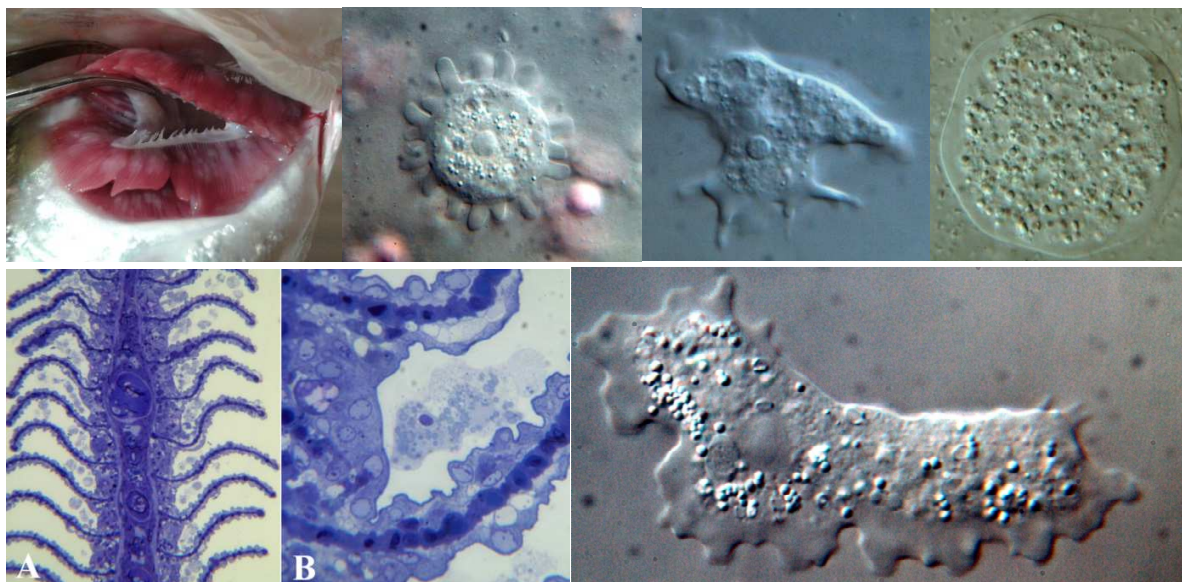


SLUTTRAPPORT



SLUTTRAPPORT FOR PROSJEKTET: ISOLERING OG KARAKTERISERING AV *PARAMOEBA PERURANS*: FENOTYPISK OG GENETISK KARAKTERISERING AV UTVALGTE KLONER FRA LAKS OG ANDRE VERTER.

RAPPORTDATO	FHF-PROSJEKTNUMMER	UTFYLT AV
15. juni 2018	901053	Are Nylund

SAMMENDRAG

Amøbisk gjellesykdom, AGD, forårsaket av *Paramoeba perurans* fremstod som et potensielt alvorlig problem for lakseoppdrett i Sør Norge i 2013. Det første offisielle utbruddet ble registrert i Sogn og Fjordane i 2006. Denne parasitten kom i tillegg til en rekke andre årsaker til gjellesykdommer (GS) hos laks i oppdrett på Vestlandet. Selv om AGD var godt kjent fra lakseoppdrett i Tasmania førte den raske økning i AGD-tilfeller, forårsaket av *P. perurans*, til et omfattende behov for ny kunnskap om denne parasitten. Dette førte til at laksenæringen i samarbeid med FHF ønsket igangsatt forskningsprosjekter for, om mulig, å fremskaffe nye strategier for å imøtegå problemet. FHF-prosjektet: 901053 hadde som mål å karakterisere (fenotypisk og genetisk) isolater av *P. perurans* for å fremskaffe nødvendige verktøy for studier av reservoar, spredning, historisk forekomst, identifisering av mulige virulensforskjeller, identifisering av virulensmarkører, temperaturtoleranse, salinitetstoleranse, og metoder for rask og sikker påvisning av parasitten.

Første steg i prosjektet var innhenting av isolater av *P. perurans* fra oppdrettslaks og utvalgte marine fisk fra fylker på Vestlandet og Trøndelag. Isolatene, som ble dyrket på agar og i flytende medier, ble klonet etter to passasjer, og de enkelte klonene ble benyttet til fenotypisk karakterisering, genetisk karakterisering, og i smittestudier for å klarlegge eventuelle virulensforskjeller.

Resultatene fra prosjektet viser at det er betydelige forskjeller mellom isolater av *P. perurans* med henblikk på temperaturtoleranse, salinitetstoleranse, veksthastighet, produksjon av spredningsstadier, morfologi, og virulens. Prosjektet har også vist at de fleste isolater av *P. perurans* kan lagres på flytende nitrogen. Det har imidlertid ikke vært mulig å påvise genetiske forskjeller, som kan forklare virulensforskjeller og annen fenotypisk variasjon, mellom kloner av *P. perurans* fra forskjellige fiskeverter og fylker i Sør Norge. Markører for studier av virulens og for spredningsstudier har ikke vært mulig å fremskaffe. Det kan ikke utelukkes at virulensvariasjon mellom kloner av *P. perurans* kan være et resultat av epigenetiske mekanismer (mekanismer som styrer om en egenskap kommer til uttrykk eller ikke) eller variasjon i mikrobiota på gjellene hos laks. De epigenetiske mekanismene kan tenkes utløst av ytre miljøfaktorer (salinitet, temperatur etc), mikrobiota på gjellene hos laks, eller variasjon i vertesresponser. Studier av historisk materiale fra perioden 2003 til 2017 viste at *P. perurans* var til stede på Vestlandet så tidlig som i 2004.

Basert på eksisterende data (manglende genetisk variasjon, nytt problem fra 2012) kan det synes som om *P. perurans* er relativt nylig introdusert til Norge, -kanskje med ballastvann fra internasjonal båttrafikk? Variasjon i salinitetstoleranse medfører at bruk av ferskvann for fjerning av amøben må gjennomføres på en slik måte at en ikke selekterer for økt salinitetstoleranse. Variasjon i temperaturtoleranse tilsier at parasitten kanskje kan spre seg til lakseoppdrett også i Nordland fylke. Påvisning av *P. perurans* hos villfanget rensefisk (leppefisk og rognkjeks) tilsier at flytting av slik fisk utgjør en potensiell risiko for spredning. I fremtidige studier av virulensvariasjon må det fokuseres på mulig epigenetiske mekanismer og gjellemikrobiota i tillegg til videre detaljerte studier av genomet til *P. perurans* og symbionten, *Perkinsela* sp.

Summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by *Paramoeba perurans*, emerged as a potential problem for salmon farming in southern Norway in 2013. The first official outbreak was registered in Sogn og Fjordane County in 2006. This parasite added to the already existing problems with gill diseases (GD) in western Norway. AGD was previously well known from Tasmanian salmon culture, but the steep increase in number of outbreaks in Norway triggered the need for more and new knowledge about *P. perurans* in Norwegian waters. The industry and FHF decided to launch several research projects on treatments and basic biology of the parasite to see if new strategies could be found in the combat against the parasite. This project, FHF-project: 901053, set out to characterize (phenotypic and genetic) isolates of *P. perurans* with the aim to provide tools for studies of reservoirs, transmission, historical distribution (and first occurrence in Norway), and identifying differences in virulence, markers of virulence, temperature tolerance, salinity tolerance, and methods for fast and safe detection of *P. perurans*.

The first step in the project was collection of isolates of *P. perurans* from farmed salmon and other marine fish species connected to salmon farming in southern Norway. The isolates, cultured on agar (malt yeast agar) and in flouting media (malt yeast broth), were cloned after two passages, and the clones were used in phenotypic - and genetic characterization and in challenge experiments to reveal differences in virulence.

The results of the phenotyping revealed significant differences between clones of *P. perurans* with respect to temperature and salinity tolerance, growth rate, production of transmission stages, morphology, and virulence. It was also shown that the majority of the clones can be stored in liquid nitrogen without losing the viability. It was not possible, however, to reveal any genetic differences between the clones that could explain the differences in virulence and other phenotypic variation. Hence, it was not possible to provide any markers for identification of virulence. It cannot be excluded that the variation in virulence could be due to epigenetic mechanisms (traits that may result from external or environmental factors) or variation in gill microbiota of the infected salmon. Examples of factors that may trigger the epigenetic mechanisms could be salinity, temperature, microbiota or host responses. Studies of historical material, collected in the period 2003 – 2017, from farmed salmon show that *P. perurans* was present in western Norway as early as in 2004.

Based on the existing knowledge it may seem as if *P. perurans* has recently (last two decades) been introduced to Norwegian farmed salmon, -possibly via ballast water from international boat traffic. Variation in salinity tolerance means that use of fresh water for removal of the parasite have to be performed in such a way that it does not increase the fresh water tolerance, while the variation in temperature tolerance suggest that the parasite may not yet have reached its possible geographical distribution in Norway. Detection of *P. perurans* in cleanerfish, wrasse and lumpfish, represent a potential risk of spreading the amoeba via movement of these from southern to the more northern parts of Norway. Future studies of virulence variation among clones of *P. perurans* should focus on epigenetic mechanisms, gill microbiota, host responses, and a more detailed examination of the genome of the parasite and its symbiont, *Perkinsela* sp..

INNLEDNING

Et betydelig problem for produksjon av Atlantisk laks i Norge har siden midten av 90-tallet vært forekomst av gjellesykdommer hvor hovedvekten av disse tilfellene har vært lokalisert til Vestlandet. En rekke med forskjellige patogener er knyttet til gjelleproblemer hos laks, og siden sommeren 2012 har flere anlegg hatt betydelige tap assosiert med tilstedeværelse av amøben, *Paramoeba perurans*. Flere av disse anleggene har fått diagnosen amøbegjellesykdom (AGD – amoebic gill disease). *P. perurans* forekommer i oppdrett av laksefisk i de fleste lakseproduserende land og ble først påvist i Norge i 2006 mens siden 2013 har det årlig vært registrert betydelige tap knyttet til denne parasitten. I tillegg til laksefisk har amøben vært påvist på flere marine arter som bergylte, rødnebb/blåstål, rognkjeks, sei og makrell. Det kan ikke utelukkes at alle disse artene kan være viktige for spredning av parasitten mellom oppdrettspopulasjoner, men det kan også være at det foreligger flere varianter av *P. perurans* hvor disse er tilpasset forskjellige marine fiskearter. Data fra felt (lakseanlegg) og fra innledende smitteforsøk indikerer at forskjellige kloner av *P. perurans* har forskjellig virulens ved smitte på laks. Kunnskapen om denne parasitten i norske farvann er imidlertid svært mangelfull med henblikk på variasjon mellom kloner, virulens, vertspreferanser, vekstbetingelser, naturlige reservoar, spredning, og toleranse for forskjellige terapeutiske behandlinger. Hovedmålene med dette prosjektet var å fremskaffe kunnskap om variasjon (fenotypisk og genetisk) hos kloner av *P. perurans* fra laks i oppdrett og fra utvalgte villfiskarter, etablere et system for nedfrysing av isolater, utvikle verktøy for studier av spredning, og fremskaffe virulensmarkører. For å nå disse målene ble det samlet inn isolater av *Paramoeba* spp fra alle områder i Norge med AGD (i tillegg til et referanse-isolat fra Skottland).

Prosjektet ble delt inn i seks arbeidspakker: API: *Fenotypisk karakterisering av amøbekloner og etablering av nedfrysningmetode*. APII: *Smitteforsøk og cellekulturstudier for å kartlegge vertstropisme og virulens hos utvalgte kloner*. APIII: *Fullgenomsekvensering av en virulent klon av *P. perurans**. APIV: *Genotyping av kloner*. APV: *Karlegging av geografisk og historisk utbredelse, identifisering av virulensmarkører, og variasjon hos isolater fra oppdrett og villfisk*. APVI: *Utvikling av real time RT PCR for rask og sikker identifisering av arter (*Paramoeba* spp) og virulente kloner av *P. perurans**. Prosjektet hadde en kostnadsramme på 5 473 000.- NOK.

Prosjektgruppen: Professor Are Nylund, Universitetet i Bergen (prosjektleder), Dr. Linda Andersen, Industrielaboratoriet (Arbeidspakkeleder), M.sc. Steffen Blindheim, Industrielaboratoriet, Professor Egil Karlsbakk, Universitetet i Bergen, Stian Nylund, Pharmaq Analytiq (Arbeidspakkeleder). To avdelingsingeniører var midlertidig ansatt på prosjektet; Dr. Christiane Trösse (Mats Martin Kindt erstattet Trösse 1.desember 2016), og Dr. Dario Pistone. I tillegg gjennomførte tre masterstudenter (Ole Marin Dahle, Martin Røed, Mats Martin Kindt) sin oppgave knyttet til prosjektet.

Styringsgruppen for prosjektet hadde følgende medlemmer: Carl. Erik Arnesen, Firda Sjøfarmer AS, Olav Breck, Marine Harvest, Bjarne Reinert, Lerøy.

PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Hovedmålene med dette prosjektet er å fremskaffe kunnskap om variasjon hos kloner av *P. perurans* fra laks i oppdrett og fra utvalgte villfiskarter, etablere et system for nedfrysing av isolater, utvikle verktøy for studier av spredning, og fremskaffe virulensmarkører.

Utviklingen av Akvakulturnæringen i Norge er i stor grad avhengig av kunnskapsgenerering fra forskningsmiljøer som fokuserer på fiskehelse/fiskesykdommer. Gjellesykdommer er blant de mest tapsbringende faktorer i produksjon av laks og de siste årene har AGD, assosiert med *P. perurans*, påført næringen store tap. Forebygging og behandling forutsetter at nødvendig kunnskap om denne amøben er tilgjengelig slik at korrekte og optimale tiltak kan gjennomføres. Forskning på amøben forutsetter at denne kan dyrkes og holdes i laboratorier gjennom hele året med moderate kostnader, og dette prosjektet skal etablere den nødvendige teknologien. Prosjektet skal også fremskaffe kunnskap om variasjon mellom isolater av *P. perurans*, dvs variasjon i virulens, vertstropisme og geografisk forekomst. Denne kunnskapen vil være nødvendig for at næringen skal kunne implementere nødvendige og målrettede tiltak for å forhindre fremtidig tap knyttet til amøbeinfeksjoner. Prosjektet skal også utvikle diagnostikk som skal kunne skille mellom virulente og mindre virulente varianter av *P. perurans* slik at tiltak mot amøben vil være effektiv med en lavest mulig kostnad.

Viktige resultatmål for prosjektet var:

- Etablering dyrkingssystemer for klonede isolater av *P. perurans* og metode for nedfrysing og opptining av disse klonene.
- Fenotypisk karakterisering av kloner av *P. perurans* med fokus på temperaturtoleranse, salinitetstoleranse, veksthastighet, antibiotikaresistens, morfologi, og virulens.

- c. Genetisk karakterisering for identifisering av virulensmarkører og markører for studier av reservoar, spredning (genotyping) og historisk forekomst i Norge.
- d. Utvikling av spesifikk real time RT PCR for rask påvisning og kvantifisering av *P. perurans* på gjeller hos laks og i miljøprøver.

PROSJEKTGJENNOMFØRING

Et sentralt første steg i prosjektet var isolering av *P. perurans* fra flest mulig geografiske områder langs norskekysten hvor amøben var til stede og fra andre fiskearter (bergylte, rogkjenks og sei) i tillegg til laks (**API & II**). Isolater av amøber, inkludert *P. perurans*, ble hentet fra Rogaland, Hordaland, Sogn og Fjordane, Møre og Romsdal og Trøndelag, dvs områder hvor lakseoppdrett har registrert problemer med AGD. Neste steg var å kloner amøbene fra de enkelte isolatene for så å identifisere de enkelte klonene. To forskjellige metoder ble benyttet i forbindelse med kloning av isolatene; a) Overføring av enkle celler til nye agarskåler, og b) fortykning av løsnings med amøber og fordeling av disse i NUNC-brett (brønner med kun en amøbe ble videreført som klon). Alle kloner ble identifisert ved sekvensering av rRNA gener (i hovedsak 18S). *P. perurans* ble isolert og klonet fra alle ovenfor nevnte fylker. I tillegg ble tre kloner av *P. pemaquidensis* isolert fra laks og leppefisk i Hordaland, to kloner av *Tetramitus* sp. isolert fra laks i Sogn og Fjordane og Hordaland, og en klon av *Plathyamoeba* sp. fra lakselus i Hordaland.

API

Alle klonede isolater av *P. perurans* ble fenotypisk karakterisert med henblikk på morfologi, vekstkarakteristika (fastsittende, tidspunkt for dannelse av flytestadier, veksthastighet), temperaturtoleranse, salinitetstoleranse, og antibiotika toleranse (API). *P. perurans* klonene ble dyrket på Malt Yeast Agar (MYA: 0.01 % Bacto™ Malt Extract, 0.01 % Bacto™ Yeast Extract, 2.0 Bacto™ Agar in 34 ‰ sterile sea water), i Malt Yeast broth (MYB; 0.01 % Bacto™ Malt Extract, 0.01 % Bacto™ Yeast Extract in 34 ‰ sterile sea water), og på RT-gill celler. Veksten på RT-gill celler var meget god, men vi valgte likevel å fokusere på den optimaliserte utgave av MYA og MYB da disse systemene var enklere å holde. Alle vekstforsøk ble gjennomført som triplikater, og i temperaturtoleranse-forsøkene ble følgende temperaturer benyttet; 4 °C, 12 °C, 15 °C, og 21 °C, og veksten fulgt over en periode på 14 dager (Blindheim et al. submitted).

Ved test av salinitetstoleransen til kloner *P. perurans*, ved 16 °C, ble følgende konsentrasjoner benyttet: 34 ‰, 30 ‰, 25 ‰, og 20 ‰ (API). Eksperimentelle studier ved ILAB hadde alt vist at det ikke var mulig å etablere smitte på laks ved 25 ‰, men hvis amøben er etablert på gjellene vil den kunne opprettholde infeksjonen ved denne saliniteten. Ti kloner av *P. perurans* ble testet i salinitetstoleranse forsøkene, -alle testet i triplikater (Blindheim et al. submitted). Konsentrasjonen av hver klon ble så bestemt ved telling i tellekammer (2 x 3 µl), og 200 amøber ble tilsatt hver brønn før brettene ble inkubert på 16°C. For å undersøke om amøbene var i stand til å vokse som normalt etter endt behandling ble amøbene overført til normale vekstbetingelser (34 ‰) 20 dager etter inokulering. Amøbene ble holdt ved 16 °C i 11 dager før en visuell vurdering av vekst ble foretatt.

Alle klonene av *P. perurans* har forskjellig bakteriesammensetning i dyrkingsmediet. Bakteriene ble forsøkt fjernet ved hjelp av antibiotika (penicillin, streptomycin, amphotericin B, gentamycin sulfat,

ampicilin). Målet var å overføre klonene til et medium bestående av døde bakterier. Vi har blant annet gjennomført dette for *Acanthamoeba castellanii* hentet fra gjellene på karpefisk i ferskvann. Bakteriefrie kloner av *P. perurans* var et viktig mål i forbindelse med smitteforsøk for testing av virulens, da det er ukjent hvilken effekt disse bakterien kan ha på laksens gjellehelse (API).

I de morfologiske studiene av *P. perurans* ble det benyttet kulturer høstet 7 dager etter passering og vasket ved sentrifugering og saltvann for å redusere mengden bakterier (API). Ti µl amøbesuspensjon ble brukt for å lage *hanging-drop* preparater som ble inkubert opp-ned i minst 30 minutter før mikroskopering. Ved mikroskopering ble minimum 30 amøber fra hvert isolat fotografert ved 1000x forstørrelse. Arealet til amøbene ble målt manuelt i ImageJ med *freehand selection tool*.

Et høyt antall av de klonede isolatene av *P. perurans* var naturlig infisert med et medlem av Chlamydiales, *Candidatus* Syngnamydia salmonis (*Simkaniaceae*), tidligere beskrevet fra gjellene på laks som epitheliocystis agens (Nylund et al. (2014). Characterization of 'Candidatus Syngnamydia salmonis' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium causing epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Arch. Bacteriol. DOI 10.1007/s00203-014-1038-3). Det at det var mulig å dyrke denne bakterien i *P. perurans*, samtidig som bakterien var assosiert med epitheliocystis hos laks, motiverte en nærmere beskrivelse (feno- og genotyping av arten). Vekst av *Ca. S. salmonis* i *P. perurans* ble dokumentert, morfologiske stadier påvist, og arten genotypet etter de kriterier som gjelder for medlemmer av Chlamydiales (API).

Et viktig steg i arbeidet med kloner av *P. perurans* var å etablere et system for nedfrysing og opptining (N&O) av kloner, dvs etablere en mulighet for lagring av amøben over lengre tid (API). Protokollene som ble testet for N&O av *P. perurans* var basert på eksisterende protokoller utviklet for kryopreservering. Klonene ble hyppigere splittet før nedfrysing, cellene høstet, konsentrasjonen øket ved hjelp av sentrifugering, og så resuspending i et frysemedium (10% DMSO i sterilfiltrert sjøvann). Cellesuspensjonene ble overført til kryorør og plassert i en Nalgene Mr. Frosty frysecontainer ved - 80 °C i tre timer før lagring på flytende nitrogen. I forsøkene ble det benyttet både flytestadier og fastsittende stadier hver for seg i separate rør. Ved opptining ble cellene plassert i vannbad (23 °C og < 5 minutter) og så overført til cellekulturflasker (15 °C) til vekst av amøbene ble observert. Rett etter tining ble DMSO (potensielt cytotoxisk) fjernet ved forsiktig sentrifugering (1000g i 5 minutter) og supernatanten fjernet før cellene ble overført til celle-flasker. Forsøk viste imidlertid at DMSO ikke var toksisk for *P. perurans* hvilket betyr at det strengt tatt ikke er nødvendig å fjerne DMSO før dyrking. Det ble også testet om kondisjonert medium (MYB) med bakterier gav en bedre overlevelse ved opptat etter tining.

APII

Klonene av *P. perurans*, samt to kloner av *P. pemaquidensis* og en klon av *Tetramitus* sp., ble benyttet i smitteforsøk for kartlegging av virulens. Det ble totalt gjennomført fem smitteforsøk med flere kloner i hvert forsøk. Smitteprotokollene inkluderte både badsmitte og ko-habitantsmitte, forskjellige temperaturer (12 °C, 15 °C og 16 °C), laks med forskjellig opphav, modifisering av bakteriemedium for oppdyrking av klonene, og forskjellige splitteregimer før smitte. Variasjon i virulens ble målt med følgende parameter; a) atferdsendringer, b) gjelleforandringer (Gill score, GS), c) histopatologi, d) real

time RT PCR (kvantifisering av *P. perurans*), og e) overføringsevne (smitte fra positiv laks til kohabitanter).

Basert på kunnskaper om virulensmekanismer (hovedsakelig forskjellige proteaser; serine proteaser, metalloproteaser, cystein proteaser, elastaser, fosfolipaser, cytotoxiske proteaser) hos *Acanthamoeba castellanii* valgte vi å teste forskjellige real time RT PCR assay rettet mot slike proteaser fra *P. perurans*. Disse ble testet både på klonede kulturer av *P. perurans* og på lakseggjeller (fra smitteforsøk) med forskjellige gjelleskader og mengde *P. perurans* (basert på real timer RT PCR).

APIII

To forskjellige kloner av *P. perurans* (lav-virulent og moderat virulent) ble dyrket opp for RNA og DNA ekstraksjon for Illumina sekvensering (**Tabell 1**). DNA og RNA sekvensene fra isolatene ble plassert i følgende kategorier: 1) Amoebozoa (Taxid 554915), 2) Euglenozoa (taxid: 33682), 3) Chlamydiae (taxid: 204428), 4) bacteria (taxid:2), og 5) ingen av de før nevnte kategoriene. Disse sekvensene dannet utgangspunktet for identifisering av aktuelle gener fra *P. perurans*, *Perkinsella* sp. og *Cand. S. salmonis*, og danner grunnlaget for genetiske karakterisering av isolatene (Arbeidspakkene IV og V) og til utvikling av nye real time RT PCR assays (Arbeidspakke VI).

Klon	Nukleinsyre	Total reads	Mapped reads	Contigs	Sum bp
R18/15Pp	DNA	134 934 736	130 402 359	36 696	49 092 599
R18/15Pp	RNA	158 900 188	148 833 326	68 728	53 696 039
H03/14Pp	DNA	80 051 666	58 871 908	17 457	72 337 110
H03/14Pp	RNA	118 702 484	76 152 203	28 016	43 447 303

Tabell 1. Oversikt over data fra Illumina sekvensering.

APIV

Hovedmålene i arbeidspakken APIV var; a) Identifisering av virulens markører eller virulens gener, og b) Identifisering av genetisk variasjon (VNTR & MLST analyser) som skulle kunne brukes i spredningsstudier og til kartlegging av geografisk variasjon. Basert på sekvensene fra arbeidspakke III ble det valgt ut gener og VNTR-områder (variable numbers of tandem repeats) som skulle kunne brukes til genotyping av kloner av *P. perurans*. Ved valg av kodende gener ble det fokusert på husholdningsgener da disse har vist seg egnet, hos andre organismer, til «multi locus sequence typing» MLST og «multi locus sequence analysis» MLSA.

APV

Hovedfokus i APV var kartlegging av geografisk og historisk utbredelse in Norge, identifisering av utbredelsen til virulensmarkører, og karlegging av variasjon mellom isolater fra oppdrett og villfisk. Det innledende arbeidet bestod av *gene-mining*, i de to genomene fra *P. perurans* som ble sekvensert (H03/14Pp og R18/15Pp) i APIII. Det ble også gjennomført en geografisk og historisk kartlegging av *P. perurans* hos norsk oppdrettslaks basert på materiale innsamlet i perioden 2003 til 2017.

APVI

Et av hovedmålene med APVI var utvikling av real time RT PCR assay for rask og sikker identifisering av *P. perurans* da en nær slektning, *P. pemaquidensis*, ofte også er til stede på gjellene hos laks med AGD. Med utgangspunkt i sekvensene fra APIII, og sekvenser av *P. pemaquidensis* fra norsk oppdrettslaks og rensefisk, ble et nytt spesifikt *P. perurans* assay designet. Et sekundært mål var å utvikle assay for differensiering av *P. perurans* med forskjellig virulens. Dette skulle baseres på resultatene fra APIV og AP V.

OPPNÅDDE RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON

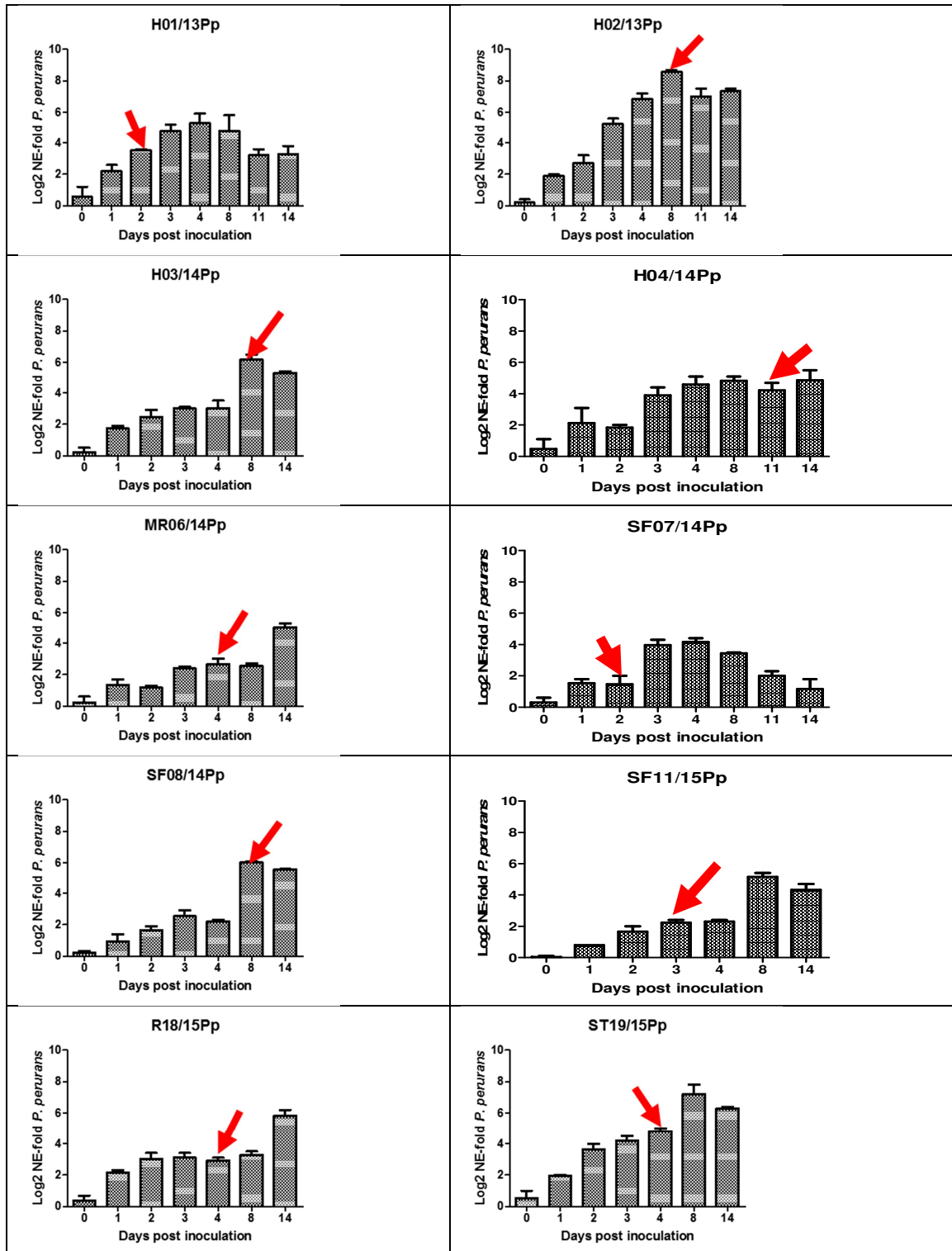
API

Testing av fenotypiske egenskaper viser klare forskjeller mellom enkelte kloner av *P. perurans*.

I temperaturforsøkene var veksten til *P. perurans* ved 4 °C saktere enn ved 12 °C og 15 °C og det ble ikke observert flytestadier ved denne temperaturen. Veksten ved 12- 21 °C var god for de fleste kloner av *P. perurans* og flytestadier ble observert på alle tidspunkt ved disse temperaturene. Likevel var det klart at etter 14 dager ved 21 °C så var kulturene av *P. perurans* i relativt dårlig forfatning og antall amøber lavt. Det kan se ut som om de ulike klonene av *P. perurans* har noe ulik temperatortoleranse. De vokser sakte ved 4 °C og bra ved 12 og 15 °C. Ved 21 °C vokser de fleste bra i begynnelsen (dag 3) men det virker som om de "brenner raskere ut". Dette vises i real-time RT-PCR resultatene ved at RNA nivåene er relativt stabile fra dag 3 til dag 14. Ved 4 °C kan ikke den mest utstrakte lange pseudopodietypen observeres for noen av isolatene, og amøbene framstår som noe mer avlepnede i formen med mange, kortere pseudopodier (Blindheim et al submitted). Det at *P. perurans* synes å vokse godt og produsere flytestadier (spredningsstadier) ved 12 – 16 °C stemmer godt med feltobservasjoner som viser at AGD i hovedsak opptrer i sommer-høst perioden i Sør Norge. I felt har en observert AGD ved temperaturer helt ned mot 10 °C (A. Nylund pers.obs.).

Ved dyrking av *P. perurans* ved 15 °C viser klonene stor variasjon i vekstmønster (**Figur 1**). Vekstmønstrene ble målt basert på endringer i mengde RNA (vha real-time PCR) fra fastsittende amøber i bunnen av cellebrønnene. Tidspunkt for dannelse av flyteformer ble også notert. Noen isolater (H01/13Pp og H02/13Pp) hadde en jevn økning i RNA nivåer fra dag 0 til dag 4 (H01/13Pp) og dag 8 (H02/13Pp), mens andre isolater hadde en mer ujevn økning i RNA nivåer. Det var også store forskjeller i mengden amøbe-RNA som ble produsert i forhold til startkonsentrasjonen. Minste økning ble målt for SF07/14Pp med 14,5 ganger mer RNA på dag 4, mens den største økningen ble målt for isolat H02/13Pp, hvor det på dag 8 var 326 ganger mer RNA enn ved start (målt på kun adherente).

Dannelse av flytende amøber forekom på forskjellige tidspunkter for de ulike isolatene, og utseende til disse kunne også variere mellom isolatene. Basert på observasjoner i mikroskop sammen med real-time RT-PCR data synes flytere å bli produsert når tettheten av adherente amøber på bunnen nådde et platå.



Figur 1: Vekstmønster for 10 ulike kloner av *P. perurans* målt over 14 dager ved 15 °C. Verdiene er normalisert og viser relativ mengde *P. perurans* RNA (kun adherente) per uttak i forhold til dag 0. Rød pil viser til første observasjon av flytende amøber, uavhengig av mengde.

Ved syv dager etter oppstart av salinitetstesten var de fleste kloner av *P. perurans* i god vekst ved 34 – 25 ‰, mens det ved 20 ‰ var lite vekst, men fortsatt levende amøber til stede. Ved mikroskopi 17 dager etter inokulering ble det observert store mengder både adherente og flytende amøber i brønnene med 34-25 ‰. Adherente amøber ved 20 ‰ ble kun observert for isolat H02/13Pp og H03/14Pp, mens det for de øvrige isolatene på denne saliniteten kun ble observert ingen eller opprundede amøber. Real-time RT-PCR resultatene viser at nivået av *P. perurans*-RNA var relativt stabilt for amøbene holdt ved de tre høyeste salinitetene (34, 30 og 25 ‰) 7 dager etter inokulering – dog med noe synkende RNA nivåer fra 34 ‰ til 25 ‰ for de fleste isolatene. Isolat SF11/15Pp viser en tydelig salinitet-avhengig reduksjon i RNA nivåer. RNA-nivået for amøbene holdt ved 20 ‰ var betydelig lavere enn for de øvrige salinitetene. Ved uttak 2, som var 17 dager etter inokulering, er det samme trend som ved 7 dager etter inokulering for de tre høyeste salinitetene, mens nivået av amøbe-RNA er på sitt laveste gjennom hele perioden i brønnene med 20 ‰. ST19/15Pp ser også ut til å vokse bedre ved 30 ‰ enn ved de andre salinitetene, både etter 7 og 17 dager. Elleve dager etter overføring tilbake til 34 ‰ MYB viste de aller fleste isolatene fra 34 ‰, 30 ‰ og 25 ‰ god vekst. Det var også god vekst i brønnene med amøber fra 20 ‰ for de fleste isolatene, men betydelig færre amøber enn i de øvrige salinitetene – dette trolig på grunn av et mindre antall amøber ved overføring. Det var ingen vekst i brønnene med amøber fra 20 ‰ for isolat MR06/14Pp.

Paramoeba perurans er i stand til å proliferere ved 34 ‰, 30 ‰ og 25 ‰ *in vitro*. Det er best vekst ved 34 ‰ og 30 ‰, og litt redusert ved 25 ‰. Ved 20 ‰ ser det ut til at prolifereringen stopper opp, noe som også var inntrykket etter mikroskopering direkte på kulturene, samt ved real-time RT-PCR analyser. Til tross for ingen eller sterkt redusert proliferasjon ved 20 ‰ i 20 dager, er de fleste isolater av *P. perurans* raskt i stand til å gjenoppta normal proliferasjon når saliniteten blir økt til 34 ‰.

Tabell 2: Overlevelse ved standard betingelser for *P. perurans* (16°C i MYB) etter 20 dager med redusert salinitet.

Isolat	34 ‰	30 ‰	25 ‰	20 ‰
H01/13Pp	+	+	+	+
H02/13pP	+	+	+	+
H03/14Pp	+	+	+	+
H04/14Pp	+	+	+	+
MR06/14Pp	+	+	+	-
SF07/14Pp	+	+	+	+
SF08/14Pp	+	+	+	+
SF11/15Pp	+	+	+	+
R18/15Pp	+	+	+	+
ST19/15Pp	+	+	+	+

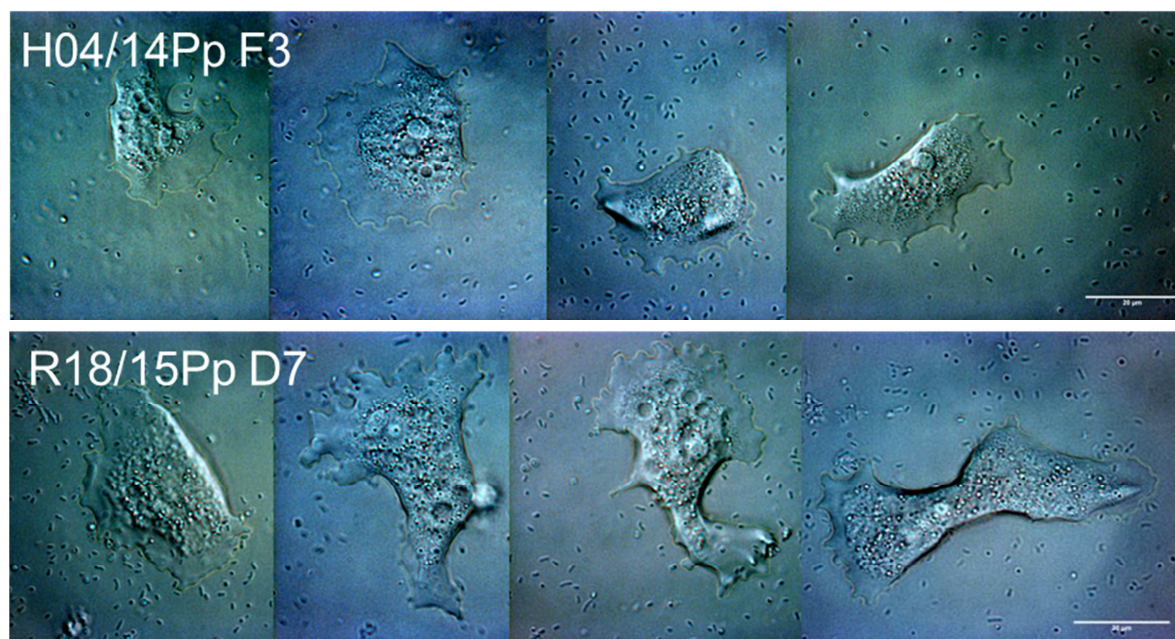
Disse forsøkene viser en viss variasjon i salinitetstoleranse hos *P. perurans*. Det er derfor ikke helt utenkelig at feil bruk av ferskvann i forbindelse med AGD behandling vil kunne selekttere *P. perurans* varianter med en bredere salinitetstoleranse og dermed redusere effekten av ferskvannsbehandling (Blindheim et al. submitted).

I forsøket på å fjerne levende bakterier fra klonene med *P. perurans* var det mulig å oppnå en betydelig reduksjon i mengde bakterier, men dette resulterte samtidig i en betydelig reduksjon i adherente amøber. Tilsetning av inaktiverede bakterier kunne ikke motvirke denne reduksjonen. Basert på disse forsøkene kan det synes som om antibiotika reduserer veksten og overlevelse til både bakterier og *P. perurans*. Det har ikke vært mulig å få kloner av *P. perurans* over på et medium uten levende bakterier. Alle smitteforsøk med disse klonene inkluderer derfor også et ukjent antall arter bakterier.

De morfologiske studiene av *P. perurans* viste klare forskjeller i form og areal (størrelse) (**Tabell 3** og **Figur 2**).

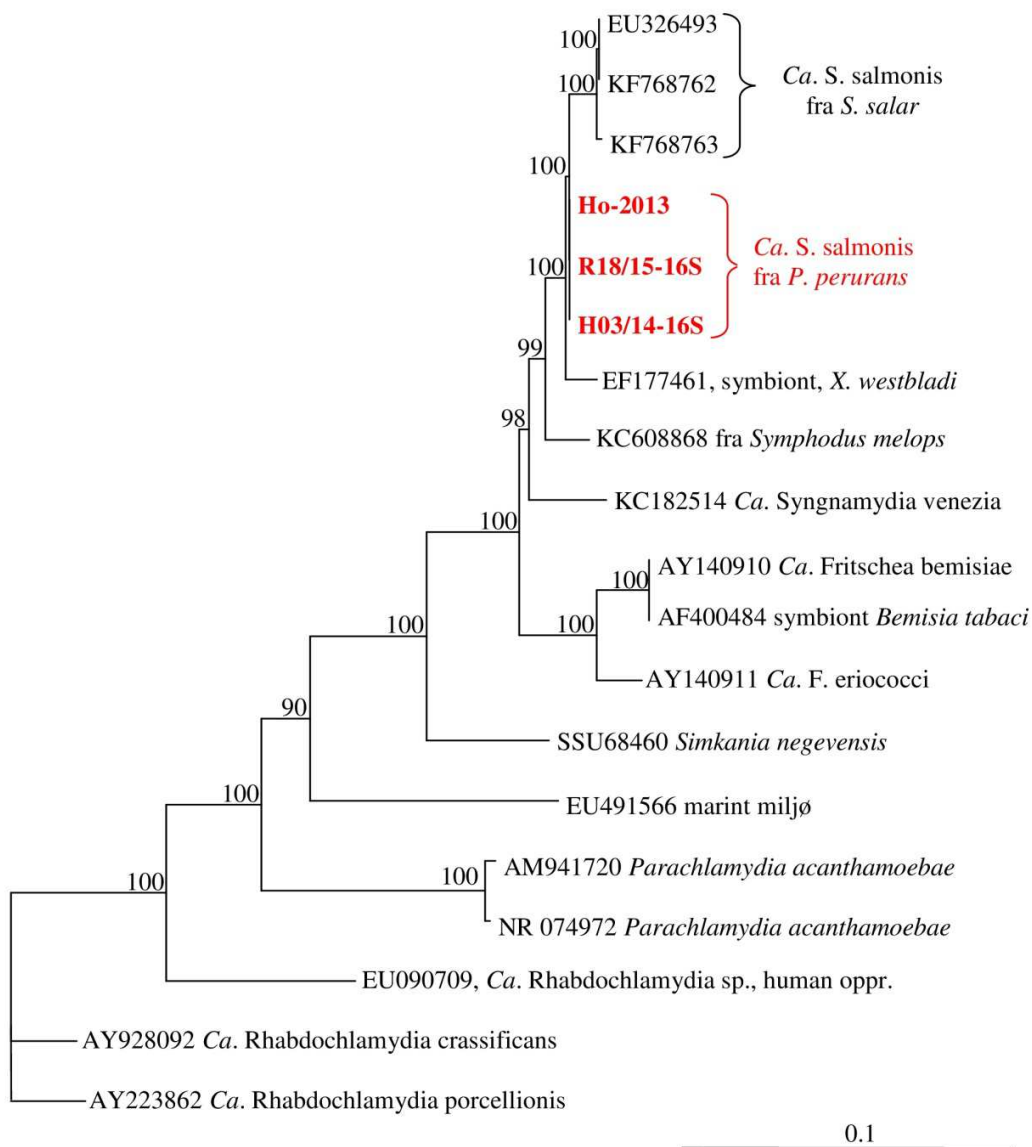
Tabell 3: Målt areal av *Paramoeba perurans* kloner.

Measurement		Cell area (μm^2)				Cell length (μm)				Cell width (μm)			
Code	N	Mean	s.d.	Min	Max	Mean	s.d.	Min	Max	Mean	s.d.	Min	Max
H01/13Pp	35	550	142	345	859	36.6	5.8	25.1	52.5	23.2	3.3	17.8	29.1
H02/13Pp	x												
H03/14Pp	30	907	227	622	1569	43.8	6.7	32.9	64.7	30.5	3.9	23.2	39.3
H04/14Pp	39	536	169	253	1039	36.1	7.1	23.8	57.3	24.3	4.7	15.5	37.2
MR06/14Pp	x												
SF07/14Pp	x												
SF08/14Pp	30	764	193	443	1182	41.1	6.2	28.3	55.0	28.5	3.8	19.8	35.7
SF11/15Pp	40	477	152	307	1053	31.8	7.5	24.9	54.7	22.8	2.9	16.8	31.8
R18/15Pp	35	881	123	698	1258	52.9	7.4	35.3	71.3	30.0	4.2	22.6	39.7
ST19/15Pp	39	573	130	351	914	33.9	3.5	26.8	41.3	25.7	3.2	19.4	33.8



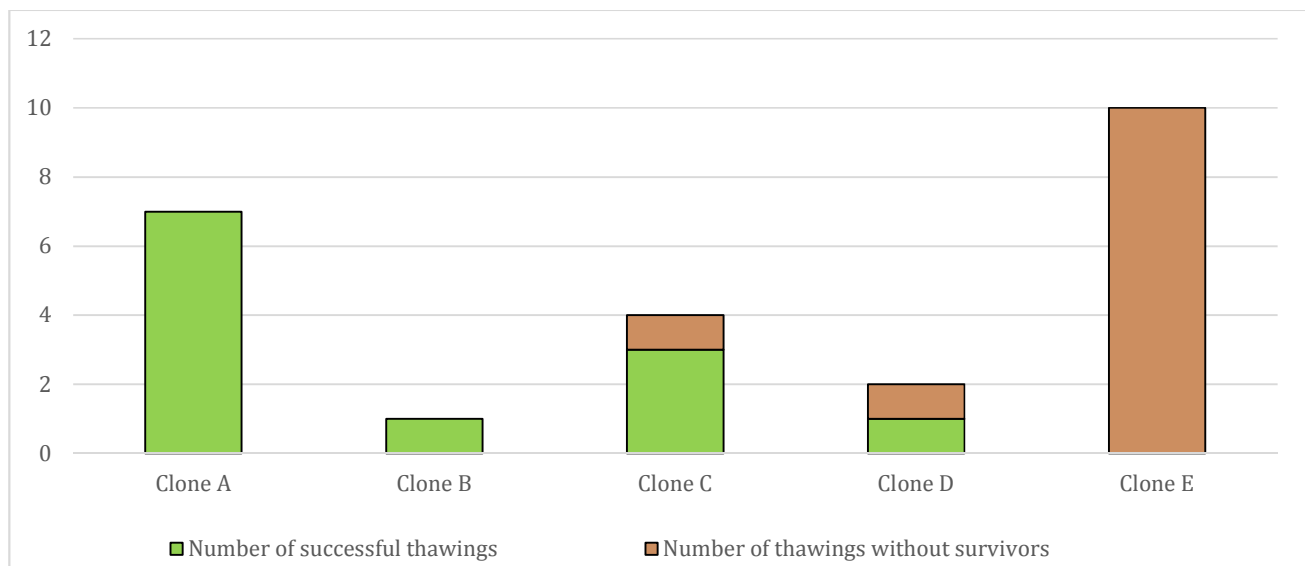
Figur 2: Eksempler på morfologi hos *P. perurans* kloner i *hanging-drop* preparater. Bilder tatt med 1000x forstørrelse. Bar = 20 μm .

Candidatus Syngnamydia salmonis (*Chlamydiales*, *Simkaniaceae*) er tidligere beskrevet som en bakterie som forårsaker epitheliocystis på gjellene til laks (*Salmo salar*) i Norge. 16S rRNA gener fra varianten i *P. perurans* viser 99,2 % identitet med *Ca. S. salmonis* fra laksegjellene og disse skal derfor tilhøre samme art (**Figur 3**). De komplette rRNA genene og aminosyresekvensene, SucA, PepF, Adk, HemL, DnaA, FtsK of FabI viser at denne arten er et nytt medlem av Simkaniaceae, og den første epitheliocystis agens som er dyrket fra gjeller hos fisk (Nylund et al. 2018). Denne bakterien synes ikke å være av betydning for virulens, da både kloner med og uten bakterien kan være høyvirulente.



Figur 3. Slektskapet mellom *Cand. S. salmonis* og andre medlemmer av Chlamydiales.

Totalt ble seks forskjellige kloner av *P. perurans* testet med henblikk på nedfrysing og opptining (N&O), hvor fem av disse ble testet i minst to separate forsøk (totalt 14 nedfrysinger). Basert på nedfrost materiale ble 24 opptiningsforsøk gjennomført og av disse var 12 en suksess (**Tabell 4**). To av klonene gav 100 % suksess (A syv av syv forsk, B et av et forsøk), mens klon C gav positivt resultat i tre av fire forsøk og klon D i ett av to forsøk. Det var ikke mulig å tine klon E (10 av 10 forsøk var negative). Vekst i cellekulturflakene ble observert mellom 7 og 23 dager etter opptining. Det totale antall amøber før og etter tining var minimalt forskjellig. Ingen forskjell i vitalitet etter opptining ble observert. Bruk av kondisjonert medium (med bakterier) synes å øke suksessen for overlevelse etter tining.



Figur 4 . Tiningsforsøk for fem forskjellige kloner av *P. perurans*.

Basert på disse data kan det synes som om de fleste kloner av *P. perurans* kan lagres på nitrogen og senere tines og brukes i nye forsøk.

APII

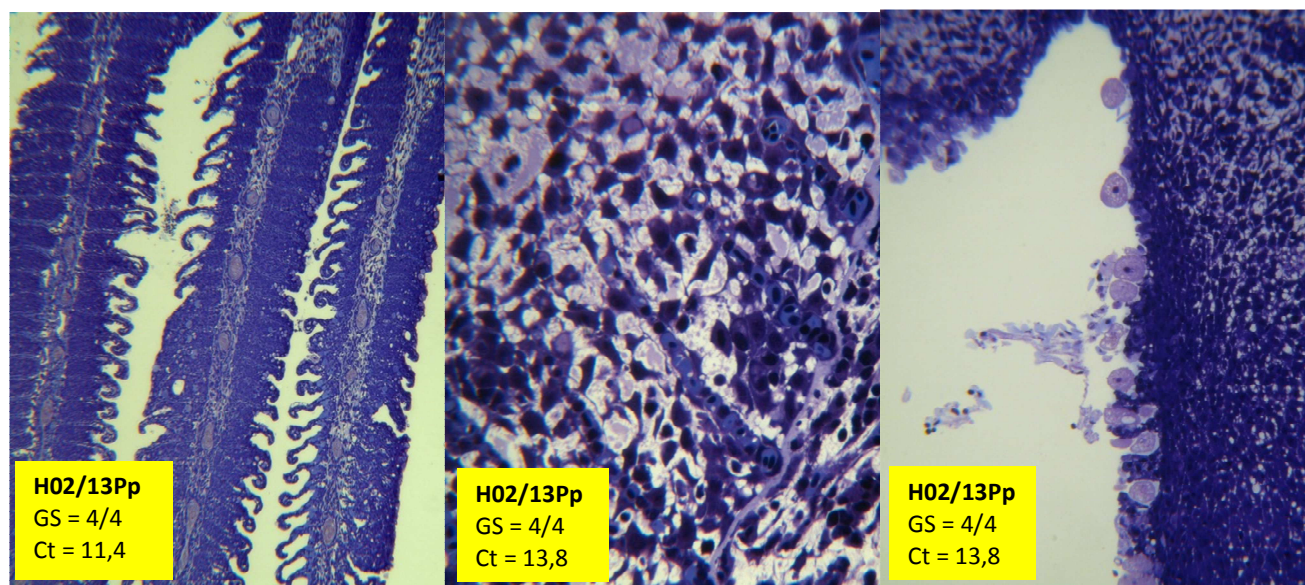
Variasjon i virulens hos de forskjellige klonene av *P. perurans* var «ekstrem», dvs noen kloner gav ingen gjelleforandringer hos smittet laks mens andre gav omfattende skader («Gill score, GS, 5») med påfølgende dødelighet i smittede populasjoner. I smitteforsøkene ble det benyttet både badsmitte og ko-habitant smitte, og i hovedsak var spredningen av virulente kloner mer effektiv enn spredning av de mindre virulente variantene av *P. perurans*. Økning i GS (gjelleskader) og spredning av amøbene var raskere ved 16 °C enn ved 12 °C for de fleste klonene av *P. perurans* (Dahle 2015, Røed 2016, Kindt 2017). *P. pemaquidensis* og *Tetramitus* sp. klonene gav ingen gjelleforandringer av betydning i de gjennomførte forsøkene. Det er derfor viktig at en ved påvisning av *Paramoeba* sp. på gjellene hos laks bruker assay som differensierer mellom *P. perurans* og *P. pemaquidensis* som begge forekommer i norsk lakseoppdrett, da den siste ikke synes å være av betydning for utvikling av AGD. Forsøkene viste også at laks med ingen GS (gjelleskade) kunne ha samme mengde *P. perurans* (målt med real time RT PCR) som

laks med GS5 (gill score 5). Tilstedeværelse av *P. perurans* betyr med andre ord ikke at laksen vil utvikle AGD.

I våre smitteforsøk var det ingen indikasjoner på at et høyt antall passasjer over tid endrer virulensen til de enkelte klonene. Det var imidlertid indikasjoner på at overføring av bakterier fra medium hos høyvirulente *P. perurans* til lav-virulente kloner vil kunne øke virulensen hos disse variantene av amøben.

Uttrykking av flere forskjellige proteaser fra *P. perurans* ble testet ved hjelp av real time RT PCR på klonede kulturer og laksegjeller med forskjellig gjelleskader (GS) og mengde *P. perurans*. Testene gav ingen klare svar med henblikk på opp- eller ned-regulering i forbindelse med vekst av *P. perurans* på gjellene hos laks. Det kan ikke utelukkes at forskjellene i virulens kan skyldes genetisk variasjon, epigenetisk mekanismer eller forskjeller i mikrobiota, noe som blir viktig å undersøke i videre studier.

Histopatologiske studier av gjeller fra laks med gjelleskader (GS) viser et utviklingsforløp med økende mengde mukusceller fulgt av epitelcellehyperplasi. Ved høy gjellescore foreligger det ekstrem hyperplasi med betydelig innslag av nekroser (**Figur 4**). Disse forandringene er assosiert med tilstedeværelse av *P. perurans*. Det synes som om amøben påvirker gjellene både mekanisk og ved utskillelse av ekstracellulære enzymer.



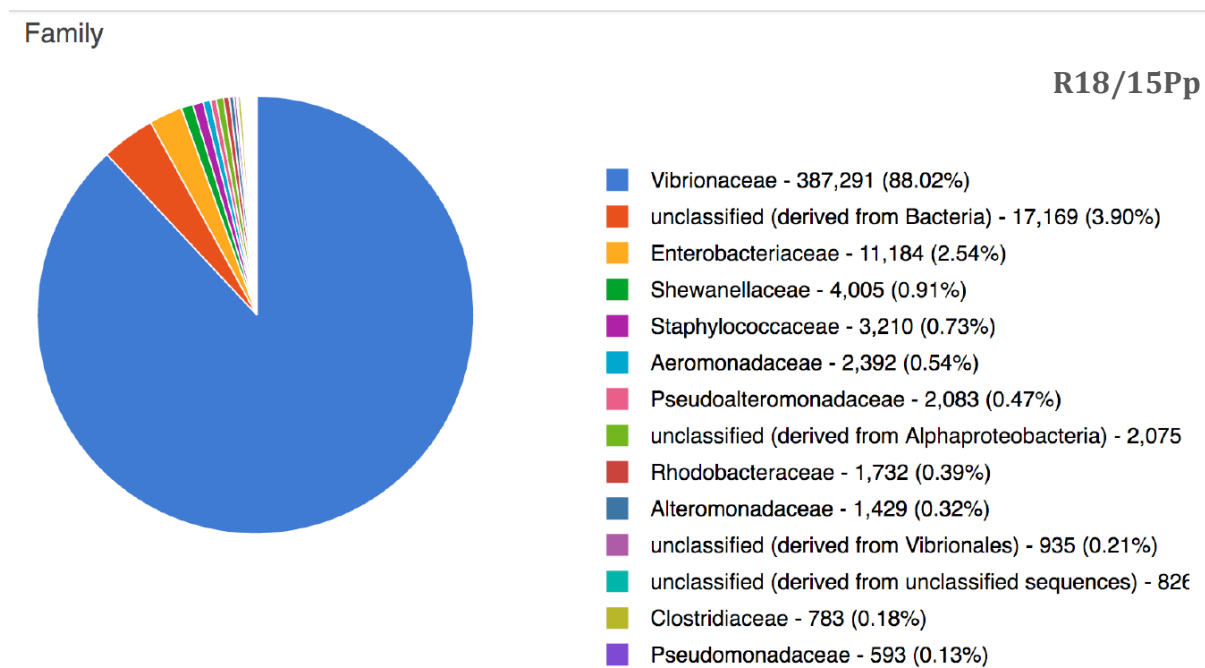
Figur 4. Gjellevevsendringer etter smitte med *P. perurans* (klon H02/13Pp). GS = gjelleskade, Ct= verdi for mengde RNA fra *P. perurans*. Vevsendringene domineres av epitelcellehyperplasi og nekroser.

Det å kunne skille mellom høy- og lav-virulente varianter av *P. perurans* kan være av stor betydning hvis virulensegenskapene kun er knyttet til den enkelte amøbe. Dette har det ikke vært mulig å dokumentere i dette prosjektet (se arbeidspakkene IV og V). Hvis derimot mikrobiotaen på gjellene hos laks er avgjørende for virulensen til de enkelte kloner av *P. perurans* så vil det være av sentral betydning

å kartlegge dette i fremtidige studier (kartlegging av mikrobiota var ikke en del av dette prosjektet) av *P. perurans* og AGD.

APIII

Store deler av genomet til *P. perurans*, genomet til symbionten, *Perkinsela* sp., genomet til *Cand. Syngnamydia salmonis*, og genomene til en rekke bakterier som var til stede i dyrkingsmediene, ble sekvensert fra to forskjellige kloner. Det var ikke mulig å påvise sekvensforskjeller mellom *P. perurans*, *Perkinsela* sp., eller *Ca. S. salmonis* fra disse to klonene. Det var imidlertid betydelige forskjeller i bakteriesammensetningen i dyrkingsmediene til disse to amøbene (**Figur 5**).



Figur 5. Bakteriesammensetning i mediet til en *P. perurans* klon (R18/15Pp).

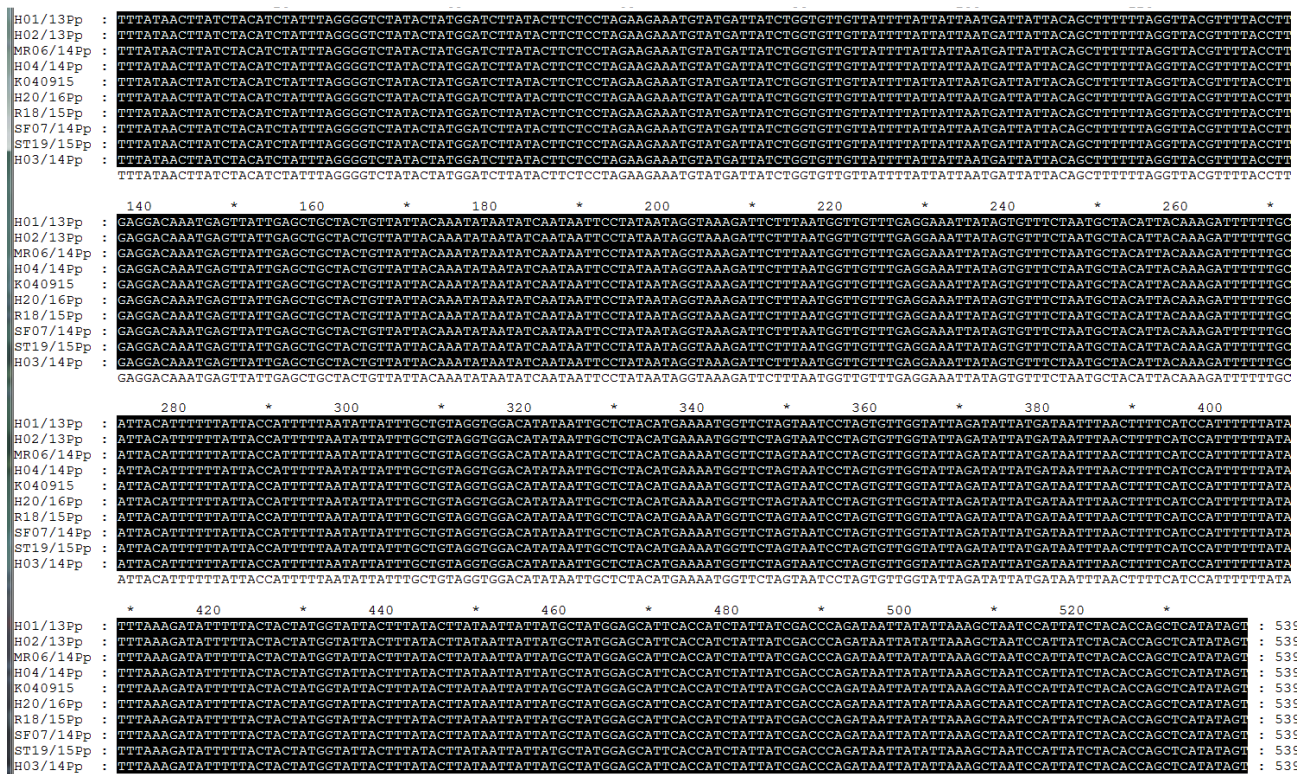
Basert på data fra Illumina sekvensering arbeides det nå med å ferdigstille genomet til *Candidatus Syngnamydia salmonis* som er en vanlig infeksjon hos kloner av *P. perurans* (Samarbeid med Professor Gilbert Greub og forsker Trestan Pillonel, Universitetet i Lausanne, Sveits). Denne bakterien er også assosiert med epitheliocystis hos laks i norsk oppdrett. Bakterien er karakterisert som en del av dette prosjektet (Nylund et al 2018), og er det første epitheliocystis agenset fra fisk som er dyrket i kultur.

APIV

Det har ikke vært mulig å påvise genetisk variasjon mellom kloner av *Paramoeba perurans* selv om det i smitteforsøk har vært vist stor variasjon i virulens mellom klonene. Alle rRNA gener, en rekke husholdningsgener, andre kodende regioner (gener som koder for enzymer), og intergenetiske områder har vært undersøkt. Resultatene fra disse studiene viser at den enkelte amøbe har flere alleler av hvert gen og at det kan være stor variasjon mellom disse allelene, men de samme alleler har vært påvist hos alle kloner, dvs ingen variasjon mellom kloner (Nylund et al. in prep.). Genetisk variasjon har

heller ikke vært mulig å påvise i studier av genomet til symbionten, *Perkinsela* sp. fra lav- og høy-virulente kloner av *P. perurans*. Også i symbionten har det vært fokusert på rRNA gener, husholdningsgener og et utvalg av andre gener (særlig enzymer).

Det har med andre ord ikke vært mulig å påvise genetisk variasjon hos *P. perurans* som kan knyttes til variasjon i virulens. Virulensvariasjon kan kanskje skyldes epigenetiske faktorer eller variasjon i bakterier knyttet til dyrkingsmedier eller mikrobiota på laksegljellene. Variasjon hos vert (*Salmo salar*) vil også påvirke den enkelte amøbeklon sin evne til å fremkalle gjellesykdom (AGD) (OM Dahle 2015; M Røed 2016; Mats Kindt 2017). Temperatur er også en viktig faktor for utvikling av AGD hos laks, men det har vært observert AGD hos laks i oppdrett ved temperaturer ned mot 9 °C (februar-mars). Smitteforsøk viser at enkelte kloner av *P. perurans* kan gi alvorlig AGD ved temperaturer ned mot 12 °C, men generelt øker virulens med økende temperatur.



Figur 6. Sekvenser av mitokondrielt DNA, cytb, fra 10 forskjellige *P. perurans* kloner (med forskjellig virulens) viser ingen variasjon.

Videre studier av virulensvariasjon hos *P. perurans* må fokusere på mulige epigenetiske mekanismer (mekanismer som styrer om en egenskap kommer til uttrykk eller ikke) og mikrobiota knyttet til gjellene hos laks med AGD. Symbionten kan være av betydning for regulering av uttrykk av gener hos amøben og faktorer som mikrobiota, temperatur, salinitet etc kan være av betydning for om gener uttrykkes eller ikke. Ved gjennomføring av nye smitteforsøk vil det være viktig å bruke laks av samme opphav da dette studiet har vist at det kan være klare forskjeller i mottakelighet for *P. perurans* og påfølgende endringer i gjellevev.


```

H01/13Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
H02/13Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
H03/14Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
H04/14Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
SF07/14Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
MR06/14Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
SF11/15Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
SF12/15Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
R18/15Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
ST19/15Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
H20/16Pp : AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :
          AAACCAACCGCCACACACCTCTGCCAGGGTTGGTTGTTGATAAAGCTCAGCCTGCCAAATCAAAAACG--ATT--ATT--ATT-- :

          *      100      *      120      *      140      *      160      *
H01/13Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
H02/13Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
H03/14Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
H04/14Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
SF07/14Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
MR06/14Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
SF11/15Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
SF12/15Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
R18/15Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
ST19/15Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
H20/16Pp : -ATT--ATT--ATT--ATT--CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT :
          ATT      ATT      ATT      ATT      CTTGTGGGAAAGAGGTGAAAATTCGGTTGTAGTTGTTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGATT

          180      *      200      *      220      *      240      *
H01/13Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
H02/13Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
H03/14Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
H04/14Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
SF07/14Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
MR06/14Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
SF11/15Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
SF12/15Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
R18/15Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
ST19/15Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
H20/16Pp : GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA : 235
          GACCAACATCCAAGAACCTCTTCCTCACCACCCGAACCTCTTCCTCACCACCCCAACCTCTTCCTCAACAACATGAAACCA

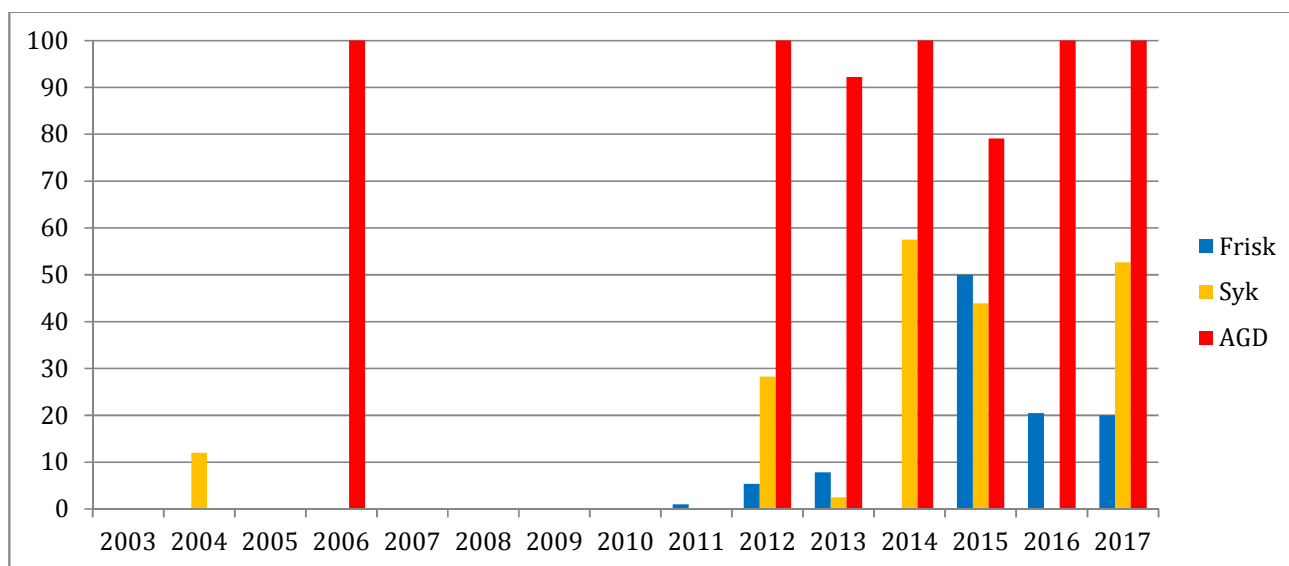
```

Figur 7: Eksempel på en VNTR som er lik hos alle undersøkte kloner av *P. perurans*. Klonene har forskjellig virulens.

APV

I kartleggingen av historisk forekomst av *P. perurans* i norsk lakseoppdrett er materiale (gjeller fra oppdrettslaks) innsamlet i perioden 2003 til 2017 undersøkt. Undersøkelser av gjeller, med henblikk på tilstedeværelse av *P. perurans*, ble utført ved hjelp av real time RT PCR med assayene Pperu (se arbeidspakke VI) og Neo-ny (E = 2,01, Dette assay detekterer alle medlemmer av *Paramoeba*). *P. perurans* ble påvist hos syv (N = 48) oppdrettslaks i 2004 (Sogn og Fjordane) med diagnosen gjellesykdom. Det var ikke mulig å påvise *P. perurans* på gjellene hos annen laks innsamlet på Vestlandet i perioden før 2006. Den 26. oktober 2006 ble et anlegg med alvorlig gjellesykdom i Sogn og Fjordane undersøkt og en ny art amøber ble påvist (Nylund A, Karlsen M, Watanabe K, Karlsbakk E, Nylund S, Isaksen T, Arnesen CE (2007). Gjennombrudd i kampen mot PGI (proliferative gjellebetennelse). Norsk Fiskeoppdrett 32 (3): 50 - 53. Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Karlsen M, Sæther PA, Arnesen, CE, Karlsbakk E (2008). Morphogenesis of Salmonid Gill poxvirus (SGPV) associated with proliferative gill disease (PGD) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Arch Virol 153 (7): 1299 – 309, Steinum T, Kvellestad A, Rønneberg LB, Nilsen H, Asheim A, Fjell K, Nygård SMR, Olsen AB, Dale OB (2008). First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba 18S cDNA sequences. J Fish Dis 31: 205 – 214.). Dette var det første offisielle utbrudd med AGD og mer enn 90 % av fisken døde. Amøben ble senere beskrevet som *Neoparamoeba perurans* (syn. *Paramoeba perurans*) fra utbrudd med AGD i Tasmania (Young ND, Crosbie PBB, Adams MB, Nowak BF, Morrison RN (2007). *Neoparamoeba perurans* n.sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). I J Parasit 37: 1469 – 1481.). Naboanlegg som også hadde gjelleproblemer ble undersøkt,

men amøben ble ikke påvist hos denne fisken. I de påfølgende årene ble laks fra Vestlandet undersøkt, ved hjelp av real time RT PCR (Assay: Neo-ny), for eventuell tilstedeværelse av *P. perurans*. Amøben ble først påvist, i vårt materiale, i 2011 med en betydelig økning i forekomst i 2012 og påfølgende år. I perioden 2003 til 2017 er 2520 laks undersøkt for tilstedeværelse av *Paramoeba perurans* (**Figur 8**).



Figur 8. Forekomst (%) av *Paramoeba perurans* hos laks i oppdrett i perioden 2003 – 2017. Fisken er delt i tre kategorier; a) Frisk, b) syk (annen diagnose enn AGD), og c) AGD.

Den raske økning i forekomst, fra få positive individer før 2011 (med unntak av utbruddene i 2006) kan indikere at *P. perurans* er introdusert til Norge, kanskje med ballastvann fra internasjonal skipstrafikk. Det er også av interesse at første påvisning av *P. perurans* var i Sogn og Fjordane i 2004 og ikke langt fra Mongstad-anlegget som har en betydelig internasjonal skipstrafikk. En hypotese er at forekomst av *P. perurans* i 2004 - 2006 i Sogn og Fjordane har vært fulgt av en spredningsfase som har resultert i etablering i de fleste vestlandsfylker i 2012. Denne hypotesen støttes også av genetiske analyser som indikerer et klonalt opphav til *P. perurans* i Norge.

I tillegg til laks er *P. perurans* er påvist hos rognkjeks og leppefisk brukt som rensefisk i lakseoppdrett på Vestlandet. Amøben er også påvist hos villfanget leppefisk (*Labrus mixtus* & *L. bergylta*) fra områdene rundt Bergen som en del av dette prosjektet (Steigen et al. 2018).

APVI

Det er utviklet to nye real time RT PCR assay som en del av prosjektet: A) Spesifikt assay for *Paramoeba perurans* (**Pperu**) og B) Spesifikt assay for *Perkinsela* sp. (**Perk**) som er symbiont hos *P. perurans* (Nylund et al. 2018). Effektiviteten (E) til disse assays er henholdsvis 1,97 og 1,95. På grunn av manglende genetisk variasjon har det ikke vært mulig å lage assays som skiller mellom høy – og lav virulente varianter av *P. perurans*.

Kode	dato	vert	kloner	Fylke	Amøbe
2013					
H01/13Pp	2013.11.25	laks	E2, B2	Hordaland	<i>P. perurans</i>
H02/13Pp	2013	laks		Hordaland	<i>P. perurans</i>
SF05/13T	2013.10.15	laks		Sogn & Fjordane	<i>Tetramitus</i> sp.
2014					
H03/14Pp	2014.01.22	laks	E9, B10	Hordaland	<i>P. perurans</i>
H04/13PP	2014.08.27	bergylte	K2-2	Hordaland	<i>P. perurans</i>
MR06/14Pp	2014.11.18	Laks	B3,E4	Møre & Romsdal	<i>P. perurans</i>
SF07/14Pp	2014.09.29	Laks	A2, B2, C3	Sogn & Fjordane	<i>P. perurans</i>
SF08/14Pp	2014.10.02	Laks	E1, H1	Sogn & Fjordane	<i>P. perurans</i>
H09/14Pq	2014.10.02	bergylte	A2, B6	Hordaland	<i>P. pemaquidensis</i>
H10/14Pq	2014.10.02	sei	C1,G3, G4	Hordaland	<i>P. pemaquidensis</i>
2015					
SF11/15Pp	2015.02.05	laks	C4, F1	Sogn & Fjordane	<i>P. perurans</i>
SF12/15Pp	2015.03.18	laks		Sogn & Fjordane	<i>P. perurans</i>
H16/15T	2015.09.10	laks		Hordaland	<i>Tetramitus</i> sp.
H16/15Pp	2015.09.10	laks		Hordaland	<i>P. perurans</i>
H17/15Pq	2015.08.27	laks		Hordaland	<i>P. pemaquidensis</i>
R18/15Pp	2015.10.04	laks		Rogaland	<i>P. perurans</i>
ST19/15Pp	2015.10.13	laks	K2, K3	Sør Trøndelag	<i>P. perurans</i>
2016					
H20/16Pp	2016.02.05	laks		Hordaland	<i>P. perurans</i>
R21/16Pp	2016.09.15	laks		Rogaland	<i>P. perurans</i>
VL22/16Pp	2016.09.22	laks			<i>P. perurans</i>
VL23/16Pp	2016.09.22	laks			<i>P. perurans</i>
2018					
R25/18Pp	2018.01.17	laks		Rogaland	<i>P. perurans</i>

Tabell 4. Kloner fra fylkene Rogaland®, Hordaland (H), sogn og Fjordane (SF), Møre og Romsdal (MR), Sør Trøndelag (ST) og Vestlandet (VL). De fleste av disse klonene er testet i smitteforsøk (virulens test).

HOVEDFUNN

1. Kloner av *P. perurans* viser stor variasjon i virulens målt som gjelleskader (gjellepatologi) hos laks og evne til spredning.
2. Kloner av *P. perurans* viser betydelig fenotypiske forskjeller i morfologi, temperaturoptimum, salinitetstoleranse, og veksthastighet i kultur. De fleste kloner av *P. perurans* kan fryses ned og lagres på nitrogen.
3. Basert på rRNA gener, husholdningsgener, gener som koder for enzymer, og potensielt hypervariable områder i genomet (VNTRs) har det ikke vært mulig å skille mellom kloner av *P. perurans* med forskjellig virulens. Det synes som om det er en klonal spredning av *P. perurans* i Sør Norge med et mulig startpunkt i Sogn og Fjordane i 2004 eller tidligere.
4. Variasjon i virulens mellom kloner av *P. perurans* kan være regulert av epigenetiske mekanismer eller et resultat av forskjeller i mikrobiota på gjellene hos laks.
5. Virulensen til kloner av *P. perurans* øker med økende temperaturer, men AGD kan forekomme i anlegg med temperaturer ned mot 9 °C.

Rapporter

Framdriftsrapport datert 29.06.2015 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2015 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 31.12.2015 for arbeidspakke III fra prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 30.06.2016 for prosjektet (FHF: 901053).
Sluttrapport datert 30.06.2016 for arbeidspakke I fra prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2016 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 30.06.2017 for prosjektet (FHF: 901053).
Framdriftsrapport datert 31.12.2017 for prosjektet (FHF: 901053).
Faglig sluttrapport datert 15.06.2018 for prosjektet (FHF: 901053).

Presentasjoner på konferanser/seminarer

Frisk Fisk mars 2015: Nylund, A (2015). AGD. Deteksjon i felt og laboratorium. (Foredraget inkluderte en presentasjon av FHF-prosjektet -901053).

3rd Gill health Initiative, Galway mai 2015. Johansen, R (2015) Characterization of *Paramoeba perurans* (presentasjon av FHF-prosjektet -901053).

Dialogmøte for AGD i Bergen 23. juni 2015. Nylund, A. (2015). Presentasjon av framdrift i prosjektet, FHF -901053.

Dialogmøte for AGD i Bergen 23. juni 2015. Andersen, L (2015). Fenotypisk karakterisering av amøbeisolater (presentasjon av arbeidspakke 1I i prosjektet, FHF -901053).

Nylund, A (2015). Isolering og karakterisering av *Paramoeba perurans*: Fenotypisk og genetisk karakterisering av utvalgte kloner fra laks og andre verter. FHF's fiskehelsesamling 1-2 september 2015.

Andersen L (2015). Fenotyping av kloner av *P. perurans*. FHF's fiskehelsesamling 1-2 september 2015.

Nylund A (2016). *Candidatus* Synonymydia salmonis vekst i *Paramoeba perurans*. Styringsgruppemøte 6. april 2016.

Trösse C (2016). Optimalisering og karakterisering av qRT-PCR assay. Styringsgruppemøte 6. april 2016

Blindheim S (2016). Fenotypisk karakterisering av *Paramoeba perurans* kloner. Styringsgruppemøte 6. april 2016.

Røed M (2016). Virulens hos utvalgte isolater med kloner av *Paramoeba* sp. isolert fra atlantisk laks og berggylt. Styringsgruppemøte 6. april 2016.

Trösse C (2016). Smitteforsøk som viser virulensforskjeller mellom kloner av *P. perurans*. Dialogmøte mellom FHF's AGD-prosjekter 23. juni 2016.

Nylund A (2016). Videre arbeid på prosjektet i 2016. «Jakt på virulensgener». Dialogmøte mellom FHF's AGD-prosjekter 23. juni 2016.

Andersen L (2016) Experimental infection of salmon and wrasse with two clonal strains of *Paramoeba perurans* in a common garden study. Dialogmøte mellom FHF's AGD-prosjekter 23. juni 2016

Trösse C (2016). Virulence variation between *Paramoeba perurans* clones isolated from different locations in Norway. Gill Health Initiative, Stirling 9. juni 2016.

Andersen L (2016). Experimental infection of salmon and wrasse with two clonal strains of *Paramoeba perurans* in a common garden study. Gill Health Initiative, Stirling 10. June.

Blindheim (2016). Phenotypic characterization of clonal strains of *Paramoeba perurans* (FHF project: 901353). Gill Health Initiative, Stirling 10. June.

Frisk Fisk mars 2017: M. Kindt, M. Roed, C. Tröse, L. Andersen, S. Blindheim, A. Nylund. Temperatur kan påvirke virulensen hos klonale kulturer av *Paramoeba perurans* under smitteforsøk på Atlantisk Laks. (FHF-prosjektet - 901053).

Frisk Fisk 2017: Nylund, A (2017). Gjellesykdommer hos laks i oppdrett. (Foredraget inkluderte en presentasjon av data fra FHF-prosjektet -901053).

Frisk Fisk februar 2017: Blindheim, SH (2017). Fenotypisk karakterisering av utvalgte *Paramoeba perurans* isolater. (FHF-prosjektet -901053).

Frisk Fisk februar 2017: Andersen, L (2017). Cryopreservering av amobekulturer av *Paramoeba perurans* (FHF prosjekt 901053).

Gill Health Initiative, Norway April 2017. A. Nylund (2017) Gill diseases in farmed Atlantic salmon with a focus on *Paramoeba perurans* (FHF-prosjektet -901053).

WORKSHOP MED FOKUS PÅ BEHANDLING MOT AGD TORSDAG 1. JUNI – GARDERMOEN. Nylund, A. (2017). Variasjon hos kloner av *Paramoeba perurans* (FHF-prosjekt 901053).

Nylund A (2018). Gill diseases. Forelesning på fiskehelsekurset BIO272, Fiskehelsestudiet ved Universitetet i Bergen.

Nylund A (2018). Presentasjon av sluttrapport (prosjekt FHF: 901053) for Styringsgruppen. Bergen 11.juni 2018

Publikasjoner fra prosjektet

Blindheim S, Andersen L, Trösse C, Karlsbakk E, Nylund A (submitted). Phenotypic characterization of *Paramoeba perurans* clones obtained from different populations of Atlantic salmon *Salmo salar* L. and Ballan wrasse *Labrus bergylta*.

Dahle OM (2015). Experimental infections with *Paramoeba perurans* and AGD development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Ballan wrasse (*Labrus bergylta*). Are there host and *P. perurans* strain-related differences in infectivity and virulence? Master Thesis in Aquamedicine, University of Bergen, June 2015. Pp 1 - 69.

Kindt M (2017). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og utvikling av amøbisk gjellesykdom hos Atlantisk laks (*Salmo salar*, L). Påvirker vanntemperaturen virulensen hos klonale isolater av amøben? Masteroppgave i fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Nylund A, Pistone D, Trösse C, Blindheim S, Andersen L, Plarre H (2018). Genotyping av Candidatus *Syngnamydia salmonis* (Chlamydiales; Simkaniaceae) co-cultured in *Paramoeba perurans* (Amoebozoa; Paramoebidae). Arch Microbiol <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1488-0> (E-pub: Oct 2017).

Nylund A, Kindt M, Pistone D, Trösse C (in prep). Lack of genetic variation among clones of *Paramoeba perurans* from farmed salmon in Norway.

Nylund A, Kindt M, Plarre H (in prep). Historical prevalence and distribution of *Paramoeba perurans* suggest an introduction to Norway after year 2000.

Røed M (2016). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og AGD utvikling hos Atlantisk laks (*Salmo salar*, L). En komparativ studie av virulens hos klonede isolater av *P. perurans*. Masteroppgave i Fiskehelse, Universitetet i Bergen.

Steigen A, Nylund A, Plarre H, Watanabe K, Karlsbakk E, Brevik Ø (2018). Gill associated Chlamydiae in five wrasse species in western Norway. Dis Aquat Org 128: 21-35.

Trösse C, Kindt MM, Andersen L, Blindheim S, Nylund A (in prep). Isolation, cloning, freezing and defrosting of *Paramoeba perurans*, - a new method for maintaining cultures of *P. perurans*.

Dahle OMV, Blindheim SH, Nylund A, Karlsbakk E., Breck O., Glosvik H., Andersen L. (in prep). Challenge of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and Ballan wrasse, *Labrus bergylta*, with clonal strains of *Paramoeba perurans* of different virulence.