

Parvicapsula pseudobranchicola; -Øke kunnskap og redusere tap

Sluttrapport FHF#900896

Forfattere:

Øyvind Brevik, Cermaq Norway

Are Nylund, Universitet i Bergen

Egil Karlsbakk, Havforskningsinstituttet/Universitetet i Bergen

Haakon Hansen, Veterinærinstituttet i Oslo

13.10.17



<i>Dato:</i> 13.10.17	<i>Prosjekt nr.:</i> FHF #900896	
<i>Tittel:</i> <i>Parvicapsula pseudobranchicola</i> ; Øke kunnskap og redusere tap		
<i>Prosjektleder:</i> Øyvind Jakobsen Brevik, Cermaq Norway	<i>Prosjekt eier:</i> FHF	
<i>Forfattere:</i> Øyvind Brevik, Cermaq Norway Are Nylund, Universitet i Bergen Egil Karlsbakk, Havforskningsinstituttet/Universitetet i Bergen Haakon Hansen, Veterinærinstituttet i Oslo	<i>Prosjektgruppe:</i> Are Nylund, Universitet i Bergen Egil Karlsbakk, Havforskningsinstituttet/Universitetet i Bergen Haakon Hansen, Veterinærinstituttet i Oslo Berit Seljestokken, Grieg Seafood Finnmark Eirik Monsen, Lerøy Aurora Øyvind Brevik, Cermaq Norway	
<i>Stikkord:</i> <i>Parvicapsula</i> , parvicapsulose, pseudobranch, myxozoa, parasitt	<i>Antall sider og vedlegg</i> 61 sider	

Sammendrag

Sykdommen parvicapsulose forårsakes av myxosporidien *Parvicapsula pseudobranchicola* og ble først beskrevet i 2002 hos oppdrettslaks i Troms og Finnmark. Sykdommen fører til tap av fisk, redusert velferd, tilvekst og kvalitet. Oppdrettsnæringen i Troms og Finnmark anser sykdommen som en av de mest tapsbringende i sjøfasen og det eksisterer ingen behandling eller profylaktiske tiltak mot den. Målet med prosjektet var å frembringe ny kunnskap om livssyklusen til parasitten, samt å prøve ut profylaktiske tiltak. Parasitten har en kompleks livssyklus med to verter hvor laksefisk (laks, sjøørret, røye og regnbueørret) er kjente mellomverter og en ukjent børstemark (Polychaeta) er hovedvert. Over 5000 individer av børstemark ble undersøkt i dette prosjektet, enten vha. mikroskopi eller realtime RT-PCR (qPCR) analyser, men hovedverten til *P. pseudobranchicola* ble ikke identifisert. Hovedverten til to beslektede myxosporidier ble imidlertid identifisert; *Gadimyxa atlantica* ble påvist i *Spirorbis spirorbis* og *Parvicapsulidae* gen. sp genotype 'S' ble påvist i *Hydroides norvegica*.

I prosjektet ble det også vist at miljøprøver gir en høy grad av inhibisjon ved qPCR analyser. Det ble derfor utviklet en metode for å unngå falske negative resultater når en analyserer for fiskepatogene agens i miljøprøver. Metoden går ut på å bruke en egenutviklet DNA ekstraksjons-protokoll sammen med en ekstern kontroll (saltbakterien *Halobacterium salinarum*). Dette gir optimal rensing av DNA og kontrollerer graden av inhibisjon ved analyser av miljøprøver.

Prosjektet fremskaffet også nye resultater med hensyn til smittevinduet for parasitten. Smittevinduet indikeres nå å være fra juni til desember i Finnmark med en topp i august-september. Høstsmolt som settes ut i Troms/Finnmark i denne perioden kan antas å være smittet med *P. pseudobranchicola* innen 3 uker etter utsett og dersom fisken utvikler parvicapsulose, vil dette skje innen 3-4 måneder etter utsett. Dødeligheten som kan relateres til parvicapsulose ser ut til å skje i forbindelse med ferdigmodning og frigjøring av parasittsporene fra pseudobranchien. Pseudobranchien er det klart viktigste målorganet for *P. pseudobranchicola* og det organet hvor sporene utvikles. Resultater fra prosjektet viser også at parasitten kan være ujevnt fordelt i pseudobranchie-vevet, noe det bør tas hensyn til ved uttak for prøver til diagnostikk.

Det ser ut som man kan redusere tap knyttet til smitte med *P. pseudobranchicola* ved å sette ut smolt som er negativ for andre patogener (eks. ISAV, IPNV, PRV, PMCV, SGPV). Et annet svært interessant funn var at laks som har gjennomgått en infeksjon med *P. pseudobranchicola* ser ut til å utvikle immunitet og vil ikke re-smittes andre høst i sjø. Det ble utviklet en metode for å påvise parasitten i sjøvann og muliggjør vurdering av parvicapsulose-risiko ved nye lokaliteter. Utprøving i felt har vist at bruk av calanus-luseskjørt eller en 6m dyp tett presenning som tiltak for å redusere prevalens eller parasittbelastning av *P. pseudobranchicola* ikke har noen effekt. Effekt av smoltstørrelse som tiltak mot parvicapsulose ble også testet, men stor smolt (124,5g i snitt) presterte ikke bedre enn mindre smolt (34% lavere vekt i snitt).

Summary

Parvicapsulosis, caused by the myxosporean parasite *Parvicapsula pseudobranchicola*, was first described in 2002 from Atlantic salmon farmed in the northernmost parts of Norway. Parvicapsulosis results in increased mortality, reduced fish welfare, growth and quality, and is considered one of the main disease concerns for salmon farmers in northern Norway. No prophylactic measures are available to mitigate the disease. The main objective for the project was to attain new knowledge on the lifecycle of the parasite and to test prophylactic measures under field conditions. More than 5000 polychaetes were examined directly with either realtime RT-PCR (qPCR) or microscopy. *P. pseudobranchicola* was not detected in any of the samples. However, the main hosts for two related myxosporidia: *Gadimyxa atlantica* was detected in *Spirorbis spirorbis* and an undescribed species belonging to the family Parvicapsulidae (Parvicapsulidae gen. Genotype 'S') was detected in *Hydroides norvegica*.

A method for detection of the parasite in seawater was developed, enabling assessment of the risk for parvicapsulosis at new sites. During the project it became clear that environmental samples contain large amounts of qPCR inhibitors. Therefore, a DNA extraction protocol that uses an external control, the salt bacterium *Halobacterium salinarum*, to measure degree of inhibition was developed.

Calanus liceskirt and a 6 meter deep PVC tarpaulin skirt were tested as prophylactic measures against the parasite. Smolt size, where the large smolt group was 124,5 g on average and the small smolts weighing 34% less, were also tested as a prophylactic measure. None of these measures prevented infection with *P. pseudobranchicola* or reduced the load of this parasite in the individual salmon. It was observed that losses associated with *P. pseudobranchicola*, could possibly be reduced by using smolts that are specific pathogen free (qPCR negative for salmon pathogens like ISAV, IPNV, PRV, PMCV, SGPV).

In this project we also showed that infective *P. pseudobranchicola* spores were present in the sea from June to December with a peak in infective pressure in August-September. Autumn smolts transferred to sea during this period will likely be infected with *P. pseudobranchicola* within 3 weeks post transfer and, if parvicapsulosis develops, it will occur within 3-4 months post sea transfer. Disease and mortality (parvicapsulosis) coincide with the completion of sporogony. Mature spores appeared in the pseudobranchs in the period with high parasite densities in the winter (late November-January), and were released (i.e. disappeared from the fish) in the period January-March. Atlantic salmon appears to develop immunity to *P. pseudobranchicola*, as parasite load declines after sporogony and the fish is not re-infected second autumn at sea. The pseudobranch was clearly established as the main target organ for *P. pseudobranchicola*. However, the distribution of the parasite in this organ can be heterogeneous and this should be taken into consideration when sampling for diagnostic purposes.

Fakta fra prosjektet

Anbefalinger:

- Unngå utsett av høstsmolt i perioden august-september for å redusere risiko for alvorlig parvicapsulose.
- Bruk patogenfri smolt for å redusere risiko for alvorlige parvicapsulose utbrudd.
- Ved diagnostikk bør hele pseudobrankien undersøkes.
- For å unngå falske negative resultat ved real-time RT-PCR analyser av sjøvannsprøver og marine bunnorganismer må en ekstern kontroll brukes for å overvåke graden av inhibisjon

Hovedfunn:

- Laks ser ut til å utvikle immunitet mot *P. pseudobranchicola* etter gjennomgått infeksjon.
- Høstsmolt som settes ut i Troms/Finnmark i perioden august-september smittes svært raskt med *P. pseudobranchicola*.
- Dersom høstsmolten utvikler parvicapsulose vil dette skje 3-4 måneder etter utsett.
- Pseudobrankien er det klart viktigste målorganet for sporedannelse.
- Parvicapsulose-dødeligheten er knyttet til ferdigmodning og frigjøring av parasittsporene fra pseudobrankien.
- Parasitten kan være ulikt fordelt i pseudobrankie-vevet.
- Luseskjørt (Calanus- eller tett PVC-skjørt) har ingen reduserende effekt på parasittens prevalens eller intensitet.

Kunnskapsbehov:

- Effekten av patogenfri smolt på infeksjon av *P. pseudobranchicola*.
- Interaksjon med andre patogener.
- Kan bruk av stor postsmolt (sjøvannstilvent og 400-500g) være et profylaktisk tiltak mot parvicapsulose?
- Hvilke immunresponser aktiveres ved infeksjon med *P. pseudobranchicola* hos laks.
- Effekten av immunstimulerende midler mot parasitten.
- Fysiopatologi ved parvicapsulose.
- Etablering av smitte modeller.
- Parasittens genetiske variasjon; finnes det varianter med forskjellig virulens?

Innhold

Sammendrag	1
Summary	2
Fakta fra prosjektet	3
Innledning.....	5
Problemstilling og formål	7
Oppsummering av de enkelte aktiviteter.....	8
Aktivitet 1: Identifisering av hovedvert.....	10
Aktivitet 2: Beskrive vevstropisme og karakterisere utviklingen til <i>P. pseudobranchicola</i> i laks.....	30
Aktivitet 3: Måle effekten av smoltstørrelse og sjøvannstilvenning på utvikling av parvicapsulose.....	42
Aktivitet 4: Utvikle en filtreringsmetode for deteksjon av <i>P. pseudobranchicola</i> -sporer i sjøvann	46
Aktivitet 5: Feltforsøk med skjørt som tiltak mot infeksjon med <i>P. pseudobranchicola</i>	54
Presentasjoner, masteroppgaver og publikasjoner fra prosjektet	60
Takk til	61

Innledning

Sykdommen parvicapsulose hos laks forårsakes av en mikroskopisk parasitt, *Parvicapsula pseudobranchicola*, som tilhører en gruppe parasitter som kalles slimsporedyr (Myxozoa, Myxosporidia). Sykdommen ble oppdaget hos oppdrettslaks i sjø i Troms og Finnmark i 2002, i forbindelse med omfattende dødelighet. Siden da har parasitten blitt påvist i oppdrettslaks i alle områder med oppdrett i Norge. Parvicapsulose representerer et betydelig sykdomsproblem, med økende alvorlighetsgrad nordover. Infeksjonene fører til dødelighet, nedsatt vekst og "produksjon" av taperfisk. Under alvorlige utbrudd av parvicapsulose vil en kunne få tusenvis av taperfisk i enkeltmerder; disse fiskene er ikke-responderende på stimuli og svimer i overflaten ("svimerlokk"). I produksjonen observeres det at parvicapsuloseutbrudd fører til redusert fôropptak under, og i perioden etter utbruddet. Affisert fisk er særlig utsatt for mekaniske skader som følge av vinterstormer og predatorskader.

Fisk med alvorlig parvicapsulose kan være tynn, sløv og mørk på farge. Utvendig sees i tillegg karakteristiske øyebledninger, og det kan være et økt innslag av katarakt og utstående øyne. Hos oppdrettslaks danner *P. pseudobranchicola* sporer i pseudobranchiene, et par-organ plassert på undersiden av gjellelokkene, som regnes som tilbakedannede gjeller (navnet betyr "falske gjeller"). Cellene i pseudobranchiene invaderes av tidlige parasittstadier og det dannes sporer (Fig.1). Ved omfattende infeksjoner ødelegges organets struktur, det svulmer opp og dekkes ofte av hvitaktig puss. Siden øynene forsynes med oksygenrikt blod via pseudobranchiene, er det blitt foreslått at ødeleggelse i dette organet kan medføre redusert blod- og oksygentilgang til øynene, som igjen kan føre til nedsatt syn eller blindhet.

Parvicapsulose rammer både vår- og høstutsatt laks, men høstutsatt fisk er særlig utsatt. Fisk satt ut i august-september utvikler sykdommen gjennom vinteren, og sporer påvises mikroskopisk i pseudobranchiene i februar-mai. Utbrudd med dødelighet og «svimerlokk» er vanligst i mars. Fisk satt ut i april-juni utvikler parvicapsulose i september-oktober.

Flere ulike fiskearter er undersøkt for tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola*, men parasitten er kun påvist i oppdrettslaks, villaks, oppdrettet regnbueørret, sjøørret og anadrom røye. Det antas at kun laksefisk er mottagelige for parasitten. Den kjente geografiske utbredelsen er fra Oslofjorden til Kirkenes og siden smitten er til stede i sjøen om sommeren, synes det mest forenlig med at sjøørret og sjørøye er sentrale i livssyklus. Forekomsten i Sør-Norge viser imidlertid at parasitten forekommer i områder uten sjørøye. Det er derfor grunn til å anta at sjøørret og tilbakevandrende laks er de viktigste fiskevertene i den naturlige livssyklusen.

Veterinærinstituttet påviser hvert år 30-40 tilfeller av parvicapsulose. Tilnærmet alle disse tilfellene er fra Troms og Finnmark hvor den er en av de mest tapsbringende sykdommene sjøfasen. Oppdrettsselskapene erfarer at parvicapsulose fører til tap av fisk, redusert tilvekst og kvalitet. Det observeres også at populasjoner som har blitt rammet av parvicapsulose får høyere dødelighet under utbrudd av HSMB og CMS om disse oppstår senere i produksjonen. 15 år etter parasitten først ble beskrevet har næringen ingen behandling eller profylaktiske tiltak mot parasitten. Dette grunnet manglende kunnskap om parasittens livssyklus i og utenfor fisken.



Figure 1 A: Kraftig parvicapsulose affisert pseudobranch. B: *Parvicapsula*-sporer i mikroskopet, typisk bønneaktig form og to neslekapsler i enden. Sporene er ca. 12/1000 mm lange

I 2013 ble forarbeidet til prosjektet «*Parvicapsula pseudobranchicola*: Øke kunnskapen og redusere tap» startet. Oppstart av aktivitetene startet med feltinnsamlinger i 2014 og prosjektet ble avsluttet i juni 2017. Prosjektet hadde et totalt budsjett på 7,1 millioner hvorav 5,6 millioner er finansiert av FHF. Det ble også gitt en tilleggsbevilgning på 418 tusen for å repetere en av aktivitetene. Prosjektet er gjennomført i et samarbeid mellom næringsaktørene Cermaq Norway, Grieg Seafood Finnmark, Lerøy Aurora og forskningsinstitusjonene Universitetet i Bergen, Veterinærinstituttet i Oslo og Havforskningsinstituttet, hvor Cermaq Norge er prosjekts eier. Prosjektgruppen har bestått av: prosjektleder Øyvind Brevik fra Cermaq Norway, arbeidspakkeleder Are Nylund fra Universitet i Bergen, prosjektmedarbeider Egil Karlsbakk fra Havforskningsinstituttet/Universitetet i Bergen, arbeidspakkeleder Haakon Hansen fra Veterinærinstituttet i Oslo, prosjektgruppemedlem Berit Seljestokken fra Grieg Seafood Finnmark og prosjektgruppemedlem Eirik Monsen fra Lerøy Aurora. Analysearbeidet er gjennomført hos UiB og VI-Oslo. Det har vært en mastergrad ved fiskehelsestudiet hos UiB tilknyttet prosjektet. Innsamling av materialet ble gjennomført hos alle tre næringsaktørene med god assistanse og tilrettelegging. Prosjektgruppen har jobbet tverrfaglig i godt samarbeid med næringsaktørene. Styringsgruppen har bestått av: Harald Sveier fra Lerøy, Karl F. Ottem fra Cermaq Norway, Merete Schrøder fra NRS og Per Anton Sæther fra Marin Helse.

Problemstilling og formål

Hovedmålet med prosjektet er å bringe frem kunnskap om livssyklusen til parasitten både i og utenfor fisken samt å utvikle og utprøve profylaktiske tiltak mot parasitten i felt.

Prosjektet inneholder følgende aktiviteter:

Aktivitet A1: Identifisere hovedverten for *Parvicapsula pseudobranchicola*.

Målet med å identifisere hovedverten til parasitten, i.e organismen hvor sporene som smitter laksen produseres, var å muliggjøre smittetest i våtlaboratorier for studier av profylaktiske tiltak.

Aktivitet A2, Beskrive vevs-tropisme og karakterisere utviklingen til *P. pseudobranchicola* i laks.

Forståelsen av hvilke organ som parasitten infiserer, hvordan parasitten oppformerer i verten og hvordan sykdommen utvikles er mangelfull. Ved å studere dette gjennom en produksjonsyklus har vi fått verdifull informasjon om immunitet, smittetidspunkt og forbedring av diagnostikk.

Aktivitet A3, Måle effekten av smolt størrelse og sjøvannstilvenning på utvikling av parvicapsulose

Observasjoner på vår- og høstsmolt populasjoner ved på samme lokalitet indikerte at fiskepopulasjoner som var større ved eksponering for smitte (vårsmolt) utviklet lavere parasittbelastning og dødelighet. Prosjektet har derfor sett på smolt størrelse som et tiltak for å redusere utfordringer med parvicapsulose.

Aktivitet A4, Utvikle en filtreringsmetode for deteksjon av *P. pseudobranchicola* sporer i sjøvann

Ved å kunne detektere *P. pseudobranchicola* sporer i sjøvann, kan smittepress på enkelt lokaliteter overvåkes og brukes aktivt i planlegging av utsett for å unngå utsett av høstsmolt på lokaliteter med høyt smittepress.

Aktivitet A5, Feltforsøk med skjørt som tiltak mot infeksjon med *P. pseudobranchicola*.

Med bakgrunn i parasittens biologi var det forventet at smittsomme sporer ville i hovedsak befinne seg i de øvre vannlag, det er derfor undersøkt om luseskjørt kunne være et effektivt tiltak mot smitte av parasitten og parvicapsulose.

Formidling av resultatene er gjort i henholdt til leveranseplanen til prosjektet. Det er holdt 8 presentasjoner fra prosjektet på fiskehelsemøter og konferanser, en masteroppgave er gjennomført og 3 vitenskapelige arbeider er publisert i internasjonale tidsskrifter med fagfelleevaluering.

Oppsummering av de enkelte aktiviteter

Kunnskap om hovedverten, som mest sannsynlig er en børstemakk (Polychaeta) i ordenen Sabellida, er en viktig brikke for å gjennomføre kontrollerte smittforsøk som muliggjør studier av profylaktiske tiltak. I aktivitet 1 var målsetningen å identifisere hovedverten til *P. pseudobranchicola*. Det ble totalt gjennomført seks feltinnsamlinger av børstemakk i prosjektet. Tre strategier ble benyttet for å påvise mulige infeksjoner av *P. pseudobranchicola* hos børstemakk: 1) filtrering av vann fra akvarier med børstemakk med påfølgende qPCR-analyser, 2) qPCR-analyser av DNA/RNA isolert fra individuelle prøver eller samleprøver fra børstemakk, og 3) disseksjon og mikroskopundersøkelser av individuelle børstemakk. Vann fra 29 akvarier med opptil flere tusen børstemakk pr. akvarium analysert vha qPCR og mer enn 5000 børstemakk undersøkt direkte med enten qPCR eller mikroskopi. Det ble ikke påvist makk infisert med *P. pseudobranchicola* i noen av prøvene. Imidlertid ble det under arbeidet identifisert sluttverter for to beslektede myxosporidier: *Gadimyxa atlantica*, ble påvist i posthornmakk *Spirorbis spirorbis* og en ubeskrevet art i familien Parvicapsulidae (*Parvicapsulidae* gen. sp. Genotype 'S', (se Kjøie et al. 2013) ble påvist i prøver av *Hydroides norvegica*. Som en del av aktivitetene ble det utviklet metoder for å unngå falske negative resultater ved qPCR analyser for deteksjon av fiskepatogene-agens i miljøprøver. Metodeutviklingen ble nødvendig da det ble klart at miljøprøver inneholder store mengder qPCR inhibitorer (hemmere). Det ble derfor utviklet en metode som benytter seg av en ekstern kontroll (saltbakterien *Halobacterium salinarum*) for å kontrollere for grad av inhibisjon ved slike analyser av miljøprøver.

Hvordan *P. pseudobranchicola* infiserer laks, hvilke organer/vev den påvirker og hvordan parasitten utvikler seg i populasjon av oppdrettslaks igjennom en produksjonssyklus, er grunnleggende kunnskap som kan brukes direkte inn i produksjonsstrategiske tiltak for å redusere risikoen for sykdomsutbrudd. I aktivitet 2 var målet å beskrive vevs-tropisme og karakterisere utviklingen til *P. pseudobranchicola* i laks. I aktiviteten ble en hel produksjonssyklus i sjø fulgt med en tidsserie av uttak fra ferskvann til slakt (604 dager). For å gjennomføre studien ble det utviklet en deteksjonsmetode/diagnostisk metode, *in situ*-hybridisering, som kombinerer sensitiviteten og spesifisiteten til PCR med histologi. Metoden ble publisert i et vitenskapelig tidsskrift (Markussen et al., 2015). I tillegg ble det også brukt histologi for å se på vevsskade og qPCR for å måle parasittbelastningen. Det ble tatt ut 11 relevante organ i en tidsserie. Resultatene viser at pseudobranchien er det klart viktigste målorganet for parasitten og er vevet der sporedannelse forekommer. Pseudobranchiens hovedfunksjon er ukjent, men øynene forsynes med oksygenrikt blod via pseudobranchiene, og skade/ødeleggelse av organet kan derfor trolig påvirke blodforsyningen til øynene. Klinikken ved parvicapsulose er forenlig med synssvekkelse/blindhet. Det er mulig at det ikke er nødvendig med et massivt smittepress for at fisken skal utvikle parvicapsulose, da parasitten er ulikt distribuert (enkelte deler av pseudobranchien var affisert og andre ikke). Dette mønsteret kan tyde på lokal proliferasjon av parasitten. Hvis det er slik, kan det bety at parvicapsulose kan oppstå som følge av redusert almenntilstand hos fisken, som kan tillate mer omfattende parasittproliferasjon. Da parasittene ikke er homogent fordelt i vevet, er det viktig å undersøke så mye som mulig av pseudobranchien i forbindelse med histologisk diagnostikk og molekylær deteksjon. Resultatene i prosjektet viser også at all høstsmolt som settes ut i Finnmark/Troms i perioden august-

september kan antas å være smittet med *P. pseudobranchicola* innen 3 uker etter utsettsdato. Fra laksen smittes vil det gå 3-4 måneder til parasitt belastningen er på sitt kraftigste. En cellulær immunrespons i pseudobranchiene syntes å sammenfalle med forekomst av modne sporer. En aktuell strategi for å bekjempe parvicapsulose kan da være å bygge immunkompetanse hos fisken fra slutten av ferskvannsfasen og de første 4 månedene i sjø. Etter primærinfeksjonen var mengde av *P. pseudobranchicola* fallende frem mot slaktetidspunkt, og der er ingen påviselig reinfeksjon andre år i sjø. Dette studiet viser at, i fravær av andre patogener, vil laks kunne produseres i Finnmark uten betydelige tap forårsaket av *P. pseudobranchicola* på tross av et betydelig smittepress med denne parasitten. Fisk som blir smittet, synes å utvikle en immunitet mot ny infeksjon med parasitten påfølgende smitteperiode andre år i sjø. In situ og qPCR sammen er en god metode for i detalj å studere vevstropisme hos *P. pseudobranchicola*. Hele studiet av vevstropisme gjennom en produksjonssyklus er publisert i et vitenskapelig tidsskrift (Nylund et al., in press).

Et av produksjonstiltakene mot parvicapsulose som prosjektet ønsket å undersøke var effekten av smoltstørrelse og sjøvannstilvenning på utvikling av parvicapsulose, aktivitet 3. Dette studiet viser ingen klare forskjeller i mottakelighet for *P. pseudobranchicola* ved sjøsetting av stor og liten laksesmolt. Begge populasjonene var imidlertid smittet med både PRV og *Yersinia ruckeri* noe som muligens kan ha påvirket mottakeligheten for *P. pseudobranchicola*. Et resultat som fremkom i dette studiet var at infektive sporer er til stede i sjøen så sent som i desember. Dette utvider smittevinduet for parasitten i Finnmark til å være fra juni til desember.

For å overvåke smittevinduet til *P. pseudobranchicola* igjennom året og på spesifikke lokaliteter ønsket prosjektet å utvikle en metode for deteksjon av DNA/RNA (eDNA/eRNA) fra *P. pseudobranchicola* i sjøvann ved bruk av qPCR. I aktivitet 4 har vi utviklet en metode for å detektere *P. pseudobranchicola* i sjøvann ved bruk av planktonhåv med 5µm maskestørrelse, sluttfiltrering av vannprøven i et Milipore vakumfilter system med nitrocellulosefilter på 0,22µm og ved bruk av en DNA ekstraksjonsprotokoll utviklet i prosjektet. Pilotundersøkelser i felt i perioden med forventet høyest smittepress (august-september) antyder at det er færre en 1 spore pr. 100 liter sjøvann på 0-5 meters dyp. Analysene viste også at det er også mye inhibitorer i vannprøver fra sjø, og at det er nødvendig å bruke ekstern kontroll for å unngå falske negative prøver.

Tidligere studier har gitt indikasjoner på at påslag med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) kan reduseres ved bruk av luseskjørt (lysåpning 300 µm og 10m dyp) og PVC-duk (tett duk 6 meter dyp). Målet med dette studiet var å undersøke om samme teknologi kunne redusere påslaget med *P. pseudobranchicola*. Motivasjon for dette er at både lakselus og *P. pseudobranchicola* er parasitter spesifikke for laksefisk (laks, ørret og røye) og det forventes derfor at smittestadiene av disse skal finnes i de øvre vannlag hvor disse fiskene oppholder seg. To forskjellige teknologier (luseskjørt og tett PVC-duk) ble testet i perioden fra smolt-utsett og frem til slaktning. Påslag med *P. pseudobranchicola* ble fulgt ved hjelp av qPCR analyser av pseudobranchier fra laks i merd med luseskjørt/duk og kontroll merder (åpne merder). Ingen av disse to teknologiene hindret påslag med parasitten eller reduserte belastning på den enkelte fisk. Studiene viser at kostnadene med bruk av luseskjørt/PVC-duk ikke kan forsvares hvis målet kun er å hindre påslag

med *P. pseudobranchicola*. Tap knyttet til smitte med *P. pseudobranchicola* synes å kunne reduseres ved å kun sette ut smolt som er negativ for andre patogener (eks. ISAV, IPNV, PRV, PMCV, SGPV).

Aktivitet 1: Identifisering av hovedvert

Ansvarlig for aktivitet: Øyvind Brevik (Cermaq), Haakon Hansen (VI), Egil Karlsbakk (HI)

Laboratoriarbeid: Øyvind Brevik (Cermaq), Haakon Hansen (VI), Egil Karlsbakk (HI), Saima N. Mohammad (VI)

Feltarbeid: Øyvind Brevik (Cermaq), Haakon Hansen (VI), Egil Karlsbakk (HI)

Introduksjon

Medlemmene i fylum Myxozoa har livssykluser som involverer to verter, en vertebrat (som regel fisk) og en invertebrat (Yokoyama, Grabner and Shirakashi 2012). Nesten alle artene i Myxozoa, inkludert *Parvicapsula*, hører til klassen Myxosporea, hvor invertebrat-vertebratene er annelider (Annelida). Slektstudier av Myxosporea, basert på ribosomale DNA-sekvenser (18S, small subunit, SSU), deler denne gruppen igjen opp i undergrupper, der en "ferskvannsguppe" og en "marin gruppe" er de viktigste. Alle de kjente livssykluserne til Myxosporea i ferskvannsguppen involverer fåbørstemakk (Oligochaeta), mens de for medlemmer av den marine gruppen involverer mangebørstemakk (Polychaeta). Arter i slekten *Parvicapsula* sammen med beslektede arter i familien Parvicapsulidae, representerer en veldefinert undergruppe i den marine gruppen (Fiala 2006). Fire livssykluser fra Parvicapsulidae er kjent: *Gadimyxa atlantica* og *Gadimyxa sphaerica* fra torsk utvikles i kalkkrøspolychaeter i slekten *Spirorbis* (Kodádková, Dyková, Tyml, Ditrich and Fiala 2014, Køie, Karlsbakk and Nylund 2007), *P. minibicornis* fra stillehavslaks utvikles i mangebørstemakken *Manyunkia speciosa* (Bartholomew, Atkinson and Hallett 2006) og en ikke navngitt art fra sild og brisling utvikles i kalkkrøspolychaeten *Hydroides norvegica* (Køie, Karlsbakk, Einen and Nylund 2013). Alle disse polychaetene tilhører orden Sabellida. Det er derfor mest sannsynlig, ut fra tilgjengelig kunnskap, at den ukjente livssyklusen til *P. pseudobranchicola* involverer en marin polychaet og gruppen Sabellida synes mest aktuell. Parvicapsulose er et stort problem særlig i Nord Norge. Det er derfor mulig at børstemakkverten er særlig alminnelig der, og i en strategi for å identifisere denne har vi prioritert feltarbeid med hensyn på innsamling av børstemakk i områder i nord der det er problemer med parvicapsulose.

I børstemakker infisert med Myxosporea utvikles en spesiell sporetype, kalt actinosporer, som frigjøres til vannet. Actinosporer spres med vannstrømmene, og disse er infektive for fisk. De festes til hud og gjeller og frigjør en amøboid "germ" (sporoplasma), som trenger inn i fisken. Det synes klart at det infektive stadiet for *P. pseudobranchicola* forekommer i vannet, siden laks i merd ofte smittes raskt etter sjøsetting (høsten). Vi vet fra tidligere at parasitten påvises i laksen umiddelbart eller etter en tid etter utsett i sjøen, alt etter tid på året. I den perioden hvor antall infiserte fisk øker, kan vi indirekte anta at vannbåren smitte er til stede. På basis av slike studier er det blitt klarlagt en periode hvor smitten kan forekomme og dette synes å være juli-desember, men hovedperioden synes å være august-oktober. Vi refererer til perioden da en har smitte i vannet som "smittevinduet". En supplerende strategi for å lokalisere smittefrigjøringen i rom kan derfor være å filtrere sjøvann. Positive eller sterke signal i definerte habitater, slik som f.eks. nær strandsona eller nær elveosser, kan antyde at sluttverten lever

der, og signal under eller over sprangsjiktet kan indikere på at den lever dypt eller grunt. Metoden kan også anvendes på vann fra akvarier med innsamlede børstemakk i. Vannfiltrering må gjøres i "smittevinduet", når actinosporer frigjøres fra infiserte makk og kan forekomme i sjøvannet. Påvisning av *P. pseudobranchicola* i vann filtrert fra akvarier kan bety at parasittens sluttvert befinner seg i akvariet og alle børstemakkene (og eventuelt andre organismer) i det aktuelle akvariet kan undersøkes med hensyn på tilstedeværelse av parasitten.

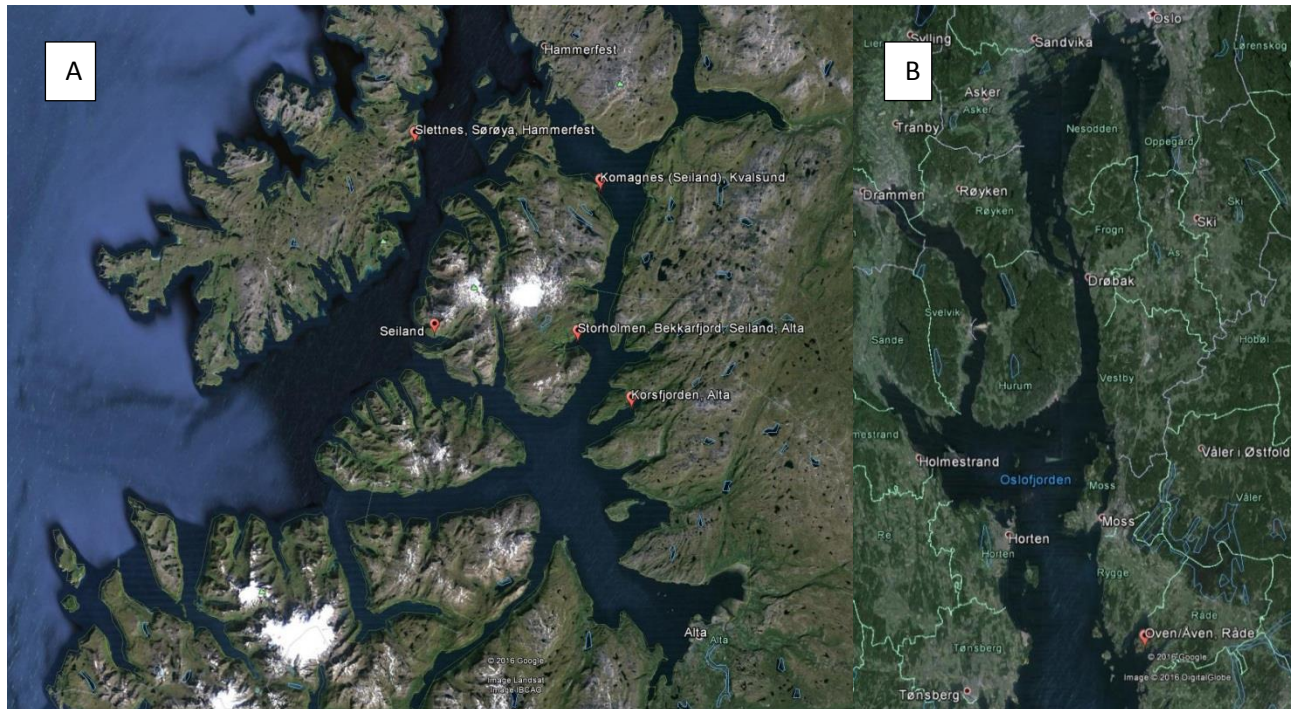
Problemstilling og mål

I aktivitet 1 har målet vært å identifisere hovedverten (børstemakk) og i så måte kunne beskrive hele livssyklusen til *P. pseudobranchicola*. Kjennskap til livssyklusen vil sterkt lette utformingen av driftsmessige tiltak. I tillegg vil etablering av en smittemodell gi mulighet for videre forskning på sykdommen, deriblant på kontrolltiltak, virulens og resistens. Aktiviteten er en videreføring og overlapping i tid med NFR-prosjektet «*Parvicapsula pseudobranchicola* – life-cycle and genetic variation» (p.nr. 207269) hvor de fleste av prosjektgruppens medlemmer (AN, EK, HH) også deltok.

Materiale og Metode

Lokaliteter

Det har blitt gjennomført feltarbeid på flere lokaliteter i Nord-Norge i og ved én lokalitet i Sør-Norge. Lokalitetene er vist på kart i figur 1 og detaljer om hver lokalitet på de påfølgende sider.



Figur 2, Feltarbeidslokaliteter: lokaliteter i nord-Norge, B: lokaliteten i sør-Norge.

Detaljert beskrivelse av de forskjellige lokalitetene:

Lokalitet i Kvalfjorden i Hammerfest Kommune, Finnmark

Dato for innsamling(er): 2013 FHF proj. (10-12 Sep.), 2014 FHF proj. (1-5 Sep.).

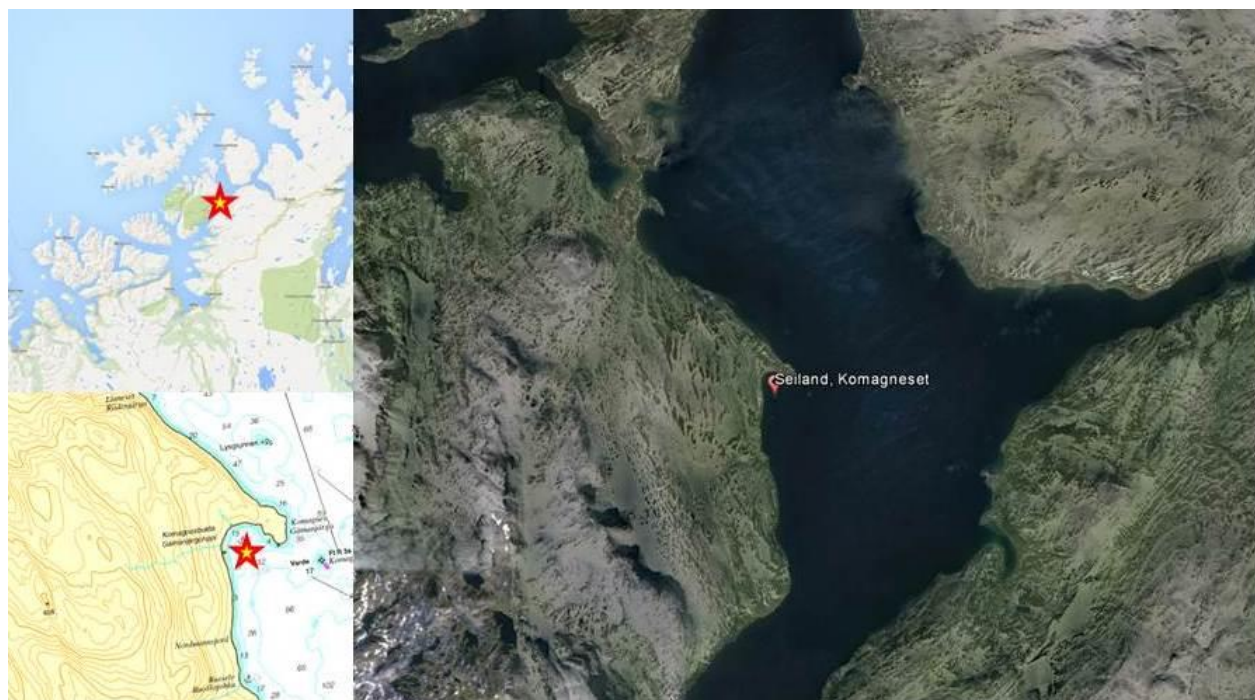


Figur 3, Beliggenhet lokalitet i Kvalfjorden

Oppdrettslokaliteten har historisk hatt gjentagende parvicapsuloseproblemer. Anlegget ligger på nordvestsida av Kvalfjorden. Fjorden er grunn (mesteparten <70 m) med ferskvannstillsig fra noen få mindre elver og bekker. Området består vesentlig av steinstrender med tang, nær anlegget finnes rullesteinstrender og bergbunn med tareskog. I pollen (se kart) finnes leir og bløtbunn, og ellers består bunnforholdene av sand, grus og leire. Hovedundersøkelser ble foretatt i Ruglbukta, Pollen (inkl. elveos), Årresjåbukta og på selve Kirkeneset. I tillegg ble det blåser, rør og oppheng til et nedlagt blåskjellanlegg inne i fjorden undersøkt, noe som gav ypperlige muligheter til prøvetaking av dyresamfunnet på installasjoner (blåskjellsamfunn, tarefester og påvekst på tare/kjerringhår). Det ble samlet og analysert vannprøver fra hele fjorden. I tillegg til prøvetaking i Kvalfjorden, ble det også gjennomført prøvetaking ved elveoser på nordøstsiden av Kvaløya, ved Storklubben og i Storevika. Det ble analysert vannprøver fra 1-3 meters dyp flere steder i fjorden (tabell 6).

Lokalitet på Seiland, Kvalsund kommune, Finnmark

Dato for innsamling(er): 2012 NFR Prosj., 2013 FHF Prosj. (10-13 Sep.)

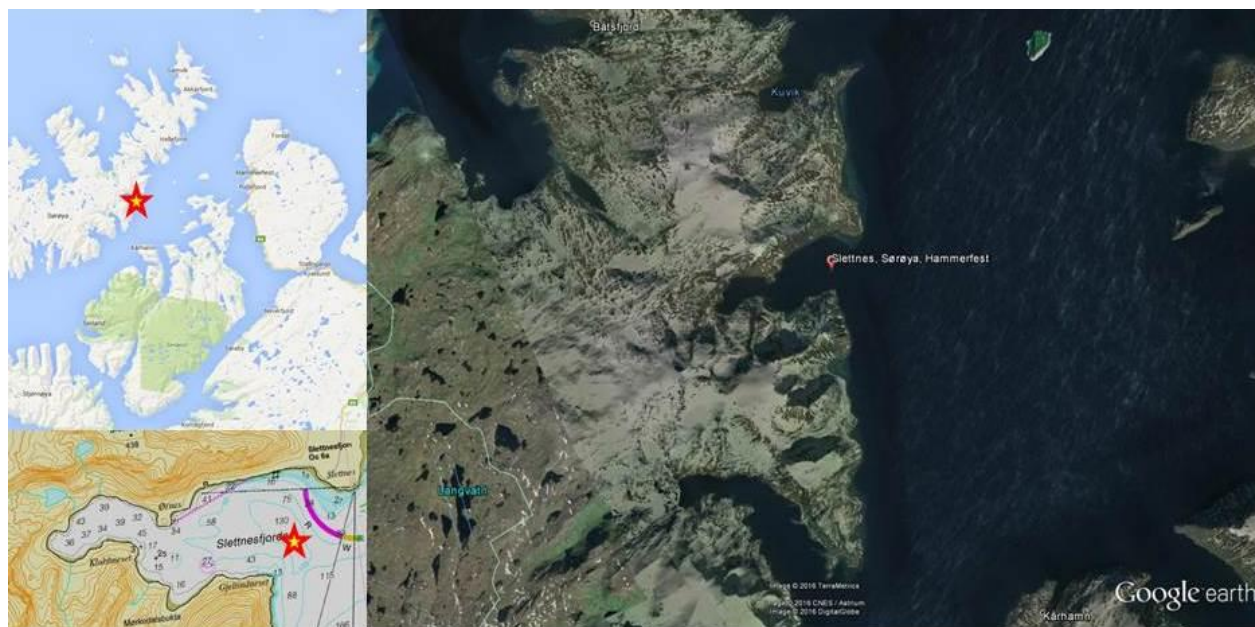


Figur 4, Beliggenhet lokalitet på Seiland

Anlegg ved land i strømutsett sund (Vargsundet), og lokaliteten har gjentatte parvicapsuloseproblemer. Området består av grusstrand i en nærliggende bukta, steinfjære sørover mot Russelv, og bergsamfunn på nasset ved anlegget. Det ble gjennomført taretråling ved et skjær inne i bukta, grabbing i selve bukta og sørover mot Russelv, fra 6 m til 80 m dyp. I tillegg ble det tatt prøver fra lodd (ringer), tauverk og store flottører inne i bukta, som ble hevet med kran og fra påvekst på selve anlegget.

Lokalitet i slettnesfjorden, Sørøya, Hammerfest kommune, Finnmark

Dato for innsamling(er): 2014 FHF proj. (1-5 Sep.)

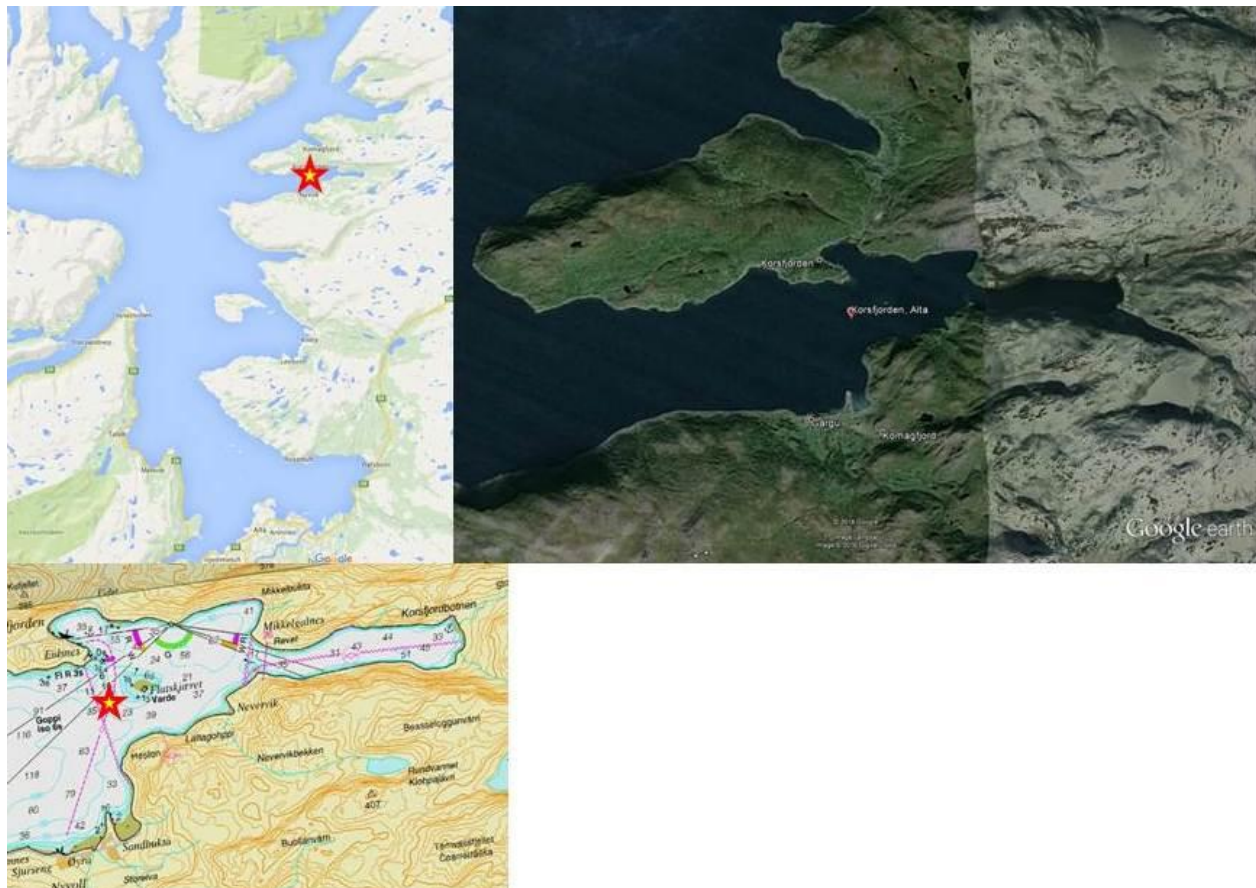


Figur 5, Beliggenhet lokalitet Slettnes.

Oppdrettsanlegg med historie av parvicapsuloseproblemer lokalisert på sørsiden mot munningen av Slettnesfjorden, som igjen munner mot Sørøysundet. Omfattende prøvetaking gjennomført i stein og grusfjære med tang i indre del, samt i elveosor. I tillegg undersøkelser og prøver fra fjæra på Ørnes og lesiden av Slettneset. Det ble samlet og analysert vannprøver fra hele fjorden.

Lokalitet i Korsfjorden, Alta kommune, Finnmark

Dato for innsamling(er): 2015 FHF Prosj. 17-20 Aug. (også 2009 VI/HI Prosj.)

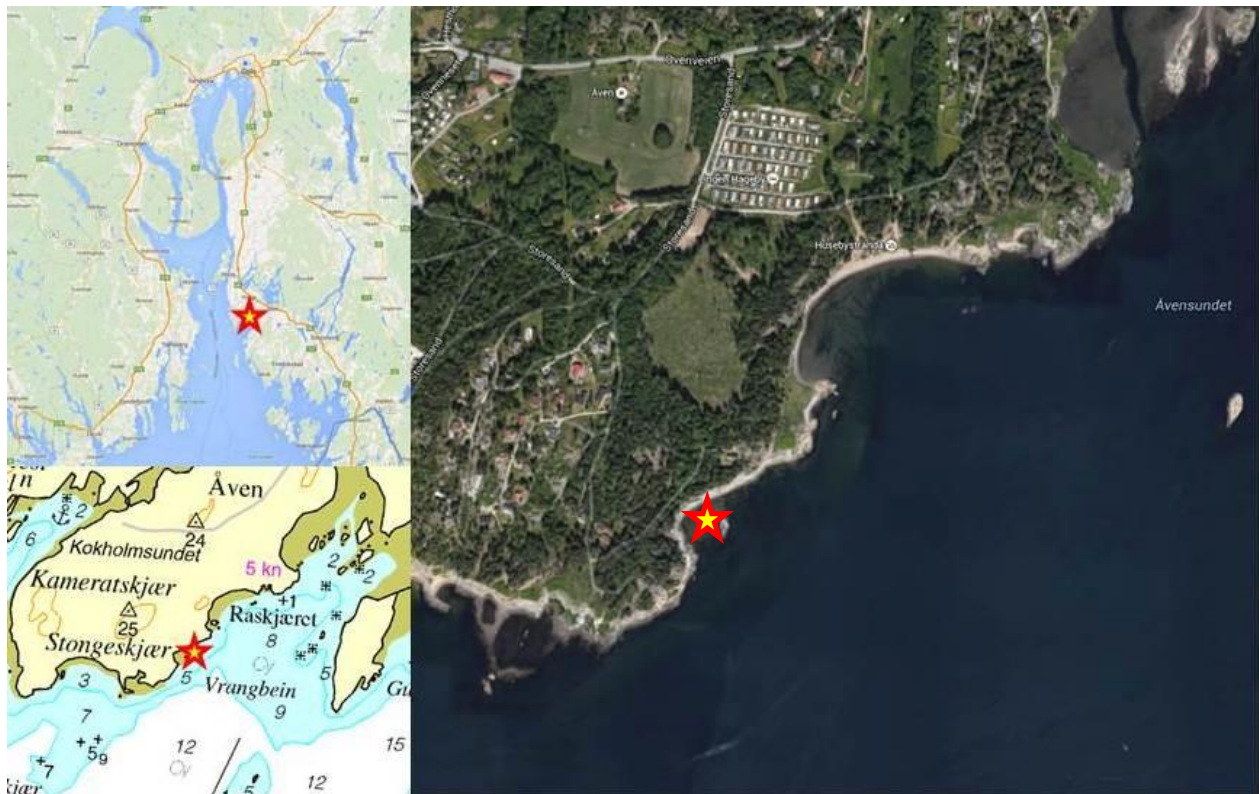


Figur 6, Beliggenhet lokalitet Hesten.

Lokaliteten har parvicapsuloseutfordringer, anlegget som ligger på sørsida av Korsfjorden. Innsamling av børstemakk ble gjennomført i fjæra i Sandbukta ved Nyvoll på fin sand, fra berg og stein på ved bergformasjonen «Hesten», steinfjære mot Nevervik, på Mikkalganes og ved elveosser innerst i Korsfjordbotten. I tillegg ble det gjennomført prøvetaking ved dykking ved «Hesten» (for det meste på berg og rullestein og grusbunn på >15m), på Revet (grus og skjellsand) og i Korsfjordbotten ut fra elveos på nordsiden (gjørmebunn, dernest sand, grus og rullestein). Rugl- (forkalkede rødalger) samfunn ved «Hesten», trekantmakksamfunn ved «Hesten» og på hardbunn i Korsfjordbotten. Det ble også samlet inn prøver fra rugl- og Chaetopterus/Owenia-samfunn ved Revet. Det ble samlet og analysert vannprøver fra «Hesten» og innover i fjorden.

Oven/Åven, Råde kommune, Østfold fylke

Dato for innsamling (er): 2014, 2015 FHF Prosj.



Figur 7, Beliggenhet lokaliet Oven

Lokaliteten er strandhabitat i et område uten oppdrettsanlegg (Oslofjorden), med sandbunn med noe tang og stein innimellom. Prøver på denne lokaliteten ble samlet inn på 0,5 til 1 meters dyp. Denne lokaliteten ble valgt fordi det er fanget sjøørret med modne sporer av *P. pseudobranchicola* her (Hansen, Poppe, Markussen and Karlsbakk, 2015).

Metoder for innsamling av børstemakk

Børstemakk og andre organismer har blitt samlet inn med flere forskjellige metoder på alle de undersøkte lokalitetene, men metodevalg avhenger av bunnforhold. Her beskrives hver metode i detalj og det listes hvilken lokalitet den aktuelle metoden er brukt på.

Manuell plukking av børstemakk i fjæresonen

Lokaliteter: Alle

Børstemakk ble plukket for hånd fra tang og andre alger, på og under steiner og fra sand, grus mellom steiner i fjæresonen, vesentlig i grisetangsonen og sagtangsonen. Alger med mye kalkrørmakk (*Spirorbis*, *Circeis*) ble samlet i bøtter med vann. Kalkrørmakk fra stein (e.g. slektene *Spirorbis*, *Paradexiospira*, *Circeis*, *Pomatoceros*) ble enten skrapet av og overført til beholdere, eller mindre stener med mye makk ble tatt med i vannfylte bøtter. Forskjellige typer frie makk som levde under og i sanden mellom steiner ble plukket manuelt eller vasket ut med sil, og sortert etter typer. Sand ble vasket i flate bakker eller såldet. I eller nær elveoser ble det brukt finmaskete håver, holdt nedstrøms for steiner som ble lettet på, slik at makk tilstede ble vasket inn i håven. Børstemakkene ble deretter sortert til gruppe/art, i feltlaboratoriet på den aktuelle lokaliteten for videre analyser.



Figur 8, Plukking av børstemark i fjæresonen og elveutos, Hammerfest, Finnmark

Grabbing med bunngrabb (Ekman)

Lokaliteter: Seiland og Kirkeneset.

Bunngrabb (van Veen) (se bilde) ble brukt til å samle inn børstemakk ned til ca 5-10 m. Grabbing ble utført fra båt vha en kran. Materialet fra grabben ble deretter samlet opp i store bøtter og manuelt skylt med sjøvann og såddet (figur 9). Børstemakk ble deretter plukket manuelt med pinsett fra filtrere, og sortert til gruppe/art, enten direkte eller i feltlaboratoriet på den aktuelle lokaliteten.



Figur 9, Innsamling av børstemark ved grabbing.

Innsamling fra gamle oppdrettsinstallasjoner

Lokaliteter: Kvalfjorden, Seiland

I Kvalfjorden ble tauverk fra et gammelt blåskjellanleggs som strakk seg fra overflaten og ned til ca 10 meter kuttet av og heist opp i en båt. Børstemakk ble deretter plukket manuelt fra disse. Lodd, tauverk og flottører (ikke i bruk) ved lokaliteten på Seiland ble lettet ut av vannet med kran, slik at prøver kunne tas fra båt.

Dykking

Lokaliteter: Korsfjorden, Alta

Børstemakk ble her plukket manuelt fra forskjellige habitater og forskjellige dyp under dykking, max. 23 m. Denne metoden ble benyttet i Korsfjorden, nord for Alta hvor 4 dykk og innsamlinger ble gjort i nærheten av oppdrettslokalitet Hesten.

Vannfiltrering – påvisning av sporer i vann

Filtrering av sjøvann og vann fra akvarier er beskrevet detaljert under aktivitet 4.

Lokaliteter: Kvalfjorden

Vannfiltrering av vann fra akvarier med børstemakk

Akvarier med vannvolum 60 l ble satt opp og fylt med prøver av børstemakk tatt fra forskjellige habitater ved lokalitet Kirkeneset. Det ble benyttet luftpumper i akvariene for å tilføre oksygen og for at vannbevegelse skulle stimulere sedentære børstemakk (figur 10) til fødeoptak/filtrering. Vannet fra karene ble etter 24-48 timer filtrert for å fange opp eventuelle actinosporer frigjort i vannet.



Figur 10, Vannfiltrering fra akvarier ved Kvalfjorden, Hammerfest, Finnmark. Øverst til venstre vises akvariene med luftpumper skjult under bøttene (som beskyttelse mot regn). Bildene 2-5 sett fra topp, venstre viser eksempler på biologisk materiale som var til stede i akvariene og siste bilde (nederst til høyre) viser hvordan vannet ble filtrert.

Metoden tillater en indirekte testing av store mengder børstemakk for actinosporefrigjøring, men må gjennomføres i perioden da børstemakkene frigjør smitte, i.e. i "smittevinduet". Metoden ble også brukt for å ta høyde for muligheten at små (mikroskopiske) børstemakk kunne være involvert, i.e. makk som ikke ble observert og samlet gjennom andre aktiviteter.

Delprøver (kalkmakk på stein, tang tare) eller i noen tilfeller alle børstemakkene i akvariene ble konservert i sprit (90%) og lagret med hensyn på videre qPCR-analyser gitt at vannprøvene fra et kar var positive for for *P. pseudobranchicola*.



Figur 11, Eksempel på fastsittende børstemakk som det er vanskelig å ta individprøver fra, men kan holdes i akvarier for å påvise eventuell actinosporefrigjøring (t.v. *Paradexiospira* og *Spirorbis* lignende typer, t.h. *Hydroides norvegica*).

En enklere variant av denne metoden hvor mindre beholdere (250 ml) ble fylt med tang med børstemakk på og sjøvann og latt stå og bunnfelle over natt, ble brukt i noen prøver fra Oslofjorden (Oven, Råde kommune). Bunnfallet ble deretter sugd opp med pipette og videre analysert med hensyn på tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola* vha. qPCR (se under). Ved prøvetaking i Korsfjorden ved Alta ble en lignende strategi brukt på noen prøver, som ble satt kjølig i flate bakker, og vannet flittrert dagen etter. I dette tilfellet ble det i tillegg tatt individprøver av makkene som var tilstede.

Analyser/Protokoller

Plukking og sortering av børstemakk: Børstemakkene ble først sortert til gruppe/slekt/art. Fra større børstemakk ble enten biter av midtre eller bakre deler kuttet av/ut ved hjelp av en skalpell. Mindre makk ble analysert hele. DNA ble ekstrahert fra enkeltindivider eller fra flere individer i samme prøve ("samleprøver"). Restene av børstemakk det ble tatt delprøver av (store makk), eller referanseprøver (små makk) ble tatt vare på for eventuelle videre morfologiske og molekylære analyser (sikker identifikasjon), spesielt med tanke på eventuelle prøver som var positive for *P. pseudobranchicola*.



Figure 12, Sortering av børstemark i felt

DNA-ekstraksjon og qPCR-analyser:

RNA/DNA-ekstraksjon ble foretatt både hos Veterinærinstituttet og UiB og med litt forskjellige metoder. Ved Veterinærinstituttet ble DNA-ekstraksjon enten foretatt med bruk av MoleDNA tissue kit (MoleGenetics) eller bruk av Dneasy/DNAminiKit på en QiaCube automatisk DNA ekstraksjonsmaskin.

Ved UiB ble forskjellige metoder for ekstraksjon testet ut:

Prøver fra 2013: Trizol (Phenol/Chloroform-ekstraksjonsmetode) (Sigma) ble brukt til å rense RNA fra enkeltmakk eller fra samleprøver. *Spiking* (tilsetning) med laksevev som var positivt for *P. pseudobranchicola* viste at enkelte typer børstemark (*Circeis* fra kjerringhår, *Desmarestia*) ga full inhibisjon av qPCR kjøringen (se resultater).

Prøver fra 2014: Trizol (Phenol/Chloroform-ekstraksjonsmetode) ble brukt til å rense RNA fra enkeltmakk eller fra samleprøver. Metoden ble forbedret fra 2013 ved at det ble foretatt *spiking* med ekstern kontroll (tilsetning av saltbakterien *Halobacterium salinarum*, Hsal) (Andersen, Hodneland and Nylund 2010) for å kontrollere kvalitet på RNA-ekstraksjon og grad av inhibisjon på qPCR kjøringen. Grad av inhibisjon ble målt med realtids qPCR på *H. salinarum*. Inhibisjon på qPCR varierte mellom 3-6 Ct verdier, noe som tilsvarer et tap av sensitivitet på 10-100 ganger

Prøver fra 2015: Med tanke på å redusere påvirkning av inhibitorer ble det valgt å benytte metoder av DNA ekstraksjon fra børstemarken som reduserer mengden inhibitorer. Flere kommersielle renseskitt ble prøvd ut, inkludert kitt beregnet for bløtdyr (mollusker) og planter. Det som kom best ut for generell

bruk på børstemakk var Qiagen DNA tissue kit (Qiagen). Dette ble derfor brukt for ekstraksjon av all børstemakk fra 2015. Alle prøvene ble også *spiket* med *H. salinarum* for å overvåke på RNA-ekstraksjon og grad av inhibisjon på qPCR-analysen.

qPCR: To forskjellige deteksjonsassay ble benyttet. Ved Veterinærinstituttet ble metoden publisert av Jørgensen et al. (2011), og til en viss grad metoden publisert av Nylund et al. (2011) benyttet. Alle qPCR-analyser ved VI benyttet master-mix fra Takara. Ved UiB ble i metoden publisert av Nylund et al. (2011) benyttet. Alle qPCR-analyser ved UiB benyttet AgPathID qPCR-kit og produsentens standard protokoll med det unntak at mengden av alle reagenser ble halvert.

Artsbestemmelse av børstemakk ved bruk av DNA Barcoding

For et utvalg børstemakk ble DNA-barcoding benyttet for å artsidentifisere representanter for noen grupper makk. DNA-barcoding er en metode hvor en liten bit av DNA'et til organismer oppformeres ved konvensjonell PCR-metodikk og deretter sekvenseres. Sekvensene sammenlignes så med sekvenser i online-databaser slik som NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) og BOLD (<http://www.boldsystems.org/>). DNA-ekstrakt brukt for å undersøke for tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola* ble også benyttet til DNA-barcoding. Primere og protokoller er beskrevet i Carr et al. (2011). DNA-barcoding av børstemakk ble gjort for å: 1) etablere en metode for sikker artsdiagnose av den aktuelle børstemakken hvis *P. pseudobranchicola* skulle bli påvist, og 2) som en kontroll på at vår sortering av børstemakk i grupper basert på morfologi var god nok.

Resultater

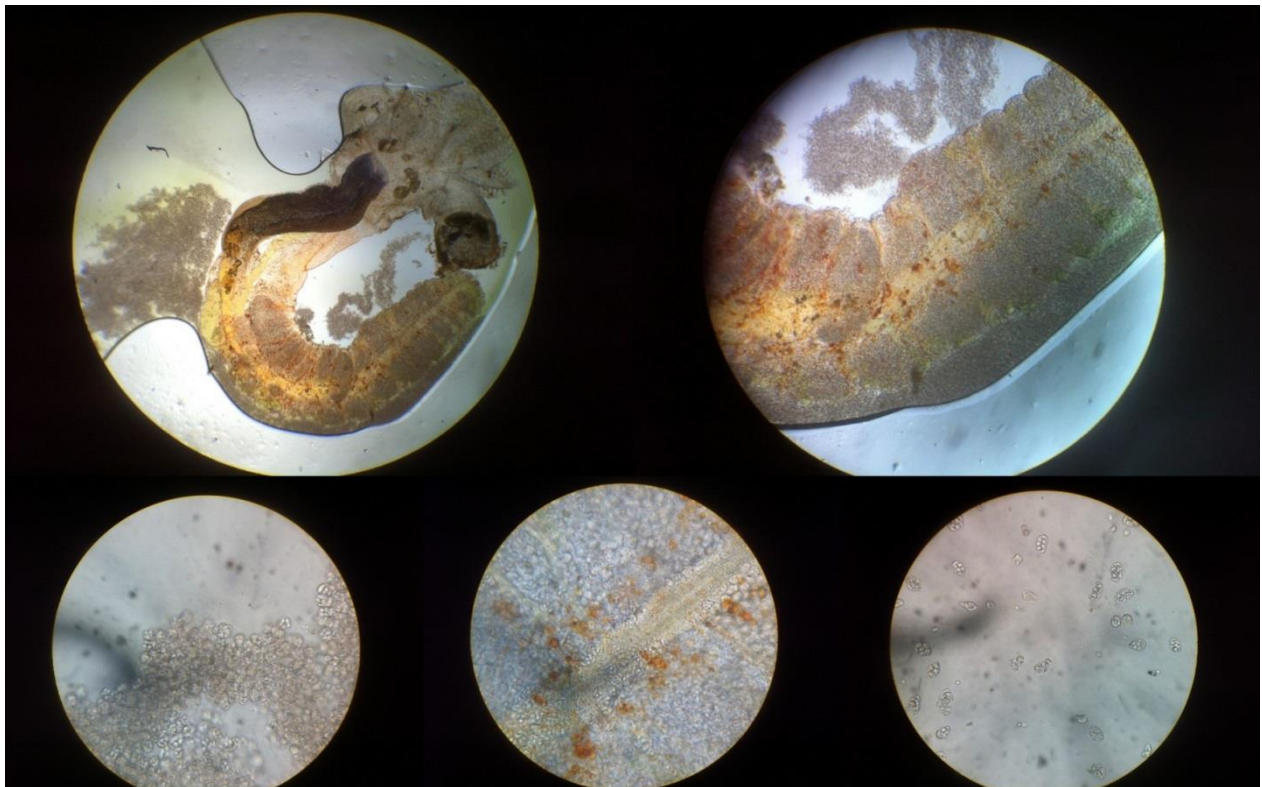
Det har blitt gjennomført totalt 5 feltarbeid i prosjektet 2013-15. I tillegg har det i et tidligere prosjekt (NFR) blitt gjennomført 3 feltturer. Et stort antall børstemakk er samlet inn og analysert (se under)¹ og vann er filtrert fra sjøen og fra akvarier med børstemakk for å påvise sporer av *P. pseudobranchicola*, men parasittens sluttvert er ikke funnet.

Det har vært enkelte prøver som har vært positive for *P. pseudobranchicola* i qPCR-analyser (høye Ct-verdier), men disse har ikke kunne bekreftes med vanlig sekvensering. Dette gjelder blant annet prøver fra børstemakk samlet inn i Oslofjorden, men også enkeltprøver fra andre lokaliteter og vannprøver har vært positive. Hvis dette er reelle positive prøver så er det også vanskelig å si om de stammer fra den aktuelle børstemakken eller om det positive signalet stammer fra DNA/sporer i vannet som blir med når man samler inn prøver. Vi forventer at en eventuell infeksjon vil gi sterkt signal i en qPCR-analyse da en infisert børstemakk sannsynligvis vil inneholde hundrevis eller tusenvis av sporer. Dette baseres på kjent litteratur (f.eks. Karlsbakk et al. 2013, Kjøie 2002, Kjøie et al. 2007, 2008, 2013) og på det vi selv observerte da vi påviste parvicapsulide actinosporer i *Spirorbis spirorbis* og *Hydroides norvegica* (se under). Det er foreløpig ukjent hvilken Ct-verdi vi kan forvente av én enkelt spore, noe som ville være av stor hjelp for å vurdere slike resultater.

¹ Resultatene vil i noen grad overlappe og inkludere resultater fra NFR-prosjektet (P.nr. 207269) da de to prosjektene også har overlappet i tid.

Vi har påvist utviklingsstadier (actinosporer, pansporocyster) av to parvicapsulide myxosporidier under prosjektets gang, men altså ikke sporer fra *P. pseudobranchicola*. *Gadimyxa atlantica* ble påvist hyppig i posthornmakk *Spirorbis spirorbis* ved Kirkeneset og en ubeskrevet art i familien Parvicapsulidae (Parvicapsulidae gen. sp. Genotype 'S', (se Køie et al. 2013) ble påvist i prøver av *Hydroides norvegica* fra Korsfjorden ved Alta.

Det er ikke mulig å fastslå eksakt hvor mange børstemakk som er undersøkt totalt i prosjektet, da et stort antall ble testet indirekte ved analyser av vann fra oppholdsakvarier. Det foreligger derimot et mer nøyaktig anslag av antallet makk som er testet individuelt eller i samleprøver (hver samleprøve typisk med 5-10 makk, alt etter størrelse) (se tabell 1)



Figur 13, *Gadimyxa atlantica* i posthornsmakk, Kvalfjorden, Hammerfest, Finnmark. Denne arten har torsk, *Gadus morhua*, som fiskevert. Hele de bakre deler av makken er fylt med sporer.

Vi hadde følgende prøver av børstemakk med positivt signal for *P. pseudobranchicola*:

- *Phascolion strombi* (Sipunculida), 50-80 m dyp, Komagnes
- *Scoloplos armiger* (Polychaeta, Orbiniidae), ≤20 m, Komagnes
- *Spirorbis* cf. *spirorbis*, og sediment fra beholder med *Spirorbis* cf. *spirorbis* på sagtang, fjæra, Råde, Østfold.

Signalene i de positive prøvene var svake (Ct>30), og ytterligere analyser på positive makk eller spesifikk ny prøvetaking resulterte ikke i videre funn. Det ble konkludert at det trolig dreier seg om signal fra

myxosporer, som makkene kan ha fått i seg fra sedimentene, alternativt sporer/DNA-fragmenter i vann i prøven. Fisken med parvicapsulose i anlegget (Komagnes) like ved frigav sannsynligvis store mengder myxosporer til miljøet. Den positive prøven fra Oslofjorden (Ct>29) kan ikke forklares på denne måten og årsaken er derfor ukjent. En mulighet er også her at positive makk har filtrert sporer fra vannet. I tillegg til >1200 fra Råde, er et stort antall *S. spirorbis* fra oppdrettslokalteter i Nord-Norge testet direkte eller indirekte, uten positive funn av *P. pseudobranchicola*. Det synes derfor usannsynlig at denne børstemakken er en vert for parasitten, men det kan ikke utelukkes at prevalensen er veldig lav eller at innsamlingene er foretatt etter frigjøring av sporer.

Tabell 1, oversikt over analyserte børstemakk

Kategorier makk	Vårt navn	Akvarieundersøkelser (minimumsestimat)	Disseksjon	qPCR
Oligochaeta, fjæra	"Rødmakk"	>400	10	55
Oligochaeta, elveos	"Hvitmakk"	>660	5	330
<i>Pomatoceros</i> spp.	Trekantmakk	>2000	17	165
<i>Hydroides norvegicus</i>		>100	35	58
<i>Spirorbis spirorbis</i>	Sagtang-spirorbis	>2000	49	1557
Spirorbidae, stein	"Steinspirorbis" (mest <i>Spirorbis</i> spp.)	>1000	31	1216
<i>Spirorbis</i> cf. <i>corallinae</i>	<i>Spirorbis</i> rødalger	>200	42	0
<i>Circeis spirillum</i> ex <i>Desmarestia</i>	Kjerring- <i>Circeis</i>	>10000	10	1135
<i>Circeis spirillum</i> ex <i>Laminaria</i>	Tare- <i>Circeis</i>	>200	10	50
Sabellida indet, rør bløtbunn	"J-makk"	0	0	114
Sabellidae (cf. <i>Branchiomma</i>)	"Ruglmakk"	>200	2	170
Errantia varia (<i>Nereis</i> , <i>Nephtys</i> , <i>Phyllodoce</i> etc.)		>400	11	44
Arenicolidae (<i>Arenicola</i> spp.)	Sandmakk	20	2	0
Cirratulinidae (cf. <i>Cirratulus</i>)	klasemakk	>50		89
Opheliidae (cf. <i>Ophelia limacina</i>)		>200	5	138
Orbiniidae/Glyceridae		>50		110
Oweniidae	sandrørsmakk	>200		*
Polynoidae (<i>Lepidonotus</i> , <i>Harmothoe</i>)	Skjellrygger	>200	10	*
Spionidae (cf. <i>Polydora ciliata</i>)		>100	20	150
Terebellidae (<i>Amphitrite</i> oa)		>50	2	*
Sipunculida (<i>Phascolion strombi</i>)		0		ca. 80
Polychaeta indet*		Ukjent		224
Totalt				5461

*qPCR testing av enkeltmakk inngår i "Polychaeta indet"

Strategien mhp artsbestemmelse av børstemakk var å foreta nærmere studier på positive prøver. Derfor ble det ikke gjort detaljert morfologisk eller molekylær identifikasjon av de fleste kategorier børstemakk som var negative for *P. pseudobranchicola*. Et utvalg av polychaeter fra forskjellige lokaliteter og grupper av børstemakk ble likevel identifisert vha. DNA-barcoding for at denne metoden for identifisering/verifisering av børstemakk skulle være klar hvis en sluttvert for *P. pseudobranchicola* ble funnet. Følgende arter ble identifisert eller ID verifisert med denne metoden: *Pherusa plumosa* (fam. Flabelligeridae), *Amphitrite cirrata* (fam. Terebellidae), *Nicomache* sp. (fam. Maldanidae), *Scoloplos*

*armiger*² (fam. Orbiniidae), og *Terebellides stroemii* (fam. Trichobranchidae) ble alle identifisert fra Kirkeneset. *Glycera capitata* (fam. Glyceridae), *Scoloplos armiger* og Serpulidae (familie) ble identifisert fra Komagnes og *Pomatoceros triqueter* (trekantmakk)(fam. Sabellidae) ble identifisert fra Korsfjorden. Metoden viste seg å ikke virke på en rekke arter/grupper, men kan brukes på en rekke av de artene som vi har undersøkt i prosjektet uten modifisering av protokollen. Det hadde blitt lagt mer innsats inn i denne delen om den var viktig for gjennomføringen av prosjektet eller hvis *P. pseudobranchicola* ble påvist i en børstemakk som var vanskelig å bestemme morfologisk.

Konklusjoner

- Mer enn 5000 børstemakk undersøkt totalt.
- Hovedverten for *Parvicapsula pseudobranchicola* ble ikke funnet, men to beslektede myxosporidier er påvist.

Diskusjon

Vi har forsøkt en rekke strategier for å identifisere hovedverten for *P. pseudobranchicola*. Omfattende vannprøve-analyser på flere lokaliteter i "smittevinduet" har gitt positive prøver, men har ikke resultert i et mønster som kan antyde habitatet til hovedverten. Vi har hatt positive vannprøver fra overflata til 40 m dyp, og nær elveoser. Makk samlet inn i "smittevinduet" er ofte blitt holdt levende i akvarier i et døgn eller mer, slik at vannet fra beholderen kan filtreres og testes for *P. pseudobranchicola*. Slike analyser har aldri gitt positive signal, men det er blitt oppdaget at en i vannet fra enkelte akvarier (spesielt de som inneholder brunalger) har omfattende qPCR inhibisjon. Det betyr at metoden i noen tilfeller kan ha vært for lite sensitiv. Derfor er det også blitt testet direkte på enkeltmakk med qPCR, og det er da lagt vekt på makk fra habitater som er kjent å forårsake inhibisjon. Det forekommer inhibisjon også i slike prøver, men ikke av en slik grad at det kan skjule infeksjoner. Analyser med qPCR av enkeltmakk har også den fordel at undersøkelsene gjerne kan gjennomføres i forkant av "smittevinduet", da infiserte makk vil være fulle av nesten modne actinosporer. Metoden har gitt en rekke positive funn, men alltid svake (lite DNA/RNA fra *P. pseudobranchicola* til stede). Mange av børstemakkene filtrerer næring fra vannet, og noen spiser sediment (detritus). I nærheten av oppdrettsanlegg kan muligens myxosporer av *P. pseudobranchicola* frigjort fra laksen bli tatt opp av makkene. En annen mulighet er at aktinosporer fra vannet filtreres ut. Tas slike opp av en makk, kan den gi positivt signal, uten å være infisert. I kjente myxosporidieinfeksjoner i børstemakk inneholder makkene tusenvis til millioner av flercellede sporer. qPCR signalet vil da bli svært sterkt (lav Ct). Det er derfor slike sterke signal det letes etter i undersøkelsene. De positive funnene som kan representere enkeltsporer er derimot en bekreftelse på at metoden er god. I disse analysene brukes qPCR-assays som er spesifikke for *P. pseudobranchicola*. Andre myxosporidieinfeksjoner detekteres ikke. Vi har derfor gjort supplerende undersøkelser ved mikroskopi i felt. Ved sortering er det i blant sett makk med avvikende morfologi, lyse områder eller klumper. Ved mikroskopiske studier er det i slike og i tilfeldige prøver blitt påvist gjær-lignende infeksjoner, ciliatinfeksjoner, amøber, gregariner og myxosporidie-actinosporer/pansporocyster. De påviste

² Dette navnet refererer til et artskompleks.

myxosporidiene er blitt sekvensert, og ble funnet å representere andre parvicapsulider (se over). Mikroskopi er en svært arbeidskrevende metode, og er ikke forenlig med undersøkelse av store mengder makk i felt. Nylig ble det publisert et studie fra Portugal hvor én (1) polychaet ble funnet infisert etter undersøkelse nesten 6000 individer av børstemakk, noe som gjorde at livssyklusen til myxozoen *Sphaerospora dicentrarchi* ble beskrevet (Rangel, Castro, Rocha, Severino, Casal, Azevedo, Cavaleiro and Santos 2016). Dette, sammen med den omfattende innsatsen som er utført i det nåværende FHF-prosjektet, viser at svært omfattende undersøkelser kan bli nødvendig for å finne sluttverten til *P. pseudobranchicola*. Uavhengig av dette, mener vi at fortsatt innsats for å finne sluttverten vil være svært viktig for næringen da det gir store muligheter for videre forskning på smitteveier, virulens, og andre aspekter som kommer akvakulturnæringen til gode.

Videre arbeid

I de gjennomførte børstemakkundersøkelsene er det utviklet gode metoder som skal være egnet til å avsløre infeksjoner med *P. pseudobranchicola*. En rekke habitater er godt eller svært godt undersøkt. I fremtidige undersøkelser bør det legges større vekt på innsamling ved dykking, da sublittoral hardbunn er dårligst undersøkt hittil.

Referanser

- Andersen, L., Hodneland, K. & Nylund, A. (2010) No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)- challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Virology Journal*, **7**, 198.
- Bartholomew, J.L., Atkinson, S.D. & Hallett, S.L. (2006) Involvement of *Manayunkia speciosa* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) in the life cycle of *Parvicapsula minibicornis*, a myxozoan parasite of Pacific salmon. *Journal of Parasitology*, **92**, 742-748.
- Carr, C.M., Hardy, S.M., Brown, T.M., Macdonald, T.A. & Hebert, P.D.N. (2011) A Tri-Oceanic Perspective: DNA Barcoding Reveals Geographic Structure and Cryptic Diversity in Canadian Polychaetes. *PLoS ONE*, **6**.
- Fiala, I. (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, **36**, 1521-1534.
- Hansen, H., Poppe, T.T., Markussen, T. & Karlsbakk, E. (2015) Seatrout (*Salmo trutta*) is a natural host for *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa, Myxosporea), an important pathogen of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasites & Vectors*, **8**, 218.
- Jørgensen, A., Nylund, A., Nikolaisen, V., Alexandersen, S. & Karlsbakk, E. (2011) Real-time PCR detection of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporea) in wild salmonids in Norway. *Journal of Fish Diseases*, **34**, 365-371.
- Karlsbakk, E., Koie, M., 2012. The marine myxosporean *Sigmomyxa sphaerica* (Thelohan, 1895) gen. n., comb. n. (syn. *Myxidium sphaericum*) from garfish (*Belone belone* (L.)) uses the polychaete *Nereis pelagica* L. as invertebrate host. *Parasitology Research*. **110**, 211-218.
- Kodádková, A., Dyková, I., Tým, T., Ditrich, O. & Fiala, I. (2014) Myxozoa in high Arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **3**, 41-56.
- Køie, M., Karlsbakk, E., Einen, A.-C.B. & Nylund, A. (2013) A parvicapsulid (Myxozoa) infecting *Sprattus sprattus* and *Clupea harengus* (Clupeidae) in the Northeast Atlantic uses *Hydroides norvegicus* (Serpulidae) as invertebrate host. *Folia Parasitologica*, **60**, 149-154.
- Køie M, Karlsbakk E, Nylund A (2008) The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auerbachii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) as invertebrate host. *Folia Parasitol* **55**:100–104
- Køie, M., Karlsbakk, E. & Nylund, A. (2007) *Parvicapsula bicornis* n. sp. and *P. limandae* n. sp. (Myxozoa, Parvicapsulidae) in Pleuronectidae (Teleostei, Heterosomata) from Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms*, **76**, 123-129.
- Køie, M., 2002. Spirorbid and serpulid polychaetes are candidates as invertebrate hosts for myxozoa. *Folia Parasitologica*. **49**, 160-162 (erratum in (163): 181
- Nylund, S., Andersen, L., Sævareid, I., Plarre, H., Watanabe, K., Arnesen, C.E., Karlsbakk, E. & Nylund, A. (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **94**, 41-57.
- Rangel, L.F., Castro, R., Rocha, S., Severino, R., Casal, G., Azevedo, C., Cavaleiro, F. & Santos, M.J. (2016) Tetractinomyxon stages genetically consistent with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxozoa: Sphaerosporidae) found in *Capitella* sp. (Polychaeta: Capitellidae) suggest potential role of marine polychaetes in parasite's life cycle. *Parasitology*, **1-7**.
- Rangel, L.F., Rocha, S., Castro, R., Severino, R., Casal, G., Azevedo, C., Cavaleiro, F. & Santos, M.J. (2015) The life cycle of *Ortholinea auratae* (Myxozoa: Ortholineidae) involves an actinospore of the triactinomyxon morphotype infecting a marine oligochaete. *Parasitol Res*.
- Yokoyama, H., Grabner, D. & Shirakashi, S. (2012) Transmission Biology of the Myxozo. In: (ed. by E. Carvalho). InTech.

Aktivitet 2: Beskrive vevstropisme og karakterisere utviklingen til *P. pseudobranchicola* i laks.

Ansvarlig for aktivitet: Are Nylund (UiB)

Laboratoriearbeid: Heidrun Plarre (UiB) og Håvard Hustoft (UiB) (qPCR analyser), Kuninori Watanabe (UiB) (histologi og TEM), Turhan Markussen (VI) (*in situ* hybridisering), Haakon Hansen (VI) og Egil Karlsbakk (HI,UiB) (histologi).

Introduksjon

Det er relativt godt dokumentert at oppdrettslaks kan bli smittet i sjø i perioden fra juli til oktober, og det foreligger indikasjoner på at smitten (actinosporer) frigjøres tidligere på Vestlandet enn i Nord-Norge. Smitte er blant annet påvist hos utvandrende smolt på Vestlandet i mai måned (Staveland 2010). I et tidligere PCR basert studium av vevsfordelingen (pseudobranchie, gjelle, nyren, lever, hjerte blod, milt, øye, tarm) til *P. pseudobranchicola* hos laks i Nord Norge var alle vev positive for parasitten i midten av januar (100 % prevalens) hos fisk som var satt i sjøen året før (Nylund et al 2005), mens fordelingen i mars viste redusert forekomst i enkelte vev. I det ene anlegget hvor 11 laks ble undersøkt var alle pseudobranchier og 91% av hjertene positive i mars, mens blodprøvene var helt negative. Gjellene hadde en prevalens på 73 % mens de fleste andre vev hadde en prevalens lavere enn 50 %. Dette er det eneste vitenskapelige studium som gir en delvis innsikt i vevsfordeling av parasitten hos laks i den marine produksjonssyklus. Eksisterende kunnskap om utviklingen av *P. pseudobranchicola* i laks må derfor sies å være svært mangelfull.

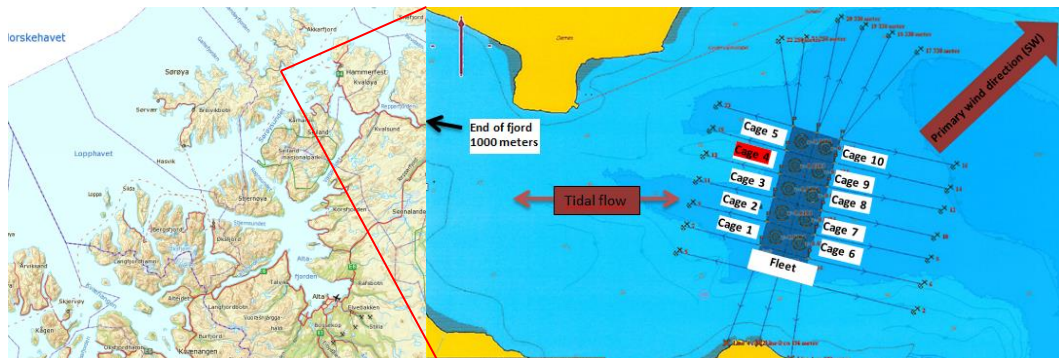
Problemstilling og formål

Målet med denne delen av prosjektet er å fremskaffe en detaljert oversikt over prevalens og intensitet av denne parasitten i utvalgte vev/organer hos laks gjennom hele den marine produksjonsfase i et utvalgt anlegg i Nord Norge (med kjent og forutsigbart parvicapsulose-problem). Som en del av dette var målet å utvikle en *in situ* hybridiseringsteknikk (ISH). ISH er en sensitiv og spesifikk deteksjonsmetode for å påvise *P. pseudobranchicola* i fiskens vev ved histologi.

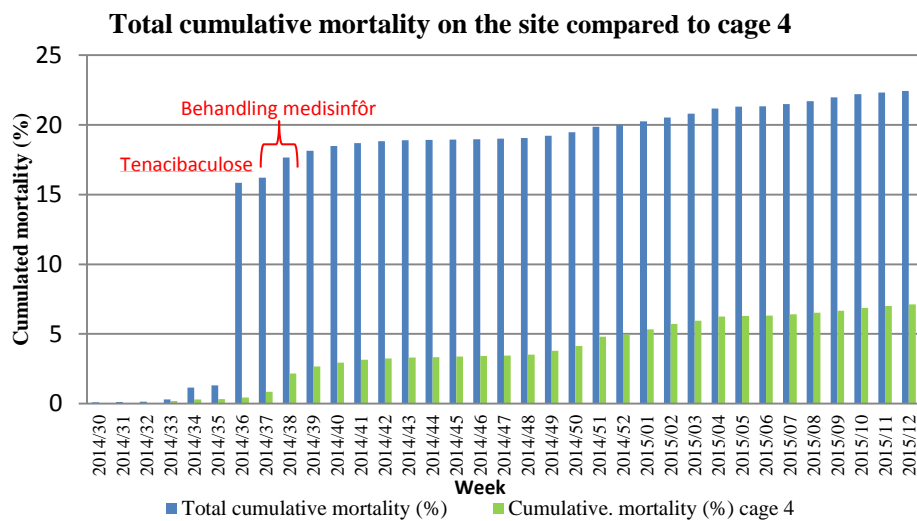
Materiale og metode

Beskrivelse av forsøkslokaliteten: Aktiviteten ble gjennomført ved et av anleggene til Cermaq Norway ved Sørøya i Finnmark (figur 14). Anlegget hadde et utbrudd av tenacibaculose i september 2014, men sykdommen rammet ikke merd 4, som var den som ble fulgt i prosjektet (figur 15). Med unntak av en kort periode med tenacibaculose var dødeligheten relativt lav i anlegget gjennom hele den marine produksjonsfasen. Ved sjøsetting ble laksen testet for en rekke agens uten at det var mulig å påvise

andre agens i slike mengder at de kan ha bidratt til eventuell dødelighet i anlegget i perioden med høy forekomst av *P. pseudobranchicola*.



Figur 14, Plassering av lokaliteten og merden som følges i aktiviteten.



Figur 15, Akkumulert dødelighet på anlegg og i studiemerd (merd 4).

Prøveuttak og prøvemateriale

I tillegg til prøveuttaket ved utsett ble det fulgt opp med uttak i februar, mars, september og desember 2015, og med et siste uttak i 2016 ved avslutning av produksjon på lokaliteten. Det ble tatt ut prøver fra 12 organer (pseudobranchie, gjelle, øye, hjerte, nyre, blod, lever, milt, tarm, urinblære, galleblære) fra 30 tilfeldige fisk.

Table 2, Oversikt over prøveuttak, datoer for prøveuttak og analyser gjennomført på de forskjellige uttakene.

Dato for prøve	Dager etter sjøsetting	Antall fisk	Analyse
11.08.14 (Freshwater)	-1	25	PCR
14.08.14		Transfer to sea	
04.09.14	21	30	PCR, Histology
18.09.14	35	30	PCR, Histology
02.10.14	49	30	PCR, Histology
11.11.14	89	30	PCR, Histology
28.11.14	106	5	Mikroskopi for sporer
08.01.15	147	30	PCR, Histology
18.03.15	216	30	PCR, Histology
26.08.15	347	30	PCR
04.12.15	451	30	PCR
02.05.16	601	30	PCR

I tillegg ble fisken undersøkt for andre kjente patogener (HSMI – PRV, CMS-PMCV, IPNV, ISAV, SAV, Candidatus *Branchiomonas cysticola*, og *Ichthyobodo salmonis*) før utsett i sjø og etter 147 og 601 dager i sjø.

Analyser/Protokoller

Prøvene ble analysert ved hjelp av qPCR. Et utvalg fisk ble også undersøkt ved hjelp av histologi, transmisjons elektronmikroskopi og *in situ*-hybridisering. Det ble også laget nativ-preparater av ferskt materiale for påvisning av sporer.

RNA ble ekstrahert med standard metoder og analysert ved hjelp av qPCR for å påvise *P. pseudobranchicola* 18S rRNA (Nylund et al 2011). I tillegg ble prøvene analysert for tilstedeværelse av et utvalg andre agens; Salmonid alfavirus, SAV (Andersen et al 2007), Piscine reovirus, PRV (Repstad 2011), Infeksiøs lakseanemi virus, ISAV (Plarre et al 2005), Infeksiøs pankreasnekrose virus, IPNV (Watanabe et al 2006), PMCV (Repstad 2011), Cand. B. *cysticola* (Repstad 2011), og *Ichthyobodo salmonis* (Isaksen et al 2012). Elongeringsfaktor 1 alpha (EF1A) ble benyttet som intern kontroll (Olsvik et al. 2005). Hver kjøring

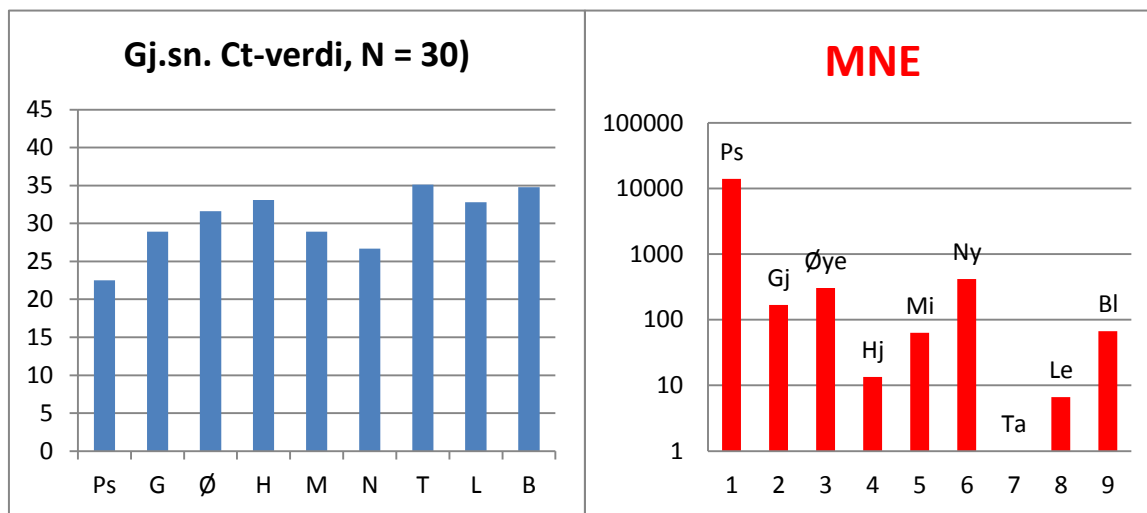
bestod av 45 sykluser og prøvene ble ansett som positive når fluorescenssignalet oversteg en gitt terskel (0,1) for det enkelte assayet.

Utvikling av *in situ* hybridiseringsmetodikk

In situ metodikk for påvisning av *P. pseudobranchicola* har blitt utviklet. Metoden ble presentert ved Frisk Fisk 2015 og er publisert i en internasjonal journal med fagfelleevaluering (Markussen et al., 2015) og blir derfor ikke presentert i detalj her. I forhold til prøveuttakene i denne aktiviteten ble det gjennomført *in situ*-analyser på fisk fra uttak 1 til 6 i forsøket. For hver fisk som ble undersøkt ble det som regel tatt tre etterfølgende snitt; ett som ble farget med HE, ett med *in situ* og ett som ikke ble farget. De to første ble sammenlignet morfologisk og det ble tatt bilder av snittene.

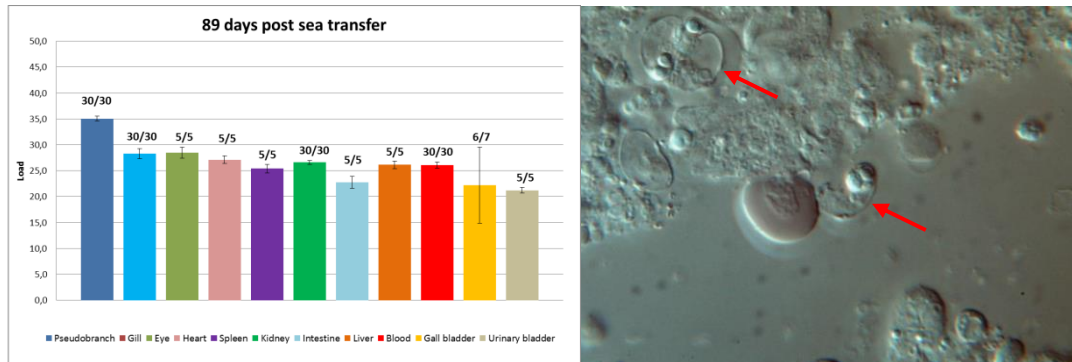
Resultater

qPCR: Fisken var negativ for *P. pseudobranchicola* før sjøsetting 15 august 2014. Allerede ved første uttak 04.09.2014 (21 dager etter sjøsetting) var alle vev i noen fisker positive for *P. pseudobranchicola* med 100 % prevalens i pseudobranchien og nyre (n= 30). Lavest prevalens (10 %) ble observert i tarmveggen. Mengde av parasitten var høyest i pseudobranchien (Figur 16), mens det var en jevnt lav påvisning i de andre vevene (dvs ingen tegn til oppformering i andre vev enn pseudobranchien).



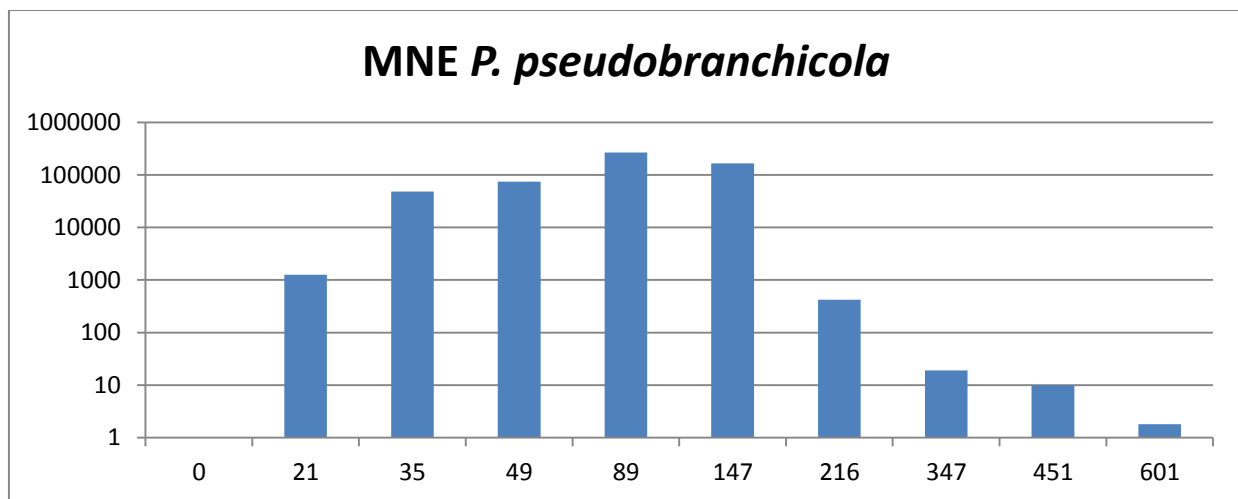
Figur 16, A) Gjennomsnittlig Ct-verdi i ni utvalgte ved (Ps = pseudobranchie, G = gjeller, Ø = Øye, H = hjerte, M = Milt, N = nyren, T = tarm, L = lever, B = blod) fra laks 21 dager etter sjøsetting. B) Gjennomsnittlig normalisert uttrykk (MNE) av SSU fra *P. pseudobranchicola* i de omtalte vev. Verdiene er normalisert mot elongeringsfaktor 1 alfa. Legg merke til logaritmisk vertikal-akse.

Størst parasittbelastning ble observert 89 dager etter sjøsetting (Figur 17a). På dette tidspunktet ble det observert tilsynelatende ferdig dannende sporer i pseudobranchie (Figur 17b). Det ble ikke observert utviklingsstadier av parasitten i noen av de andre vevene ved histologi. Det ble kun observert få modne sporer av *P. pseudobranchicola* hos laks fra uttakene i dette studiet.



Figur 17, A) Parasittbelastning målt med load (Ct verdi fra realtime RT-PCR minus 45) i 11 vev, ved dag 89 etter sjøsetting. B) Sporer av *P. pseudobranchicola* i pseudobranchien ved samme tidspunkt.

Laksen i dette anlegget ble fulgt gjennom hele den marine produksjonsfasen (601 dager) uten at det var mulig å påvise store mengder modne sporer av *P. pseudobranchicola*, slik en tidligere har sett ved parvicapsulose. Fra dag 147 til 216 etter sjøsetting ble det observert et signifikant fall i mengde med target gen (RNA) fra parasitten (presentert i figur 18 som gjennomsnitt normalisert ekspresjon log2 transformert). Dette sammenfalt med at parasitten forsvant fra pseudobranchiene hos de fiskene som ble undersøkt histologisk. Det tolkes som at omfattende sporefrigjøring fra fisken har skjedd denne perioden, altså januar til mars. Frigjøring kan også ha foregått tidligere (november-desember) uten at vi kunne påvise dette kvantitativt (rRNA tetthet) eller histologisk. Et økt innslag av immunceller ble sett i sporefrigjøringsperioden. Da det ikke ble observert tegn på reinfeksjon andre høst i sjø, tyder studien på at tidligere infeksjon beskytter mot ny infeksjon den resterende del av den marine produksjonsfasen. Følgelig kan det være mulig å vaksinere laks mot parasitten.

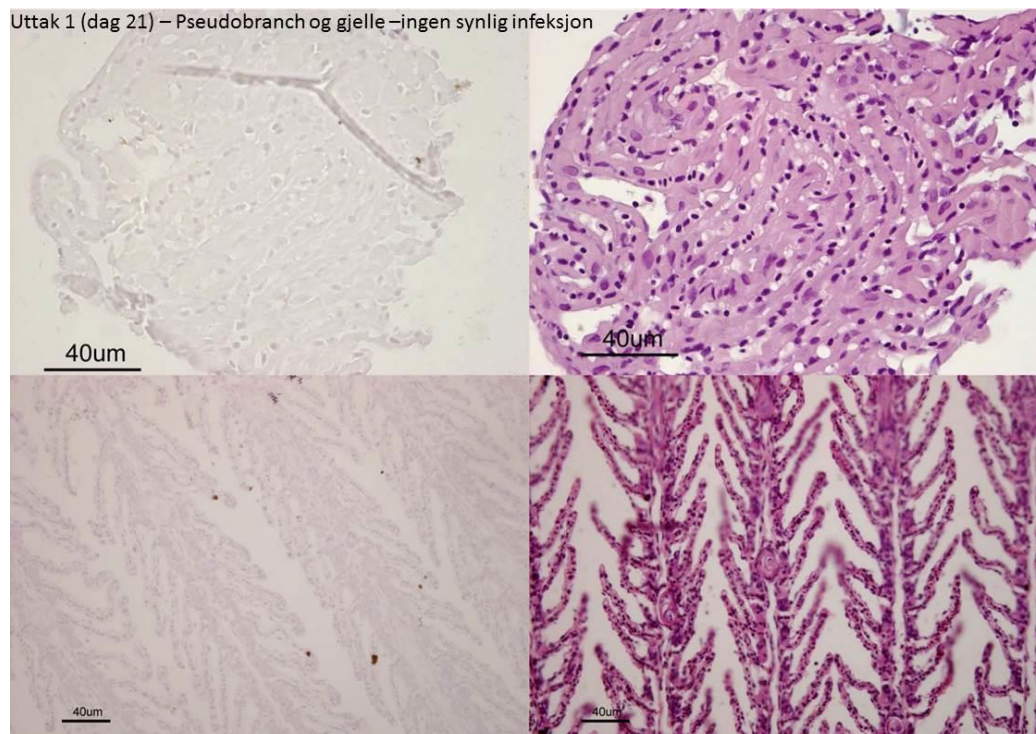


Figur 18, MNE (mean normalized expression) for mengde SSU fra parasitten i pseudobranchie hos laks gjennom 601 dager i marine produksjon, dvs fra utsett og frem til slakting. Første uttak er i smoltanlegg (14.08.2014) og siste uttak er ved slakting 6. mai 2016.

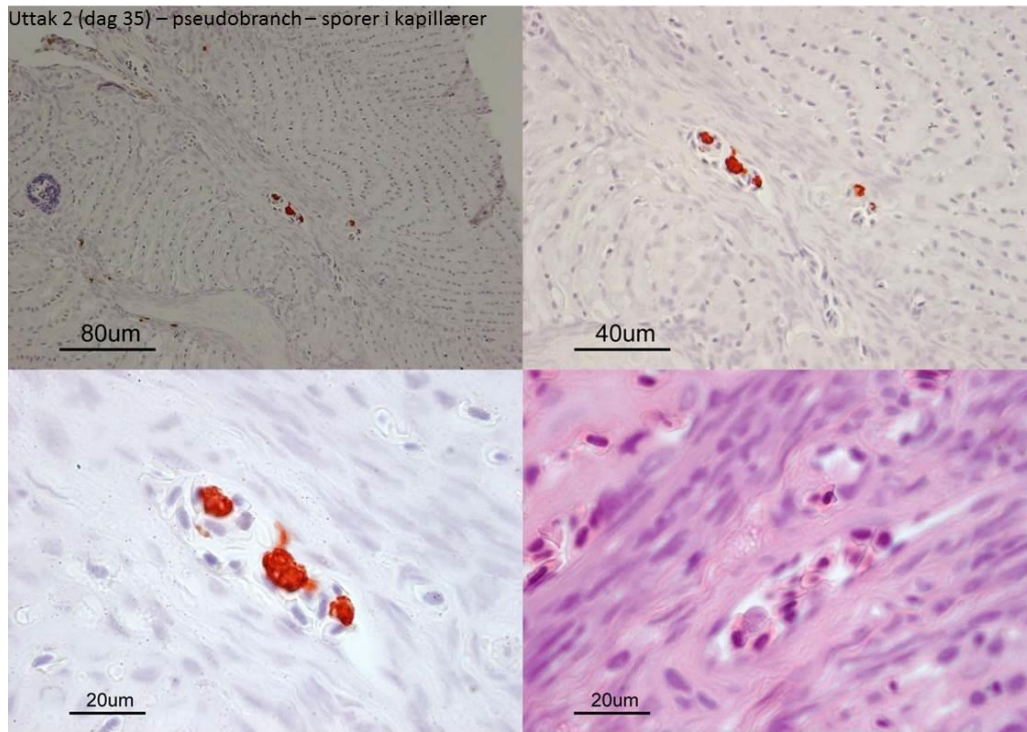
In-situ resultater:

Metoden viser at parasitten ikke er jevnt fordelt i vevet og at den ikke sikkert kan påvises i vevet før i uttak 4 (etter 89 dager). Et begrenset antall fisk er undersøkt da dette er en tidkrevende metode. Resultatene er imidlertid gode og gir interessant og informasjon om infeksjonen i fisken (se bilder under). I pseudobranken er fargede parasitter (rød farge *in situ*) synlige allerede fra uttak 2, men kan kun sees i blodårene på dette tidspunktet. Fra uttak 3 til og med uttak 5 sees en økende mengde sporer i pseudobranken. I uttak 5 (147 dager etter utsett) er det store mengder sporer i avgrensede deler av pseudobrankien, mens andre deler er helt normale (ikke infisert) (se figur 13). I uttak 6 ses ødelagt vev, men det er ingen sikker påvisning av sporer (kun 1 fisk analysert).

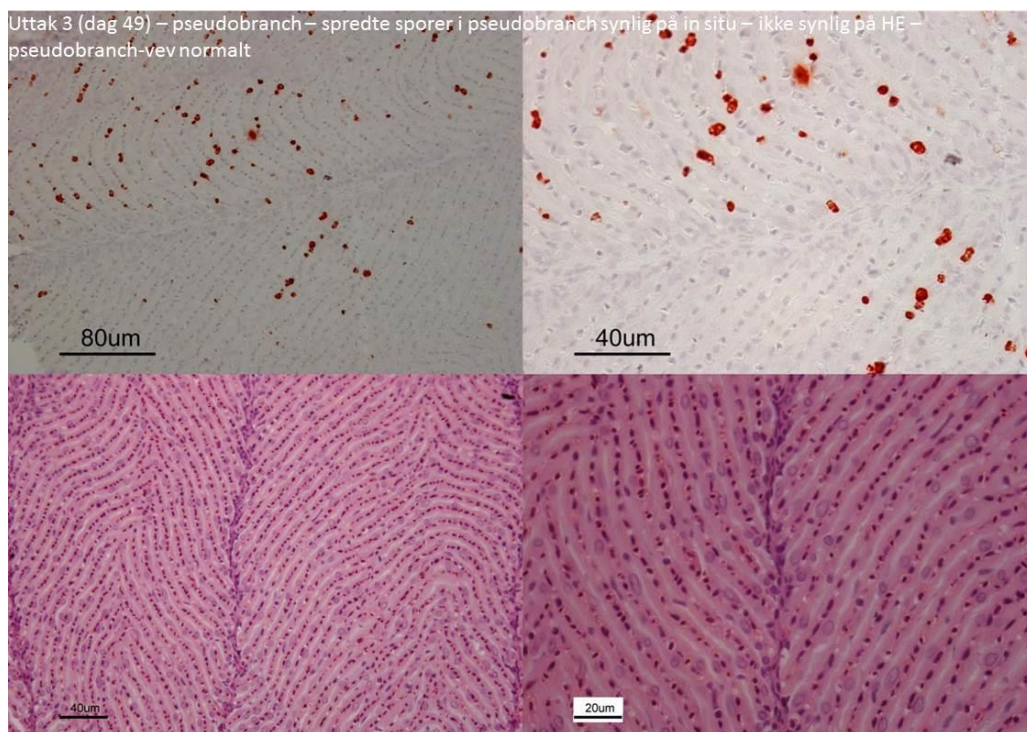
I uttak 4 observeres parasitter i blodbanen i gjellefilamentene, men i ingen andre deler av gjellevevet eller i andre organer bortsett fra i pseudobrankien. Resultatene indikerer en mulig frigivelse av sporer fra fisken i tiden mellom uttak 5 og 6 (det var likevel ikke mulig å observere ferdige sporer i ferske preparater av pseudobrank). Ingen andre organer ser ut til å være synlig påvirket av infeksjonen, noe som bekreftes av qPCR-analysene som kun viser en økning i mengde i pseudobranken utover i prøveperioden, mens det i de andre vevene ikke er noen økning.



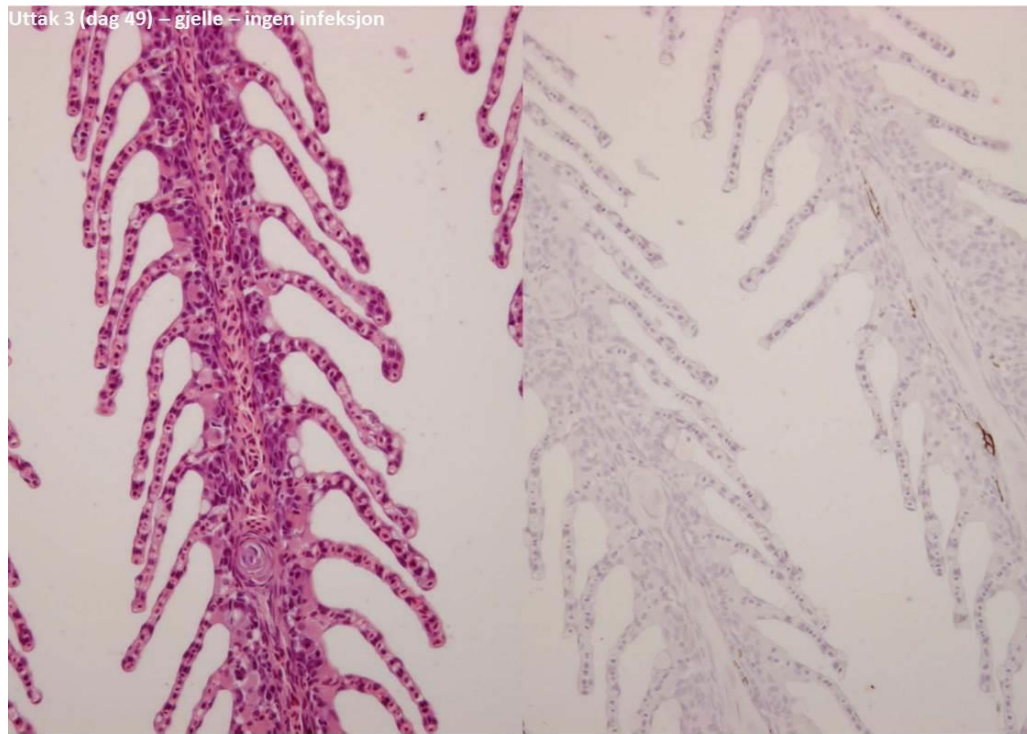
Figur 19, Bilder av gjeller og pseudobrank vev farget med In-situ eller HE fra uttak 1 (21 dager i sjø, 4 september).



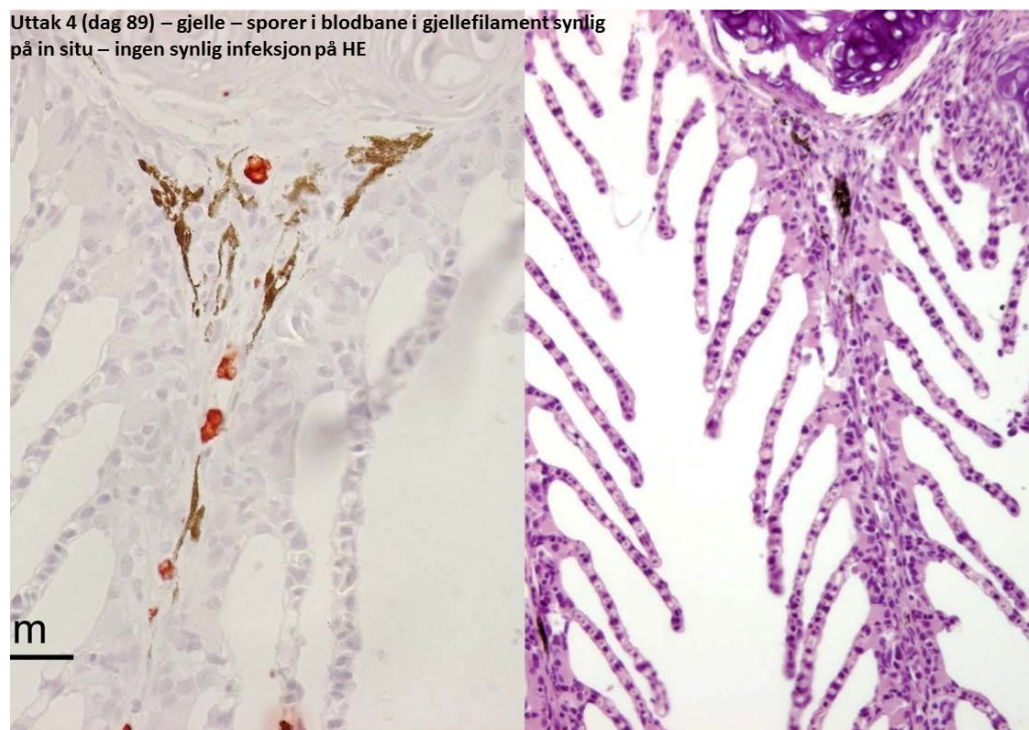
Figur 20, Bilder av pseudobranck vev farget med In-situ eller HE fra uttak 2 (35 dager i sjø, 18 september).



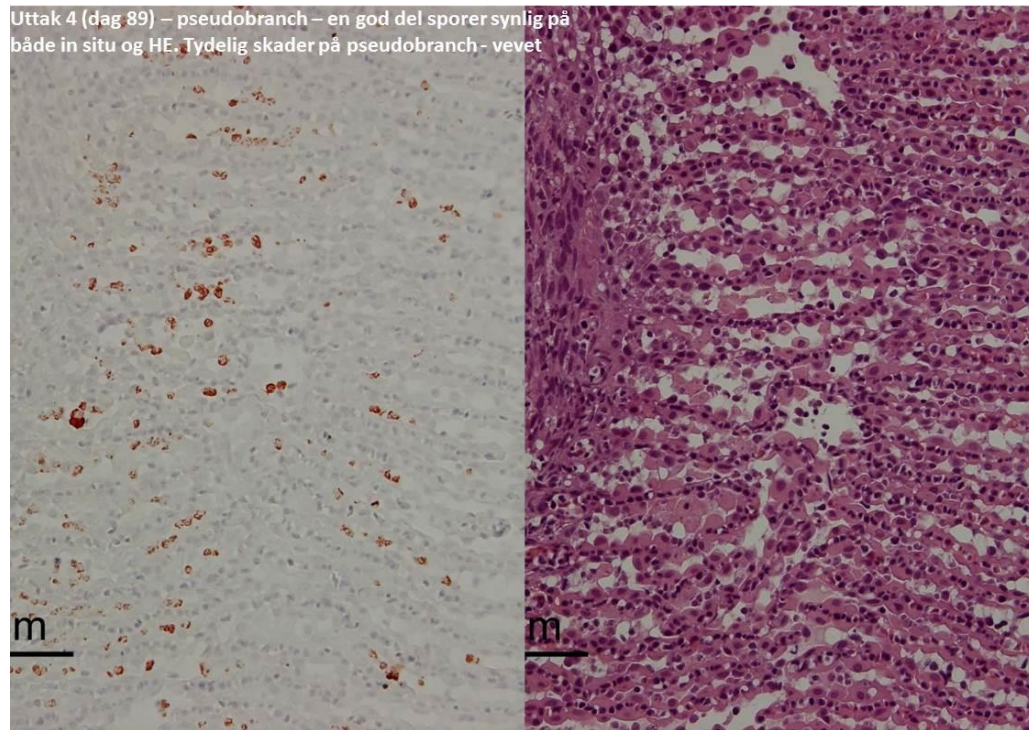
Figur 21, Bilder av pseudobranck vev farget med In-situ eller HE fra uttak 3 (49 dager i sjø, 2 oktober).



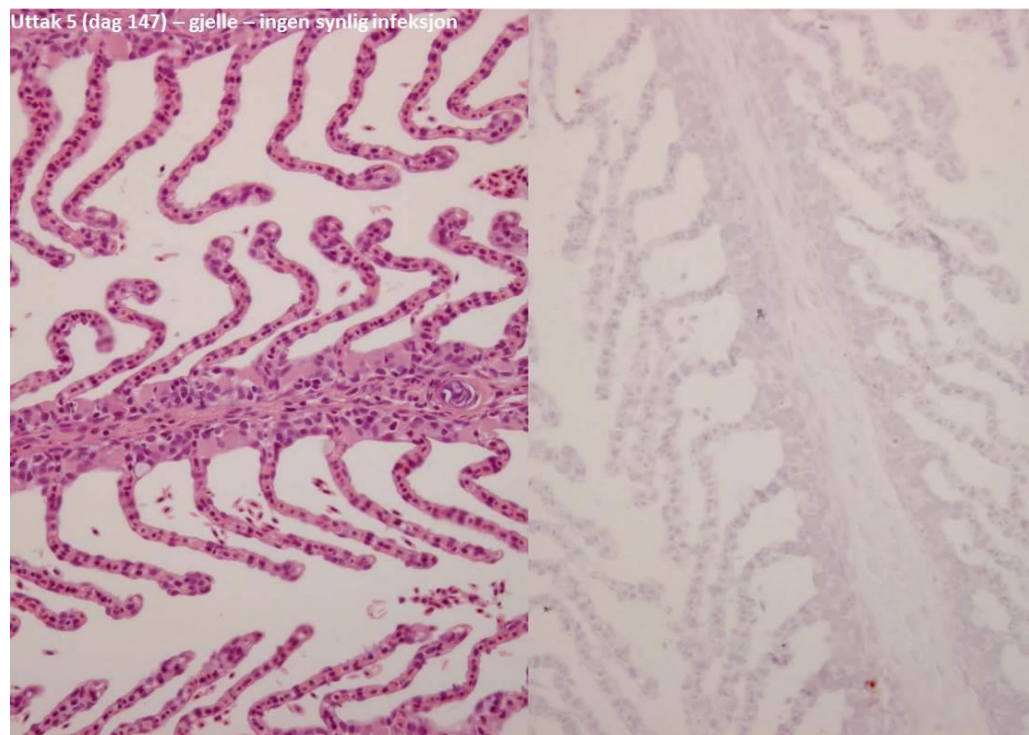
Figur 22, Bilder av gjeller vev farget med In-situ eller HE fra uttak 3 (49 dager i sjø, 2 oktober).



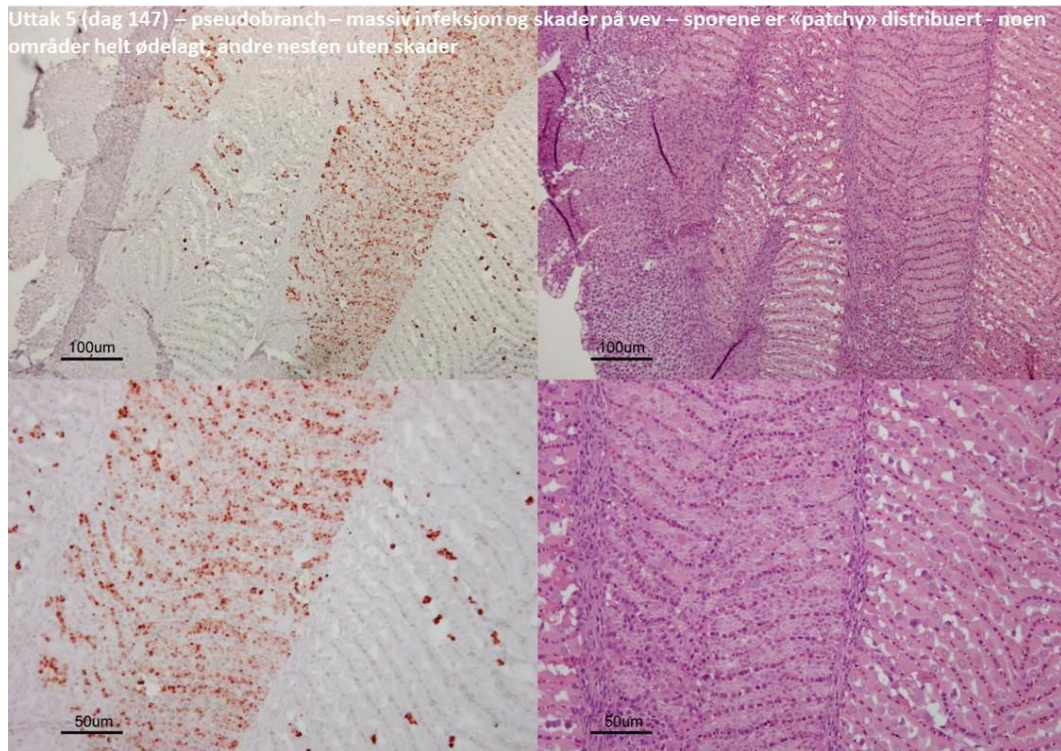
Figur 23, Bilder av gjeller vev farget med In-situ eller HE fra uttak 4 (89 dager i sjø, 11 november).



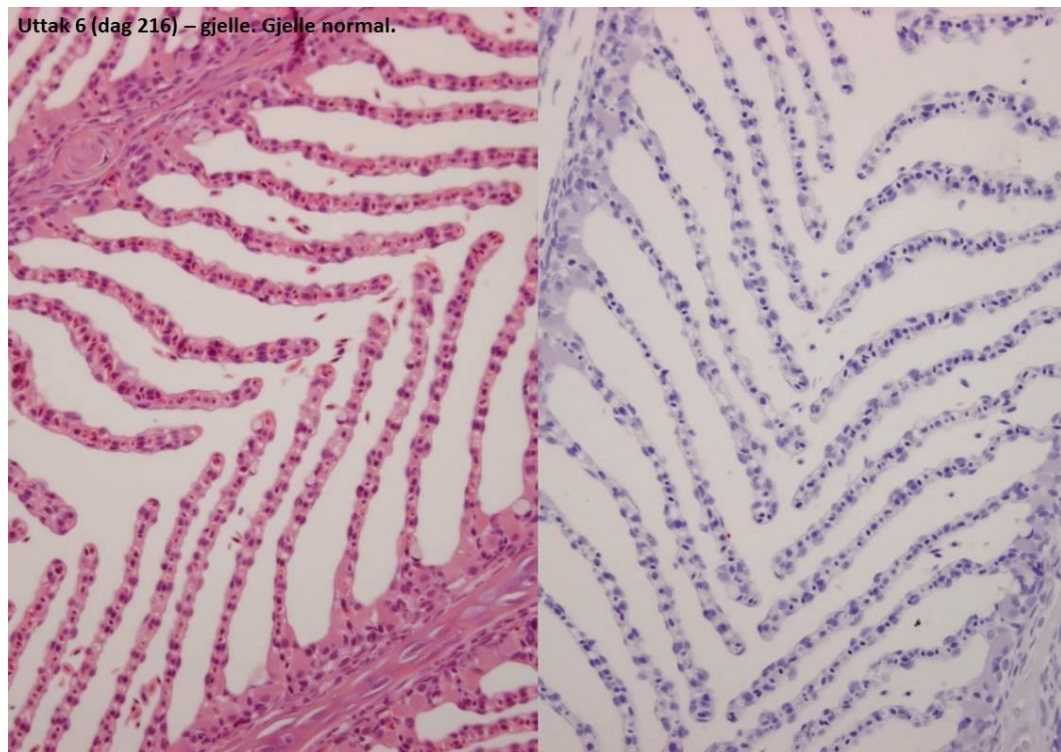
Figur 24, Bilder av pseudobranch vev farget med In-situ eller HE fra uttak 4 (89 dager i sjø, 11 november).



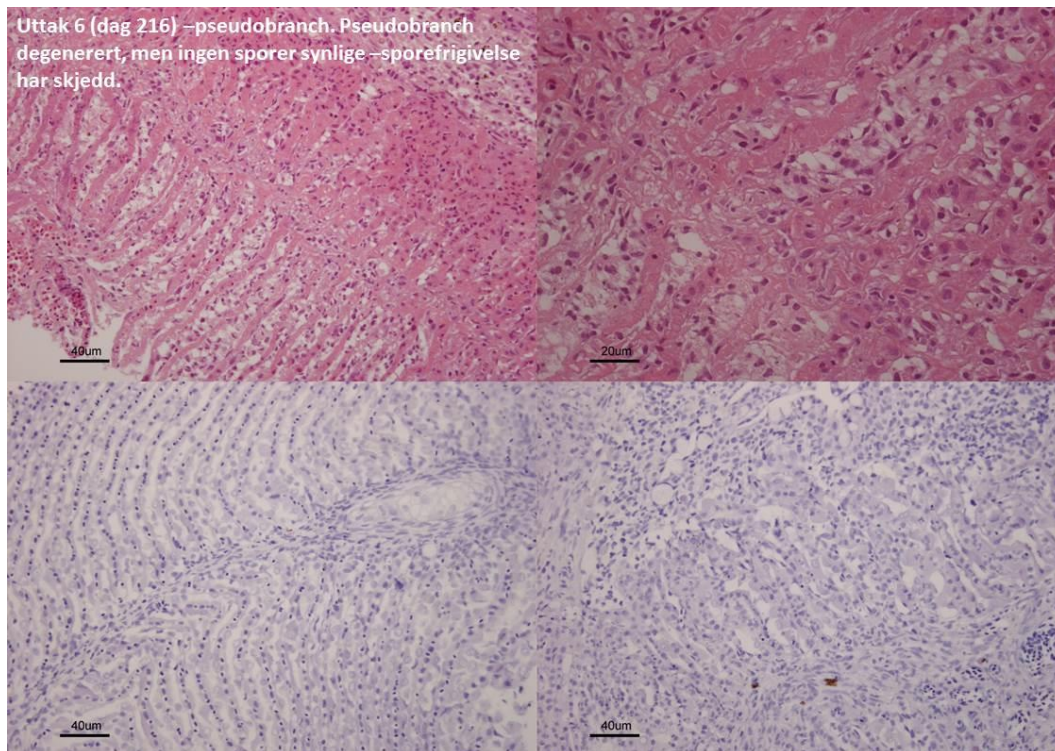
Figur 25, Bilder av gjeller vev farget med In-situ eller HE fra uttak 5 (147 dager i sjø, 8 januar).



Figur 26, Bilder av pseudobranchie vev farget med In-situ eller HE fra uttak 5 (147 dager i sjø, 8 januar).



Figur 27, Bilder av gjeller vev farget med In-situ eller HE fra uttak 6 (216 dager i sjø, 18 mars). Ingen parasitter.



Figur 28, Bilder av pseudobranchie vev farget med In-situ eller HE fra uttak 6 (216 dager i sjø, 18 mars). Ingen parasitter å se, men vevsforandringer og tegn på heling. Formodentlig fra skader etter sporefrigjøring.

Konklusjoner

Tropisme

- In situ og qPCR sammen er en god metode for i detalj å studere vevstropisme hos *P. pseudobranchicola*. Resultatene viser at pseudobranchien er det viktigste målorganet for *P. pseudobranchicola*.
- *P. pseudobranchicola* er påvist i blodbanene (karveggene) med *in situ* og forekomst av slike blodstadier forklarer trolig at blodprøver er positive ved qPCR.
- Det er mulig at det ikke er nødvendig med et massivt smittepress for at fisken skal utvikle parvicapsulose, da parasitten er ulikt distribuert (enkelte pseudobranch avdelinger affisert, andre ikke). Dette mønsteret kan tyde på lokal proliferasjon av parasitten. Hvis det er slik, kan det bety at parvicapsulose kan oppstå som følge av redusert almenntilstand hos fisken, som kan tillate mer omfattende parasittproliferasjon. Modne sporer ble sett dag 106-147, men tilsynelatende umodne sporer forekom dag 89.
- En celleulær immunrespons i pseudobranchiene syntes å sammenfalle med forekomst av modne sporer.

- Etter primærinfeksjonen var mengde av *P. pseudobranchicola* fallende frem mot slaktetidspunkt, og der er ingen påviselig reinfeksjon andre år i sjø. Dette studiet viser at, i fravær av andre patogener, vil laks kunne produseres i Finnmark uten betydelige tap forårsaket av *P. pseudobranchicola* på tross av et betydelig smittepress med denne parasitten. Fisk som blir smittet, synes å utvikle en immunitet mot ny infeksjon med parasitten påfølgende smitteperiode andre år i sjø. Etter en kort periode med tenacibaculose i september var der en periode med økt dødelighet om vinteren (november-januar). Laksen ble testet for en rekke agens uten at det var mulig å påvise andre agens enn *P. pseudobranchicola* i denne perioden, og dødeligheten knyttet derfor til parvicapsulose. Innslaget av klinisk *P. pseudobranchicola* affisert fisk var likevel lavt i forhold til mange andre anlegg i regionen.

Litteratur

Andersen L., Bratland A., Hodneland K., Nylund A. (2007). Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Arch Virol 152(10):1871-83.

Markussen T, Agusti C, Karlsbakk E, Nylund A, Brevik Ø, Hansen H (2015). Detection of the myxosporean parasite *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using *in situ* hybridization (ISH). Parasit Vectors. 15;8:105. doi: 10.1186/s13071-015-0718-4.

Nylund A, Karlsbakk E, Saether PA, Koren C, Larsen T, Nielsen BD, Broderud AE, Høstlund C, Fjellsøy KR, Lervik K, Rosnes L (2005). *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporea) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63:197-204.

Olsvik, P. A., K. K. Lie, A. E. O. Jordal, T. O. Nilsen, and I. Hordvik. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *Bmc Mol Biol* 17: 6 – 21

Plarre H, Devold M, Fridell F, Nylund A (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids collected in Western Norway. *Dis Aquat Org.* 66: 71 – 79

Repstad O (2011). Kartlegging av patogendynamikk hos oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) med diagnosen pankreassykdom (PD) (2011). Master i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Staveland Ø (2010). Prevalence and densities of *Paranucleospora theridion* in wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmon trutta* L.) in selected areas in Western Norway. Master thesis, University of Bergen, Norway.

Watanabe K, Karlsen M, Devold M, Isdal E, Litlabø A, Nylund A (2006) Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Dis Aquat Org.* 70: 183 – 192.

Aktivitet 3: Måle effekten av smoltstørrelse og sjøvannstilvenning på utvikling av parvicapsulose.

Ansvarlig for aktivitet: Are Nylund (UiB)

Analyser: Heidrun Plarre (UiB)

Introduksjon

Data fra overvåkning av høstusett viser et høyt smittepress i sjø fra august til oktober. Erfaring fra felt viser at høstutsett av 0-åring i denne perioden ofte resulterer i alvorlige utbrudd av parvicapsulose.

Problemstilling og formål

Målet med arbeidspakken er å se på om størrelse og sjøvannstilvenning av smolt ved utsett av 0-åringer kan påvirke mottakeligheten for *P. pseudobranchicola* og dermed ha en effekt når det gjelder utbrudd av parvicapsulose.

Gjennomføring

Totalt 4 sjøvannstilvendte høstsmolt grupper ble fulgt, 2 grupper med snitt størrelse på hhv. 82 og 83 gram, samt to grupper med snittstørrelse på 119 og 130 gram. Smolten ble overført til sjø i perioden 3-11 november. Genetikk, tidspunkt for utsett, og lokalitet var så identiske som mulig. Lokaliteten som ble valgt hadde kjent historikk mht parvicapsulose (tilbakevendende problem).

Null uttak gjøres på smoltanlegget av alle gruppene. Fiskens smittestatus ble også sjekket (PRV, PMCV, ILAv, IPNv, Flavo, Yersinia, Costia).

I sjø ble fisken prøvetatt 2, 4 og 6 uker etter utsett, videre uttak med større intervall. Mengde *P. pseudobranchicola* ble overvåket med qPCR på alle uttak. Det ble tatt prøver av 28 fisk pr uttak; vev fra hjerte og pseudobrank ble analysert for tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola* vha. qPCR.

Beskrivelse av oppdretts/sampling lokaliteter/biotoper

Anlegget er lokalisert i Korsfjorden i Finnmark og har de siste årene hatt et tilbakevendende problem med sykdom assosiert med *P. pseudobranchicola*.

Prøveuttak og prøvemateriale

Tabell 3 gir en oversikt over smolt satt ut i anlegget. Alle fire merdene ble fulgt i forsøksperioden.

Tabell. 3, Oversikt over smolt (antall og vekt) ved sjøsetting.

Smolt kar	Merd i sjøanlegg	Snittvekt ved sjøsetting	Antall sjøsatt	Dato for utsett
101	2206	83	197158	10.11.2014
104	2203	82	102099	06.11.2014
301	2201	119	158138	05.11.2014
302	2204	130	188084	03.11.2014

Følgende uttak ble tatt av laks tas for analyse med henblikk på tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola*: 1) 20.10.2014, 2) 19.11.2014, 3) 03.12.2014, 4) 17.12.2014, 5) 14.01.2015, 6) 11.02.2015, 7) 12.03.2015, 8) 08.04.2015 og 9) 06.05.2015). Det ble tatt ut pseudobranchie, gjeller, nyre og hjerte fra alle fisker, men hovedfokus for qPCR analyser omfattet pseudobranchie og hjerte.

Analyser/Protokoller

RNAet ekstrahert fra pseudobranchie og hjerte ble benyttet til qPCR påvisning av *P. pseudobranchicola* (Nylund et al 2011) og et utvalg av andre agens; Salmonid alfavirus, SAV (Andersen et al 2007), Piscine reovirus, PRV (Tabell 2), Infeksiøs lakseanemi virus, ISAV (Plarre et al 2005), Infeksiøs pankreasnekrose virus, IPNV (Watanabe et al 2006). Elongeringsfaktor 1 alpha (EF1A) ble benyttet som intern kontroll (Olsvik et al. 2005). Hver kjøring bestod av 45 sykluser og prøvene ble ansett som positive når fluorescenssignalet oversteg en gitt terskel (0,1) for det enkelte assayet.

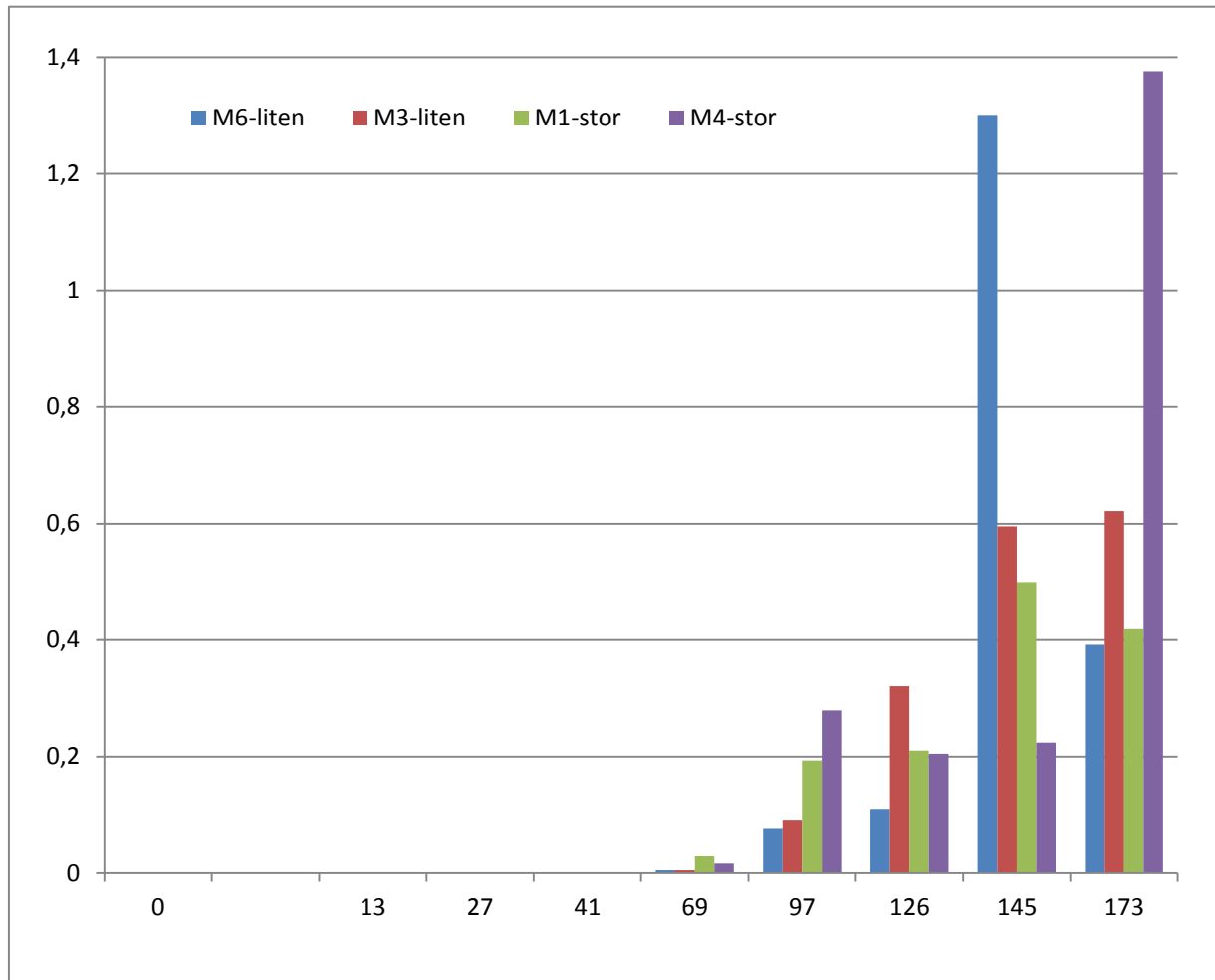
Tabell 4, qPCR assay for påvisning av Piscine reovirus, PRV, hvor assayet er rettet mot segmentet M2 (cf. Oddvar Repstad, Masteroppgave 2011).

Primer / Probe	Sekvens
PRV-M2-F	5` - CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA -3`
PRV-M2-probe	FAM 5` - CTG GCT CAA CTC TC -3`MGB
PRV-M2-R	5` - GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG - 3`

Resultater

All fisken var negativ for *P. pseudobranchicola* i ferskvann (20.10.2014) og ved første uttak i sjø (19.11.2014). Ved andre uttak, 27 dager etter sjøsetting (03.12.2014), var den totale prevalens 5,0 % og

denne økte til 100 % i alle merdene (90 % i merd 3) etter 41 dager (17.12.2014). Prevalensen forble så 100 % gjennom resten av forsøksperioden. Det foreligger ingen klare forskjeller ved sjøsetting av liten og stor smolt med hen blick på mengde (densitet) av *P. pseudobranchicola* (figur 29) i pseudobranch-prøvene, målt som parasitt rRNA. Det er en forholdsvis jevn økning i densitet av parasitten frem mot 145 dager etter sjøsetting. All smolten i dette forsøket var smittet med både Piscine orthoreovirus (PRV) og *Yersinia ruckeri* før sjøsetting. Det er usikkert om disse patogener har påvirket fiskens mottakelighet for *P. pseudobranchicola*. Mengden *Y. ruckeri* var relativt høy frem mot dag 41 etter sjøsetting.



Figur 29, MNE (Mean normalized expression) av *P. pseudobranchicola* i pseudobranchie hos laks i forsøksperioden. Merdene M3 og M6 fisk liten smolt mens merdene M1 og M4 fikk stor smolt. X-akse er dager etter sjøsetting.

Konklusjoner

Dette studiet viser ingen klare forskjeller i mottakelighet for *P. pseudobranchicola* ved sjøsetting av stor (snittvekt på 124,5 gr.) og liten laksesmolt (snitt vekt på 82,5 gr.). På tidspunktet for forsøket ble størrelsesforskjell på tilgjengelig smolt maksimert (størrelsesforskjell på 34%). Begge populasjonene var imidlertid smittet med både PRV og *Y. ruckeri* noe som muligens kan ha påvirket mottakeligheten for *P. pseudobranchicola* og dermed påvirket resultatet i forsøket. Dette forsøket viser også at infektive sporer er til stede i sjøen så sent som i desember. Ved dag 145 og 173 er det to grupper som skille seg ut med henblikk på densitet (MNE), -henholdsvis merd 6 (liten fisk) og merd 4 (stor fisk). Forklaringen på dette avviket ser ut til å skyldes variasjon i uttrykking av elongeringsfaktoren noe som kan være forårsaket av ulik nedbrytningshastighet av mRNA i laksecellene i forhold til nedbryting av rRNA i parasitten. En høstsmolt på 124,5 gr. er liten i sammenligning til postsmolt som er tilgjengelige i dag (400-500 gr.). Et forsøk der man øker størrelsesforskjellene mellom gruppene, en 500 gr. postsmolt mot en 100 gr. «standard» høstsmolt (hvor begge er patogenfrie ved start), bør gjennomføres før en kan med sikkerhet avslå smoltstørrelse/postsmolt som et profylaktisk tiltak mot *P. pseudobranchicola*.

Referanser

Andersen L., Bratland A., Hodneland K., Nylund A. (2007). Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Arch Virol 152(10):1871-83.

Olsvik, P. A., K. K. Lie, A. E. O. Jordal, T. O. Nilsen, and I. Hordvik. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. BMC Mol Biol 17: 6 – 21

Plarre H, Devold M, Fridell F, Nylund A (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids collected in Western Norway. Dis Aquat Org. 66: 71 – 79

Repstad O (2011). Kartlegging av patogendynamikk hos oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) med diagnosen pankreassykdom (PD) (2011). Master i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Watanabe K, Karlsen M, Devold M, Isdal E, Litlabø A, Nylund A (2006) Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). Dis Aquat Org. 70: 183 – 192.

Aktivitet 4: Utvikle en filtreringsmetode for deteksjon av *P. pseudobranchicola*-sporer i sjøvann

Ansvarlig for aktivitet: Øyvind Brevik (Cermaq Norway)

Laboratoriarbeid: Øyvind Brevik (Cermaq Norway) og Heidrun Plarre (UiB)

Feltarbeid: Øyvind Brevik (Cermaq Norway), Egil Karlsbakk (HI), Haakon Hansen (VI)

Introduksjon

Tidligere har måling av *P. pseudobranchicola* smittepress/smittestoff kun vært mulig å gjøre ved analyse av infeksjonsstatus på nylig sjøsatt smolt. Ved å bruke denne tilnærmingen er det vist at smittevinduet er fra slutten av juni til ut oktober. Da det vanligvis ikke settes ut fisk senere enn oktober i Finnmark/Troms har det ikke vært mulig å si noe om smittepress utover vinteren. Smittepresset er på sitt største i august-september og smolt satt ut i dette tidsrommet blir smittet med parasitten raskt.

En metode for direkte påvisning av parasitten i sjøvann vil kunne brukes til definere smittevinduet utover den perioden det settes ut smolt i Finnmark og Troms. Ved å kombinere filtrering av vann og semikvantitativ måling av actinosporer i vann med qPCR vil smittepresset som fisken utsettes for beskrives mer i detalj. Denne kunnskapen kan brukes direkte inn mot produksjon; planlegging av utsett, lokalitetsplassering og gjennomføring av profylaktiske tiltak.

Problemstilling og formål

Målet med aktiviteten var finne en metode for å detektere sporer av parasitten direkte i sjøvann, ved å gjøre pilotstudier på flere filtreringsmetoder.

Gjennomføring

Vannprøver ble samlet inn i felt nært lokaliteter med parvicapsulose historikk i Finnmark. Det ble samlet inn vannprøver fra forskjellige dyp 0-15 m hvor en antar at sporer er til stede. Alle prøvene ble samlet inn i perioden (august-september) det er forventet å finne actinosporer frigitt fra børstemakk i Finnmark. Vannprøver fra akvarieforsøk (aktivitet 1, børstemakk fra forskjellige biotoper ble holdt i akvarier i 24-48 timer før vann fra akvariene ble prøve tatt for å undersøkes for actinosporer) ble også filtrert med bruk av filtreringsmetode 1 (beskrevet i protokoller i teksten under).

Beskrivelse av sampling lokaliteter og prøvemateriale

2013, 10-12 september

Sampling ble gjort nært en lokalitet med gjentakende parvicapsulose-problemer. Anlegget ligger på nordvestsida av Kvalfjorden nær Hammerfest, se figur 30. Anlegget inneholdt ikke fisk ved prøvetakning. Fjorden er grunn (mesteparten <70 m) med ferskvannstilsig fra noen få mindre elver og bekker. Vannprøvene ble samlet inn ved bruk av planktonhåv. Det ble tatt totalt 6 vannprøver, se tabell 5.

Tabell 5. Oversikt over vannprøver tatt ved lokalitet Kvalfjorden 10-12 september 2013.

Prøve	Dybde	Sted
p1	0-1m	Fjære
p2	0-1m	Fjære
p3	0-1m	Åpen farvann
p4	5	Åpen farvann
p5	9	Åpen farvann
p6	0-1m	Langs anlegg



Figur 30, Viser hvor vannprøvene ble samlet i forhold til lokaliteten.

2014,04-05 september

Lokalitet beliggende i Slettnesfjorden i Hammerfest kommune, Finnmark. Lokaliteten har historikk med parvicapsuloseutfordringer. Anlegget ligger i en liten sidefjord til Sørøysundet, figur 31. Lokaliteten er strømuttsatt med tidevannsstrømmer. På tidspunktet for prøvetaking var det satt ut smolt 14 dager før vannprøver ble samlet inn. Det ble samlet 6 vannprøver fra fjorden ved anlegget, se figur 31 og tabell 6 for detaljer. Vannprøvene ble samlet inn ved bruk av planktonhåv.

Tabell 6. Oversikt over vannprøver tatt ved lokalitet Slettnesfjorden 04-05 september 2014.

Prøve	Dybde	Sted
Site1 trekk A	1-3	Langs land, nært elveutløp
Site 1 trekk B	1-3	Langs land, nært elveutløp
Site 1 trekk C	1-3	Langs land, nært elveutløp
Mørkedalsbukta	1-3	Langs land, langgrunn bukt m. sandbunn
Fjord	1-3	Åpen farvann
Ferskvann, v. munning av elv	1-3	I elven stående i vannstrømmen



Figur 31, Viser hvor de 6 vannprøvene ble samlet inn. 4 forskjellige steder (ikke ved anlegg).

2015 17-20 august

Lokaliteten ligger på sørsida i Korsfjorden, Altakommune i Finnmark. Anlegget har historiske utfordringer med parvicapsulose. Det var ikke fisk på lokaliteten under prøvetakningen. Det ble samlet inn 6 vannprøver ved bruk av planktonhåv, se figur 32 og tabell 7.

Tabell 7. Oversikt over vannprøver tatt ved lokaliteten i Korsfjorden 17-20 august 2015.

Prøve	Dybde	Sted
P1 trekk A	4,5	Mellom land og anlegg
P2 trekk B	6,5	Mellom land og anlegg
P3 trekk C	5,5	Mellom land og anlegg
P4 Elveos Boten	1-3m	Over sandbunn, nært elveos
P5 Langs land Botnen	1-3m	Langs land, steinbunn
P6 Sandbank Revet	1-3m	Over sandbunn, strømutsett



Figur 32 Viser hvor de 6 vannprøvene ble samlet inn i forhold til lokaliteten.

Prøvetaknings- og analyseprotokoller

To metoder for filtrering ble testet ut i prosjektet:

1. Pre-filtrering igjennom planktonduk 100 og 50 μm , med sluttfiltrering i et Millipore vakuum-system (47mm filter) og ved bruk av en vakuumpumpe (VWR-100C) som sugde vannet gjennom elektropositive filter med porestørrelse 0,22 μm (1MDS).
Vann ble samlet inn i 1 liters glassflasker og pre-filtrert igjennom et PVC-rør med 100 μm og 50 μm planktondukfilter. Det pre-filtrerte vannet ble så filtrert igjennom elektropositive filter med porestørrelse 0,22 μm (1MDS). Filteret ble lagt opp ned i en 50mm petriskål med 1,4ml lysisbuffer (E.Z.N.A total RNA kit from OmegaBioTek). Petriskålene ble så ristet på vippebrett i 10 minutter. To alikvoter (à 350 μl) lysisbuffer ble fordelt i rør og tilsatt 350 μl 70% EtOH, vortexet og frosset. Prøvene ble på et senere tidspunkt tint og RNA ble ekstrahert med E.Z.N.A total RNA kit (OmegaBioTek) med standard protokoll som er oppgitt fra produsent (E.Z.N.A). Fra 2014 ble det også benyttet en ekstern kontroll bestående av hele bakterieceller av *Halobacterium salinarum* for å kontrollere graden av inhibisjon. *Halobacterium salinarum* er en ekstremofil bakterie som kun finnes i saltsjøer med svært høye konsentrasjoner av salt og vil derfor ikke være mulig å finne naturlig i prøvene.
2. Bruk av planktonhåv (KC-Denmark) med 25 cm diameter åpning, 5 μm maskestørrelse, 15 cm lang og 35cm³ volum. Planktonhåven ble slept etter båt i 3,5km/t i 500m. Dybden på håven ble justert ved å tyngge den ned med lodd og overvåket med dybdemåler. Teoretisk mengde filtrert vann pr. prøvetakning ble beregnet til ca. hundre liter. Etter slepet ble håven hengt opp slik at resterende vann kunne renne igjennom planktonduken. Duken ble så spylt med ferskvann for å samle alt plankton i bunnen ved tappeventilen. Filtratet ble deretter tappet over i 50 ml rør. Totalt ble det samlet 100-125 ml filtrat pr. slep/sampling. Dette ble så sluttfiltrert med Millipore vakuum-system med elektropositive filter (1MDS) og RNA-ekstraksjon (som beskrevet over) eller med nitrocellulosefilter på 0,22 μm (SigmaAldrich) og påfølgende DNA-ekstraksjon. Følgende protokoll ble brukt for ekstraksjon av DNA fra nitrocellulose filter: Ekstern kontroll (*H. salinarum*) ble tilsatt filteret før det ble brettet og lagt i et 2 ml eppendorf-rør. 1 ml med aceton ble tilsatt for å løse opp filteret, røret ble vortexet til filteret var løst opp, deretter sentrifugert ved 12 000 rpm i 15 min og supernatanten ble fjernet. Steget ble repetert to ganger med noen forandringer (sentrifugering ved 9500 rpm x 5 min og 0,5ml aceton i siste repetisjon). Pelleten ble vasket med 75% sprit før sentrifugering (9500 rpm x 5 min), supernatanten ble fjernet og pelleten ble lufttørket før den ble rensset med Qiagen DNeasy kit etter produsentens protokoll med følgende forandringer: 1 ekstra vask med AW2 buffer og dobbel eluering i 60 μl EA buffer.

RNA og DNA fra vannprøvene ble analysert for tilstedeværelse av forskjellige agens ved bruk av qPCR; *P. pseudobranchicola* (S. Nylund et. al 2011), *H. salinarum* (L. Andersen et. al 2010), *Paramoeba spp.* (Repstad, masteroppgave ved UiB 2011), *P. perurans* (S. Nylund et. al 2011), og *Branchiomonas cysticola* (Repstad, masteroppgave ved UiB 2011).

Resultater

2013

I vannprøvene fra pilotforsøket i felt med planktonhåv (KC-Denmark) ble det vist at det var mulig å detektere sporer med *P. pseudobranchicola* ved bruk av planktonhåv og qPCR analyse. Dette ble utført slik som beskrevet i protokoll 2 for vannfiltrering. Det ble detektert små mengder RNA fra *P. pseudobranchicola* sporer i en prøve filtrert fra 100 liter vann fra 5 meters dybde.

Tabell 8. Oversikt over qPCR-resultat (presentert som Ct-verdier) fra de 6 vannprøvene tatt ved lokalitet i Kvalfjorden 2013, ND=ikke detektert

Prøve	Dybde	Sted	<i>P. pseudobranchicola</i>	<i>Paramoeba spp.</i>	<i>B. cysticola</i>
p1	0	Fjære	ND	28	40
p2	0	Fjære	ND	29	ND
p3	0	Åpen farvann	ND	27	ND
p4	5	Åpen farvann	35	31	ND
p5	9	Åpen farvann	ND	28	ND
p6	0	Langs anlegg	ND	30	ND

Fra vannprøver tatt fra akvarier hvor børstemakk fra forskjellige biotoper var holdt i 24-48 timer var det kun mulig å filtrere 200-700ml vann før filteret ble tettet av partikler. Dette ble utført slik beskrevet i protokoll 1 for vannfiltrering. Det ble ikke detektert *P. pseudobranchicola* arvestoff fra noen av akvariene /biotopene undersøkt. Det ble funnet positive prøver for amøber innen slekten *Paramoeba* og enkelte svake positive prøver for *B. cysticola*. Det ble ikke tilsatt ekstern kontroll i analysene fra 2013.

Tabell 9. Oversikt over qPCR-resultat (presentert som Ct verdier) fra vannprøver tatt fra de tolv akvariene med børstemark samplet ved lokaliteten i Kvalfjorden 2013, ND=ikke detektert

Filtrering av vann fra akvarium med:	<i>P. pseudobranchicola</i>	<i>Paramoeba spp.</i>	<i>B. cysticola</i>
Tidevannsone, blæretang, blåskjell og sand	ND	30	ND
Stein - <i>Spirorbis</i>	ND	29	ND
Sand, ruglbukt fra 4-8m	ND	28	ND
Sagtang - <i>Spirorbis</i> ruglbukt	ND	29	36
Blåskjell fra Kirkeneset	ND	30	ND
Sand 5,5m Kirkegårdsbukt	ND	31	37
Kjerringhår	ND	29	ND
Rugl	ND	31	ND
Tare stipus	ND	29	ND
Kjerringhår	ND	30	ND
Sagtang - <i>Spirorbis</i>	ND	30	ND
Rugl	ND	29	ND

2014

Det ble satt ut fisk på lokaliteten i Slettnesfjorden 15. august, denne testet positiv for *P. pseudobranchicola* ved første prøveuttak 04. september. Den 4. september ble det også tatt vannprøver fra området rundt oppdrettsanlegget (figur 31, tabell 6). Prøvene ble tatt slik som beskrevet i protokoll 2 for vannfiltrering. Alle 6 vannprøvene var negative for *P. pseudobranchicola*. Dette indikerer at sporene ikke var tilstede i detekterbare mengder i september i vannlagene, 1-3 m, hvor vannprøvene ble tatt. Det ble tilsatt ekstern kontroll (*H. salinarum*) og denne viste inhibisjon i vannprøvene som reduserte sensitiviteten på prøven opptil 10 ganger. Se tabell 10 for detaljer

Tabell 10. Oversikt over qPCR-resultat (presentert som Ct-verdier) fra de 6 vannprøvene tatt ved lokaliteten i Slettnesfjorden i 2014, ND=ikke detektert

Prøve	<i>P. pseudobranchicola</i>	<i>Paramoeba spp.</i>	<i>B. cysticola</i>	<i>H. salinarum</i>
Site1 trekk A	ND	ND	ND	30
Site 1 trekk B	ND	ND	ND	31
Site 1 trekk C	ND	ND	ND	28
Mørkedalsbuk	ND	ND	ND	30
Fjord	ND	ND	ND	28
Ferskvann fra elv	ND	ND	ND	28
SW kontroll med <i>H. sal</i>	ND	ND	ND	27
ND. kontroll Uten <i>H. sal</i>	ND	ND	ND	ND
FW Kontroll + <i>H. sal</i>	ND	ND	ND	24

Vannprøver fra akvariene viste stor grad av inhibisjon målt med ekstern kontroll (*H. salinarum*). Vannfiltreringen ble gjort slik beskrevet i protokoll 1. Graden av redusert sensitivitet varierte med 10-1000 ganger. *P. pseudobranchicola* ble ikke påvist i noen av prøvene fra de akvariene/biotopene undersøkt. Det ble funnet til dels store mengder amøber innen slekten *Paramoeba* (ikke *P. perurans*), spesielt fra sjøvann tatt fra fjæren ved lokaliteten i Kvalfjorden.

Tabell 11. Oversikt over qPCR-resultat (presentert som Ct verdier) fra vannprøver tatt fra 6 akvarier med børstemark samplet ved lokaliteten i Kvalfjorden og lokaliteten ved i Slettnesfjorden i 2014, ND=ikke detektert

Filtrering av vann fra akvarium med:	<i>P. pseudobranchicola</i>	<i>Paramoeba spp.</i>	<i>B. cysticola</i>	<i>H. salinarum</i>
Sagtang - <i>Spirorbis</i> fra lokalitet sørøysundet	ND	ND	ND	45
Sagtang – <i>Spirorbis</i> fra lokalitet nær Hammerfest	ND	ND	ND	ND
Rødalger, <i>Spirorbis</i> , lokalitet sørøysundet site 1	ND	19	ND	29
Klasemark, lokalitet sørøysundet site 1	ND	ND	ND	37
Stein- <i>Spirorbis</i> , lokalitet sørøysundet site 1	ND	19	ND	30
Neg. kontroll, sjøvann fra lokalitet nær Hammerfest	ND	12	ND	29
Rensekontroll	ND	ND	ND	ND
NTC	ND	ND	ND	ND
NTC	ND	ND	ND	ND

2015

Det ble tatt 6 vannprøver i Korsfjorden (figur 32), filtreringen ble gjort slik beskrevet i protokoll 2 for vannfiltrering og grad av inhibisjon ble målt med ekstern kontroll (*H. salinarum*). Resultater fra qPCR

assay mot *H. salinarum* (Andersen et al 2010) viste fullstendig inhibisjon, tabell 12. Ved å fortynne DNA 1:10 i vann ble inhibisjonen redusert. Alle filtrene (n=6) var negative for *P. pseudobranchicola* og positiv for *H. salinarum*. Graden av inhibisjon ble målt til 0-10 ganger nedsatt sensitivitet.

Vann (160-350 ml) fra de ti forskjellige akvariene ble filtrert direkte på nitrocellulosefilter og grad av inhibisjon ble målt til 0-1000 ganger nedsatt sensitivitet. Ingen av prøvene var positive for *P. pseudobranchicola* ved qPCR-analysen. Graden av inhibisjon var størst i akvarier som inneholdt tang.

Tabell 12. qPCR-test av graden inhibisjon i DNA fra filtrert sjøvann fra Korsfjorden 2015.

Prøve	<i>H. salinarum</i>	<i>H. salinarum</i>	<i>H. salinarum</i>
P2 6.5m	29	ND	ND
-Neg kont. + H.sal	16	17	16

Tabell 13. Oversikt over qPCR resultat (presentert i ct verdier) fra de 6 vannprøvene tatt ved lokalitetem i Korsfjorden 2015, ND=ikke detektert

Prøve	<i>H.salinarum</i>	<i>P. pseudobranchicola</i>
P1 4,5m	32	ND
P2 6,5m	29	ND
P3 5,5	28	ND
P4 1-3m	32	ND
P5 1-3m	29	ND
P6 1-3m	28	ND
Kontroll 3, Springvann	28	ND

Tabell 14. Oversikt over qPCR-resultat (presentert som Ct-verdier) fra vannprøver tatt fra de 6 akvariene med børstemark samplet ved lokalitet i Korsfjorden 2015, ND=ikke detektert

Filtrering av vann fra akvarium med:	<i>H. salinarum</i>	<i>P. pseudobranchicola</i>
Trekantmakk	31	ND
Sagtang – <i>Spirorbis</i> , Hesten	ND	ND
Stein - <i>Spirorbis</i> , Mikkelbuk	33	ND
J-makk	33	ND
Kjerringhår	36	ND
Kjerringhår	ND	ND
<i>Hydroides</i>	28	ND
Kjerringhår	ND	ND
Kontroll	27	ND
Kjerringhår	ND	ND
Trekanmakk	42	ND
<i>Hydroides</i>	30	ND

Konklusjon

Deteksjon av sporer eller arvestoff (DNA/RNA) fra *P. pseudobranchicola* fra filtrert sjøvann er mulig. Av de metodene som ble utprøvd var det størst suksess med planktonhåv med 5µm maskestørrelse. Dette oppsettet er mobilt og har potensiale til å filtrere store mengder vann når håven dras etter båt ved lav hastighet. Metoden kan utbedres ved å ha en strømmåler både inne i og utenfor håven for å bedre kunne kalkulere mengde filtrert vann. Pre-filtrering av vann med planktonduk i PVC-rør gjorde at totalvolumet av filtrert vann ble begrenset til filtrering av maksimalt 1,5l sjøvann. En gjennomsnittlig prøve ga et filtrert volum på 600-700 ml.

Den største risikoen ved metoder som skal påvise eDNA/eRNA (eller sporer) ved filtrering av sjøvann er inhibitorer og risikoen for falske negative. Det er derfor en absolutt nødvendighet å bruke eksterne eller interne kontroller for å overvåke dette. Vi hadde god erfaring med bruk av arkebakterien *H. salinarum* og qPCR-assayet publisert av Andersen *et al.* (2010). Bruk av nitrocellulose-filter og renseprotokollen utviklet i prosjektet (filtreringsmetode 2) med påfølgende 1:10 fortykning av templatet, ga de beste og mest stabile resultater. Våre resultater viser at det er mulig å detektere arvestoff fra *P. pseudobranchicola* i sjøvann ved filtrere det igjennom en planktonhåv med 5µm maskestørrelse. Ved å kombinere denne metoden med sluttfiltrering i nitrocellulosefilter med tilhørende DNA-/RNA-ekstraksjonsprotokoll, ekstern/intern kontroll og 1:10 fortykning av templat, har vi en metode som vil kunne fungere i felt samt gi sikre svar på tilstedeværelse av parasittens arvestoff i sjøvann ved forskjellige dyp.

Filtrering av vann fra akvarier med tang gir svært mye inhibisjon og dette er vist å komme fra sukkerstoffer som tangen frigjør i vannet. Dette vanskeliggjorde bruken av akvarier for noen biotoper.

Vår konklusjon er at vi har en metode for filtrering og deteksjon av *P.pseudobranchicola* sporer i sjøvann som fungerer, men denne må verifiseres i felt. De feltundersøkelsene vi gjennomførte indikerte at det er svært få, færre en 1 pr. 100l sjøvann på de dypene vi undersøkte.

Referanser

Nylund S, Andersen L, Sævareid I, Plarre H and others (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. Dis Aquat Org 94:41-57

Andersen, L., Hodneland, K. and Nylund, A. (2010). No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Virology Journal, 7(1): 1-14, doi 10.1186/1743-422X-7-198.

Repstad O (2011). Kartlegging av patogendynamikk hos oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) med diagnosen pankreassykdom (PD) (2011). Master i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Aktivitet 5: Feltforsøk med skjørt som tiltak mot infeksjon med *P. pseudobranchicola*.

Denne aktiviteten er gjennomført to ganger, dvs i 2013 ved bruk av luseskjørt og i 2016-2017 ved bruk av PVC-duk.

Introduksjon

Resultater fra tidligere arbeid viser at infeksjon med *P. pseudobranchicola* kan detekteres i laks satt ut i Troms allerede fra slutten av juni og at smittepresset øker utover høsten. Det antas at sporene som smitter fisken flyter fritt i de øvre vannmassene, og prosjektgruppen ønsket derfor å undersøke hvilken effekt en presenning kunne ha på helsestatus. Det er her tenkt at presenningen kan hindre vannmassene i de øverste meterne å komme i direkte kontakt med fisken og på den måten redusere smittepress av *P. pseudobranchicola* som en antar er hovedårsaken til utbrudd av parvicapsulose.

Målet var å teste om bruk av presenningen kunne hindre vannmassene i de øverste meterne å komme i direkte kontakt med fisken og på den måten redusere smittepress av *P. pseudobranchicola*.

Beskrivelse av materialet og metodikk for forsøket gjennomført i 2013

I 2013 ble skjørt testet ut på en lokalitet med nullåring hvor lokaliteten var rigget med presenning før utsett. På lokaliteten var en av merdene utstyrt med Calanus-luseskjørt som i utgangspunktet var produsert for å hindre påslaget av lakselus i merd. I løpet av produksjon ble det registrert forskjeller i prevalens og dødelighet mellom de ulike merdene på lokaliteten. Måling av intensitet og prevalens av *P. pseudobranchicola* i fisken ble utført med qPCR analyser på prøver av pseudobrankier. Hvert prøveuttak bestod av 30 fisk for å sikre statistisk signifikans, intervall var hver 14 dag, fra kontroll og forsøksmerd ut oktober, deretter ble det tatt ut 30 fisk i måneden ut året 2013.

Følgende uttak av laks ble tatt for analyse med henblikk på tilstedeværelse av *P. pseudobranchicola*: 1) 02.08.2013, 2) 18.08.2013, 3) 16.09.2013, 4) 27.09.2013, 5) 11.10.2013, 6) 25.10.2013, 7) 11.11.2013 og 8) 10.12.2013. Det tas 30 fisk fra hver av de 2 gruppene. Totalt 480 prøver.

RNA ble ekstrahert fra pseudobrankien og benyttet til qPCR påvisning av *P. pseudobranchicola* (Nylund et al 2011). Elongeringsfaktor 1 alpha (EF1A) ble benyttet som intern kontroll (Olsvik et al. 2005). Hver kjøring bestod av 45 sykluser og prøvene ble ansett som positive når fluorescenssignalet oversteg en gitt terskel (0,1) for det enkelte assayet.

Resultater fra forsøket gjennomført i 2013

Prevalens av *P. pseudobranchicola* var 100 % ved alle uttak gjennom hele perioden i sjøvann. Det ble ikke observert forskjell i påslag i merdene med og uten luse-skjørt.

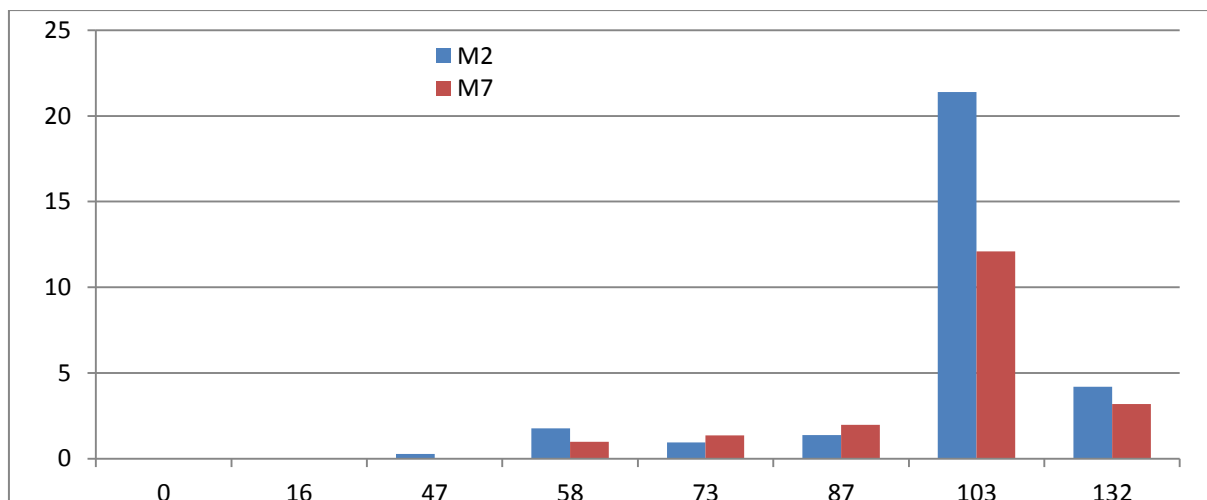


Figure 33, MNE (Mean Normalized Expression) verdi for 30 laks ved de respektive uttak etter usett. Laksen i begge merdene var negative ved utsett-tidspunktet (dag 0). Kun laks fra merden med skjørt (merd 2) ble testet ved dagene 16 og 47. Merd 7 var uten skjørt i forsøksperioden. (X-akse er dager etter sjøsetting).

Prosjektbakgrunn for forsøket gjennomført i 2016-2017

Resultater fra forsøket som ble kjørt i 2013 viste at det ikke ble målt en effekt på infeksjons intensitet og prevalens av *P. pseudobranchicola* ved bruk av «*calanus luseskjørt*». Dette produktet har en lysåpning på 300 µm, og det er derfor mulig at parasittsporen (actinosporen), som antas å være 10-30 µm, kan ha passert igjennom duken. Det ble følgelig bestemt av styringsgruppen og FHF at aktiviteten skulle repeteres i 2016 med en tett PVC-duk som er 6 meter dyp.

Beskrivelse av materialet og metodikk for forsøket gjennomført i 2016-2017

En lokalitet med nullåring utsett i september ble rigget med PVC-duk på forsøksmerden og oksygenmåler på kontroll og forsøksmerd. Fisk fra samme brønnbåttransport ble satt ut i to merder (Kontroll og merd med PVC-duk. Lokaliteten ligger i Loppa i Finnmark,

Tabell 15, bakgrunnsdata for de to merdene som ble fulgt, merd 8 med PVC-duk og merd 9 uten PVC-duk

Mær nr.	8	9
Satt ut	4.10.16	4.10.16
SF anlegg	Silver Seed	Silver Seed
Vaksine	AJm6	AJm6
Dødelighet 1. 30 dager	0,27	0,42
Akkumulert dødelighet	1,67	2,13
Dødelighet april, %	0,25	0,39
Ant. fisk per 25.4.	98 547	100 564

Målet var å teste om bruk av tett PVC-duk kunne hindre vannmassene i de øverste meterne å komme i direkte kontakt med fisken og på den måten redusere smittepress av *P. pseudobranchicola*.

Det ble gjennomført en prøvetaking av fisk (30 fisk pr merd) ukentlig de første fire ukene og deretter ble fisken tatt opp med et månedlig uttak frem til april 2017 (Tabell 16). Målinger av prevalens og tetthet av *P. pseudobranchicola* i fisken ble utført med qPCR analyser på prøver av pseudobranchier (gjeller og hjertet ble inkludert i ett uttak).

Table 16, Oversikt over uttak av laks fra de to merdene. V-L = gjennomsnittlig vekt og lengde (ikke registrert i de tre siste uttakene).

<i>Merd</i>	11.10. 2016	18.10. 2016	26.10. 2016	01.11. 2016	06.12. 2016	02.01. 2017	06.02. 2017	06.03. 2017	10.04. 2017
<i>PVC-duk</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>V - L</i>	77,2-18,5	80,2-17,7	101,1-19,1	119,6-20,1	204,8-23,3	272,3-26,1	-	-	-
<i>Kontroll</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>V - L</i>	69,3-17,1	83,0-17,8	93,8-19,0	151,3-20,2	192,1-23,5	228,9-24,8	-	-	-
<i>Totalt</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60

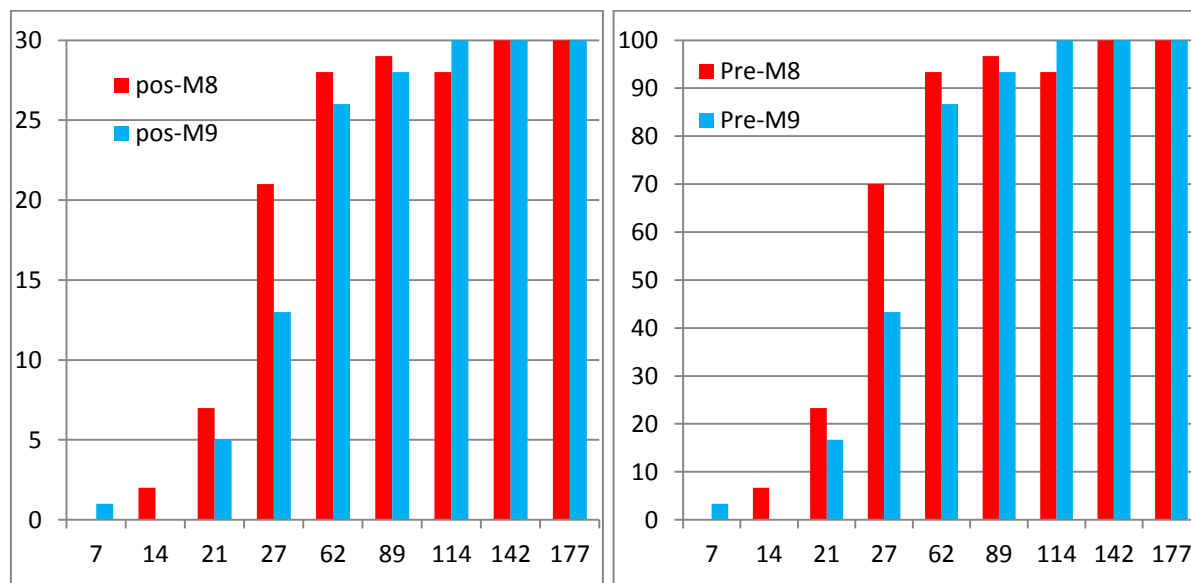
Sykdomshistorikken basert på rutinemessige påvisningene på anlegget igjennom forsøksperioden viste: Påvisning av PRV i 6/10 fisk (Ct ca 30), PMCV i 6/10 fisk (ct 34-36) hvorav en fisk hadde mye virus (Ct 18). Histologi viste betennelse i pseudobranchier forenlig med parvicapsulose på 5/5 samt tegn til gjellepox på 1/5 fisk. Ingen av disse rutinemessige påvisningene ble gjort på fisk fra forsøksmerdene.

NB: Ingen fisk, inkludert i dette studiet, var positive for SGP virus med qPCR analyser.

RNA ble ekstrahert fra pseudobranchien og benyttet til qPCR påvisning av *P. pseudobranchicola* (Nylund et al 2011). Elongeringsfaktor 1 alpha (EF1A) ble benyttet som intern kontroll (Olsvik et al. 2005). Hver kjøring bestod av 45 sykluser og prøvene ble ansett som positive når fluorescenssignalet oversteg en gitt terskel (0,1) for det enkelte assayet.

Resultater fra forsøket gjennomført i 2016-2017

Det ble observert en gradvis økning i antall positive individer fra usett og frem til dag 114 etter usett (Figur 34). Det var ingen signifikant forskjell mellom merd med «luseduk» og kontroll merd.



Antall positive individer.

Prevalens av *P. pseudobranchicola*.

Figure 34, Figuren viser antall individer positive for *P. pseudobranchicola* og den resulterende prevalens i studieperioden. Merd M8 er med luseduk og Merd M9 er kontroll.

Belastningen (tetthet) av *P. pseudobranchicola* økte i studieperioden, men var forholdsvis lav i forhold til det en kan observere i forbindelse med massive utbrudd (Figur 35). Ingen signifikant forskjell i belastning hos laks i kontroll merd versus merd med PVC-duk.

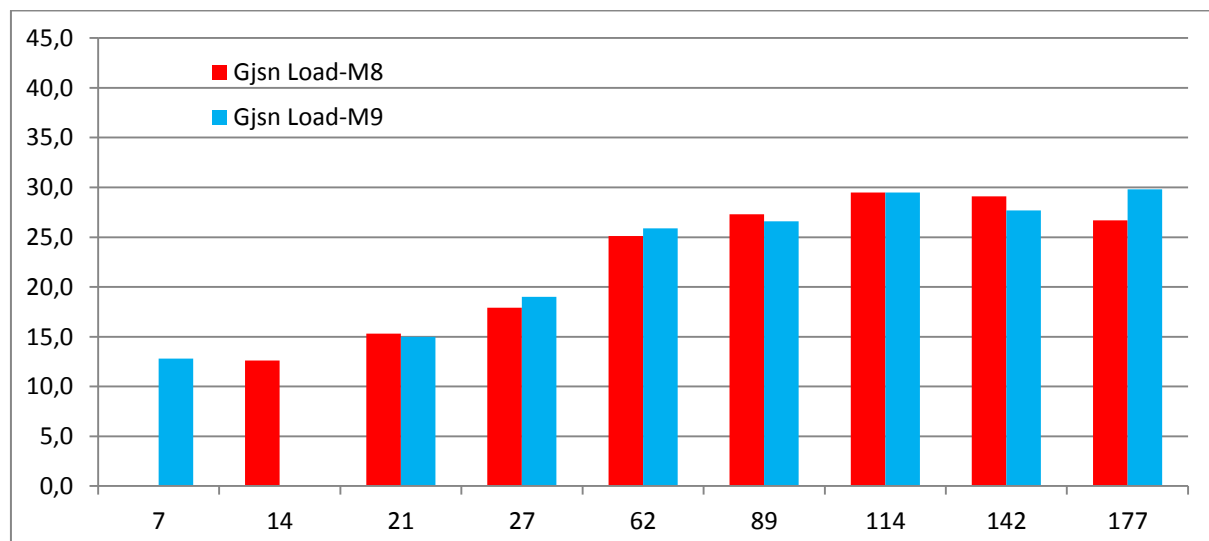


Figure 35, Belastning med *P. pseudobranchicola*. Merd M8 er med luseduk og Merd M9 er kontroll.

***P. pseudobranchicola* i gjeller og hjerte**

Parasitten ble påvist i både hjerte og gjeller hos individer med positive pseudobranchier, men tettheten av parasitten var betydelig lavere i disse vevene. Data fra M8 er vist i Figur 36 og data fra kontroll merd (M9) er vist i Figur 37.

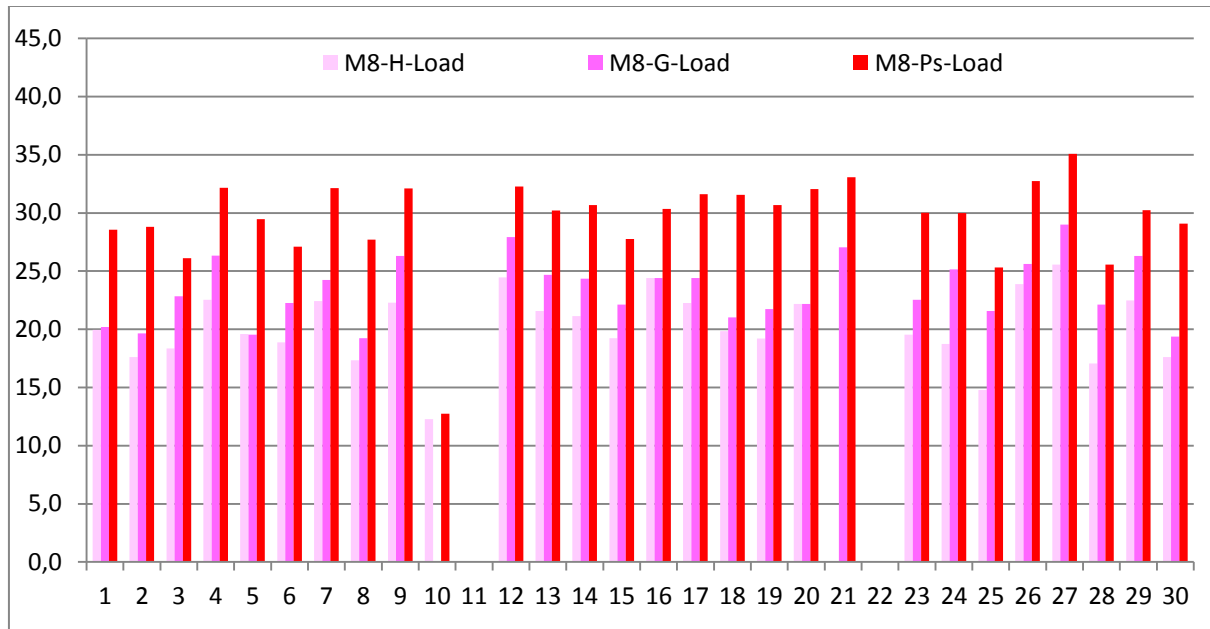


Figure 36, Belastning av *P. pseudobranchicola* i gjeller og hjerte ved dag 114 etter sjøsetting. H = hjerte, G = gjeller og Ps = pseudobranchier. Merd M8 med luseduk (N = 30 laks)

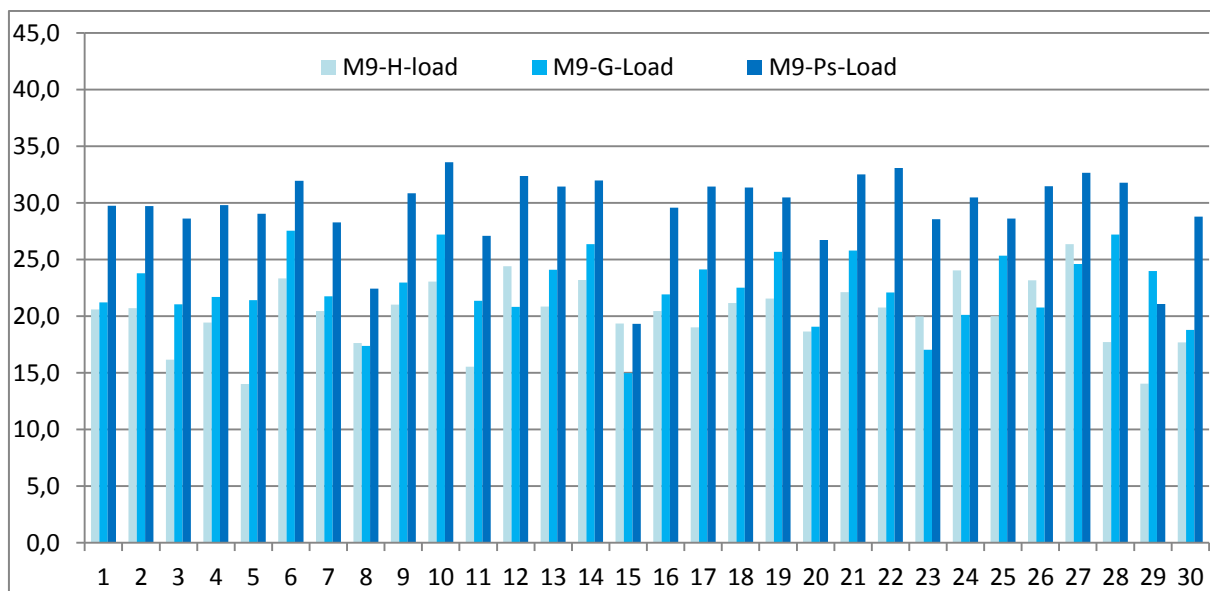


Figure 37, Belastning av *P. pseudobranchicola* i gjeller og hjerte ved dag 114 etter sjøsetting. H = hjerte, G = gjeller og Ps = pseudobranchier. Merd M9 kontroll (N = 30 laks).

Analyse med henblikk på tilstedeværelse av andre mikroparasitter.

All laks i uttaket 06.02.2017, 114 dager etter utsett, ble testet for forekomst av virusene ISAV, SAV, IPNV, SGPV, PRV og PMCV, for bakterien *Candidatus Branchiomonas cysticola*, og parasitten *Ichthyobodo salmonis*. Ingen virus eller *Cand. B. cysticola* ble påvist i fisken (N = 30 fra M8 og N = 30 fra M9). *I. salmonis* ble påvist i begge merdene, M8 og M9, med en prevalens på henholdsvis 10,0 % og 20,0 %. Belastningen var svært lav hos de positive individene.

Vurdering av funnene

Begge forsøkene med luseskjørt og PVC-duk ga samme resultat, det vil si ingen beskyttelse mot påslag med *P. pseudobranchicola*. Forsøkene ble gjennomført på to forskjellige lokaliteter. Det kan selvfølgelig ikke utelukkes at denne teknologien kan gi en viss beskyttelse under bestemte vind og strømforhold, men disse forsøkene viser at under «normale» forhold i Finnmark så vil denne løsningen ikke gi de ønskede resultater som kan rettferdiggjøre økte kostnader knyttet til teknologien.

Luseskjørt (Calanus og 6 meter dypt PVC-skjørt) synes ikke å ha noen verdi som forebyggende tiltak mot påslag med *Parvicapsula pseudobranchicola*. På grunn av økte kostnader knyttet til denne teknologien frarådes bruk av luseskjørt og PVC-duk hvis målet kun er å redusere påslag med *P. pseudobranchicola*.

Det kan imidlertid synes som om at konsekvensen av påslag med *P. pseudobranchicola* kan reduseres til et minimum ved at smolt som sjøsettes er fri for andre patogener som for eksempel ILAV, PRV, IPNV og SGPV.

Referanser

- Nylund S, Andersen L, Saevareid I, Plarre H, Watanabe K, Arnesen CE, Karlsbakk E, Nylund A (2011). Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Dis Aquat Organ*. 2011 Mar 16;94(1):41-57.
- Olsvik, P. A., K. K. Lie, A. E. O. Jordal, T. O. Nilsen, and I. Hordvik. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol* 17: 6 – 21

Presentasjoner, masteroppgaver og publikasjoner fra prosjektet

Presentasjoner

Hansen, H., Ø. J. Brevik, A. Jørgensen, Å. Garseth, A. Nylund, and E. Karlsbakk. The distribution of *Parvicapsula pseudobranchicola* in wild salmonids in Norway. In: 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish Tampere, Finland. 2013.

Karlsbakk E, Jørgensen A, Ottem KF, Nikolaysen V, Alexandersen S, Hansen H, Brevik Ø, Nylund A (2014). *Parvicapsula* – en introduksjon. Foredrag Lofotseminaret Mortsund 05.06.14.

Brevik Ø, Ottem KF, Karlsbakk E, Hansen H, Seljestokken B, Hårstad H, Nylund A (2014) *Parvicapsula pseudobranchicola* -Prevalens og infeksjonsvindu. Foredrag Lofotseminaret Mortsund 05.06.14.

Brevik Ø, Hansen H, Markussen T, Seljestokken B, Hårstad H, Nylund A (2014). *Parvicapsula pseudobranchicola*; -Øke kunnskap og redusere tap. Foredrag FHF fiskehelsesamling Værnes 27.10.14

Brevik Ø, Hustoft H, Nylund A, Karlsbakk E, Hansen H, Plarre H (2015). Karakterisering av utvikling til *Parvicapsula pseudobranchicola* i laks. Foredrag Frisk Fisk Tromsø 03.03.15.

Markussen T, Agusti C, Karlsbakk E, Nylund A, Brevik Ø, Hansen H (2015). Detection of the *myxosporean* parasite *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using *in situ* hybridization (ISH). Foredrag Frisk Fisk Tromsø 03.03.15.

Brevik Ø, Hustoft H, Hansen H, Markussen T, Nylund A (2015). Vevs-tropisme, infeksjonsforløp og smittevindu til *Parvicapsula pseudobranchicola* i laks. Foredrag FHF fiskehelsesamling Bergen 02.09.15

Brevik Ø, Hustoft H, Hansen H, Markussen T, Karlsbakk. E, Nylund A (2015) *Parvicapsula* -Parasittens livssyklus i laks. Foredrag FHF Nordnorsk fiskehelsesamling Tromsø 24.08.16

Masteroppgaver

Hustoft H (2015). A longitudinal study of the tissue distribution of *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar*), sea launched in the early autumn (2015). Master i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Publikasjoner

Markussen, T., Agusti, C., Karlsbakk, E., Nylund, A., Brevik, O., Hansen, H., 2015. Detection of the myxosporean parasite *Parvicapsula pseudobranchicola* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using *in situ* hybridization (ISH). *Parasites & Vectors*. 8:105

Hansen H, Poppe TT, Markussen T, Karlsbakk E. Seatrout (*Salmo trutta*) is a natural host for *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa, Myxosporea), an important pathogen of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasite Vector*. 2015;8 1:218; doi: 10.1186/s13071-015-0828-z.

Nylund, A., Hansen, H., Brevik, O., Hustoft H., Markussen, T., Plarre H., Karlsbakk, E., 2017. Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporea) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasites & Vectors*

Foto kreditering

Foto brukt i rapporten er tatt av forfatterne. Kartbilder er hentet fra google maps.

Takk til

Fiskehelsepersonell, driftsledere og røktere hos Cermaq Norway, Lerøy Aurora og Grieg Seafood Finnmark for å ha bistått i innsamling av materialet.