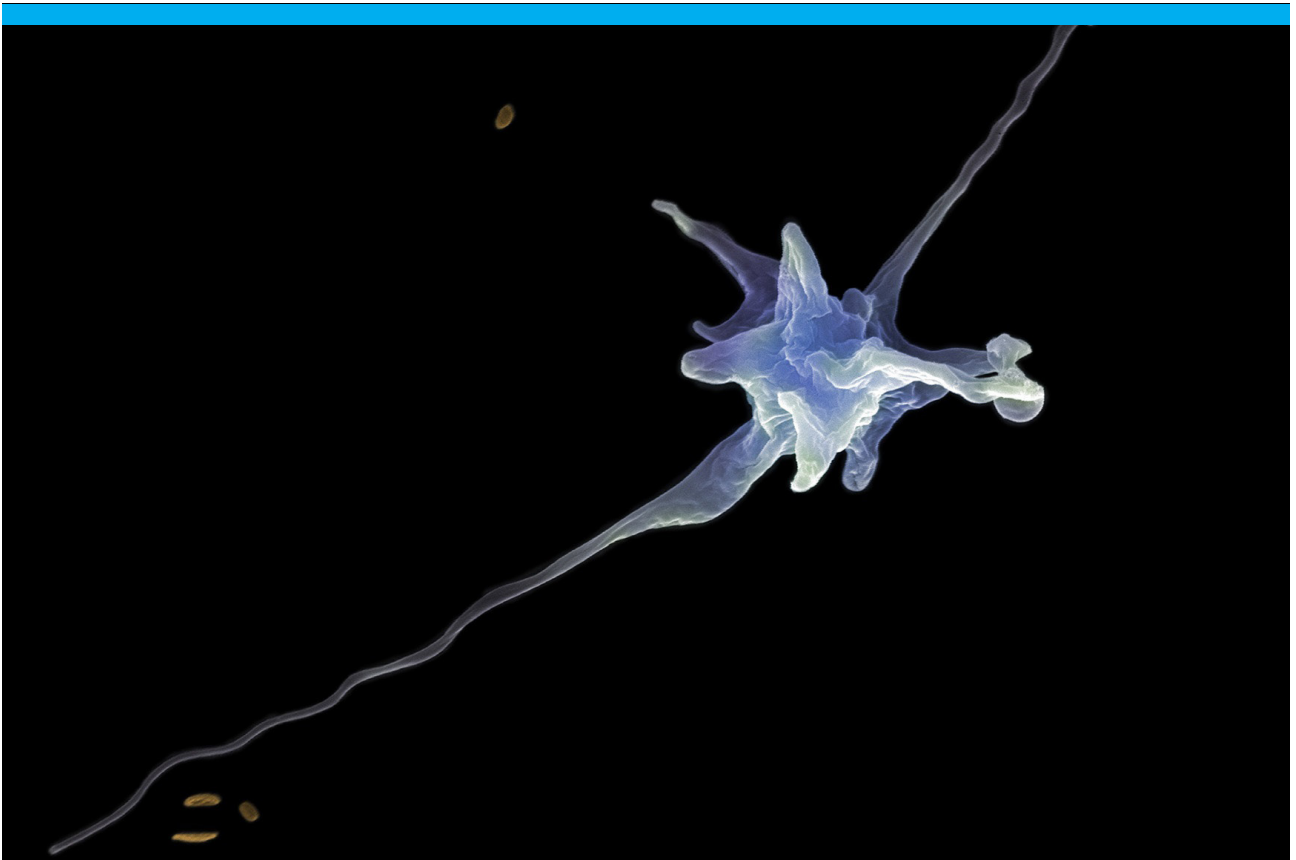


AGD - behandlingsstrategier - resistensutvikling hos *Paramoeba perurans* ved hydrogenperoksid- og ferskvannsbehandling



AGD - behandlingsstrategier - resistensutvikling hos *Paramoeba perurans* ved hydrogenperoksid- og ferskvannsbehandling

Innhold

1. Sammendrag	3
Summary	4
2. Hovedfunn og kunnskapsbehov	5
3. Bakgrunn	6
4. Materialer og Metoder.....	6
4.1. Protokoll.....	6
4.2. Gjennomføring.....	7
5. Resultater	9
5.1. Karakterisering av amøber etter eksponering for H ₂ O ₂ og FV.....	9
5.2. Effekter av <i>in vitro</i> behandling på <i>P. perurans</i> ved ulike metoder	10
5.3. Vurdering av amøbens følsomhet for gjentatte H ₂ O ₂ - og FV-behandlinger	11
6. Diskusjon	12
7. Referanser.....	14

Forfattere / Authors
 Sigurd Hytterød
 Mari Darrud
 Saima Nasrin Mohammad

Oppdragsgiver
 Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond
 (FHF)

ISSN 1890-3290
 © Veterinærinstituttet 2017



Design omslag: Reine Linjer
 Foto forside: Jannicke Wiik-Nielsen

1. Sammendrag

Amøbegjellesykdom (AGD), forårsaket av amøben *Paramoeba perurans*, har etablert seg i norsk oppdrettsnæring som en alvorlig sykdom, og ferskvann (FV) eller hydrogenperoksid (H_2O_2) brukes som behandling mot sykdommen. Disse metodene er ikke hundre prosent effektive, og i mange tilfeller utvikler sykdommen seg på nytt etter behandling. Det er vanlig å gjennomføre flere behandlinger av de samme merdene innenfor samme AGD-sesong, og den samme amøbepopulasjonen kan dermed bli utsatt for gjentatte behandlinger. Det faktum at enkeltindivider av *P. perurans* overlever og formerer seg etter behandling har reist spørsmål om amøben evner å utvikle nedsatt følsomhet og eventuelt resistens mot H_2O_2 og FV.

I denne rapporten presenteres resultater fra gjentatte *in vitro* H_2O_2 - og FV-eksponeringer av et *P. perurans*-isolat. Fire ulike fremgangsmåter/metoder for *in vitro* eksponering av *P. perurans* ble forsøkt, der mulighet for å ta vare på eksponerte amøber for oppformering i ny kultur ble vektlagt. Forsøkene viste at flytende/frie amøber hadde betydelig høyere følsomhet for FV- og H_2O_2 -eksponering enn festede/fastsittende amøber. Eksponering av festede amøber ble derfor benyttet i forsøk på å undersøke om *P. perurans* evner å utvikle nedsatt følsomhet og eventuelt resistens mot FV og H_2O_2 . FV-behandling i to timer ble vurdert til å være en grenseverdi for overlevelse hos *P. perurans* ved *in-vitro* behandling av festede amøber. Ved eksponering for H_2O_2 , 1800 ppm i 20 minutter, overlevde enkelte amøber, men restitusjonstiden var svært lang. Lavere behandlingsdoser ble derfor benyttet ved gjentatte behandlinger av samme amøbekultur, med hensikt å forberede en amøbekultur for sammenligning av følsomhet for FV og H_2O_2 mot en naiv amøbekultur. Den samme amøbepopulasjonen ble eksponert og dyrket opp tre ganger, henholdsvis for FV i 30 minutter og for 600 ppm H_2O_2 i 30 minutter. Testene viste at *P. perurans* overlevde behandlingene, og amøbene lot seg dyrke opp i kultur etter eksponeringene. Sammenligning av overlevelse og vekst mellom pre-eksponerte og naive amøber ble gjort ved å observere og telle eksponerte amøber fra begge grupper i mikroskop. Det var imidlertid utfordrende å gjøre gode vurderinger for om gjentatte FV- og H_2O_2 -eksponeringer førte til redusert følsomhet hos amøbene. Metodikk for å besvare denne hypotesen bør baseres på en annen tilnærming enn kun dyrkning og sammenligning av veksthastighet hos amøbekulturer. Dyrkning og kvantifisering av *P. perurans* ved hjelp av telling av amøber i mikroskop kan brukes som et supplement til annen metodikk.

Summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by the amoeba *Paramoeba perurans* is considered a serious disease in the Norwegian fish farming industry, and bath treatments with fresh water (FW) or hydrogen peroxide (H₂O₂) are the methods applied against AGD. None of the methods completely eliminate the amoeba, and often the disease progresses post treatment. Thus, in many farms repeated treatments are conducted during the same production cycle, and the amoeba population are exposed several times to FW or H₂O₂. The fact, that single amoeba survive treatments and are able to reproduce, has raised questions about reduced sensitivity to repeated exposure and even development of resistance against FW and H₂O₂ treatments.

This study presents results from repeated *in vitro* exposure of a *P. perurans* isolate to FW and H₂O₂. Four different *in vitro* exposure techniques were applied to find a suitable approach to sustain the amoebas in a culture medium post exposure, and to cultivate the amoebas for repeated treatments. The results from the four tests show that free-living/floating amoebas are significantly more sensitive to FW and H₂O₂ exposure compared to attached amoeba. For that reason, exposure of attached amoebas was preferred as the experimental model in an attempt to study sensitivity and resistance to repeated FW and H₂O₂ treatments. *In vitro* exposure to FW for two hours eliminated all *P. perurans*, and was considered the limit for surviving FW treatment in this test. The highest tested H₂O₂-dose, 1800 ppm for 20 minutes, reduced the amoebas significantly but did not eliminate all *P. perurans* individuals. However, recovery was slow in surviving amoebas exposed to this H₂O₂-dose. Thus, milder treatments were applied in the repeated exposure challenge test. The same amoeba culture was exposed and re-cultured three times, respectively to FW for 30 minutes and to 600 ppm H₂O₂ for 30 minutes. Amoeba surviving these treatments were successfully cultured post exposure. The sensitivity to FW and H₂O₂-treatment were determined from visual observation of survival and growth rates post exposure, using a microscope. Survival and growth rates were compared between pre-exposed and naïve (never exposed to FW or H₂O₂) amoeba cultures. However, from the visual observations, there was challenging to create valid conclusions whether repeated FW and H₂O₂-exposures caused reduced sensitivity in the *P. perurans* culture. We recommend a different approach to address this hypothesis in a potential follow-up trial. Quantification of FW and H₂O₂-exposed *P. perurans* cultures by means of visual observation should be used as a supplement to other methods.

2. Hovedfunn og kunnskapsbehov

Hovedfunn

- Metode basert på observasjon og telling av amøber i mikroskop ga ikke grunnlag for å vurdere om *P. perurans* kan utvikle redusert følsomhet og resistens mot H₂O₂- og FV-behandlinger
- *P. perurans* overlever eksponering for 1800 ppm H₂O₂ i 20 minutter, men restitueringen gikk svært langsomt ved *in-vitro* behandling for denne dosen
- FV-behandling i to timer var øvre grenseverdi for overlevelse hos *P. perurans* i *in-vitro*-forsøkene
- *In-vitro* eksponering for H₂O₂ og FV ga generelt lange restitusjonstider observert som tid mellom eksponering og cellevekst
- *P. perurans* endrer form og størrelse ved *in-vitro* eksponering for H₂O₂ og FV
- Flytende/frie *P. perurans*-individer er betydelig mer følsomme for H₂O₂- og FV-eksponering enn det fastsittende/festede amøbeceller er

Kunnskapsbehov

- Utvikling av metodikk for å studere *P. perurans* i *in vitro*-forsøk generelt, og for å studere resistensutvikling ved eksponering for H₂O₂- og FV
- Spesielt fokus på utvikling av metode for kunne skille levende og døde *P. perurans*
- Optimalisering av behandling mot *P. perurans* med hensyn på behandling av ulike livshistoriestadier av amøben - flytende, festede og pseudocyster

3. Bakgrunn

Amøbegjellesykdom (engelsk: AGD) forårsakes av amøben *Paramoeba perurans* og har etablert seg som en alvorlig sykdom i norsk lakseoppdrett. Behandling med ferskvann (FV) eller hydrogenperoksid (H_2O_2) brukes som tiltak mot AGD, og begge metoder har dokumentert effekt mot amøben. Ingen av metodene er hundre prosent effektive (Clark mfl. 2003, Mo mfl. 2015), og i mange tilfeller utvikler sykdommen seg på nytt etter behandling. Dette skyldes trolig at amøber overlever behandlingene. Det er vanlig å gjennomføre flere behandlinger av de samme merdene innenfor samme AGD-sesong, og den samme amøbepopulasjonen kan dermed bli utsatt for gjentatte behandlinger. Det faktum at enkeltindivider av *P. perurans* overlever og formerer seg etter behandling har reist spørsmål om amøben evner å utvikle nedsatt følsomhet og eventuelt resistens mot H_2O_2 og FV.

Resistens er en betegnelse for et patogenes evne til å utvikle motstandskraft mot behandling, og de fleste sykdomsfremkallende organismer kan utvikle resistens som et resultat av suboptimal behandling med medikamenter eller kjemikalier. Innenfor sykdomskontroll i fiskeoppdrett er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) et godt eksempel på en organisme som har utviklet resistens mot flere typer kjemisk behandling, deriblant mot H_2O_2 -behandling (se referanser i Helgesen mfl. 2015).

Det er flere mekanismer som kan forklare redusert følsomhet for H_2O_2 . Økt aktivitet i enzymer med antioksidierende effekt er dokumentert i pattedyrceller i forbindelse med H_2O_2 -resistens (Fiander og Schneider 2000, Spitz mfl. 1992, Baud mfl. 2004). Det er også målt økt enzymaktivitet hos H_2O_2 -resistente bakterier og sopp (Amin og Olson 1968, Elkins mfl. 1999, Nakamura mfl. 2012, Uhlich 2009). Slike eksempler viser at det finnes naturlige prosesser i celler for nedbrytning av frie oksygenradikaler, nettopp slike forbindelser som frigjøres og er giftige mot lakselus og kanskje *P. perurans* ved H_2O_2 -behandling. Hvis *P. perurans* har evne til å aktivt redusere oksidativt stress, kan det tenkes at subletale behandlinger med H_2O_2 fører til en seleksjon av *P. perurans*-individer med lav følsomhet for H_2O_2 -behandling, og dermed resistensutvikling mot virkestoffet.

Mulig resistensutvikling ved FV-behandling er oss bekjent ikke studert, til tross for at flere studier rapporterer at amøber overlever eksponering for FV (se f. eks. Powell og Clark 2003, Roberts og Powell 2003, McCarthy mfl 2015, Lima mfl 2016). Det er også kjent fra studier at amøbene endrer størrelse og form til små, avrundede celler (pseudocyster) ved eksponering for vann med lav salinitet (Powell & Clark 2003; Nowak, Crosbie & Adams 2010, Lima mfl. 2016 a,b.). Evnen til å redusere størrelse og form kan trolig forstås som en mekanisme for å beskytte seg mot ugunstige endringer i det ytre miljøet. En teori kan derfor være at enkelte amøber overlever behandling med H_2O_2 eller FV ved å endre form fra klassiske amøbeformer med pseudopodier, til små avrundede former. Det er også vist at *P. perurans* har evne til aktiv regulering av vannvolumet i cellekroppen ved aktiv transport av vann ut av cellen ved hjelp av kontraktile vakuoler (Lima mfl 2016a). Hvis FV-behandling fører til en selektert overlevelse hos *P. perurans*-individer med særs god evne til å regulere vannvolumet inne i cellen, kan gjentatte FV-behandlinger påvirke amøbepopulasjonen i retning av å bli mindre følsom for FV.

I denne studien har vi gjennomført gjentatte H_2O_2 - og FV-eksponeringer av et *P. perurans*-isolat, og deretter sammenlignet overlevelse hos de pre-eksponerte amøbene med overlevelsen hos naive amøber etter behandling. Hensikten med studien har vært å teste om gjentatte subletale behandlinger kan redusere amøbens følsomhet mot behandlingsmediene.

4. Materialer og Metoder

4.1. Protokoll

De eksperimentelle forsøkene ble gjennomført i Veterinærinstituttets laboratorium. Alle testene ble utført *in vitro* med det samme isolatet av amøben *P. perurans*.

Før hver eksponering ble amøbekulturen oppformert i celledyrkningsmediet malt-gjær buljong (MYB) i cellekulturflasker (Falcon 25 cm²). Oppformeringen foregikk ved et amøbekulturen ble vasket med filtrert og autoklavert sjøvann (34 ‰ salinitet) og overført til nye cellekulturflasker ca hver fjerde dag over en periode på 14 dager. Mediet i flaskene som inneholdt både flytende og fastsettende amøbeceller ble overført til sentrifugerør (Falcon 50 ml) og sentrifugert ved 1000 rpm i fem minutter. Amøbene ble

dermed konsentrert i bunnen på sentrifugerørene og celletettheten (amøber/ml) i den oppkonsentrerte amøbeløsningen ble bestemt ved telling av amøbene i et Fusch-Rosenthal tellekammer. Et volum av amøbeløsningen med kjent celletetthet ble så eksponert for ulike doser av H₂O₂ (konsentrasjon og tid) eller for destillert FV ved forskjellig varighet. Etter eksponeringen ble amøbene vasket og tilbakeført til MYB.

Overlevelse etter eksponering ble vurdert ved visuelle observasjoner av vekst/ikke vekst i amøbekulturen, og amøbens følsomhet for behandlingene ble vurdert ut fra observert veksthastighet etter eksponering. Vurdering av amøbene ble gjort i cellekulturplater (Falcon tissue culture plate, 24 well) eller cellekulturflasker ved bruk av mikroskop (Leica DM IL LED) ved 100x og 200x forstørrelse. Amøbene ble undersøkt over en periode på inntil tre uker etter behandling, og eventuell cellevekst ble notert. Eventuelle endringer i amøbenes følsomhet for behandlingsmediene ble undersøkt ved å sammenligne overlevelse og veksthastighet mellom amøber eksponert tre ganger for H₂O₂ eller FV og naive amøber, det vil si amøber som ble eksponert for H₂O₂ eller FV for første gang. Amøber eksponert for filtrert og autoklavert sjøvann (34 % salinitet) ble brukt som positiv kontroll i alle testene.

Analyse av H₂O₂-konsentrasjoner i eksponeringsvannet

Behandlingsløsninger med H₂O₂ ble laget ved å tilsette ulike mengder Paramove 49,5 % W/W konsentrat til filtrert og autoklavert sjøvann (34 % salinitet). Omvendt titrering med ceriumsulfat og svovelsyre ble brukt for bestemmelse av H₂O₂-konsentrasjonen i behandlingsvannet (metode fra Aqua Pharma). Ceriumsulfat ble blandet i et beger og titrert med behandlingsvann til fargeomslag.

Reaksjon: $2 \text{Ce} (\text{SO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Ce}_2 (\text{SO}_4)_3 + \text{O}_2$

Konsentrasjon av hydrogenperoksid (mg/liter) i vannet ble regnet ut fra mengden tilsatt behandlingsvann ved titrering.

4.2. Gjennomføring

Ulike fremgangsmåter/metoder for *in vitro* eksponering av *P. perurans* ble forsøkt, der muligheten for å ta vare på eksponerte amøber for oppformering i ny kultur ble vektlagt. Det ble til sammen testet fire metoder som her presenteres kronologisk.

1) Eksponering av amøber for H₂O₂ i glasskolbe med konstant omrøring i eksponeringsmediet

En kolbe med 25 ml filtrert og autoklavert sjøvann (34 % salinitet og 15 °C) ble tilsatt Paramove 49% for å oppnå en H₂O₂-konsentrasjon på 1500 ppm i behandlingsvannet. Fem ml amøbeløsning ble tilsatt til H₂O₂-løsningen, og en magnetrører sørget for konstant omrøring mens amøbene ble eksponert. Etter 20, 40, 60 og 180 minutter ble amøber pipettert ut, vasket og overført til brønner (v=3ml) i celledyrkningsplater med MYB (femreplikater per eksponering). Forsøket ble gjentatt med 1200, 600 og 300 ppm H₂O₂ i 20, 40 og 60 minutter.

2) Eksponering av amøber for H₂O₂ og FV i cellekulturplater - festede amøber

En ml amøbekultur ble sådd ut i celledyrkningsplater, der hver brønn rommet et volum på 3 ml. Platene ble inkubert ved 15 °C slik at amøbene fikk tid til å feste seg til bunnen av cellebrønnene. Etter ca femten timer ble MYB pipettert av og behandlingsmediet tilsatt. Amøbene ble eksponert for 1800, 1200 og 600 ppm H₂O₂ i 20 minutter og FV i 60, 120, 180 og 240 minutter. Etter endt eksponeringstid ble behandlingsmediet pipettert av, amøbene vasket, og 2 ml ny MYB ble tilsatt i hver brønn. Brønnene ble vasket ukentlig med sjøvann og ny MYB ble tilsatt.

Etter hver eksponering ble i tillegg 1 ml amøbeløsning sådd ut i cellekulturflasker med 15 ml MYB for dyrkning og ny oppformering.

3) Eksponering av amøber for H₂O₂ og FVi cellekulturplater - ikke festede amøber

Brønner i en cellekulturplater ble fylt opp med 3 ml behandlingsmedium, henholdsvis 1200, 600 og 400 ppm H₂O₂ og FV. Avhengig av celletettheten ble 10-50µl amøbeløsning tilsatt hver brønn, og amøbene ble eksponert for H₂O₂ i 15, 30 og 60 minutter og for FV i 30, 60 og 120 minutter. Etter endt eksponering ble amøber fra behandlingsbrønnene overført til cellebrønner med MYB i en ny cellekulturplate. I tillegg ble det pipettert ut 0,1 ml amøbeløsning fra hver eksponering til en cellekulturflaske med 15 ml MYB for etablering av en kultur med eksponerte amøber.

4) Eksponering av amøber for H₂O₂ og ferskvann i cellekulturflasker

Cellekulturflasker med 15 ml MYB ble tilsatt amøber fra en kultur med høy celletetthet. Flaskene ble inkubert ved 15 °C slik at amøbene fikk tid til å feste seg til flaskebunnen. Etter ca 15 timer ble MYB helt av og behandlingsmediet tilsatt. Amøbene ble eksponert for 400 og 600 ppm H₂O₂ i 10, 20 og 30 minutter. H₂O₂-dosene var basert på erfaringer fra eksponeringene med metode 1, 2 og 3. Behandlingen ble gjort som tre replikater for hver dose. Etter endt eksponeringstid ble behandlingsmediet pipettert av, og amøbene ble vasket én gang med MYB. Ny MYB ble tilsatt (15 ml) til cellekulturflasken før de ble inkubert ved 15 °C. Flaskene ble vasket med sjøvann og tilsatt ny MYB ukentlig. Den samme prosedyren ble fulgt for FV-behandling der amøbene ble eksponert i 30 minutter.

Amøber som overlevde eksponering for 600 ppm i 30 minutter ble dyrket opp til en kultur med høy celletetthet og eksponering for H₂O₂ 600 ppm i 30 minutter ble gjentatt. Denne prosedyren ble gjentatt tre ganger.

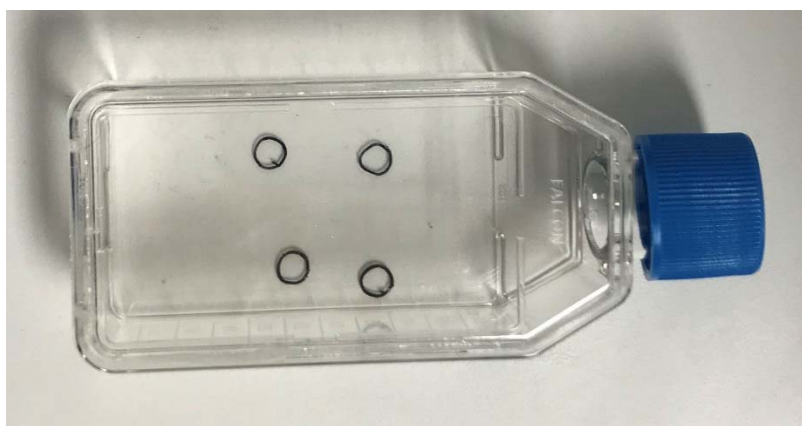
Amøber som overlevde eksponering for FV i to timer ved metode nr. 3 ble dyrket opp i cellekulturflasker til høy celletetthet og ny eksponering for FV i 30 minutter ble gjort i cellekulturflasker (metode nr. 4). FV-behandling i 30 minutter ble gjentatt to ganger.

Vurdering av eksponeringsmetode 1-4

I forsøkene der målet var å dyrke opp eksponerte amøber for å gjøre gjentatte behandlinger, ble eksponering gjort med festede amøber foretrukket. Det ble testet to fremgangsmåter med festede amøber; eksponering i cellebrønner, og i cellekulturflasker. Bakterievekst var en stor utfordring ved eksponering av amøber i cellebrønner. Det var betydelig enklere å kontrollere bakterieveksten i flaskene enn i brønner, dette fordi amøbekulturen lettere lot seg vaskes med rent sjøvann når de ble holdt i flasker. Bakterievekst kan være en stor utfordring ved dyrkning av *P. perurans* i cellekultur, spesielt hvis mengdeforholdet mellom amøber og bakterier blir for stort i favør bakterien. Da kan bakterien «ta over» i kulturen og amøbene får uegnede vekstbetingelser. Amøbene blir også vanskelig å observere/telle hvis bakteriemengden blir for stor. Disse erfaringene gjorde cellekulturflasker til et førstevalg ved eksponeringen.

Sammenligning av følsomhet for H₂O₂- og FV-eksponering etter gjentatte behandlinger

En amøbekultur eksponert tre ganger for H₂O₂ ble podet ut i cellekulturflasker der fire «tellefelt» (≈ 5 mm i diameter) var markert med en penn (figur 1). Det samme ble gjort for amøbekulturen som var eksponert tre ganger for FV. Naive amøber (aldri eksponert for H₂O₂ eller FV) ble brukt som sammenligningsgrunnlag for overlevelse og cellevekst. Når amøbene hadde festet seg ble antallet celler innenfor hvert felt estimert ved telling i mikroskop. Deretter ble MYB erstattet med behandlingsmedium og amøbene ble eksponert for FV i 30 minutter eller for H₂O₂ ved 600 ppm i 20 minutter. Etter eksponering ble FV og H₂O₂-løsning erstattet med ny MYB. Antall amøber innenfor de fireavgrensede områdene ble estimert umiddelbart etter eksponering, og deretter 1, 2 og 6 dager etter behandling. Amøber eksponert for sjøvann ved 34 ‰ salinitet fungerte som positiv kontroll.



Figur 1. Cellekulturflaske med påtegnede «tellefelt», d≈5 mm.

5. Resultater

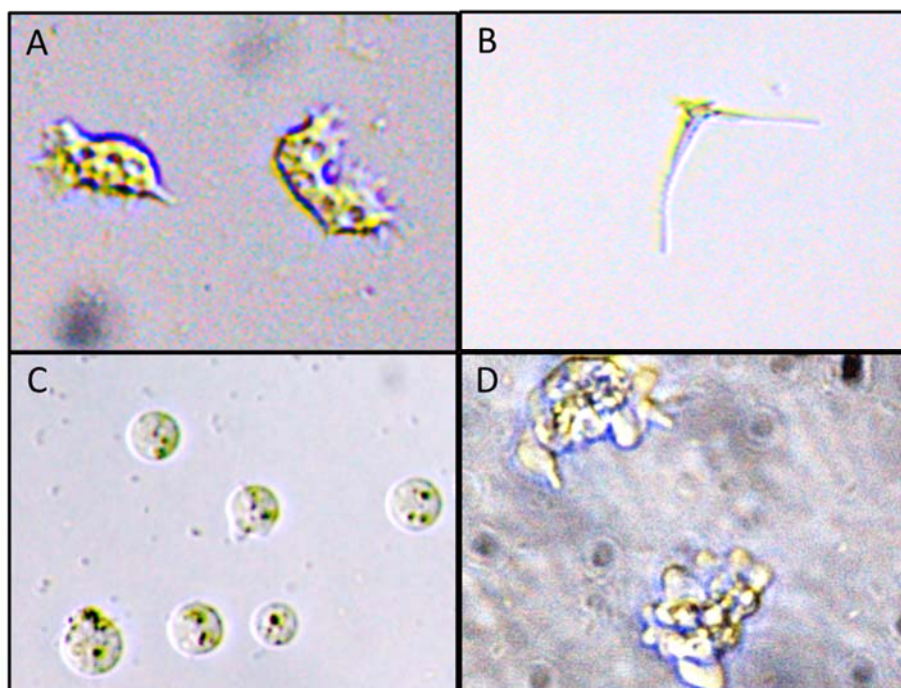
5.1. Karakterisering av amøber etter eksponering for H₂O₂ og FV

Ved eksponering for H₂O₂ og FV endret amøbene fasong og størrelse (figur 2).



Figur 2. Bilder av *P. perurans* tatt med scanning elektronmikroskop. Til venstre: *P. perurans* eksponert for FV i 60 minutter. I midten: *P. perurans* eksponert for H₂O₂ 1800 ppm i 20 minutter. Til høyre: *P. perurans* i saltvann.

Normale amøber i henholdsvis festet og flytende stadium er vist i figur 3A og 3B. Ved H₂O₂-eksponering dannet amøbene former som kan beskrives som blomsterlignende (figur 2 og 3D). Størrelsen ble også noe redusert. Ved eksponering for FV ble amøbecellene runde (figur 2 og 3C) og svært små kun minutter etter eksponeringen, for deretter å øke noe i størrelse. Til tross for store forskjeller i tid til regenerering av normale amøbeformer ved ulike behandlinger, var det en felles observasjon i alle testene at amøbene brukte lang tid på å komme tilbake til vekstfase der de formerte seg med tilnærmet normal veksthastighet.



Figur 3. Festede (A) og flytende (B) amøbe i dyrkingsmediet MYB ved 100x forstørrelse. Amøber eksponert for FV i 60 minutter forstørret 200x (C) og for H₂O₂, 1800 ppm i 20 minutter ved 400x forstørrelse (D).

Her presenteres observasjonene av amøbene etter behandling og frem til cellekulturen begynte å vokse, i fire faser:

Fase 1, Like etter behandling - Akutte effekter i form av morfologiske forandringer

Amøbene endret former fra å være klassiske amøbeformer med lange pseudopodier, enten som fastsittende amøber (figur 3A) eller flytestadier (figur 3B), til å danne små runde «pseudocyster» ved ferskvannseksponering (figur 3C) og «blomsterformede» strukturer ved H₂O₂-eksponering (figur 3D).

Fase 2, 1-4 uker etter behandling - Regenerering av normale amøbeformer

I denne fasen kom amøbene som overlevde eksponeringene tilbake til sine normale former og størrelser. H₂O₂-eksponerte amøber kom raskere tilbake til normal form enn FV-eksponerte amøber. Behandlingstid var avgjørende for hvor lang tid amøbene brukte på restitusjonen.

Fase 3, 2-6 uker etter behandling - Celledeling og vekst i kultur

Amøbene hadde regenerert sine normale former og begynte å dele seg. Celleantallet/tettheten i kulturen økte. Tiden dette tok var avhengig av eksponeringsmetode. Ved eksponering av amøber som var festet mot underlaget (flaskebunn eller cellekulturbrønn) kom amøbene raskere tilbake i fase 3. Ved eksponering av amøber i flytestadier, tok denne prosessen lenger tid. Det var også en sammenheng mellom eksponeringsbelastning (konsentrasjon/tid) og tid til observert celledeling, der kraftig eksponering ga økt tid til celledeling.

Fase 4, 6-12 uker etter behandling - Normal amøbevekst i kultur og oppformering av amøber

Tettheten i cellekulturen ble høyere og amøbene dannet flytestadier i kulturen. Amøbekulturen ble da podet ut i nye cellekulturflasker og oppformering av amøben kunne begynne for fullt.

5.2. Effekter av *in vitro* behandling på *P. perurans* ved ulike metoder

1) Eksponering av amøber for H₂O₂ i glasskolbe med konstant omrøring i eksponeringsmediet

Denne eksponeringsmåten ga svært kraftig effekt på amøbene. Amøbene lot seg ikke dyrke opp til høy tetthet i kultur, selve etter eksponering for den laveste H₂O₂-dosen, 300 ppm i 20 minutter. Det var derfor ikke mulig å dyrke opp amøbene til høy tetthet for gjentatt eksponering.

Årsaken til den kraftige behandlingseffekten var trolig at denne metoden utsetter amøbecellene for en «360 graders eksponering», det vil si at cellene som var i fri flyt under omrøringen ble eksponert over hele celleoverflaten/amøbekroppen. Amøben hadde da ingen side/overflate som var beskyttet mot det ytre miljøet, slik som når den sitter festet på en fiskegjelle eller på bunnen i en cellebrønn/flaske.

Eksponering i kolbe med omrøring av mediet ble kun forsøkt med H₂O₂, og ikke med FV.

2 og 3) Eksponering av amøber for H₂O₂ og FV i cellekulturplater - festede og ikke-festede amøber

Ved begge disse metodene lyktes det å oppformere amøber som overlevde behandlingen. Det var imidlertid store forskjeller i veksthastighet hos amøbekulturer eksponert for ulike H₂O₂-doser og FV med forskjellig varighet, og det var en direkte sammenheng mellom eksponeringsbelastning og restitusjonstid. Kraftig behandling, det vil si høye H₂O₂-doser og lang behandlingstid med FV ga den lengste restitusjonstiden, og ved enkelte behandlinger overlevde ingen av amøbene. Ved begge metoder ble oppdyrkingen av eksponerte amøber hemmet av kraftig bakterievekst. Det lyktes imidlertid å dyrke opp et stor antall amøber eksponert for FV i to timer med metode 3, og disse ble tatt vare på og videreført i forsøket.

4) Eksponering av amøber for H₂O₂ og FV i celledyrkningsflasker

Amøbene overlevde eksponering for 400- og 600 ppm H₂O₂ i 10, 20 og 30 minutter, og for FV i 30 minutter. Kulturene lot seg dyrke opp etter alle H₂O₂- og FV-eksponeringene. Det var også her en klar sammenheng mellom eksponeringsbelastning og restitusjonstid, der amøbene regenererte sin naturlige form etter kun noen få dager etter eksponering for 400 ppm H₂O₂ i 10 min. Her ble det også registrert vekst etter ca 7 dager. Ved eksponering for 600 ppm H₂O₂ i 30 minutter var amøbene tilbake til normale former etter 7-9 dager, og tilbake i vekstfase etter tre til fire uker. Amøbene som ble eksponert for FV i 30 min var tilbake til sine normale former allerede én dag etter eksponering, og vekst ble registret etter en uke.

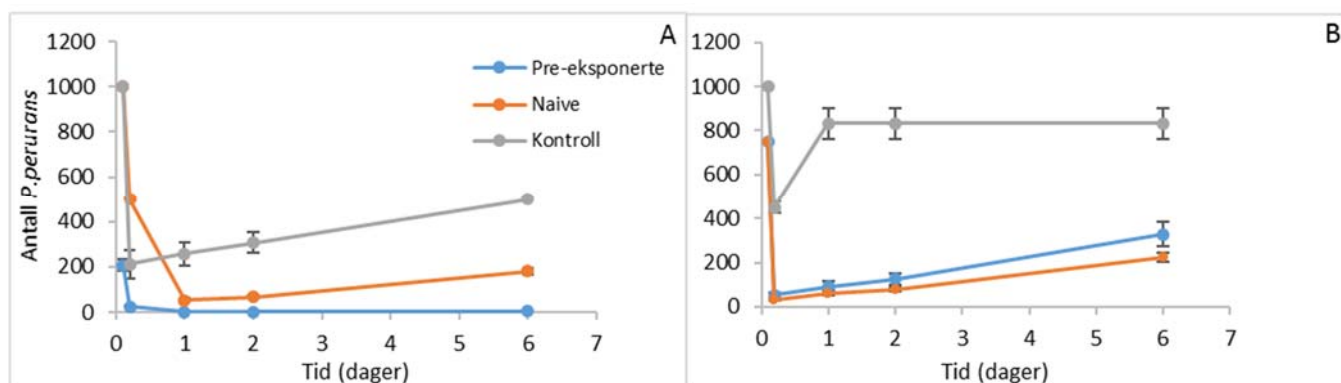
Tabell 1: Resultater fra eksponering av amøber for H₂O₂ ved ulike doser og FV ved ulike behandlingstider.

Medium	Kons/tid	Metode	Overlevelse	Vellykket dyrkning	Kommentar
H ₂ O ₂	1500 ppm i 20 minutter	1	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	1200 ppm i 20 minutter	1	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	600 ppm i 20 minutter	1	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	300 ppm i 20 minutter	1	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	1800 ppm i 20 minutter	2	Ja	Ja	Mye bakt.
H ₂ O ₂	1200 ppm i 20 minutter	2	Ja	Ja	Mye bakt.
H ₂ O ₂	600 ppm i 20 minutter	2	Ja	Ja	Mye bakt.
H ₂ O ₂	1200 ppm i 15 minutter	3	Usikkert	Nei	
H ₂ O ₂	1200 ppm i 30 minutter	3	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	1200 ppm i 60 minutter	3	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	600 ppm i 15 min	3	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	600 ppm i 30 min	3	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	600 ppm i 60 min	3	Nei	Nei	
H ₂ O ₂	400 ppm i 15 min	3	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	400 ppm i 10 minutter	4	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	400 ppm i 20 minutter	4	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	400 ppm i 30 minutter	4	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	600 ppm i 10 minutter	4	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	600 ppm i 20 minutter	4	Ja	Ja	
H ₂ O ₂	600 ppm i 30 minutter	4	Ja	Ja	
Ferskvann	60 minutter	2	Ja	Ja	
Ferskvann	120 minutter	2	Ja	Nei	Mye bakt.
Ferskvann	180 minutter	2	Ja	Nei	Mye bakt.
Ferskvann	240 minutter	2	Ja	Nei	Mye bakt.
Ferskvann	30 minutter	3	Ja	Ja	
Ferskvann	60 minutter	3	Ja	Ja	
Ferskvann	120 minutter	3	Ja	Ja	Brukt videre
Ferskvann	30 minutter	4	Ja	Ja	

5.3. Vurdering av amøbens følsomhet for gjentatte H₂O₂- og FV-behandlinger

Før eksponering av de pre-eksponerte- og naive amøbene for 600 ppm H₂O₂ i 20 minutter, lyktes det ikke å etablere et likt antall amøber fra de to gruppene innenfor «tellefeltene» i cellekulturflaskene. Dette skyldes trolig ulik tetthet i de to cellekulturene. Behandlingseffektene på de to amøbekulturene ble derfor ikke direkte sammenlignbare. I gruppen med naive amøber ble det observert en kraftig reduksjon i antall amøber etter eksponering, og en moderat cellevekst i perioden på seks dager etter behandlingen (figur 4A). I gruppen med pre-eksponerte amøber var amøbetallet ved behandling betydelig lavere enn i gruppen med naive amøber (figur 4A). Behandlingen reduserte også antallet amøber kraftig, og det var kun to celler per tellefelt i gjennomsnitt etter behandling (figur 4A). Vekstbetingelsene var derfor svært dårlig i denne gruppen etter eksponeringen.

Ved FV-eksponering av pre-eksponerte- og naive amøber i 30 minutter ble amøbeantallet kraftig, og tilnærmet like mye redusert etter eksponering i begge grupper. Det var også relativt lik vekst i begge grupper over perioden på seks dager etter eksponering (figur 4B). Her var antallet amøber likt før eksponering, men tellingene etter eksponering vurderes som usikre på grunn av svært redusert størrelse på amøbene og det var derfor utfordrende å telle alle amøbene innenfor «telleområdene»



Figur 4. Effekt og utvikling i *P. perurans* (antall) ved behandling med H₂O₂, 600 ppm i 20 minutter (A) og FV i 30 minutter (B). Pre-eksponerte = amøber som var behandlet tre ganger med 600 ppm H₂O₂ i 30 minutter (A) og amøber som var behandlet tre ganger med FV i 30 minutter (B). Naive = amøber som var behandlet for første gang med H₂O₂ (A) og FV (B). Kontroll = eksponert for rent sjøvann (positiv kontroll).

6. Diskusjon

Denne studien viser at *P. perurans* har evne til å overleve *In vitro* eksponeringer for H₂O₂ og FV. Overlevende amøber lot seg dyrke i kultur til høye celltettheter, og det ble gjennomført gjentatte behandlinger med den samme amøbepopulasjonen. Det lyktes imidlertid ikke å gjøre gode vurderinger for om gjentatte eksponeringer førte til redusert følsomhet hos amøbene for H₂O₂- og FV-behandling. Metoden som ble brukt; observasjon og telling av amøber i mikroskop, egnet seg til å registrere overlevelse og vekst, men ikke til å kvantifisere forskjeller mellom pre-eksponerte- og naive amøbekulturer.

Resultatene i *in-vitro* testene er i samsvar med observasjoner av overlevende amøber i smitteforsøk med H₂O₂- og FV-behandling av AGD-syk fisk (Hytterød mfl 2017). Resultatene viser også at det er tydelige dose-respons forskjeller ved *in-vitro* eksponeringer, der amøbene har lengst restitusjonstid ved de kraftigste behandlingene. Dette er i samsvar med lignende studier som nylig er gjennomført med FV i Tasmania (Lima mfl 2016 a,b) og med FV og H₂O₂ i Skottland (McCarty mfl 2015). Våre forsøk viser at amøbene overlever etter FV-behandling i to timer, men at FV-behandling utover to timer ser ut til å drepe alle amøbene. Lima mfl (2016b) kom frem til samme grenseverdi for FV-behandling. Ved *in-vitro* H₂O₂-eksponering ble det registrert overlevelse etter behandling med 1800 ppm H₂O₂ i 20 minutter. Det kan se ut til at *P. perurans* kan overleve høye H₂O₂-doser, men at amøbene da bruker svært lang tid på restitusjon. Dette ble observert ved svært langsom vekst i kultur etter eksponering.

En interessant observasjon i denne studien var en stor forskjell i følsomhet hos amøbene ved eksponering av flytende/frie amøber sammenlignet med eksponering av festede/fastsittende amøber. De frie amøbene i *in-vitro* testene var svært følsomme for behandlingene, mens festede amøber tolererte høyere behandlingsdoser. Dette gjaldt ved eksponering for både H₂O₂ og FV, og kan trolig forklares med at de festede amøbene har en delvis beskyttet overflate, nemlig den siden som vender ned mot underlaget. På tilsvarende måte kan det tenkes at festing til- og interaksjon mellom *P. perurans* og gjellepitelet beskytter amøbene mot badebehandlinger i anlegg. Interaksjonen mellom amøber og gjellevev er godt beskrevet i Wiik-Nielsen mfl (2016), og bilder i denne studien, som viser at amøbene lager «groper» i gjellevevet, gir støtte til «beskyttelsesteorien». I forsøk med behandling av AGD ved forskjellig gjellescore (score 1, 2 og 3) er det vist en bedre effekt mot *P. perurans* etter behandling ved score 1 enn ved score 3 (Hytterød mfl 2017). Årsaken kan være at amøbene sitter mere integrert i gjellevevet hos fisk med score 3, og at de der er mindre tilgjengelige for behandlingsmediet enn tidlig i AGD-utviklingen (score 1). Resultater fra *In-vitro* forsøkene, som viser at frie amøber er svært følsomme for behandling, støtter strategien med tidlig behandling mot AGD. Frittlevende- og nylig festede amøber vil da trolig være mere tilgjengelige for behandlingsløsningene.

Sammenligning av følsomhet for H₂O₂ og FV hos pre-eksponerte og naive amøber var utfordrende med tellemetoden, det vil si telling av *P. perurans* i mikroskop før og etter behandling. Faktorer som gjorde det utfordrende å vurdere eventuelle forskjeller i overlevelse og vekst:

- Lang restitusjonstid og langsom vekst selv ved forsiktig eksponering gjorde det vanskelig å skille overlevelse/veksthastighet mellom pre-eksponerte og naive amøber.
- Langsom vekst etter H₂O₂-eksponering gjorde det utfordrende å dyrke opp amøbene til et stort antall slik at en sammenligning på likt grunnlag med naiv kultur kunne gjennomføres.
- Utfordrende å behandle et tilnærmet likt antall amøber fra pre-eksponerte og naive grupper, og en direkte sammenligning av overlevelse/vekst blir derfor utfordrende.
- Endring i form og størrelse på amøbene gjør det vanskelig å observere amøbene i mikroskop like etter behandling, og det er utfordrende å telle celler med høy nøyaktighet.
- Ukontrollert bakterievekst, særlig ved FV-behandling, gjorde det utfordrende å se/telle amøber fordi bakteriene legger la som et belegg/teppe over amøbene, selv i cellekulturflasker. En teori kan være at den kraftige bakterieveksten etter behandling skyldes redusert evne hos amøbene til å spise bakterier, og at bakterien dermed får utvikle seg fritt.
- Behandlingen reduserte amøbene og et stort antall amøber ble vasket ut ved fjerning av behandlingsmediet og tilføring av ny MYB.

I forsøk på å sammenligne følsomhet for H₂O₂- og FV-eksponering mellom pre-eksponerte og naive amøber gjorde den store usikkerhetene i resultatene det vanskelig å konkludere. Vi vurderer metoden, som kun er basert på observasjon i mikroskop, dyrkning og estimering av antall amøbeceller, som for usikker til å konkludere om de pre-eksponerte amøbene har endret følsomhet for behandlingene. Metodikk for å besvare hypotesene bør bases på en annen tilnærming enn kun dyrkning og sammenligning av veksthastighet hos amøbekulturer. Dyrkning og kvantifisering ved hjelp av telling av amøber i mikroskop bør vurderes som et supplement til annen metodikk.

7. Referanser

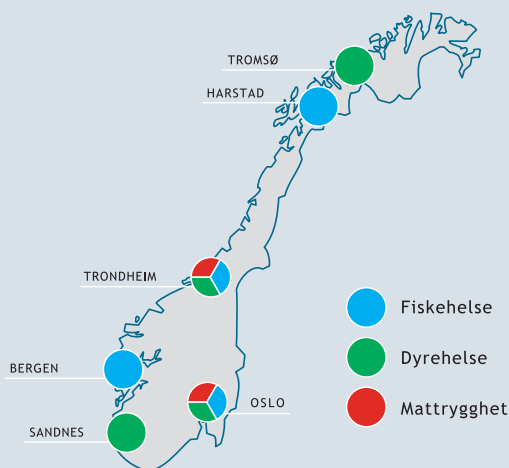
1. Amin, V.M., Olson, N.F. (1968). Influence of catalase activity on resistance of coagulase-positive staphylococci to hydrogen peroxide. *Appl. Microbiol.* 16, 267-270.
2. Baud, O., Greene, A.E., Li, J.R., Wang, H., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 24, 1531-1540.
3. Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P., McDermott, T.R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4594-4600.
4. Fiander, H. & Schneider, H. (2000). Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett.* 156, 117-124.
5. Helgesen, K.O., Romstad, H., Aaen, S.M., Horsberg, T.E. (2015). First report of reduced sensitivity towards hydrogen peroxide found in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in Norway. *Aquaculture Reports* 1, 37-42.
6. Hytterød, S., Andersen, L., Hansen, H., Blindheim, S.H., Poppe, T.T., Kristoffersen, A.B., Mo, T.A. (2017). AGD-behandlingsstrategier - Dose-respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann. Veterinærinstituttets rapportserie 10, 30s.
7. Lima, P. C., Taylor, R. S., Cook, M. (2016a). Involvement of contractile vacuoles in the osmoregulation process of the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*. *J Fish Dis*, 39(5), 629-633. doi:10.1111/jfd.12408
8. Lima, P. C., Taylor, R. S., Cook, M. (2016b). Pseudocyst formation in the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*: a short-term survival strategy to abrupt salinity variation. *J Fish Dis*. doi:10.1111/jfd.12588
9. McCarthy, U., Hall, M., Schrittwieser, M., Ho, Y.M., Collins, C., Feehan, L., Simons, J., White, P. (2015). Assessment of the viability of *Neoparamoeba perurans* following exposure to hydrogen peroxide. A study commissioned by the Scottish Aquaculture Research Forum (SARF). <http://www.sarf.org.uk>, 59s.
10. Mo, T.A., Hytterød, S., Olsen, A.B., Hansen, H. (2015). Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014. Veterinærinstituttets rapportserie 9-2015, 36s.
11. Nakamura, K., Kanno, T., Mokudai, T., Iwasawa, A., Niwano, Y., Kohno, M. (2012) Microbial resistance in relation to catalase activity to oxidative stress induced by photolysis of hydrogen peroxide. *Microbiol. Immunol.* 56, 48-55.
12. Powell, M.D. & Clark, G.A. (2003). *In vitro* survival and the effect of water chemistry and oxidative chemical treatments on isolated gill amoebae from AGD affected Atlantic salmon. *Aquaculture* 220, 135-144.
13. Roberts, S. D. & Powell, M. D. (2003). Reduced total hardness of fresh water enhances the efficacy of bathing as a treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 26, 591-599.
14. Spitz, D.R., Adams, D.T., Sherman, C.M., Roberts, R.J. (1992). Mechanisms of cellular resistance to hydrogen peroxide, hyperoxia, and 4-hydroxy-2-nonenal toxicity - the significance of increased catalase activity in H₂O₂-resistant fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 221-227.
15. Uhlich, G.A. (2009). KatP. contributes to OxyR-regulated hydrogen peroxide resistance in *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology* 155, 3589-3598.
16. Wiik-Nielsen, J., Mo, T.A., Kolstad, H., Mohammad, S.N., Hytterød, S., Powell, M.D. (2016). Morphological diversity of *Paramoeba perurans* trophozoites and their interaction with Atlantic salmon, *Salmo salar* L., gills. *J. Fish Dis*. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.2444>.

Faglig ambisjøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute