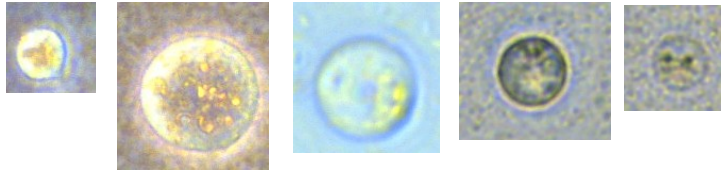


«Fastsittende» eller "beitende" amøber observert i vannfilm / biofilm ("surface microlayer") hos alle isolater fra dag 2

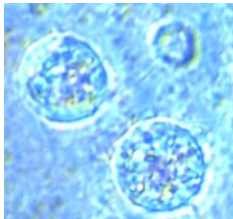
Betydning?

Opprundede stadier sett for alle isolat

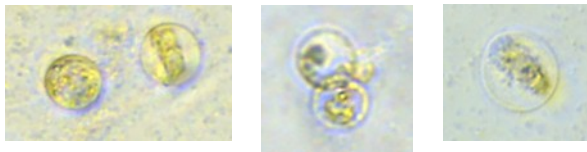
- ☀ Opprundede amøber kunne ses for alle isolat i løpet av de 14 dagene



- ☀ Disse kunne variere i størrelse: ~25-50 μm i diameter



- ☀ Noen var granulerte med lysere områder:



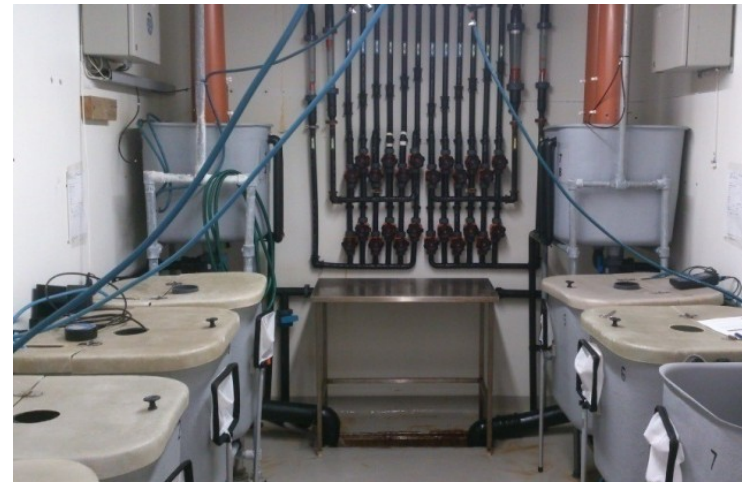


Industrielaboratoriet

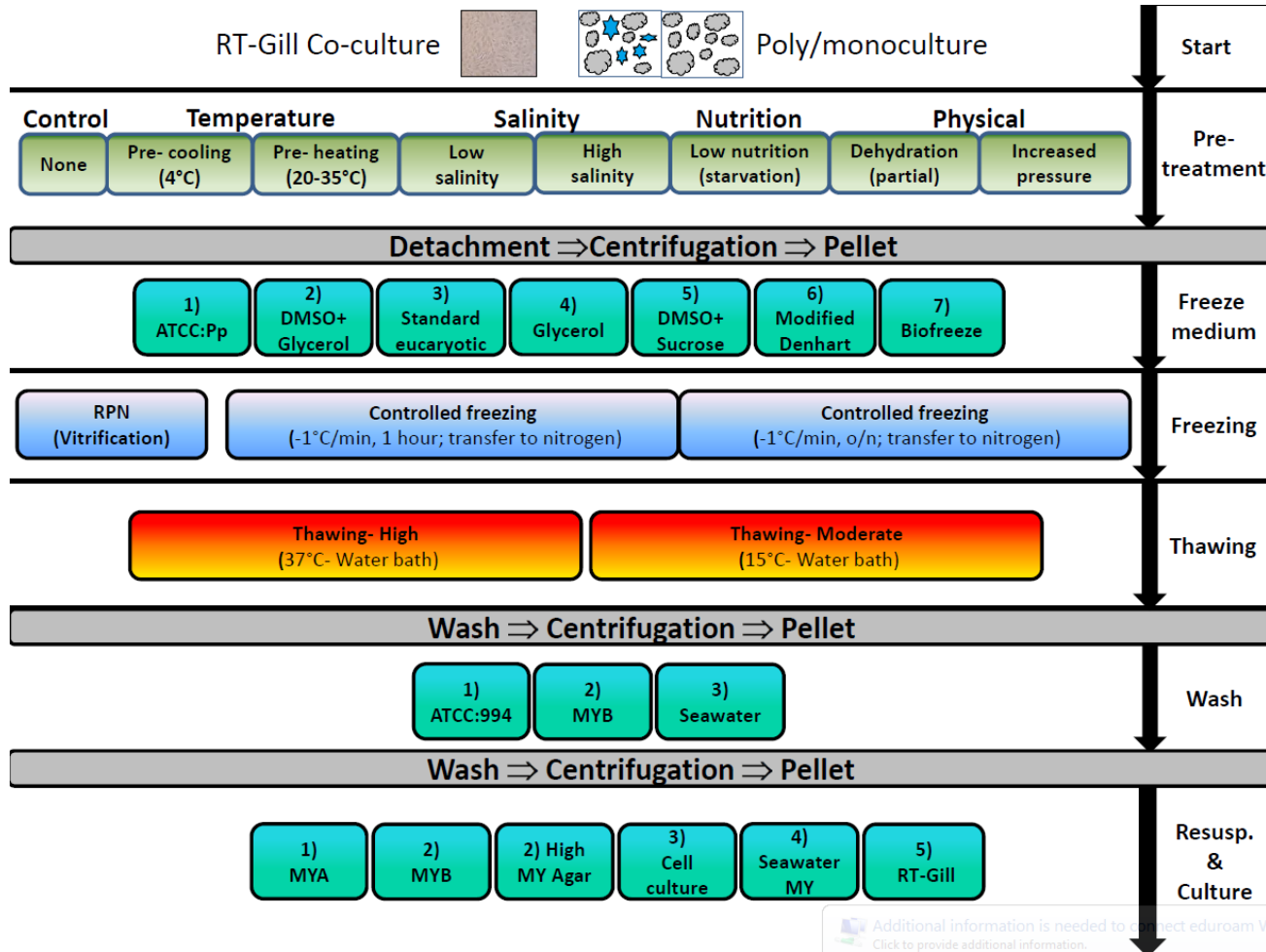


Laks smittet med ulike kloner av *P. perurans*

- ✱ Disse fem klonene (og andre) skal nå benyttes i smitteforsøk med laks høsten 2015
- ✱ Har de ulike klonene ulik virulens hos laksen?
- ✱ Kan de ulike veksthastighetene gjenspeiles i dynamikken i smitteforløpet?
- ✱ Gitt nøyaktig like dyrkningsbetingelser
- ✱ Badsmitte og kohabitering (tilsetting av usmittet fisk)
- ✱ Real-time RT-PCR, histologi og vannprøver
- ✱ Sekvensering av ulike kloner



Nedfrysning av amøber

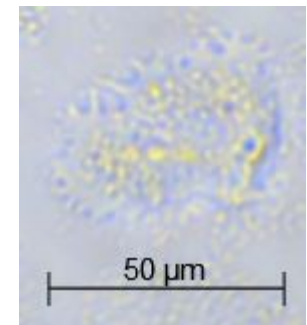
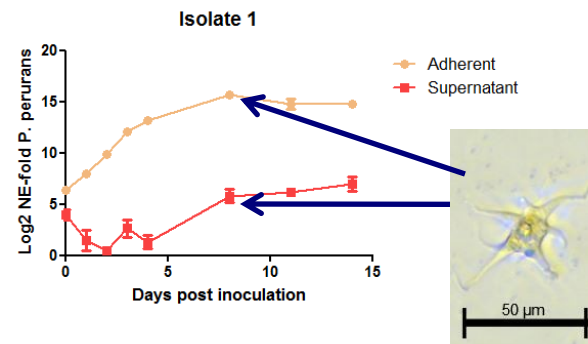
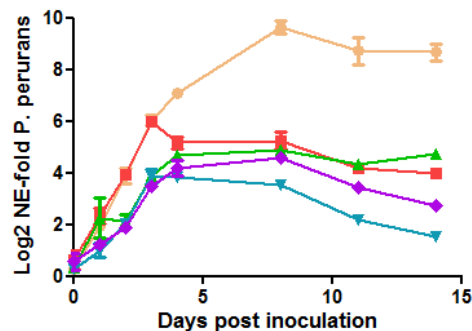


Additional information is needed to connect eduroom W
 Click to provide additional information.

Figur: S.Nylund

Oppsummering

- ✦ Fem kloner fra laks og leppefisk undersøkt
- ✦ Fenotypiske forskjeller påvist, bla utseende på flytere
- ✦ Ulikt vekstforløp og tidspunkt for påvisning av flytere
- ✦ Høyeste RNA nivå for adherente amøber sammenfalt med tidspunkt for dannelse av flytere, og når økning i RNA nivåer i supernatanten kunne ses
- ✦ Kulturene når en platåfase
- ✦ "Beitende" amøber kunne ses i vannfilm for alle isolat
- ✦ De fem klonene skal benyttes i smitteforsøk høst 2015



Malt og gjær medium: - også amøber blir det de spiser!



Colourbox