

## **Amøbisk gjellebetennelse (AGD); Temperatur og salinitetsstudie med *Neoparamoeba perurans*-positiv fisk fra felt**

### **SLUTTRAPPORT**

#### **Sammendrag (Norsk/Engelsk)**

Amøbisk gjellebetennelse (AGD) forårsakes av den opportunistiske amøben *Neoparamoeba perurans* (*N. perurans*). Formålet med dette prosjektet var å opparbeide kunnskap om hvorvidt lave vintertemperaturer innvirker på overlevelsen av *N. perurans* i infiserte populasjoner av Atlantisk laks og om naturlig årstidsavhengig temperaturøkning ville fremprovosere klinisk sykdom i infiserte populasjoner.

Fisk fra en tidligere *N. Perurans* infisert populasjon av oppdrettet Atlantisk laks ble ilandført til kontrollerte forsøksbetingelser ved Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB), hvor tilsammen 200 individer ble jevnt fordelt i to 3 m<sup>3</sup> forsøkskar inneholdende sjøvann (~34 ppt) ved 3,5 °C. Etter overføring ble temperaturen i begge karene økt til 6 °C, over 6 dager. Etter akklimatisering ble det gjennomført en kontrollert temperatureksponering i det ene av de to forsøkskarene og temperaturen ble økt med 1 °C, annenhver dag til temperaturen nådde 16 °C. Temperaturen ble så stabilisert og holdt ved 16 °C i 30 dager. Det andre forsøkskaret fungerte som kontroll og ble holdt konstant ved 6 °C gjennom hele forsøksperioden.

Adferd, klinikk og dødelighet ble monitorert gjennom hele forsøket. For å følge utvikling av en eventuell infeksjon ble det foretatt regelmessige uttak av gjellevev for histologisk vurdering og realtime RT-PCR mht. *N. perurans*, i tillegg til visuelle vurderinger av gjellescore.

Den akkumulerte dødeligheten i forsøkskarene var ~28 %, hovedsakelig forårsaket av sårutvikling.

Det ble i løpet av forsøket ikke påvist *N. perurans*, eller beskrevet patologi forenelig med amøbeinfeksjon. Analyser av 0-prøver foretatt ved uttak av fisk fra produksjonslokalitet vist ingen tilstedeværelse av *N. perurans*, hvilket indikerer fravær av *N. perurans* ved forsøksstart.

Grunnet manglende funn av *N. perurans* ved uttak av fisk fra produksjonslokalitet vurderes forsøksresultatene ikke å være konklusive mht. parasittens overlevelse på lave temperaturer eller temperatur som risikofaktor for klinisk AGD.

---

Amoebic gill disease (AGD) of Atlantic salmon is caused by the opportunistic amoeba *Neoparamoeba perurans* (*N. perurans*). The aim of this project was to investigate whether low sea-water temperatures would influence on the survival of *N. perurans* in already infected Atlantic salmon population and if such populations would develop amoebic gill disease due to seasonal increase in water-temperature.

In this experiment, 200 farmed Atlantic salmon (~350 grams) with a history of AGD were transferred (point 0) from a production site on the western coast of Norway to controlled trial conditions at Industrielaboratoriet I Bergen (ILAB). The salmon (n=100x2) was separated in two 3 m<sup>3</sup> tanks containing sea-water (~34 ppt) at 3,5 °C. After transfer the temperature, in both tanks, was gradually increased over a period of 6 days, to 6 °C. The temperature in one of these tanks was then increased with 1 °C every other day until the temperature reached 16 °C, and then kept at 16 °C for a period of 30 days. In the other tank (control) the temperature was held constantly at 6 °C during the whole experiment..

During the experiment, behavior was monitored and morbidities and mortalities was registered. Sampling of histology and realtime RT-PCR of gill tissue was done frequently along with assessment of gill scores, to monitor any development in disease development and AGD-related pathology.

The cumulative mortality for both tanks was ~28 %, mostly related to development of wounds.

There were not detected *N. perurans*, nor described any pathology related to amoebic gill disease during the experiment. Neither samples collected at the production site was positive for *N. perurans* at point 0, which indicates that no amoeba was present at the beginning of the experiment.

Due to the lack of *N. perurans*, results drawn from this project must be considered inconclusive regarding sea-water temperature as risk factor for infection of *N. perurans* in host populations of Atlantic salmon or clinical outbreak of AGD.

## **Bakgrunn**

Amøbisk gjellesykdom (AGD) forårsakes av den opportunistiske amøben *Neoparamoeba perurans* (*N. perurans*). Sykdommen ble for første gang beskrevet i 1985 etter introduksjon av atlantisk laks i Tasmania og har siden den gang vært årsak til store tap i oppdrett av atlantisk laks i Tasmania og Australia. Sykdomsutbrudd har også inntil nylig forekommet sporadisk i Skottland og Irland, men med en betydelig økt forekomst i 2011 og 2012.

Høsten 2006 manifesterte sykdommen seg for første gang ved fire geografisk adskilte lokaliteter langs Vestlandskysten av Norge. Sykdommen opptrådte på ny høsten 2012, da det ved fire kjente tilfeller ble diagnostisert AGD langs Vestlandskysten av Norge.

Grunnet økt fokus og tilgang på nye diagnostiske verktøy er det vinteren 2013 gjennomført prevalensundersøkelser ved bruk av realtime RT-PCR undersøkelser i oppdrettspopulasjoner på Vestlandet. Resultatene fra disse undersøkelsene indikerte en forekomst på om lag 30 % av prøvetatte lokaliteter, med en overvekt av kystnære lokaliteter. Det hersket imidlertid stor usikkerhet om resultatene representerte en «ny-etablering» og reell økt forekomst, eller om de skyldtes økt fokus og/eller tilgang på og bruk av nye sensitive diagnostiske verktøy (PCR).

Litteraturen beskriver temperatur og salinitet som viktige risikofaktorer, der temperaturer over 7 °C virker å disponere for kliniske utbrudd av sykdommen. Det fantes imidlertid lite data som beskrev klinisk forløp under 7 °C, og ingen tidligere undersøkelser beskriver amøbens overlevelsesrate ved lave vintertemperaturer. I lys av erfaringene med AGD fra Skottland og Irland var det usikkert om sykdommen var og ville etableres oppdrettspopulasjoner langs Vestlandskysten av Norge. Kunnskapen rundt amøbens biologi, utbredelse og virulens er begrenset og en hadde ved tidspunkt for forsøksstart ikke nok kunnskap til å forutse hvorvidt amøbens tilstedeværelse ville disponere for kliniske sykdomsutbrudd ved vårens temperaturøkning.

### **Prosjektets omfang**

Prosjektet omfattet innsamling av 200 stk Atlantisk laks fra tidligere AGD-diagnostisert produksjonslokalitet, landbaserte forsøksfasiliteter med temperatur- og salinitetsstyring (Industrilaboratoriet i Bergen), samt innkjøp av diagnostiske tjenester fra Veterinærinstituttet i Bergen, Pharmaq Analytiq og Patogen Analyse.

Prosjektet ble kostnadsberegnet til 787 003,- NOK og hadde en tidsbegrenset varighet på 2,5 mnd.

### **Prosjektorganisering**

Prosjektet ble etablert gjennom et konsortium bestående av havbruksbedriftene Sjøtroll Havbruk AS, Lerøy Seafood Group ASA, Marine Harvest ASA, Grieg Seafood ASA, Norwegian Royal Salmon ASA og Bremnes Seashore AS, samt analyseselskapet Pharmaq Analytiq. Fiskeri og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) bidro med finansiell støtte.

**Tabell 1: Prosjektets styrings- og prosjektgruppe, samt tilknyttede forskningsinstitusjoner.**

Styringsgruppe	Selskap	Navn	Rolle
	Marine Harvest	Gordon Ritchie	Leder
	Lerøy Seafood Group	Harald Sveier	Medlem
	Grieg Seafood	Tor Erik Homme	Medlem
	Norwegian Royal Salmon	Stein Ove Tveiten	Medlem
	Bremnes Seashore	Jørn Rune Bruun	Medlem
	Pharmaq Analytic	Svein Alexandersen	Medlem
	Fiskeri og Havbruksnæringens Forskningsfond	Merete Bjørgan Schrøder	Observatør
Prosjektgruppe	Selskap	Navn	Rolle
	Sjøtroll Havbruk/Lerøy Vest	Bjarne Reinert	Prosjektleder
	Pharmac Analytic	Amund Litlabø	Medlem
	Fomas	Torbjørn Pedersen	Medlem

**Tabell 2: Oversikt over fordeling av ansvarsområder.**

Arbeidsoppgave	Selskap	Navn
Prosjektleder (prosjektledelse, prosjektbeskrivelse, rapportering, sluttrapport)	Sjøtroll Havbruk/Lerøy Vest	Bjarne Reinert
Uttak og seleksjon av fisk	Pharmaq Analytic /Fomas/NRS	Amund Litlabø, Torbjørn, Stein Ove Tveiten
Transport av fisk til smittelaboratorie	ILAB	Linda Andersen
Praktisk gjennomføring i smittelaboratorie	ILAB	Linda Andersen
Prøvetakning (uttak, lagring og evt.	Pharmaq Analytic	Amund Litlabø

innsendelse)		
Analysering PCR	Pharmaq Analytic	Amund Litlabø
Analysering histologi (standardhistologi av formalinfikserte vevsprøver + evt. spesialfarging og immunohistokjemi dersom patologi ikke sammenfaller med AGD-patologi).	Veterinærinstituttet	Øyvind Vaagnes

### **Prosjektets effektmål**

AGD representerer en av de mest tapsbringende sykdommer i oppdrett av atlantisk laks i Tasmania, Australia, Irland og Skottland. I Norge ble sykdommen for første gang beskrevet ved fire tilfeller i 2006 for deretter å ha vært fraværende frem til høsten 2012. Ny aktualitet og begrenset mengde kliniske data fra norske AGD-tilfeller gir økt behov for kunnskap. Ut fra et smitteforebyggende og behandlingsforberedende perspektiv, var det av stor interesse å fremskaffe ny kunnskap om;

- Infiserte laksepopulasjoner ville utvikle klinisk AGD ved naturlig årstidsavhengig temperaturøkning
- Omfang og grad av klinikk.
- Effekt av behandling med hydrogenperoksid.

Det finnes per i dag noe begrenset informasjon på området fra andre lakseproduserende land, men det hersker stor usikkerhet hvorvidt disse data er direkte overførbare til norske N. perurans isolater og gjeldende hydrografi i norske oppdrettsområder. Kunnskap generert fra dette forsøket vil være av stor nytte i det smitteforebyggende arbeidet, samt i forbindelse med vurdering av behov for oppskalering av kontrolltiltak for å øke beredskap på kliniske sykdomsutbrudd i norsk oppdrettsnæring.

### **Prosjektets resultatmål**

- Opparbeide data på hvorvidt lave vintertemperaturer innvirker på amøbens overlevelse i infiserte populasjoner
- Opparbeide data om smitte- og sykdomsutvikling i amøbe-infisert populasjon og hvorvidt dette korrelerer med temperaturøkning.
- Opparbeide data på klinisk utvikling, infeksjonsintensitet og histopatologiske endringer ved et infeksjonsforløp.
- Opparbeide data på effekt ved behandling med hydrogenperoksid.

### **Gjennomføring av prosjektet**

Produksjonslokalitet for Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ble utvalgt som egnet lokalitet med bakgrunn i at lokaliteten hadde diagnostisert AGD høsten 2012. Ved utvelgelse av forsøksfisk ble det gjennomført gjellescore av 30 stk tilfeldig utvalgt fisk. Det ble videre tatt ut gjelleprøver på RNA-later fra de samme 30 individene, samt organpakker (gjelle, pseudobranch, nyre,

lever, milt, hjerte og hud/muskel) fiksert på formalin. Histologiske analyser av gjeller, samt PCR-analyser av gjellelev ble analysert fortløpende ved henholdsvis Veterinærinstituttet i Bergen og Pharmaq Analytiq, mens øvrig formalinfiksert organmateriale ble lagret for evt. senere analyser.

Den 13.02.2013 ble 200 individer Atlantisk laks hentet fra lokaliteten ved bruk av orkastnot. Fisken var av høst 2012 generasjon og hadde en snittvekt på 350 gram. Etter uttak ble fisken overført til transportkar på bil, inneholdende sjøvann (3,1 °C og 34 ‰) fra lokalitet tilsatt 5 ppm Aqui-S, og inntil transportert til Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB).

Fisken ble så fordelt likt i to 3 m<sup>3</sup> forsøkskar. Temperaturen i forsøkskarene var ved forsøksstart 3,5 °C med en saltholdighet på 34 ‰, og ble over en periode på 6 dager økt til 6 °C.

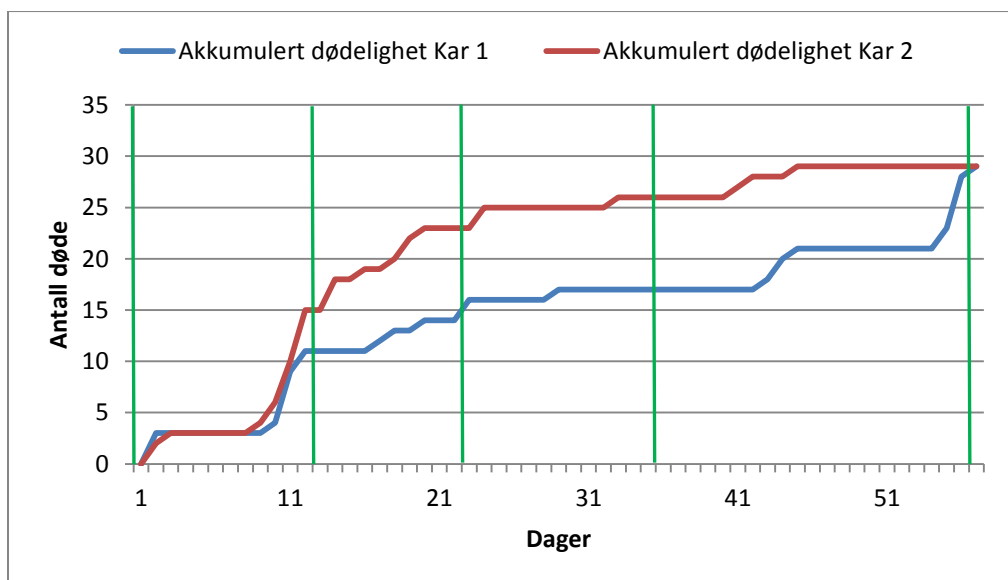
Deretter ble temperaturen i kar nr. 1 økt med 1 °C annenhver dag inntil temperaturen nådde 16 °C. Temperaturen ble så stabilisert ved 16 °C i 30 dager i påvente av klinikk. I kar nr. 2 ble temperaturen holdt stabilt ved 6 °C gjennom hele forsøket.

Adferd, klinikk og dødelighet ble monitorert fortløpende. Det ble videre foretatt utak av gjellelev for histologisk vurdering ved Veterinærinstituttet i Bergen, samt realtime RT-PCR analyser mht. N. perurans. Det ble i tillegg gjennomført visuell bedømmelse av gjellescore.

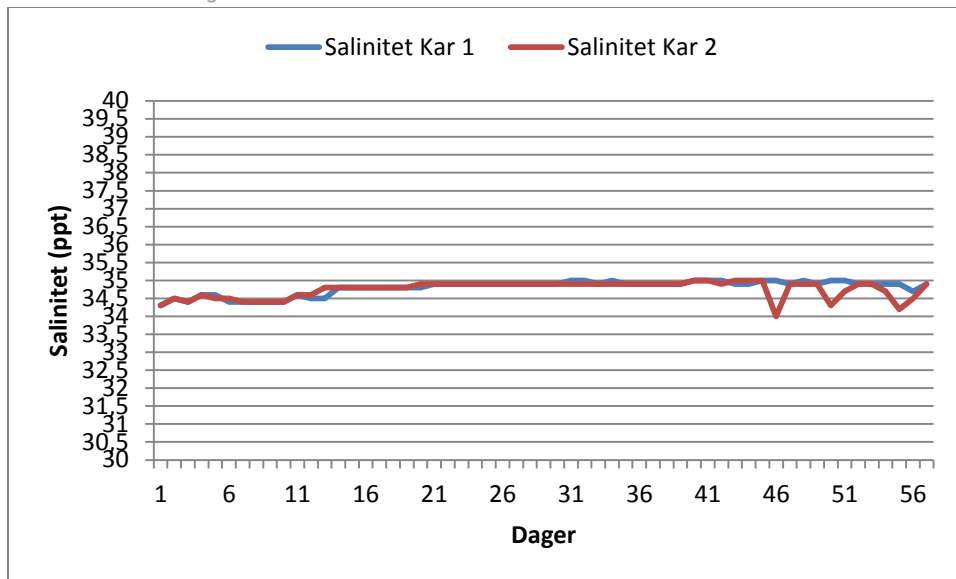
Forsøket ble avsluttet 10.04.2013, og samtlige gjenværende fisk ble avlivet.

## Resultater og konklusjon

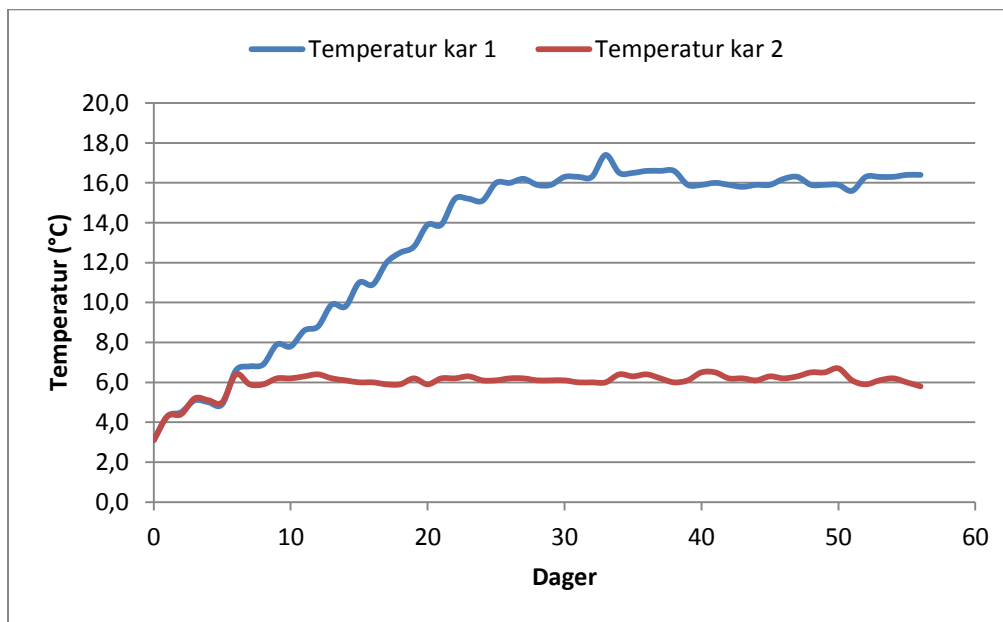
Dødelighetstall og prøvetakningstidspunkt i forsøket er vist i figur 1. Salinitet, temperatur og oksygenivåer er vist i figur 2, 3 og 4. Tabell 1 viser resultater fra gjellescore.



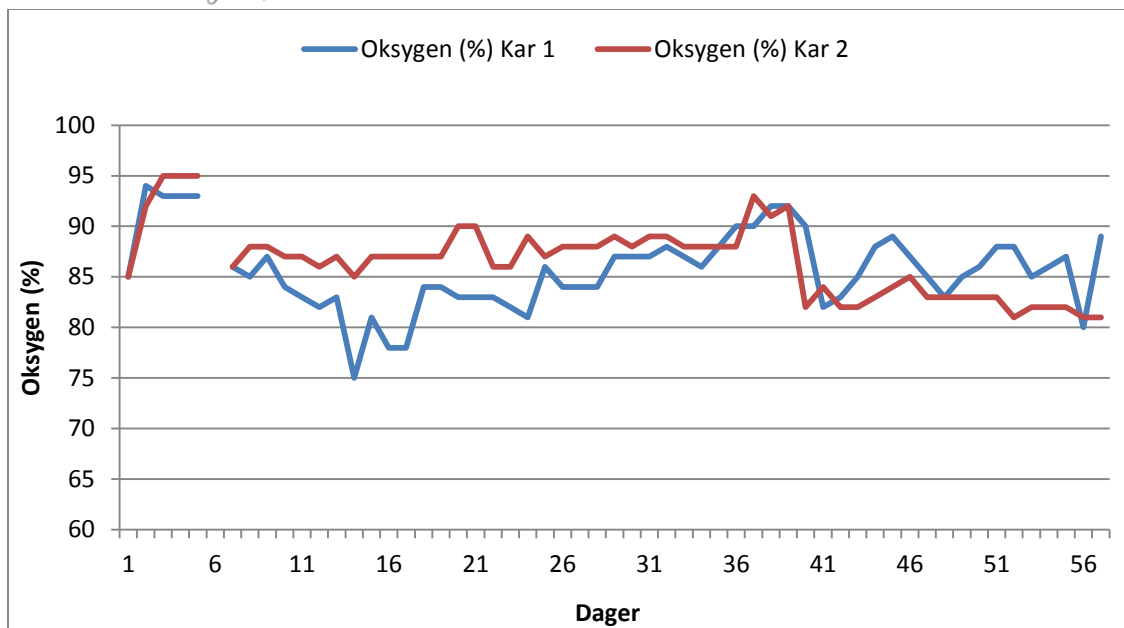
**Figur 1; Akkumulert dødelighet i kar nr. 1 og 2, samt oversikt over prøvetakninger.** Akkumulert dødelighet i begge karene var 29 fisk (~ 28 %). Prøvetakning ved dag 0, 12, 23, 35 og 57 er markert med grønne linjer.



**Figur 2; Salinitet i kar nr. 1 og 2.** Saliniteten ble holdt konstant ved 34-35 ppt.



**Figur 3; Temperatur i kar nr. 1 og 2.** Temperaturen i kar nr. 1 ble økt gradvis til 16 °C, og stabilisert i 30 dager, mens temperaturen i kar nr. 2 ble holdt ved 6 °C under hele forsøksperioden.



**Figur 4; Oksygenmetning i kar nr. 1 og kar nr. 2.** Oksygenmetningen ble holdt mellom 75 % og 95 % metning gjennom hele forsøksperioden.

**Tabell 3. Resultater fra gjellescore.** Undersøkelser for gjellescore ble gjennomført på dag 12, 16, 23, 35 og 57 etter oppstart av forsøket (DEO). Majoriteten av fisken hadde ikke gjellescore (score 0); 104/132 (79,4 %), mens 26/131 (19,8 %) hadde lesjoner som kunne plasseres i kategori 1. Et individ hadde gjellescore 2 (1/131, 0,8 %). ID=ingen data.

Dato	DEO	Kar	Gjellescore			
			0	1	2	3
25.02.2013	12	1	3/10	7/10	ID	ID
01.03.2013	16	1	8/10	2/10	ID	ID
08.03.2013	23	1	10/10	ND	ID	ID
08.03.2013	23	2	8/10	2/10	ID	ID
20.03.2013	35	1	15/20	4/20	1/20	ID
20.03.2013	35	2	17/20	3/20	ID	ID
11.04.2013	57	1	17/23	6/23	ID	ID
11.04.2013	57	2	26/28	2/28	ID	ID

Gjellescore bedømt på dødfisk ble i de fleste tilfeller plassert i kategorien 0.

### Histologi

Samtlige histologiprøver ble innsendt Veterinærinstituttet i Bergen for analyse.

0-prøve (n=30): Innsendingen viste bare små endringer. De fleste individer hadde et fåtall

epiteliocyster, men uten andre endringer. To fisk hadde fokalt moderat karskader i sekundære gjellelammeller. To fisk hadde moderat klubbing av sekundære gjellelammeler. En fisk hadde moderat fokal økning i slimceller. Ingen fisk hadde endringer som ville kunne observeres klinisk og det ble ikke påvist amøber i materialet.

Øvrige innsendelser: Varierende grad av proliferativ gjellebetennelse (PGI) med karskader, celleinfiltrasjon, fokale nekroser og adhesjon av sekundære gjellelammeller. Årsaken til disse endringene ble ikke påvist i materialet.

Histologisk vurdering av gjeller ble gjennomført av Veterinærinstituttet i Bergen (VI).

### **Bakteriedyrkning**

Utstryk fra sår ble utført på blod agar med NaCl og marin agar. Resultater fra bakteriedyrkning viste *Vibrio splendidus* lignende bakterier i hovedvekten av prøvene, mens det ved utstryk fra et individ ble påvist *Tenacibaculum* sp.

Analyser av bakterieskåler ble gjennomført av VI.

### **Realtime RT-PCR**

Det ble foretatt tilsammen 197 realtime RT-PCR av gjellelev mht. *N. perurans*. Samtlige prøver var negative.

Realtime RT-PCR prøver ble analysert av Pharmaq Analytiq. I tillegg analysert 40 stk prøver hos Patogen Analyse AS.

### **Konklusjon:**

Den akkumulerte dødeligheten i forsøkskarene var ~28 %, hovedsakelig forårsaket av sårutvikling. Det ble i løpet av prosjektperioden ikke påvist *N. perurans*, eller beskrevet patologi forenelig med amøbeinfeksjon.

Produksjonslokalitet som var opprinnelsen til den Atlantiske laksen i dette forsøket fikk diagnostisert AGD høsten 2012. I perioden etter diagnostisering og frem til forsøksstart falt vanntemperaturen ved produksjonslokaliteten ned til 3,1 °C. Grunnet manglende funn av *N. perurans* ved uttak av fisk fra produksjonslokalitet vurderes forsøksresultatene ikke å være konklusive mht. parasittens overlevelse ved lave temperaturer eller temperatur som risikofaktor for klinisk AGD.