

Ny kunnskap om epiteliocystis hos laks

*FHF-900800 Gjelleprosjekt
aug2012-apr2015*

*NFR-233858 MultifacGillHealth
apr2014-mar2017*

Anne-Gerd Gjevre, Jannicke Wiik-Nielsen, Mark Powell* og Duncan Colquhoun

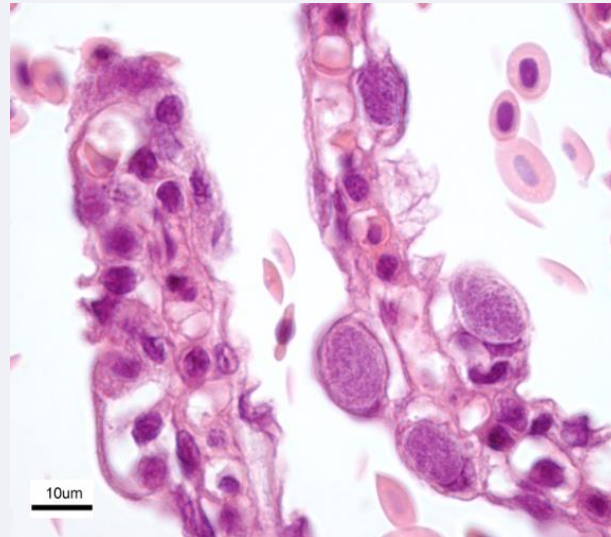


Foto: J Wiik-Nielsen



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

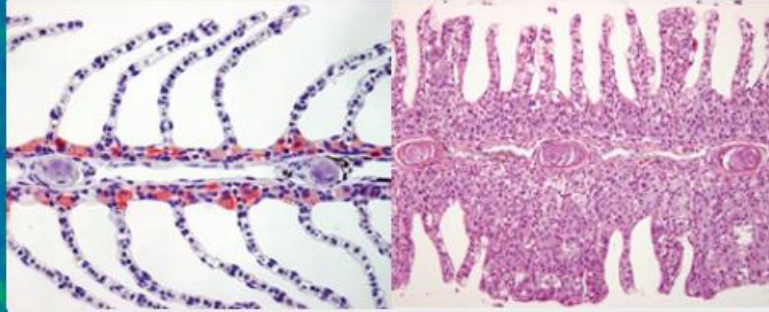


Sluttrapport FHF-900800

Rapport 8 - 2015

Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann - patologi, utvalgte agens og risikofaktorer

*Terje Marken Steinum
Edgar Brun
Duncan Colquhoun
Mona Gjessing
Kai-Inge Lie
Anne Berit Olsen
Saraya Tavornpanich
Anne-Gerd Gjevre*



Disposisjon

- Hvilke agens forårsaker epiteliocystis hos norsk laks?
- Hvor utbredt er epiteliocystis i Norge?
- Hvordan reagerer laksens gjeller på infeksjonen?
- Hvordan blir laksen smittet?
 - Resultater fra to smitteforsøk
- Oppsummering



Hvilke agens forårsaker epiteliocystis hos laks i Norge?

- Mitchell *et al.*, J. of Fish Dis. 2010
- Toenshoff *et al.*, PLoS ONE 2012
- Nylund *et al.*, Arch Microbiol 2015
- Undersøkt gjellevev i VI sin biobank - 2003-2014
- Benyttet *in-situ* hybridisering, laserdisseksjon og PCR

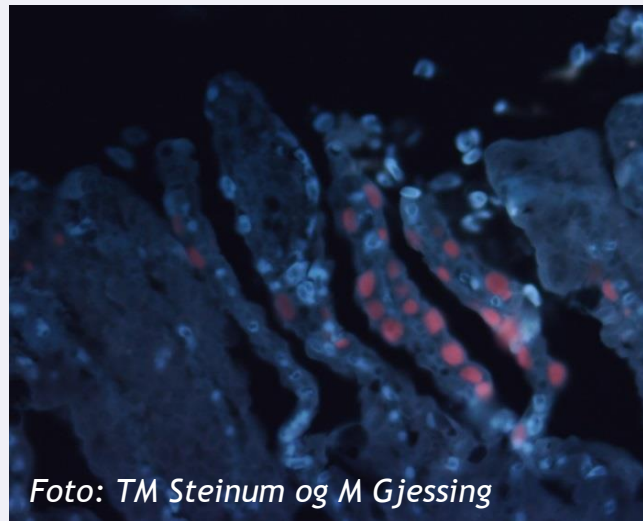


Foto: TM Steinum og M Gjessing

A novel epitheliocystis associated bacterium in Atlantic salmon

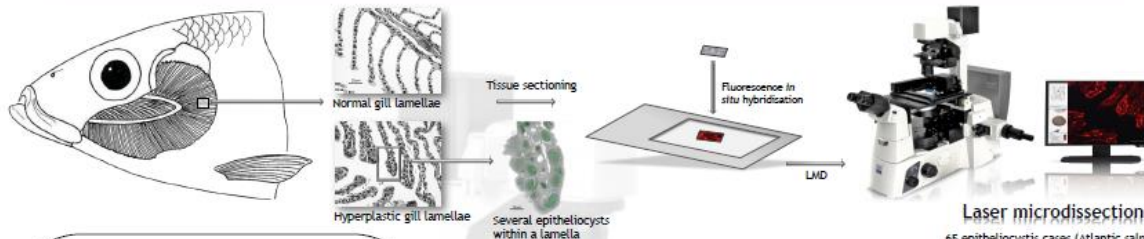
Laser microdissection facilitates identification

J. Wiik-Nielsen¹, H.T. Solheim¹, T.M. Steinum², G. Børnø¹, H.R. Skjelstad¹, A.B. Olsen¹ & D.J. Colquhoun¹

¹Norwegian Veterinary Institute, Norway ²Istanbul University, Turkey



J. Wiik-Nielsen
Norwegian Veterinary Institute
jwiik@vhi.no



Laser microdissection

65 epitheliocystis cases (Atlantic salmon, Norway) covering a period of 10 years

Introduction

Epitheliocystis, an infection characterized by cytoplasmic bacterial inclusions (epitheliocysts) in the gill and less commonly skin epithelial cells, has been reported in many marine and freshwater fish species and may at times be associated with pathological changes and mortality. Bacteria associated with epitheliocystis have not yet been successfully cultured and until recently, only bacteria related to the Chlamydiae have been associated with the infection. The number of bacterial species described and associated with this condition is, however, growing slowly, due largely to retrieval of genetic information by molecular biological means. Recently two non-Chlamydial taxa i.e. *Candidatus Branchiomonas cysticola*¹ and *Endozoicomonas elysicola*² have been identified as agents of epitheliocystis.

Materials & methods

As part of a project aimed at mapping the epitheliocystis related bacterial taxa present in Norwegian salmon farming we developed a system involving visualization of epitheliocysts in paraffin embedded tissue sections by fluorescence in situ hybridization (FISH). Visualized epitheliocysts were then laser microdissected (LMD) and total DNA extracted. Samples negative by *B. cysticola* specific qPCR were investigated further using 'universal' 16S rRNA primers followed by sequencing. The method was used to screen 65 samples collected from a wide geographical area in Norway covering a period of 10 years.

Results

The FISH-LMD method was successful in retrieving relatively pure bacterial nucleic acids in quantities suitable for PCR and subsequent sequencing. 17% of the samples (n=11) were negative by *B. cysticola* specific qPCR, indicating that these cysts are caused by a bacterium other than *B. cysticola*. So far, one of the samples has been sequenced and identified as a previously undescribed agent of epitheliocystis in Atlantic salmon.

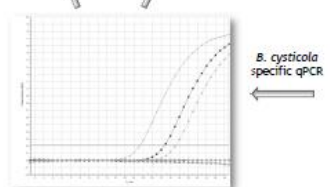
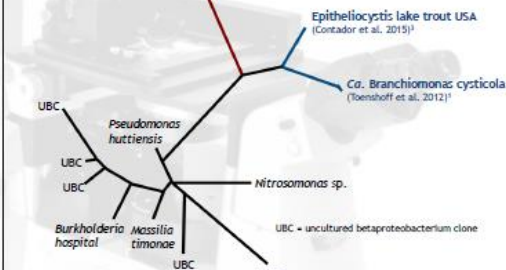
Conclusions

Laser dissection microscopy allows relatively rapid identification of specific subpopulations of bacteria from archived tissue blocks. This study provided additional support for previous studies suggesting *B. cysticola* as the dominating agent of epitheliocystis in farmed Atlantic salmon. A novel epitheliocystis associated betaproteobacterium was also identified. A specific PCR analysis for detection and quantification of the novel bacterium is now under development.

References

1. Tsenhoff ER, Iwamaeda A, Mitchell SD, Steinum T, Falk K, Colquhoun DJ, Horn M (2012). A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS one*, 7(1), e32896.
2. Mendosa M, Gilza L, Martinez X, Caraballo X, Rojas J, Aranguren UF, Salazar M (2013). A novel agent (*Endozoicomonas elysicola*) responsible for epitheliocystis in cobia *Rachycentrum larvae*. *Dis Aquat Organ*, 106:31-37
3. Contador E, Melthor P, Ryneir I, Huber R, Lillo BK, Frasca S, Lundsten JS (2015). Epitheliocystis in lake trout *Salvelinus namaycush* (Walbaum) is associated with a β-proteobacterium. *J Fish Dis*, doi: 10.1111.

Novel epitheliocystis associated bacterium



Acknowledgements

Project 233858 "Gill disease in Atlantic salmon - studies of multiple factors in challenge models" was funded by the Norwegian Research Council.

EAFP 2015

Veterinærinstituttet



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

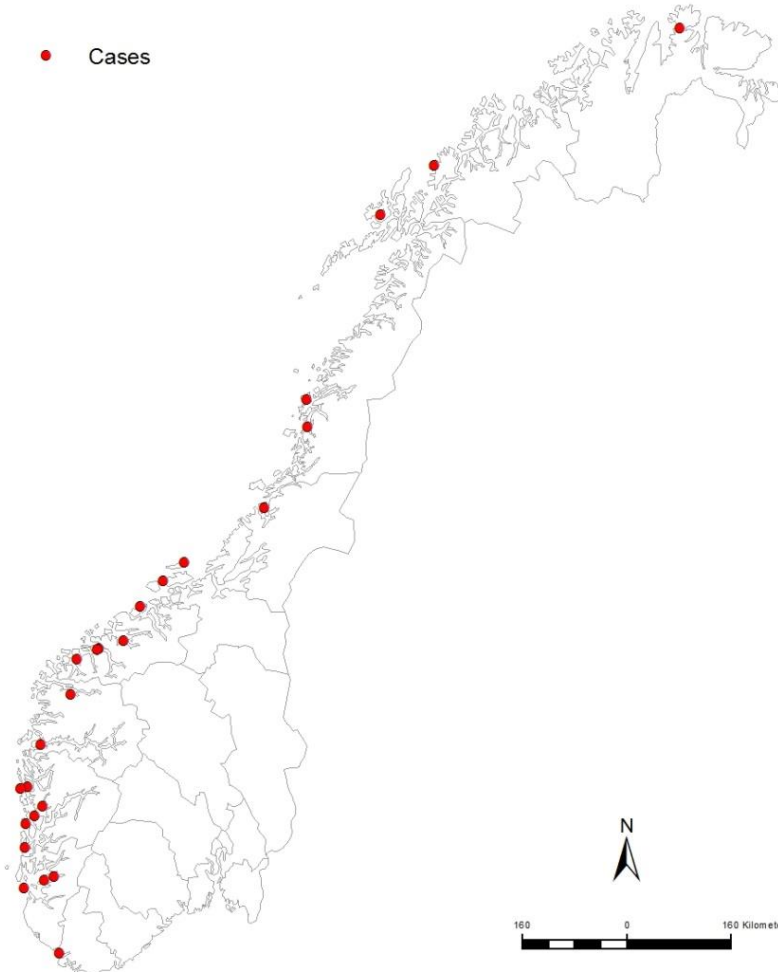
Undersøkelse av historisk materiale

- resultat

- Undersøkte 65 tilfeller av epiteliocystis hos norsk atlantisk laks
- *B. cysticola* ble påvist i 83 % av tilfellene
- I 17 % - mulighet for tilstedeværelse av andre bakterier
- En ny epiteliocystis-assosiert-bakterie påvist
 - I slekt med epiteliocystis-bakterie hos lake trout, USA (Contador *et al.* 2015)

Innsamling av materiale 2012-2013

Totalt 26 lokaliteter med mistanke om gjellesykdom
Gjennomsnitt 25 fisk per lokalitet



Fra Vest-Agder til Finnmark

FHF-900800 Gjelleprosjekt
aug2012-apr2015

Hvor utbredt er epiteliocystis i Norge?

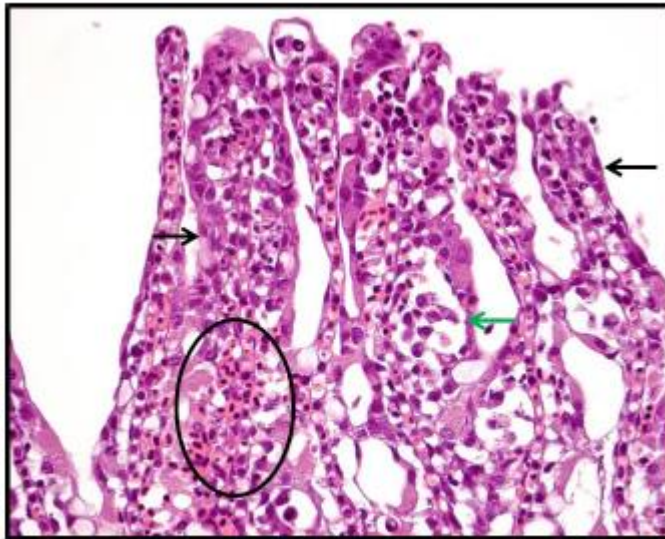
- **Ca. Branchiomonas cysticola**
 - Påvist på 24 av 26 lokaliteter
 - Ofte påvist i nesten alle fisk
 - Ofte sammen med andre agens
 - «Ubiquitær» i anlegg med gjellesykdom

Landsdel	Anlegg nr	B. cysticola % positive fisk
	1	100
		60
	2	100
Sør-Norge	3 (AGD)	100
	4 (AGD)	60
	5 (AGD)	100
	6	100
	7	93
	8	ikke påvist
	9 (AGD)	100
	10	100
	11	100
	12	100
Midt-Norge	13	97
	14	100
	15	100
	16	100
	17	100
	18	100
Nord-Norge		100
	19	100
	20	80
	21	100

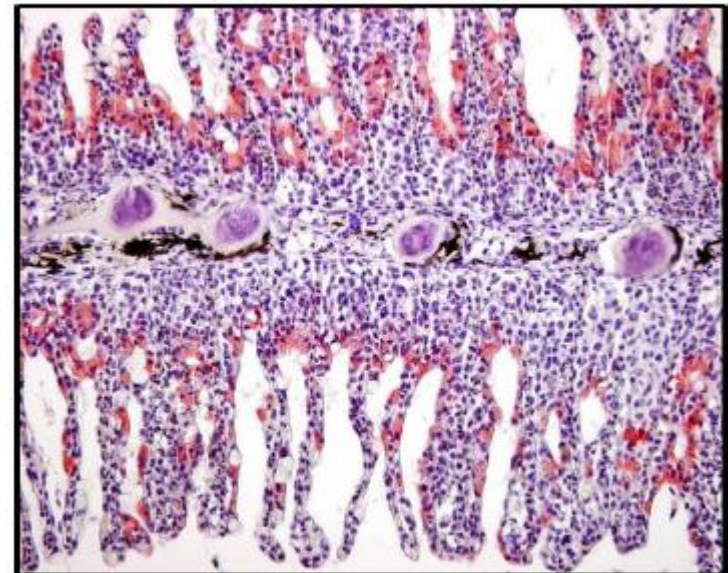


Hvordan reagerer gjellene på infeksjonen?

- Fortykket epitel og dødt vev på lamellene
- Sammenvokste lameller
- Blødning i gjellevevet
- Økt mengde kloridceller



Figur 6. Blødninger (sirkel), fortykkede lameller (piler) og betennelsesceller (grønn pil) under epitel.

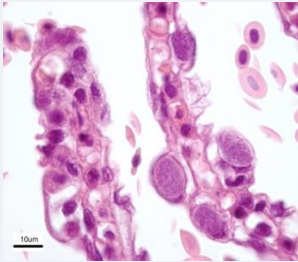


Figur 9. Økt antall kloridceller (røde).

Hvordan smitter 'Ca' Branchiomonas cysticola fisk?

Smitteforsøk 2013

Smittemateriale



Homogeniserte *infiserte gjeller*
fra fisk i sjøvann (klinisk frisk)



Badesmitte og injeksjon i bukhule
4 uker

Smitteforsøk 2015

Smittemateriale

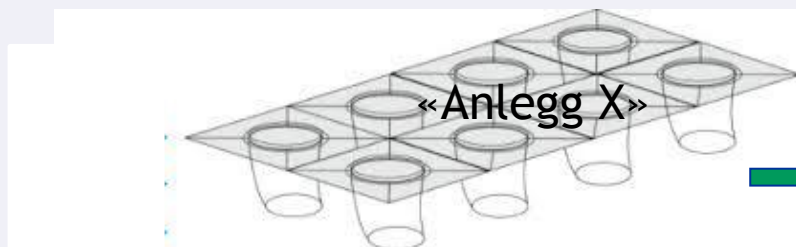


Vann fra kar med syk settefisk

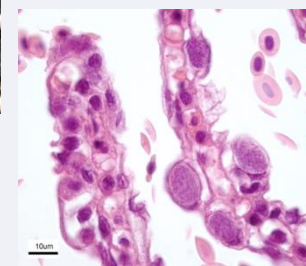
9 uker



Smitteforsøk VESO Vikan, 2013



Gjellebuer fra 25 laks



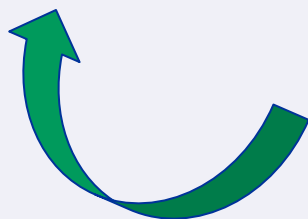
Konklusjon

Kunne ikke bekrefte at Branchiomonas-bakterien gir gjellebetennelse ved smitte av frisk laks

Homogenisering



Prøvetaking
Gjelle og nyre



Badesmitte - postsmolt - sjøvann
Intra-peritoneal smitte - parr - ferskvann



Januar 2015: RAS-settefiskanlegg med Branchiomonas-infeksjon og høy dødelighet

- Veterinærinstituttet kontaktet av fiskehelsebiolog
- *B. cysticola* påvist i gjeller med forandringer
- Anlegget hadde også hatt problemer tidligere år
- Mattilsynet påla sanering
- Veterinærinstituttet fikk tillatelse til å overføre fisk til smitteforsøk på I-lab



Smitteforsøk Industri-laboratoriet, 2015



Fisk overført 29.01



Vann rant fra kar 4 til kar 3



Kar 3: Frisk fisk fra I-lab
40 g



Kar 4: Infisert fisk fra smoltanlegg
40-60 g

Fisk eksponert: 05.02
Forsøket avsluttet: 09.04



Smitteforsøk Industri-laboratoriet, 2015

- Ukentlig prøveuttak
 - Gjeller og nyre til agenspåvisning og histologi
 - PCR for
 - B. cysticola
 - Salmon Gill Pox-virus
 - Andre organer til histologi
 - Filtrerte vannprøver (500 l) for agenspåvisning



Foreløpige resultater-Branchiomonas

- **Fisk fra anlegget (kar 3)**
 - Kraftig infeksjon før overføring til I-lab
 - Lavere infeksjons status ved forsøks-start
 - Infeksjon mer eller mindre forsvunnet etter ca. 1 måned i forsøk
- **Kohabitant fisk (kar 4)**
 - Ingen fisk var PCR-positive ved start
 - 5/5 prøvetatt fisk positive etter ca. en måned
 - Økende infeksjon status mot slutten av forsøket
 - 96% prevalens ved forsøkslutt



Foreløpige resultater- Pox virus

■ Fisk fra anlegget

- Påvist i gjelleprøver tatt i desember 2014
- Lavere smitte nivå (høyere Ct verdier) ved start av forsøket
- Ikke påvist pox virus etter en måned i forsøk

■ Kohabitant fisk

- Høye Ct verdier påvist i 2 av 5 fisk prøvetatt etter en måned i forsøk
- Ingen positive prøver før eller etterpå...



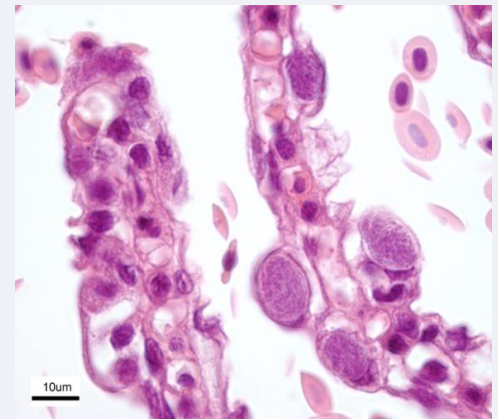
Konklusjoner smitteforsøk så langt

- Blandingsinfeksjon i det opprinnelige utbruddet i settefiskanlegget
 - B. cysticola, poxvirus og flere?
- Høy grad av smitteoverføring med B. cysticola til kohabitanter - mekanisme?
- Svært lav grad av smitteoverføring med poxvirus til kohabitanter?
- Fisken fra anlegget så ut til å kvitte seg med både B. cysticola og poxvirus etter en måned i forsøk



Oppsummering: *B. cysticola*

- Er svært utbredt i norske oppdrettsanlegg
- *B. cysticola* funnet i 83 % av 65 tilfeller av epiteliocystis hos norsk laks
- Opptrer ofte samtidig med andre infeksiøse agens
- Bakterien synes å gi spesielle, syklige forandringer i gjellene
- Vannbåren smitte gir infeksjon av naiv fisk



Takk til alle som har bidratt!



*FHF-900800 Gjelleprosjekt
aug2012-apr2015*



*NFR-233858 MultifacGillHealth
apr2014-mar2017*

Mona Gjessing, VI

Terje M. Steinum, VI

Heidi Solheim, VI

Anne Berit Olsen, VI

Kai-Inge Li, VI

Geir Bornø, VI

Hanne Ringkjøb Skjelstad, VI

Amund Litlabø, Kobbervik og Furuholmen Oppdrett AS

Flere fiskehelsetjenester

