

Standardisering av AGD-gjellescore

Enhetlig gjellescoring basert på data fra eksperimentelle forsøk og oppdrettsanlegg for laks



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Innhold

Sammendrag	3
Summary	4
Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov	5
Bakgrunn	6
Materialer og metoder	7
Laboratorieforsøk	7
Gjellescoreing og prøvetaking av laks i tre oppdrettsanlegg	9
Statistikk	11
Resultater	11
AGD-utvikling i laboratorieforsøk med <i>P. perurans</i> ved 8, 12 og 16 °C	11
Ulike fremgangsmåter for beregning av scoreverdi	12
Forskjeller i gjellescoreverdi og utvikling på de ulike gjellebuene	13
Plassering av lesjoner på gjelleflatene	14
Gjellescoreing og prøvetaking av laks i oppdrettsanlegg	16
Sammenligning av laboratoriescoremetoden og det todelt score systemet	17
Deteksjon av agens ved real-time RT-PCR og histologiske vurderinger av gjellene	17
Påvisning av agens med PCR og histologi versus differanse mellom total gjellescore og aktiv AGD-score	18
Diskusjon	18
Gjelleflaten med høyeste scoreverdi bør angis som fiskens gjellescore	18
Todelt gjellescoreing	19
Makroskopisk gjellescore og tilstedeværelse andre agens enn <i>Paramoeba perurans</i>	20
AGD-gjellescoreing i laboratorieforsøk	20
Fordeling av lesjoner på gjellebuer og gjelleflater	21
Forekomst- og fordeling av lesjoner på de ulike områdene på gjelleflaten	21
Oppsummering	21
Referanser	22

Forfattere

Sigurd Hytterød (Veterinærinstituttet)
 Anja Bråthen Kristoffersen (Veterinærinstituttet)
 Mari Darrud (Veterinærinstituttet)
 Stine Kolstø (FoMAS Fiskehelse og Miljø)
 Tor Atle Mo (Norsk institutt for naturforskning)
 Steffen Hageselle Blindheim
 (Industrilaboratoriet)
 Susanne Håvardstun Eide (Industrilaboratoriet)
 Linda Andersen (Industrilaboratoriet)

Oppdragsgiver

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond
 (FHF)
 FHF prosjektnummer: 901333



ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2018

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: David A Strand



Sammendrag

Amøbegjellesykdom (AGD) har etablert seg som en alvorlig sykdom i norsk fiskeoppdrett. AGD forårsakes av amøben *Paramoeba perurans* og patologiske funn begrenser seg hovedsakelig til gjellene der man kan se makroskopiske forandringer som forhøyede hvite, slimete områder på gjelleoverflaten. I histologiske gjellesnitt kan epitelcelleproliferasjon og sammenvoksing av gjellefilamenter ses for denne sykdommen. Et makroskopisk AGD-scoringssystem utviklet av Taylor mfl. (2009) brukes som grunnlag for å bestemme grad og utvikling av AGD på merdkanten, og flere aktører har laget sine egne prosedyrer og anbefalinger basert på dette systemet. Det er ønskelig med et entydig scoresystem der gjellescoreverdier er sammenlignbare, uavhengig av hvilke aktører som utfører scoringen. I dette prosjektet er data fra laboratorieforsøk, sammen med erfaringer og resultater fra gjellescoring i tre oppdrettsanlegg, benyttet som grunnlag for vurderingen av AGD-gjellescoresystemet. Rapporten lanserer den fremgangsmåten for gjellescoring som er vurdert som best egnet i norske oppdrettsanlegg. Her undersøkes begge sider av alle gjellebuer for lesjoner, det vil si 16 gjelleflater, og den gjelleflaten med høyest scoreverdi angis som fisken gjellescoreverdi. Denne fremgangsmåten er lett å tilegne seg samtidig som den er praktisk gjennomførbar, entydig og med god repeterbarhet.

Hos norsk oppdrettslaks er gjelleskader med multifaktorielle årsaker vanlig. Det er derfor nødvendig med et gjellescoresystem som kan skille AGD fra andre gjellelesjoner. Et todelt gjellescoresystem utviklet av FoMAS - Fiskehelse og Miljø AS, der «aktiv AGD-score» skilles fra total gjellescore, har vist seg som godt egnet under norske forhold.

I laboratorieforsøk er det viktig med et scoresystem som gir et detaljert bilde av sykdomsutviklingen slik at selv små forskjeller mellom forsøksgrupper kan fanges opp. Det anbefales at «laboratoriescoremetoden» brukes i smitteforsøk der AGD-gjellescore studeres. Denne detaljerte gjellescoringsmetoden har blitt benyttet i en rekke AGD-smitteforsøk utført ved Industrielaboratoriet (ILAB) og har vist seg å være godt egnet for å fange opp forskjeller mellom forsøksgrupper. Scoreverdi for alle 16 gjelleflater hos hver fisk noteres, og verdiene for alle fisk innenfor en forsøksgruppe betegnes som en gjellematrise. Matrisen gir mulighet til å beregne gjellescore på flere måter og flere aspekter ved sykdommen kan studeres.

I smitteforsøket i denne studien ble det observert flest lesjoner på områder dorsalt og ventralt, samt inn mot brusken på gjelleflatene. Lesjoner ble også påvist tidligere på gjellebue 2 enn på de andre gjellebuene. De nevnte områdene var også mere affisert enn områdene midt på gjelleflaten og ytterst på de frie gjellefilamentene gjennom sykdomsutviklingen.

Det er sannsynlig at høyest vanngjennomstrømning i gjellespalten mellom bue 2 og 3 forklarer denne observasjonen, men her trengs det mer forskning for å kunne konkludere.

Summary

Amoebic gill disease (AGD), caused by the amoeba *Paramoeba perurans*, has become a significant disease to farmed Atlantic salmon in Norway. AGD manifests as white, mucoid lesions or patches on the gill surfaces. Histopathologically, epithelial hyperplasia and lamellar fusion may be seen associated with these patches in the gills. In order to monitor and manage AGD, the different salmon producers have developed gross AGD-gill scoring protocols using a scoring system described by Taylor et al. (2009) as a guideline. However, due to variations in these protocols, gill score is calculated differently throughout the Atlantic salmon farming industry, making comparisons between farms and producers difficult. In this study, we have evaluated the gross AGD-gill scoring system, using data from five laboratory experiments and experience from gill scoring in three different Norwegian salmon farms. The aim of the project is to improve and unify the existing gill scoring system.

Multifactorial gill lesions are commonly seen in Norwegian farmed salmon, and for this reason, a gill scoring system where AGD-lesions can be separated from other gill lesions is required. We recommend a score system developed by the fish health service FoMAS in Norway, where “active” AGD score and “total” gill score are registered separately. Both scores are generated by examination of all 16 gill surfaces and the single gill arch with the highest score determines the overall gill score of the individual fish. This method gives a precise description of AGD-status, AGD-development and general gill health of the fish. The procedure is considered mild to the salmon, quick and easy to learn.

In experimental AGD-studies, a detailed gross gill scoring system is necessary to separate differences in AGD-development between experimental fish groups. Here, we recommend the “Laboratory score protocol”, a method which has been successfully used by ILAB in several AGD-challenge trials. In this method, scores from all 16 gill surfaces for each fish are recorded, and the gill scores from all fish in an experimental group of 10 fish, 160 values, are referred to as a gill matrix. This gill matrix provides the opportunity to calculate the gill score in various manners and to study detailed aspects of the gross pathology between fish groups.

During the infection trial in this project, patches were observed most frequently in the ventral and dorsal areas of the gill surface, as well as towards the basis of the gill arches. In addition, patches were observed earlier on the second gill arch compared to the other gill arches. Analyses of data from the previous AGD trials show that gill arch two and three accumulate higher gill scores compared to gill arches one and four. Higher water flow in the gill slit between the second and third gill arch may explain this observation, but more research is needed to reach a conclusion.

Hovedfunn, anbefalinger og kunnskapsbehov

Hovedfunn

- Beregning av gjellescore basert på den mest affiserte gjelleflaten er den beste fremgangsmåten ved AGD-gjellescoring i oppdrettsanlegg fordi:
 - Fremgangsmåten trolig gir de mest enhetlige scoreverdiene.
 - Fremgangsmåten har god repeterbarhet.
 - Fremgangsmåten er praktisk gjennomførbar i oppdrettsanlegg under alle forhold.
- Et todelt gjellescoresystem er nødvendig for å gi en god vurdering av AGD-status hos laks i norske oppdrettsanlegg og for å fange opp underliggende gjelleskader som har andre årsaker enn AGD.
- Det todelte gjellescoresystemet, utviklet av FoMAS - Fiskehelse og Miljø AS, er godt egnet til å skille AGD fra andre gjellelesjoner, og er definert som:
 - 1) Aktiv AGD-gjellescore - forhøyede, hvite, slimete flekker på gjelleoverflaten.
 - 2) Total gjellescore - alle makroskopiske forandringer på gjelleoverflaten, inkludert aktive AGD-lesjoner.
- Et detaljert gjellescoresystem, der verdier for alle 16 gjelleflater noteres, er utprøvd i en rekke AGD-smitteforsøk ved Industrielaboratoriet (ILAB), og er nødvendig for å avdekke små forskjeller i AGD-utvikling mellom forsøksgrupper i laboratorieforsøk.
- Detaljert gjellescoring av 10 fisk gir en gjellematrise med 160 verdier. Matrisen gir mulighet til å beregne gjellescore på flere måter og flere aspekter ved sykdommen kan studeres.
- AGD-forandringer oppstår først i områdene dorsalt (mot rygg) og ventralt (mot buk) fremfor midt på gjellebuene.
- Aktive AGD-forandringer oppstår innerst mot brusken før de kan ses på de ytre frie gjellefilamentene.
- AGD-gjelleforandringer kan ses tidligere på gjellebue 2 enn på de andre gjellebuene.
- Gjellebue 2 og 3 får generelt høyere scoreverdier enn gjellebue 1 og 4.

Anbefalinger

- Bruk den høyeste AGD-scoreverdien på enkeltgjelleflate som fiskens AGD-scoreverdi.
- Bruk den høyeste total-scoreverdi på enkeltgjelleflate som fiskens total-scoreverdi.
- Det er viktig å skille aktive AGD-forandringer fra eldre AGD-lesjoner og andre gjellelesjoner for å kunne gi et godt øyeblikksbilde av AGD.
- Undersøk områdene dorsalt og ventralt, samt inn mot brusken på gjelleflatene ekstra nøye ved gjellescoring tidlig i AGD-utviklingen.

Kunnskapsbehov

- Utvikling av smitte modeller for andre gjelleagens som bidrar til makroskopiske gjelleforandringer for å kunne studere infeksjonene hver for seg og hvordan de makroskopisk manifesterer seg på gjellene.
- Betydning av makroskopisk gjellescore, de ulike scorenivåene (0-5), for fiskens helsestatus.
- Betydning av lesjonenes fordeling for fiskens helsestatus - klumpvis fordeling av lesjoner (mange fire frie gjellflater) vs jevn fordeling av lesjoner over mange gjelleflater.
- Betydning av behandlingstidspunkt og gjellescorestatus i forhold til smittepress: Er det et terskelnivå for når man bør behandle fisken?

Bakgrunn

Amøbegjellesykdom (AGD) forårsakes av amøben *Paramoeba perurans* syn *Neoparamoeba perurans* (Young mfl. 2007). Siden midten av 1980-tallet har sykdommen forårsaket store tap i produksjonen av oppdrettslaks i Australia (Tasmania) (Munday 1986). På 1990-tallet ble *P. perurans* oppdaget hos oppdrettsfisk i flere sydeuropeiske land (Rodger & McArdle 1996). I 2011 startet en periode med omfattende AGD-utbrudd i Europa, først ved De britiske øyer og etter hvert ble utbruddene påvist stadig lenger nord ved Orknøyene, Shetland, Færøyene og Norge (Oldham mfl. 2016). I de siste årene har AGD etablert seg som en alvorlig sykdom også i norsk fiskeoppdrett (Mo mfl. 2015, Hjeltne mfl. 2018). Patologiske funn begrenser seg hovedsakelig til gjellene der man kan se forhøyede hvite, slimete områder på gjelleoverflaten (Adams mfl. 2004). Epitelcelleproliferasjon og sammenvoksing av gjellefilamenter er ofte assosiert med de hvite slimflekken, og disse forandringene kan ses i histologiske snitt (Adams mfl. 2004) og makroskopisk som hvite nekrotiske områder i gjellevevet. Det er utarbeidet et AGD-scoringssystem til bruk i felt for å bestemme grad og utvikling av AGD (Taylor mfl. 2009), se tabell 1.

Tabell 1: Makroskopisk gjellescoresystem for å bestemme grad av AGD (fra Taylor mfl. 2009)

Infection level	Gill score	Gross description
Clear 0	0	No sign of infection and healthy red colour
Very light	1	1 white spot, light scarring or undefined necrotic streaking
Light	2	2–3 spots/small mucus patch
Moderate	3	Established thickened mucus patch or spot groupings up to 20% of gill area
Advanced	4	Established lesions covering up to 50% of gill area
Heavy	5	Extensive lesions covering most of the gill surface

AGD-gjellescoringen utføres ved at fiskens gjeller undersøkes visuelt for makroskopiske forandringer. Visuelle scoringssystemer har en viss grad av subjektivitet, og dette gjelder også for AGD-gjellescoresystemet. Oppdrettere og fiskehelsetjenestene har hatt stort fokus på kursing og opplæring av personell for at gjellescoring skal kunne gjøres så likt som mulig fra gang til gang. Likevel har gjellescoring, og særlig fremgangsmåten for å beregne AGD-gjellescoreverdi vært mye diskutert, og flere aktører har laget sine egne prosedyrer og anbefalinger. Til tross for at de fleste aktørene baserer seg på systemet beskrevet av Taylor mfl. (2009) (tabell 1) ved vurdering av lesjoner på hver enkelt gjelleflate, har det vist seg at systemet blir tolket forskjellig ved beregning av en samlet scoreverdi for fisken. Flere fremgangsmåter for beregning av gjellescore har blitt nevnt, som for eksempel:

- Gjennomsnittet av gjellescoren på alle 16 gjelleflatene.
- Gjennomsnitt av gjellescore der kun gjelleflater med lesjoner inngår i beregningen.
- Antall lesjoner på alle 16 gjelleflater, dividert på 16.
- Antall lesjoner på alle 16 gjelleflater dividert på antall affiserte gjelleflater.
- Den mest affiserte av de 16 gjelleflatene.

Disse fremgangsmåtene for bestemmelse av gjellescore gir ulik gjellescoreverdi hvis de brukes til å beregne scoreverdi for samme fisk, spesielt ved score 1 og 2, grunnet stor varians i antall gjelleflater som er affisert tidlig i sykdomsforløpet. Ulike fremgangsmåter for beregning av scoreverdi gjør det vanskelig å sammenligne sykdomsutvikling mellom anlegg, og det er ønskelig med et enhetlig AGD-gjellescoresystem i norsk lakseoppdrett.

Makroskopiske AGD-gjellescoringen er oppdretternes og fiskehelsetjenestenes viktigste metode på merdkanten for å vurdere status og utvikling av AGD. Scoringen brukes også som et verktøy for å bestemme om fisken skal behandles, eventuelt når i sykdomsforløpet behandling skal iverksettes, og til å vurdere effekten av behandlinger. Det er derfor ønskelig med et scoresystem der gjellescoreverdier er

sammenlignbare, uavhengig av hvilke aktører som utfører scoringen. Dette anses som viktig for overføring av erfaringsbasert kunnskap mellom anlegg.

Forandringer som kan observeres på gjellene hos norsk oppdrettslaks har ofte multifaktorielle årsaker. Dette kompliserer AGD-gjellescoringen fordi andre gjelleskader enn de som er forårsaket av *P. perurans* kan forveksles med AGD makroskopisk. Studier har vist at flere patogener kan opptre samtidig i gjeller hos oppdrettslaks (Steinum mfl. 2010, Gjessing mfl. 2017). I tillegg kan skader fra for eksempel alger, maneter og hydroider også være årsak til hvite flekker på gjellene (Baxter mfl. 2012). Hos norsk oppdrettslaks er gjelleskader med multifaktorielle årsaker snarere regelen enn unntaket, og det er viktig å kunne skille mellom makroskopiske forandringer som er forårsaket av amøber, og gjelleforandringer som er forårsaket av andre agens eller som har andre årsaksforhold, som for eksempel mekaniske skader. Scoringsmetoden etter Taylor mfl. (2009) er utelukkende ment for å gradere AGD, og næringen har uttrykt et behov for et enhetlig system til å skille AGD-score fra andre makroskopiske gjelleforandringer.

Metodikk for gjellescoring i eksperimentelle forsøk er også et diskusjonstema. Bevissthet og tydelighet rundt begrepsbruk og metodikk er avgjørende for at resultater fra forskningen skal kunne sammenlignes og diskuteres opp mot hverandre.

Dette prosjektet har hatt som mål å gjøre AGD-scoringssystemet mer entydig og best mulig egnet som verktøy for å vurdere status og utvikling av AGD i oppdrettsanlegg under norske forhold. Prosjektet har også studert metoder for gjellescoring av laks i laboratorieforsøk. Et gjellescoresystem som er tydeligere definert vil øke overførbarheten av erfaringsbasert kunnskap fra AGD-utbrudd mellom anlegg og regioner. Prosjektet har derfor hatt som mål å avklare begrepsbruk rundt gjellescoring og anbefale en entydig fremgangsmåte for gjellescoring med forankring i systemet beskrevet av Taylor mfl. (2009).

Materialer og metoder

Laboratorieforsøk

Data fra fire laboratorieforsøk i FHF-prosjekt 901036 «AGD: Behandlingsstrategier/dose-respons-studier hos oppdrettslaks» (Hytterød mfl. 2017) er benyttet som grunnlag for vurderingen av AGD-gjellescoresystemet som brukes av de fleste aktørene i norsk oppdrettsnæring. Datamaterialet består av detaljerte gjellescoreregistreringer for hver enkelt gjelleflate hos laks i fire ulike smitteforsøk, og utgjør til sammen 2194 enkeltfisk (35 104 gjelleflater). Gjellescoreverdien for hver enkelt gjelleflate er basert på beskrivelsene i Taylor mfl. (2009), der skalaen går fra 0-5 (se tabell 1), men med små modifikasjoner:

- Score 1 = En hvit flekk.
- Score 2 = To eller flere hvite flekker som dekker opptil 20 % av den undersøkte gjelleflaten.
- Score 3 = Fra 20 % til 50 % av den undersøkte gjelleflaten er affisert.
- Score 4 = Fra 50 % av den undersøkte gjelleflaten er affisert.
- Score 5 = Nær 100 % av den undersøkte gjelleflaten er affisert.

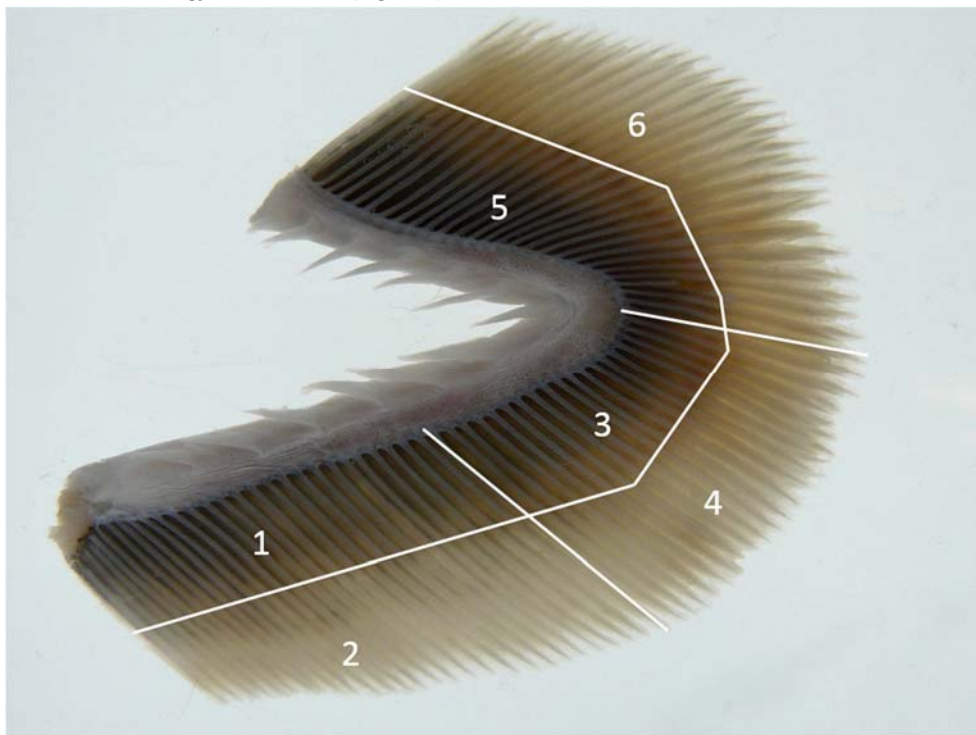
Figur 1 viser et eksempel på hvordan disse dataene er registrert og bearbeidet i et gjellescoreskjema. Denne fremgangsmåten for gjellescoring omtales videre som «laboratoriescoremetoden».

Fisk nr	Dpi	Temp	Gjellescore venstre side								Gjellescore høyre side								Beregninger				
			Gjb 1		Gjb 2		Gjb 3		Gjb 4		Gjb 1		Gjb 2		Gjb 3		Gjb 4		snitt	max	min	sum	ff
			y	i	y	i	y	i	y	i	i	y	i	y	i	y	i	y					
271	19	8	2	2	0	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1,0	2	0	16	3
272	19	8	2	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	2	0	1	1	0	0,7	2	0	11	7
273	19	8	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0,6	2	0	9	8
274	19	8	0	0	2	0	2	2	0	2	2	2	0	1	1	2	1	2	1,2	2	0	19	5
275	19	8	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0,4	2	0	6	11
276	19	8	2	2	2	0	1	2	0	0	2	2	1	1	1	0	1	0	1,1	2	0	17	5
277	19	8	1	0	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1,4	2	0	22	1
278	19	8	1	1	2	1	2	1	0	2	0	0	0	0	2	0	1	2	0,9	2	0	15	6
279	19	8	2	0	2	2	0	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1,3	2	0	21	2
280	19	8	2	1	0	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	0	2	1	1,4	2	0	23	2
281	19	16	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1,8	2	1	29	0
282	19	16	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1,7	2	1	27	0
283	19	16	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1,7	2	1	27	0
284	19	16	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2,2	3	2	35	0
285	19	16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1,9	2	1	31	0
286	19	16	0	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	0	2	1,7	2	0	27	2
287	19	16	1	1	0	1	1	0	0	1	2	0	2	2	2	2	2	0	1,1	2	0	17	5
288	19	16	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	2,3	3	2	37	0
289	19	16	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	0	2	2	1	1,6	2	0	25	1
290	19	16	2	0	1	2	1	1	1	0	2	2	1	1	1	2	1	1	1,2	2	0	19	2

Figur 1: Skjema med verdier fra gjellescoring etter laboratoriescoremetoden i et behandlingsforsøk. Figuren viser gjellescoreverdier for hver gjelleflate fra 20 fisk i to forsøksgrupper som er holdt ved ulike vanntemperaturer, 8 og 16 °C. Dpi = dager etter smitte med *P. perurans*, Gjb = gjellebue, y = gjellebuens ytre flate, i = gjellebuens indre flate, snitt = gjennomsnittet av scoreverdier fra alle gjelleflater for ett individ, max = gjelleflaten med høyeste scoreverdi, min = gjelleflaten med laveste scoreverdi, sum = summen av alle scoreverdier fra alle gjelleflatene for ett individ, ff = frie gjelleflater, det vil si gjelleflater helt uten lesjoner (scoreverdi null). De samlede registreringene for 10 fisk per gruppe har vi valgt å kalle en gjellematrise (160 registreringer), her vist med rød ramme.

I laboratorieforsøkene (Hytterød mfl. 2017) ble laks (110-390 gram) smittet med amøber i et felles kar (volum = 2500 L) etter standard metode ved ILAB (1000 amøber fra en klonalkultur av *P. perurans* per liter sjøvann ved 34 ‰ salinitet i en time). Etter smitte, og etter at AGD hadde utviklet seg til gjellescore ca. 2 (basert på den mest affiserte gjelleflaten), ble fiskene fordelt på 10 kar (volum = 500 L). Deretter ble fiskene behandlet med ulike konsentrasjoner og tider av hydrogenperoksid og ferskvann ved forskjellige vanntemperaturer og saliniteter (brakkvann). I ett forsøk ble fisken også behandlet ved ulike stadier i sykdomsutviklingen (gjellescore 1, 2 og 3). Prøver av laksen (gjellescore, PCR og histologi) ble tatt ut like før behandling, og ved utvalgte tider over en periode på 21 dager etter behandling. Det ble imidlertid ikke tatt prøver i første del av sykdomsutviklingen, fra smittetidspunktet og frem til behandling, det vil si fra score 0 til 2, vurdert på den mest affiserte gjelleflaten (en periode på ca. 14 dager). Det er derfor gjennomført ett smitteforsøk for å supplere eksisterende gjellescoredata med registreringer av scoreverdier tidlig i AGD-utviklingen. Laks med gjennomsnittsvikt på 127 gram ble fordelt på seks forsøkskar (volum = 500 L) og akklimatisert til fullt sjøvann (34 ‰) i en uke. Temperaturen ble gradvis (2 °C per dag) justert fra 12 til 8 °C i to kar, og fra 12 til 16 °C i to kar før smitte. Gruppene med fisk ble deretter smittet med *P. perurans* (badsmitte med 1000 amøber per liter i én time ved 34 ‰ salinitet). Vanntemperaturen ble holdt på henholdsvis 8, 12 og 16 °C, der vannet i to og to kar holdt samme temperatur (duplikater). Hyppige prøveuttak i den første delen av sykdomsfasen ble vektlagt, der gjelleprøver til real-time RT-PCR og histologi ble tatt like etter at makroskopisk gjellescore var notert (i henhold til figur 1). Gjelleprøven for PCR ble tatt fra 2. gjellebue på fiskens høyre side, fiksert i RNA later og analysert hos Pharmaq Analytiq AS for påvisning av *P. perurans*. Gjellebue nr. 2 på fiskens venstre side ble fiksert i 10 % bufret formalin, prosessert for innstøpning i parafin, snittet og H&E farget. Bearbeiding og histopatologiske vurderinger ble utført av Fish Vet Group AS.

Prøver ble tatt av 20 fisk fra hver temperaturgruppe (n = 10 fisk per kar) 4, 7, 11, 14 og 19 dager etter smitte, og fra 10 fisk fra hver gruppe (n = 5 fisk per kar) 26 og 34 dager etter smitte. I tillegg til gjellescoring etter laboratoriescoremetoden ble det registrert hvor på hver enkelt gjelleflate de hvite lesjonene kunne observeres gjennom sykdomsforløpet hos et utvalg av fiskene (n = 10 per temperaturgruppe). Lesjonenes plasseringen ble registrert for hvert individ ved inntegning i en mal med bilder av ulike gjelleflatene (figur 2).



Figur 2: Eksempel som viser inndeling av de ulike anatomiske områdene på gjelleflatene. 1) Ventral region, inn mot brusken. 2) Ventral region, frie gjellefilamenter. 3) Midtre region, inn mot brusken. 4) Midtre region, frie gjellefilamenter. 5) Dorsal region, inn mot brusken. 6) Dorsal region, frie gjellefilamenter.

Gjelleflaten ble delt inn i seks områder basert på gjellenes anatomiske oppbygging, etter råd fra Alf Dalum, Pharmaq Analytiq AS. Et eksempel på denne inndelingen er vist i figur 2. Området inn mot brusken er definert som området hvor gjellefilamentene er fusjonert av det interbranchiale septum, og makroskopisk vil dette området ha mørkere pigmentering enn de frie gjellefilamentene. Antall lesjoner innenfor hvert av områdene på hver gjelleflate ble registrert og notert i en tabell. Hver enkelt lesjon ble angitt med ett poeng. Lesjoner der plasseringen tangerte grenselinjen mellom to felt ble registrert med 0,5 poeng i begge feltene, eventuelt med 0,25 poeng ved tangering av fire linjer, det vil si i krysningspunktet mellom fire felt. Fordelingen av lesjoner innenfor feltene ble fremstilt ved at fisk med gjennomsnittlig scoreverdi < 0,5, mellom 0,5 - 1, mellom 1 - 1,5 og > 1,5 ble gruppert, og det ble testet om det var forskjeller i antall lesjoner mellom de ventrale (1 og 2), midtre (3 og 4) og dorsale (5 og 6) områdene i en test, og mellom området på gjellebuen inn mot brusken (1, 3 og 5) og området med frie gjellefilamenter (2, 4 og 6) i en annen test.

Gjellescoring og prøvetaking av laks i tre oppdrettsanlegg

En viktig del av dette prosjektet har vært å sammenligne data fra gjellescoring med laboratoriescoremetoden med data fra scoringsmetoder som brukes i oppdrettsanlegg. Personell med erfaring fra AGD-gjellescoring av fisk fra smitteforsøk har ikke den samme erfaringen med å gjellescore fisk som kan ha underliggende lesjoner, både eldre AGD-lesjoner og lesjoner forårsaket av andre agens. Det var derfor et mål at personell som vanligvis scorer fisk i laboratorieforsøk og personell med erfaring fra gjellescoring i oppdrettsanlegg fikk score gjeller fra de samme fiskene, med de to ulike metodene. Hensikten med dette var å utveksle erfaringer og for å kunne vurdere fordeler og ulemper med scoringsmetodene.

Tre oppdrettsanlegg for laks på Sør-Vestlandet ble valgt som lokaliteter for gjellescoring og prøvetaking. Dette var oppdrettsanlegg som lå i områder hvor det erfaringsmessig har vært AGD-utbrudd hvert år de siste årene. I tabell 2 er det gitt en oversikt over antall prøveuttak og miljøparametere i anleggene. Fiskens størrelse varierte fra 200-500 gram i anlegg 1 og 2, mens gjennomsnittsstørrelsen på fisken i anlegg 3 var ca 200 gram ved prøveuttaket den 7. november. Intensjonen var å gjennomføre tre prøveuttak i alle anleggene i løpet av høsten 2017, men planen måtte justeres på grunn av værforhold og avvik i forventet AGD-status i de tre anleggene.

Tabell 2: Dato for prøveuttakene, antall dager i sjø for fisken i anlegget ved hvert prøveuttak, samt vanntemperatur og salinitet i de tre anleggene som inngikk i studien. * Behandlet med ferskvann 01.12.2017.

Anlegg	Uttak	Dato	Dager i sjø	Temperatur (°C)	Salinitet (‰)
1	1	07.11.2017	55	12	28-34
1	2	22.11.2017	70	10	28-34
1	3	11.12.2017	89	9	28-34
2	1	22.11.2017	60	10	35
2	2	11.12.2017*	79	9	35
3	1	07.11.2017	25	11	26-31

Under alle prøveuttakene ble det scoret gjeller fra 50 tilfeldig utvalgte fisk fra hvert anlegg. Scoring ble gjort av personell fra fiskehelsetjenesten FoMAS etter en todelt scoringsmetode (Persson mfl. 2015), se nærmere beskrivelse under, og deretter av personell fra ILAB etter laboratoriescoremetoden for de samme fiskene. Fisk ble håvet fra merdene og bedøvet med Benzoak før gjellescoringen ble utført. Ved gjellescoring med den todelte scoremetoden ble overflaten på begge sider av hver gjellebue undersøkt (alle 16 gjelleflater), og to gjellescoreverdier, begge basert på Taylor mfl. (2009) ble notert i et skjema. Den første verdien beskriver kun lesjoner som er forenlige med AGD i utvikling eller aktive AGD-lesjoner. Denne scoreverdien kalles derfor «Aktiv AGD-score» og lesjonene er karakterisert som forhøyede, hvite, slimete flekker på gjelleoverflaten. Den andre verdien angir fiskens totale gjellescore. Total gjellescore er definert som alle makroskopiske forandringer på gjellene uavhengig av årsak. Det vil si alle AGD-forandringer, både «aktive» lesjoner og eldre AGD-skader, samt endringer forårsaket av andre agens, og fysiske gjelleskader. Begge scoreverdiene, både total gjellescore og aktiv AGD-score blir gitt basert på den mest affiserte enkeltgjellebuen, altså den buen som har den høyeste enkeltscoreverdien (det som i figur 2 kalles max-verdi i laboratoriescoremetoden). Gjellescoring i oppdrettsanlegg gjøres vanligvis ved at én person holder bedøvet fisk med buken opp mens en annen person blar gjennom gjelleflatene med en flat trepinne (figur 3). Ved laboratoriescoremetoden holdes fisken av den samme personen som gjellescorer. Her undersøkes gjellene ved at man blar seg gjennom gjellebuene med en finger, fra innsiden av fiskens munnhule (figur 3).



Figur 3: Gjellescoring gjennomføres med de to ulike metodene i praksis. Bilde til venstre viser hvordan gjellescoring gjøres i anlegg mens bilde til høyre viser hvordan fisken holdes og undersøkes ved laboratoriescoremetoden.

Ti av fiskene som ble gjellescoret i hvert anlegg ble avlivet, og det ble tatt gjelleprøver til real-time RT-PCR samt histologi etter samme prøvetakingsprotokoll som beskrevet for laboratorieforsøket. Gjelleprøvene fra oppdrettsanleggene ble i tillegg til *P. perurans* analysert for tilstedeværelse av *Paranucleospora theridion* (syn. *Desmozoon lepeophtherii*), Salmonid gill pox virus (SGPV) og *Ca. Branchiomonas cysticola*.

Histologisk ble gjellepreparatene scoret semikvantitativt (0-4) etter følgende kategorier: AGD-score (hyperplasi som er tolket til å være mest forenlig med AGD), hyperplasi (total mengde hyperplasi), aneurysmer/telangiectasi, tromber, karskade (kronisk) og blødninger. I videre analyser er hyperplasi definert som total mengde hyperplasi minus AGD-score. De 5 kategoriene; hyperplasi, aneurysmer/telangiectasi, tromber, karskader (kronisk) og blødninger er definert som «andre skader» i videre analyser. Forekomst av pox-lignende forandringer, *P. theridion* forandringer og epiteliocystis ble angitt som observert eller ikke observert. Skalaen var som følger:

- 0 = ingen hyperplasi
- 1 = < 10 % av gjellevevet affisert (svært mild)
- 2 = 10 - 25 % av gjellevevet affisert (mild)
- 3 = 25 - 50 % av gjellevevet affisert (moderat)
- 4 = > 50 % av gjellevevet affisert (uttalt)

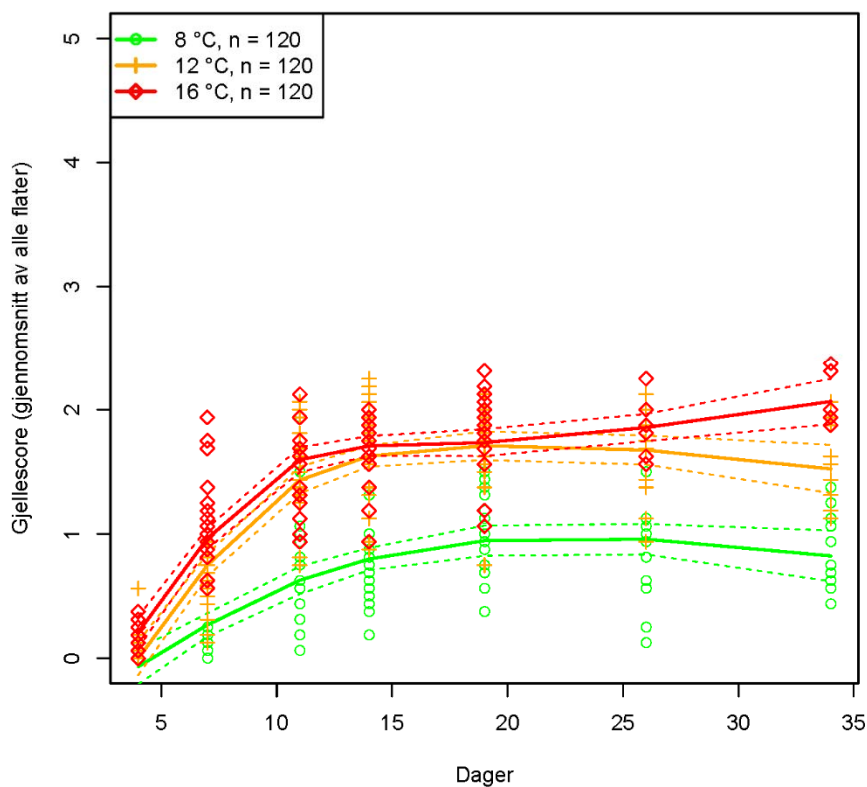
Statistikk

Dataene er presentert i figurer enten som boxplot eller barplot. Et boxplot viser variasjonen av tall som median (tykk strek), 25 til 75% kvantilene som bokser, det vil si at minst 50 % av dataene ligger inni boksen, mens strekene viser minimum og maksimumsverdier for tallene. Et barplot viser andelen av observasjonene som er i hver kategori. Områdene som det skilles på i figurene er enten gjellebuer, grupperinger av gjellebuer, eller områder på gjellebuer. For å se om det er statistisk signifikante forskjeller mellom områdene som er i barplottene ble hvert område tilegnet en kategori med tilhørende verdi. Når områdene er gjellebuer har vi totalt 4 gjellebuer. Kategoriene med tilhørende verdi i parentes blir da inndelt i: ikke mest affisert (0), eneste mest affiserte gjellebue (1), en av to mest affiserte gjellebuer (1/2), en av tre mest affiserte gjellebuer (1/3) eller alle gjellebuer like affisert (1/4). Hver fisk fikk så tildelt en verdi for hvert område og summen over alle fisker for hvert område ble beregnet. Deretter ble forventet gjennomsnitt for et område beregnet ved å trekke en verdi fra det mulige utfallet av verdier for alle *n* fiskene og summen av disse trekningene ble beregnet. Trekningene ble så gjentatt 10000 ganger. Hvis den reelle observerte summen var større enn 95 % kvantilen av de 10000 repetisjonene, eller mindre enn 5 % kvantilen, ble området ansett å ha signifikant henholdsvis høyere eller lavere sum av verdier og dermed være mer/mindre affisert enn forventet. Utfallsrommet tilsvarer mulige verdier et område kan få. For 4 kategorier vil utfallsrommet være (0, 1/4, 1/3, 1/3, 1/3, 1/2, 1/2, 1/2, 1).

Resultater

AGD-utvikling i laboratorieforsøk med *P. perurans* ved 8, 12 og 16 °C

Det ble observert gjellelesjoner hos fisk så tidlig som fire dager etter smitte med *P. perurans* ved alle tre vanntemperaturer, men AGD utviklet seg raskere ved 12 °C og 16 °C sammenlignet med ved 8 °C. Høyeste gjennomsnittlige scoreverdi (alle 16 flater) ble registrert i gruppen holdt ved 16 °C og var 2,0 på dag 34 etter smitte med *P. perurans*. Gjellescoreutviklingen flatet ut mellom 14 og 26 dager etter smitte i alle gruppene (figur 4). I perioden fra 26 til 34 dager etter smitte kunne man imidlertid se en økning i gjellescore i 16 graders-gruppen, mens det var en svak nedgang i gruppene holdt ved 8 og 12 °C. *P. perurans* ble påvist i gjellevevet ved hjelp av real-time RT-PCR, og de histologiske vurderingene bekreftet forandringer som var forenlige med AGD (hyperplasi og observasjon av amøber).

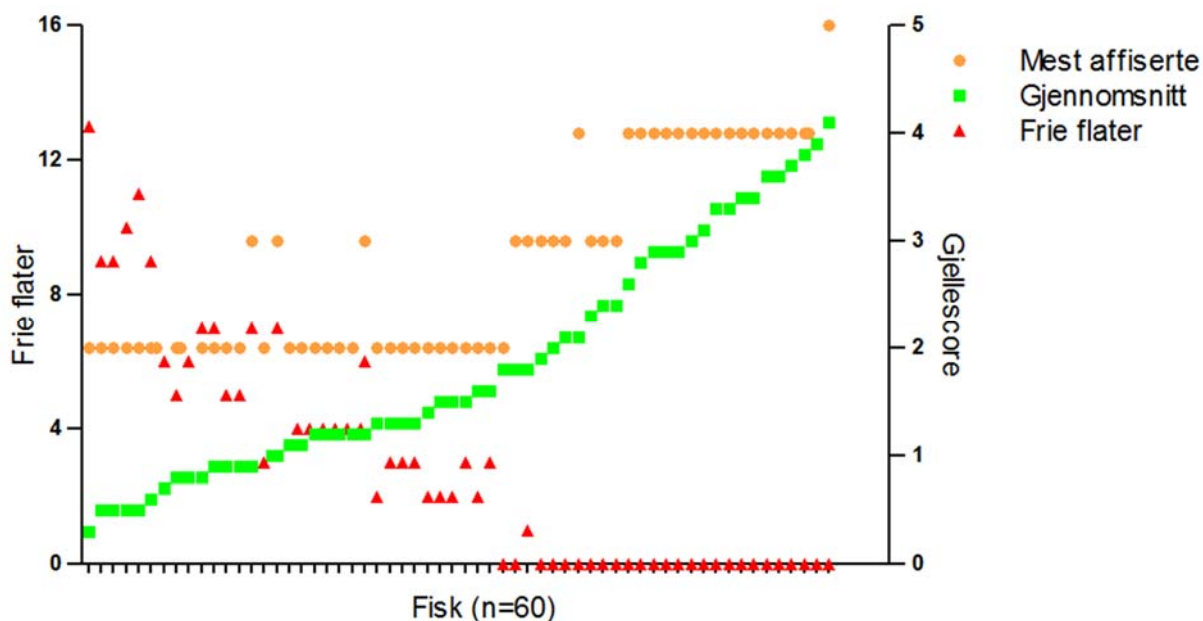


Figur 4: Gjellescoreutvikling ved 8, 12 og 16 °C. Hvert punkt i figuren (○, +, ◇) representerer gjellescoreverdien fra én fisk.

Ulike fremgangsmåter for beregning av scoreverdi

I figur 5 er gjellescore fra 60 enkeltfisker fra en og samme forsøksgruppe i et smitteforsøk fremstilt på tre ulike måter; 1) basert på den mest affiserte gjelleflaten 2) som gjennomsnitt av scoreverdien for alle 16 gjelleflatene 3) som antall frie gjelleflater. Blant fiskene som har gjellescoreverdi 2 basert på den mest affiserte gjelleflaten varierer antallet gjelleflater som er helt frie for lesjoner fra 0 til 13. Blant disse fiskene varierer også gjennomsnittlig score fra ca 0,2 til 1,9. Hos fisk som har gjellescoreverdi 3 som den høyeste verdien på en enkelt gjelleflate, er det tilnærmet ingen flater som er helt frie for lesjoner (figur 5). Det vil si at på dette stadiet i sykdommen har alle gjelleflatene makroskopiske forandringer forenlige med AGD. Blant disse fiskene varierer gjennomsnittlig score fra ca 2,1 til 2,9.

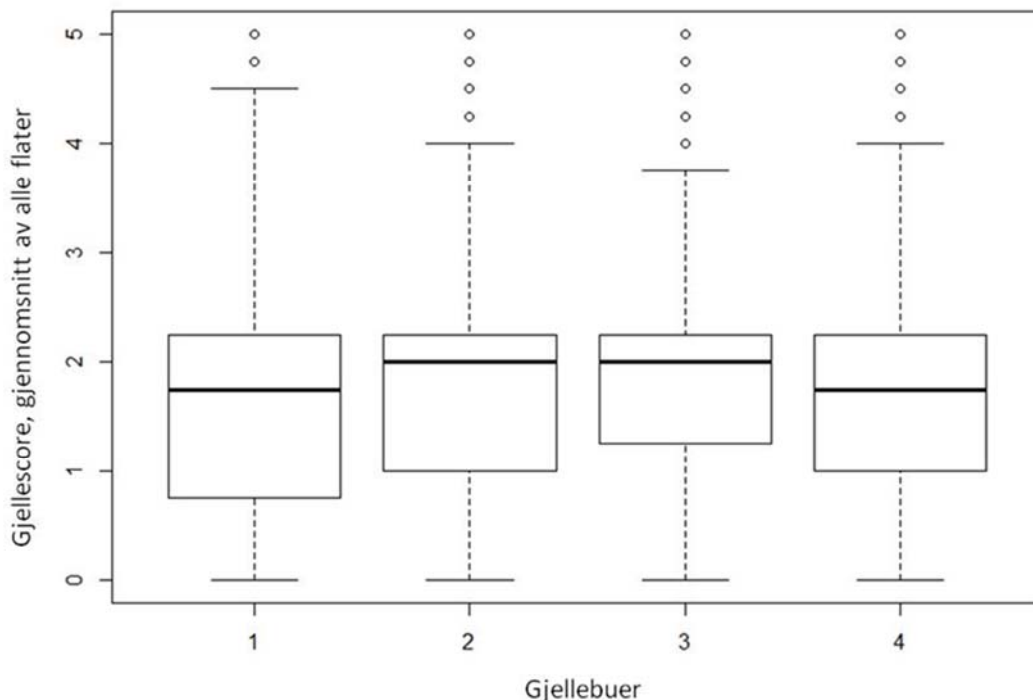
Gjellescore for enkeltfisker kan variere med nesten to hele scoreverdier avhengig av om man oppgir den mest affiserte gjelleflaten eller gjennomsnitt av scoreverdi på alle 16 gjelleflater ved angivelse av fiskens gjellescore.



Figur 5: Fremstilling av tre beregningsmetoder for gjellescore. X-aksen representerer enkeltfisker fra et smitteforsøk. Høyre y-akse angir gjellescore oppgitt enten som mest affiserte gjellefalte eller gjennomsnittlig score av alle 16 flatene. Venstre y-akse angir antall frie flater (0 - 16), altså antall gjelleflater helt uten makroskopiske forandringer (scoreverdi null).

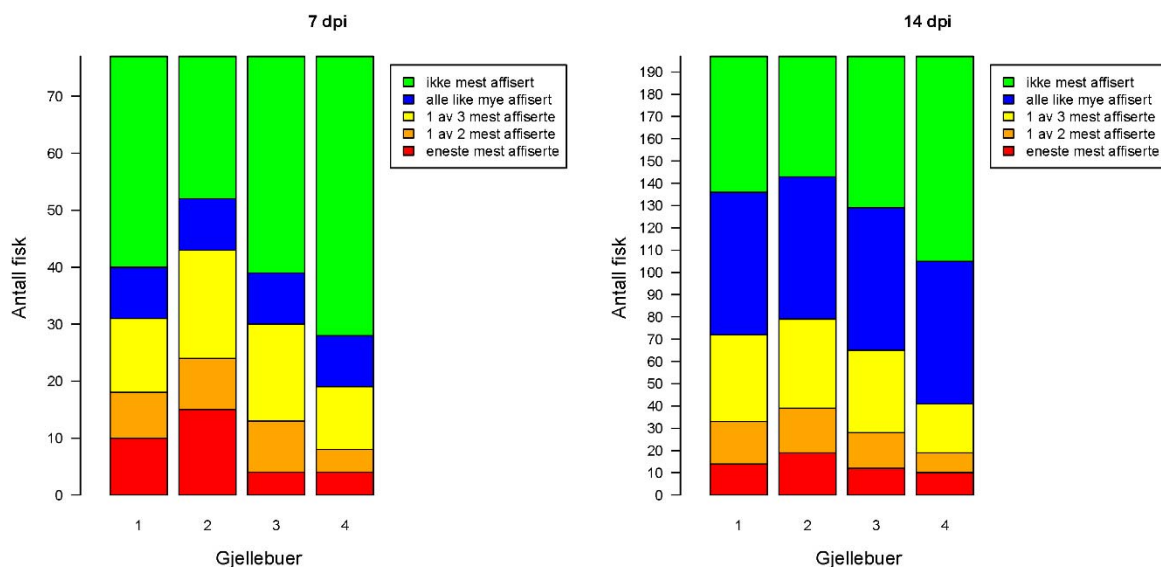
Forskjeller i gjellescoreverdi og utvikling på de ulike gjellebuene

En sammenstilling av gjellescoreverdier fra 780 fisk i smitteforsøk (fisken fra kontrollgruppene i 4 forsøk i FHF-prosjekt 901036 «AGD: Behandlingsstrategier/dose-responsstudier hos oppdrettslaks») viser at det ble registrert større makroskopiske forandringer på gjellebue 2 og 3 sammenlignet med på gjellebue 1 og 4 (figur 6). Det var signifikant høyere score på gjellebue 3 sammenlignet med på gjellebue 1 ($p < 0,001$).



Figur 6: Gjennomsnittlig AGD-gjellescore på de ulike gjellebuene hos fisk fra smitteforsøk (n=780). Boksplottene viser median verdien for gjellescore på gjellebue 1-4 med horisontal tykk strek. De midtre 50 % av dataene (fra 25 til 75 % kvartilene) er vist med bokser for hver gjellebue. Stiplede linjer viser lengden ut til minste/største verdi som ikke anses som ekstremt høy/lav. Symboler (○) angir verdier som anses å være mye høyere enn de resterende verdiene.

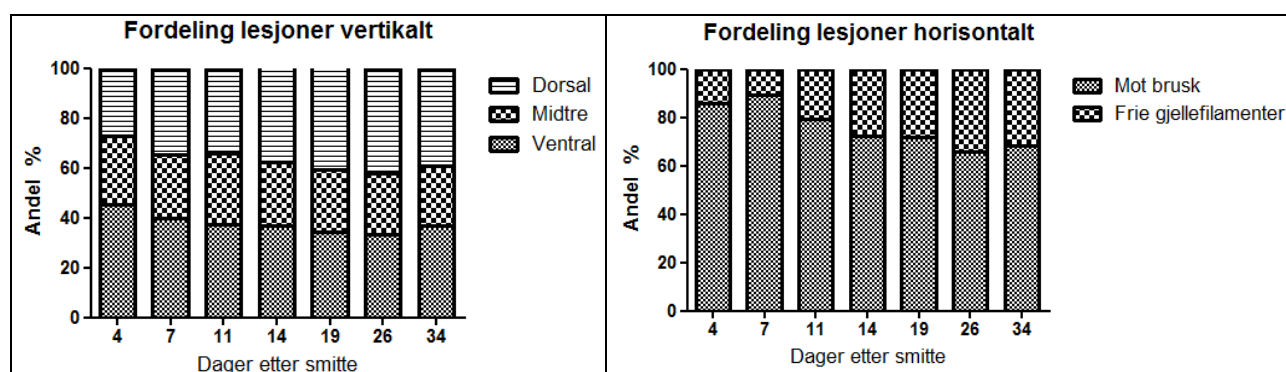
I smitteforsøket der utvikling av AGD ble studert i tidlig fase av sykdommen, ble det tidlig i forsøket observert større grad av makroskopiske AGD-forandringer på gjellebue nummer 2 enn på de andre tre gjellebuene (figur 7). Dette var tilfellet både ved 7 og 14 dager etter smitte (figur 7). Forskjellen mellom gjellebue nummer 2 og de andre buene var signifikant med $p = 0,006$ og $p = 0,02$ for henholdsvis 7 og 14 dager. Det understrekes at disse resultatene er fra smitteforsøk i laboratorium og at AGD-utvikling hos fisk kan være annerledes i merder i sjøen.



Figur 7: Figuren viser hvordan gjellescoren fordelte seg på de fire gjellebuene 7 dager (venstre) og 14 dager (høyre) etter smitte (dpi) med *P. perurans* i smitteforsøket der gjellescore ble studert i tidlig fase av AGD-utviklingen. Hver gjellebue er vist som én søyle, og søylen er delt inn etter følgende fem kategorier: Rød) gjellebuen har høyest gjellescoreverdi og er den eneste med denne scoren, Oransje) gjellebuen er en av to gjellebuer med den høyeste scoreverdien. Gul) gjellebuen er en av tre buer med den høyeste scoreverdien Blå) alle gjellebuene har samme scoreverdi. Grønn) gjellebuen har ikke den høyeste scoreverdien. Fisk uten gjellescore (scoreverdi 0 på alle buer) er ikke med i datagrunnlaget.

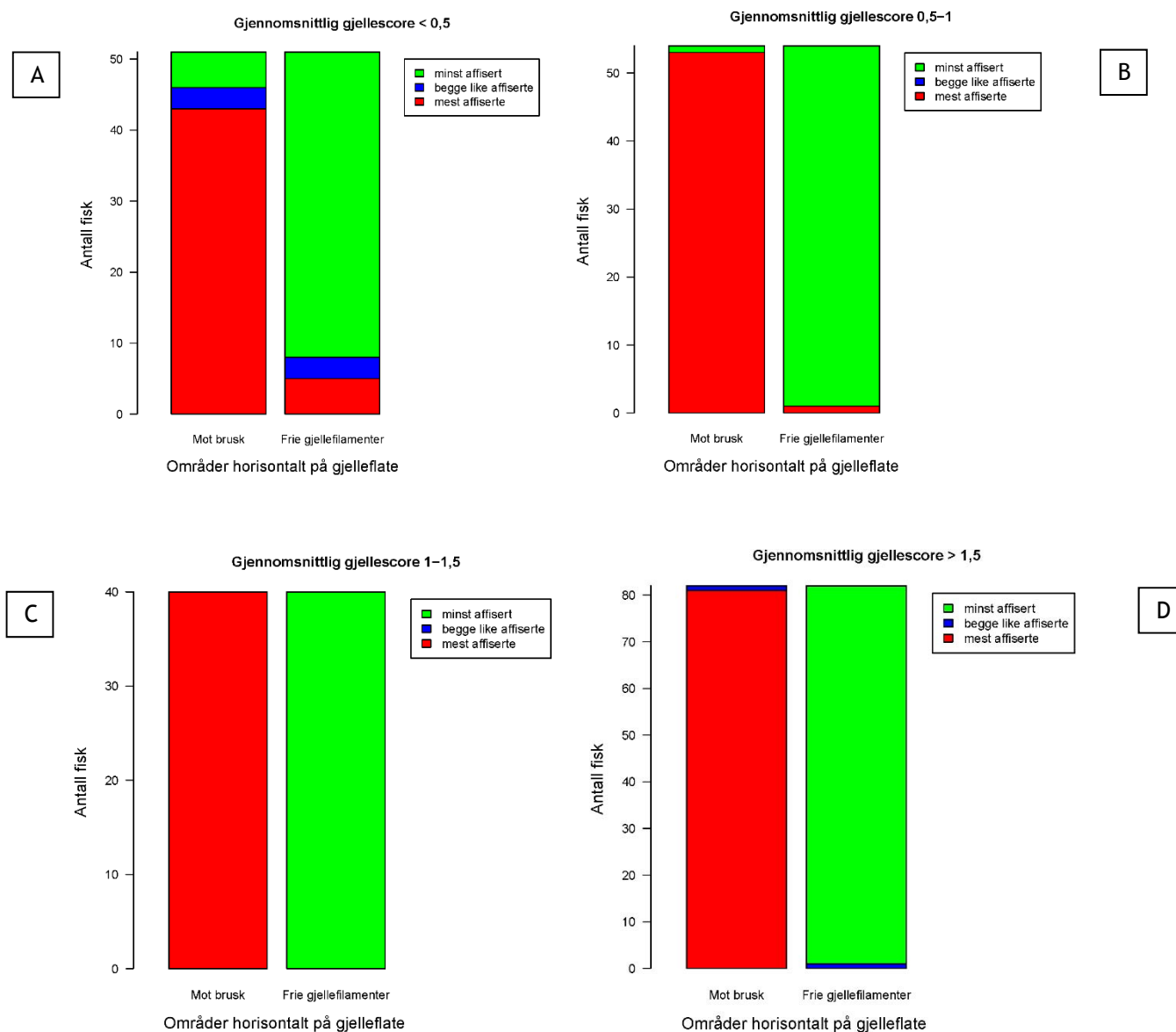
Plassering av lesjoner på gjelleflatene

I smitteforsøket der gjellescore ble studert i tidlig fase av AGD-utviklingen ble også plasseringen til lesjonene på hver gjelleflate registrert. Resultatene viser at det var flest lesjoner dorsalt og ventralt på gjelleflaten gjennom hele forsøket (figur 8). Gjennomsnittlig fordeling av lesjoner mellom de ulike regionene på gjellene var som følger: Dorsal region 37%, midtre region 26% og ventral region 38% når man vurderte alle uttakstidspunktene samlet. Det var også et tydelig mønster i fordeling av lesjoner mellom området inn mot brusken og området med frie gjellefilamenter (ytre del). De fleste lesjonene oppstod først i området inn mot brusken, før det fra 11 dager etter smitte gradvis blir flere lesjoner i området med frie gjellefilamenter (figur 8). Fordelingen mellom områdene inn mot brusken / frie gjellefilamenter var som følger: 4 dpi: 86 % / 14 %, 7 dpi: 89 % / 14 % og 11 dpi: 79 % / 21 %.

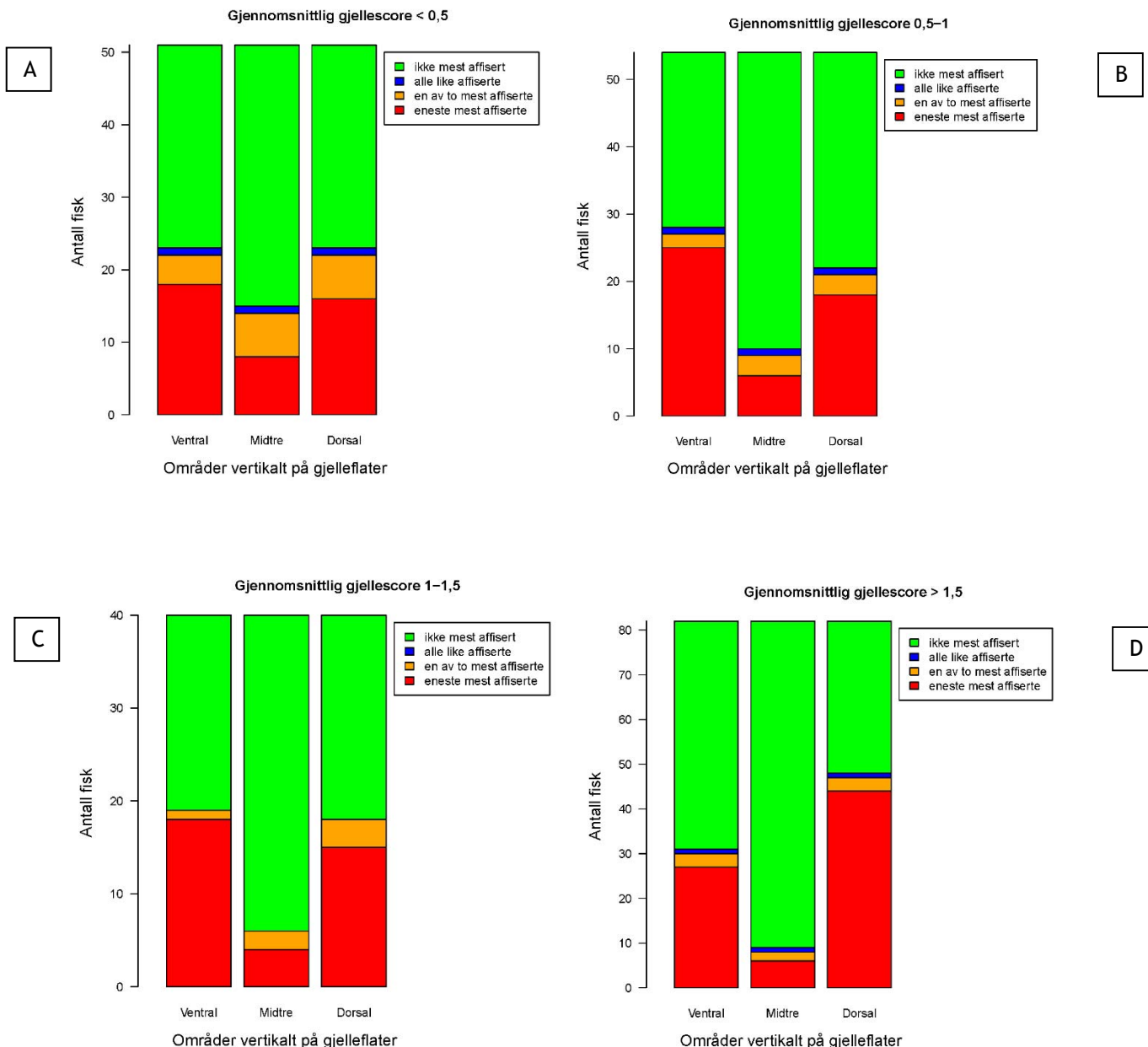


Figur 8: Fordeling av AGD-lesjoner vertikalt (figur til venstre) og horisontalt (figur til høyre) på gjelleflatene.

Områdene der de fleste lesjonene først oppstod (dorsalt og ventralt, samt inn mot brusken) var også de områdene som hadde flest registrerte lesjoner gjennom hele forsøket (figur 9 og 10). Områdene dorsalt og ventralt var signifikant mere affisert enn det midtre området ($p < 0,001$), og området nær brusken var signifikant mere affisert enn området ytterst med de frie gjellefilamentene ($0 < 0,001$). Dette gjaldt for alle gjellescorekategoriene som ble undersøkt ($<0,5$, $0,5-1$, $1-1,5$, $>1,5$).



Figur 9: Horisontal fordeling av lesjoner innenfor hver enkelt gjelleflate. Hver figur representerer en gruppe med fisk der gjennomsnittlig gjellescore er henholdsvis $< 0,5$ (A), $0,5 - 1,0$ (B), $1,0 - 1,5$ (C) og $> 1,5$ (D). Y-aksen angir antall fisk innenfor hver scoregruppe. Gjelleflaten er delt i to områder i horisontalplanet, nærmest brusken og frie gjellefilamenter, og angitt med hver sin søyle i figuren. Søylene er delt inn etter følgende tre kategorier. Rød: Området har flest lesjoner (er mest affisert). Blå: Begge områder har like mange lesjoner. Grønn: Området har ikke flest lesjoner.



Figur 10: Vertikal fordeling av lesjoner på hver enkelt gjelleflate innenfor grupper av fisk med gjennomsnittlig gjellescore < 0,5 (A), 0,5 -1,0 (B), 1,0-1,5 (C) og > 1,5 (D). Y-aksen angir antall fisk innenfor hver scoregruppe. Gjelleflaten er delt i tre områder i vertikalplanet fra dorsalt (mot hodet) via et midtre område (medialt) til ventralt (mot buken) og angitt med hver sin søyle i figuren. Søylene er delt inn etter følgende fire kategorier. Rød: Området har flest lesjoner (mest affisert). Oransje: Området er ett av to områder med flest lesjoner. Blå: Alle tre områder har like mange lesjoner, det vil si har samme verdi. Grønn: Området har ikke flest lesjoner.

Gjellescore og prøvetaking av laks i oppdrettsanlegg

Det ble gjennomført tre besøk hos anlegg 1, to besøk hos anlegg 2 og ett besøk hos anlegg 3. Av de tre anleggene ble det kun gjennomført AGD behandling hos anlegg 2, mens fisken i anlegg 3 aldri utviklet AGD i prosjektperioden. Totalt ble det gjellescoret 300 fisker (n = 50 fisk per uttak) med både laboratoriescoremetoden og det todelte scoresystemet. Det ble også tatt ut gjeller til PCR og histologi fra 10 fisker i hvert uttak.

Sammenligning av laboratoriescoremetoden og det todelte scoresystemet

Ved gjellescoring med laboratoriescoremetoden i oppdrettsanleggene, ble det ikke vurdert om gjelleforandringene var forårsaket av andre agens eller om de skyldtes eldre AGD-skader. Dette fordi man ikke skiller mellom aktiv AGD score og total gjellescore med laboratoriescoremetoden. Dermed ble gjellescoringen med laboratoriescoremetoden sammenlignet med total gjellescore fra den todelte gjellescoringsmetoden, ettersom disse scoreverdiene er sammenlignbare. Scoreverdien i begge metoder er basert på den enkeltgjelleflaten med høyest scoreverdi.

Det var godt samsvar mellom scoreverdier fra laboratoriescoremetoden og verdier fra det todelte scoresystemet (tabell 3). Differansen i score ved hvert uttak (gjennomsnitt av 50 fisk) varierte fra 0 til 0,5 mellom disse metodene. Det var avvik hos 117 av 300 fisker, hvorav 9 avvik var på to scoreverdier, mens 108 avvik var på én scoreverdi.

Det var størst differanse mellom laboratoriescoremetoden og det todelte systemet ved scoring av fisk i anlegg 2, ved et prøveuttak 10 dager etter behandling med ferskvann. Her var scoreverdien (gjennomsnitt av 50 fisk) ved bruk av laboratoriescoremetoden 3,42, mens total gjellescore fra det todelte systemet var 2,92, en differanse på 0,5.

Ved bruk av laboratoriescoremetoden til gjellescoring av den behandlede fisken i anlegg 2 fant vi at antallet frie flater hadde økt etter behandling, og at gjennomsnittlig gjellescore var redusert.

Gjennomsnittlig antall frie flater økte fra 0,12 før behandling til 2,98 etter behandling, og gjellescore beregnet som gjennomsnittsverdi for alle 800 gjelleflatene ble redusert fra 3,10 før behandling til 1,96 etter behandling. I likhet med resultatet fra det todelte scoresystemet som viser at aktiv AGD score var lav sammenlignet med total gjellescore, indikerer dette at behandlingen har redusert alvorlighetsgraden av AGD.

Tabell 3: Differanse i gjellescoreverdi (gjennomsnitt, n = 50 fisk per prøveuttak) ved sammenligning av laboratoriescoremetoden og total gjellescore fra det todelte systemet. Antall fisk der det var forskjell i gjellescoreverdi mellom de to metodene i parentes. *Anlegg behandlet med ferskvann mot AGD.

Anlegg	Prøveuttak	Differanse mellom laboratoriemetode og todelte gjellescoresystem
1	1	-0,14 (20)
1	2	0,02 (16)
1	3	-0,12 (15)
2	1	0,26 (16)
2	2*	0,50 (25)
3	1	0,00 (25)

Deteksjon av agens ved real-time RT-PCR og histologiske vurderinger av gjellene

P. perurans ble påvist med real-time RT-PCR i alle tre anleggene. Mengden RNA for *P. perurans* er angitt som Ct-verdier i tabell 4. I anlegg 1 var det synkende Ct-verdier i de tre prøveuttakene. Dette betyr at mengden *P. perurans* økte fra uttak én til uttak tre i dette anlegget, og kan tolkes som at mengden amøber økte med tiden i anlegg 1. I anlegg 2 var det høyere Ct-verdier ved andre prøveuttak, etter en behandling mot AGD med ferskvann, sammenlignet med ved første prøveuttak som var før behandling. Dette indikerer at mengden amøber har blitt redusert etter behandling. I anlegg 3 var det høye Ct-verdier, og AGD utviklet seg ikke i dette anlegget i prosjektperioden.

Parasitten *P. theridion* ble påvist i varierende mengder, men med 100 % prevalens i alle anleggene ved alle fem uttakene. Bakterien *Ca. B. cysticola* ble påvist med 100 % prevalens i anlegg 1, og i anlegg 3, men i varierende mengder. Denne bakterien ble ikke funnet i anlegg 2. Mengden av både *P. theridion* og *Ca. B. cysticola* ble noe redusert fra uttak én til uttak tre i anlegg 1. Se tabell 4.

Med unntak av AGD-score og total mengde hyperplasi ble det kun registrert svært milde eller milde forandringer i gjellepreparatene fra 60 fisk. Gjennomsnittsverdiene for hvert prøveuttak er oppgitt i tabell 4, under «andre skader». Forandringer forenlig med SGPV var hovedsakelig svært milde og fokalt- eller multifokalt utbredt. Det er også verd å merke seg at selv om tilstedeværelse av lesjoner assosiert med de ulike agensene i noen tilfeller var høye, så var forekomsten av disse forandringene karakterisert som milde eller svært milde (tabell 4).

Tabell 4: Gjellescore, PCR og histologi fra prøveuttakene i oppdrettsanleggene. Tabellen viser differansen mellom «total gjellescore» og «aktiv AGD-score» og gjennomsnittlig Ct-verdier for de ulike agensene med prevalenser i parentes. Histologiske forandringer er vurdert i et scoresystem fra 0-4 for AGD (AGD-score) og for øvrige lesjoner (andre skader, se material og metode). De tre siste kolonnene viser histologiske funn (prevalens) assosiert med SGPV, *P. theridion* og *Ca. B. cysticola*. ND = ikke funnet. n = 10 fisker per uttak.

Anlegg-uttak	Total vs Aktiv score	Real-time RT-PCR som Ct-verdier (prevalens %)				Histologi				
		<i>Ca. B. cysticola</i>	<i>P. theridion</i>	<i>P. perurans</i>	SGPV	AGD-score	Andre skader	SGPV	<i>P. theridion</i>	<i>Ca. B. cysticola</i>
1-1	0,7	14,8 (100%)	18,3 (100%)	18,0 (100%)	28,3 (20%)	0,6	0,54	80 %	100 %	100 %
1-2	1	15,9 (100%)	18,8 (100%)	16,1 (100%)	30,7 (10%)	1,1	0,52	30 %	100 %	90 %
1-3	0,9	19,3 (100%)	19,3 (100%)	15,1 (100%)	ND	1,5	0,7	20 %	100 %	90 %
2-1	1	ND	19,6 (100%)	13,0 (100%)	26,0 (60%)	2,8	0,58	80 %	80 %	30 %
2-2	2,6	ND	19,5 (100%)	21,2 (90%)	30,1 (20%)	0,7	0,72	40 %	80 %	0 %
3-1	0,6	29,2 (40%)	22,1 (100%)	25,5 (50%)	23,7 (100%)	0	0,66	80 %	90 %	20 %

Påvisning av agens med PCR og histologi versus differanse mellom total gjellescore og aktiv AGD-score

Differansen mellom total gjellescore og aktiv AGD-score sier noe om hvor påvirket gjellene er av andre faktorer enn aktiv-AGD. Differansen mellom disse verdiene var fra 0,6 til 1,0 i fem av uttakene, og 2,6 i uttaket hvor fisken var behandlet med ferskvann (tabell 3). Fra uttakene i oppdrettsanleggene var det tydelig at en differanse mellom aktiv AGD-score og total gjellescore kunne dokumenteres med det todelt scoresystemet. Det var også funn av andre agens enn *P. perurans* samt histopatologi assosiert med andre agens i de fleste prøveuttakene. Forandringene som kunne sees i histologiske snitt var imidlertid svært milde, og det var ikke mulig å vurdere hvorvidt de mikroskopiske funnene kunne relateres til makroskopisk gjellescore. Det var godt samsvar i utviklingen av aktiv AGD-score og den histologiske vurderingen av AGD-score.

Diskusjon

Gjelleflaten med høyeste scoreverdi bør angis som fiskens gjellescore

Makroskopisk gjellescoring er ansett som viktigste metoden for å vurdere status og utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos oppdrettslaks på merdkanten. Et hovedmål i dette prosjektet har vært å vurdere ulike fremgangsmåter for gjellescoring, samt å finne den best egnede måten å beregne fiskens gjellescoreverdi på under norske forhold. I denne vurderingen er det lagt vekt på at AGD-gjellescoringen skal gi et riktig bilde av status for sykdommen på scoretidspunktet, og gi informasjon om hvordan AGD utvikler seg hos fisken i den aktuelle merden over tid. Scoreverdien skal altså være en god betegnelse på fiskens gjellehelse. Høy praktisk gjennomførbarhet er et annet viktig kriterium som er vektlagt, det vil si at gjellescoringen skal kunne utføres raskt og effektivt, men samtidig skånsomt på et tilstrekkelig stort antall laks, og under krevende værforhold. I tillegg er det lagt stor vekt på at angivelsen av scoreverdi skal være så entydig som mulig slik at gjellescore kan sammenlignes mellom merder innenfor samme anlegg og mellom ulike næringsaktører.

Et scoresystem beskrevet av Taylor mfl. (2009) benyttes som grunnlag for AGD-gjellescoring hos de fleste aktører i oppdrettsnæringen. Dette systemet er basert på visuelle observasjoner av makroskopiske endringer og er dermed til en viss grad basert på subjektive vurderinger. Systemet åpner også for tolkning, og dette forsterkes ved at scoreverdiene tidlig i sykdomsforløpet relateres til antall flekker, mens scoreverdier senere i sykdomsforløpet oppgis som prosentvis utbredelse av lesjoner på gjelleflaten. Selv om de fleste baserer seg på systemet beskrevet i Taylor mfl. (2009) har fremgangsmåten for å beregne AGD-gjellescoreverdi vært mye diskutert blant norsk lakseoppdrettere. Kjernen i denne diskusjonen synes å være om fiskens AGD-scoreverdi skal bestemmes ut fra gjennomsnittlig scoreverdi for alle 16

gjelleflater, eller om enkeltgjelleflaten med den høyeste scoreverdien skal være direkte bestemmende for fiskens AGD-gjellescore. I dette prosjektet har vi analysert data fra flere AGD-smitteforsøk i laboratorium der detaljert gjellescore er registrert og notert for alle 16 gjelleflater. Fordeler og ulemper med forskjellige fremgangsmåter for beregning av scoreverdi i oppdrettsanlegg er vurdert, og sammen med praktisk erfaringsutveksling ved scoring av fisk i tre anlegg høsten 2017, har vi kommet frem til at fiskens AGD-scoreverdi bør beregnes basert på den enkeltgjelleflaten med høyest scoreverdi. Denne fremgangsmåten er lett å tilegne seg og forholde seg til, samtidig som den er praktisk gjennomførbar, entydig og med god repeterbarhet. Gjelleflaten med den høyeste scoreverdien er enkelt å registrere, sammenlignet med for eksempel gjennomsnittlig scoreverdi på alle 16 gjelleflater der store mengder informasjon må memoreres eller noteres før en verdi kan angis. Repeterbarheten anses som viktig for metoden fordi sykdomsutvikling skal vurderes over tid, noe som krever gjellescoring av fisk fra samme merd ved flere påfølgende tidspunkter, og også fordi verdiene fra gjellescoring utført av forskjellige personer skal kunne sammenlignes.

Datagrunnlaget fra laboratorieforsøkene gir støtte for at gjellescoring basert på den mest affiserte gjelleflaten gir et reelt øyeblikksbilde av AGD. I tidlig AGD-utvikling, det vil si ved gjellescore 1 og 2, vil imidlertid bruk av den mest affiserte gjelleflaten kunne gi et noe unyansert bilde av AGD innenfor en fiskegruppe. Dette fordi det vil være store individvariasjoner på dette stadiet med tanke på hvor mange gjelleflater som er affiserte ettersom fisken i denne fasen av sykdommen kan ha et varierende antall gjelleflater helt frie for lesjoner. Scoring med laboratoriescoremetoden gir et mer detaljert bilde av gjellescoreutviklingen enn scoring kun basert på den mest affiserte gjelleflaten, fordi laboratoriescoremetoden genererer en gjellescorematrise der data kan bearbeides og der gjellescore kan fremstilles på flere måter. I oppdrettsanlegg der hensikten med gjellescoring er å skaffe et godt øyeblikksbilde av AGD samt å vurdere utvikling av AGD over en tidsperiode, vurderes disse nyansene som mindre viktige. Ved gjellescoring i oppdrettsanlegg anser vi fordelene med en entydig, praktisk gjennomførbar og repeterbar metode som større enn ulempene som tapet av nyanser medfører.

Gjellescoring er et viktig verktøy i vurderingen av om fisk skal behandles mot AGD eller ikke. I fasen der behandling vurderes i et anlegg, følges AGD-utviklingen nøye med hyppige gjellescoringer. I slike sammenhenger har AGD-gjellescoring basert på høyeste scoreverdi på enkeltgjelleflate vist seg som godt egnet til å vurdere AGD-utviklingen (Stine Kolstø, FoMAS pers. medd.). Dette fordi denne fremgangsmåten for gjellescoring gir sammenlignbare verdier mellom to scoringstidspunkter (repeterbar). Etter behandling brukes gjellescoring som et verktøy for å vurdere behandlingseffekt. Data fra laboratorieforsøk har vist at scoring basert på den mest affiserte gjelleflaten kan ha svakheter når det gjelder å fange opp forskjeller i behandlingseffekt mellom fiskegrupper. Enkelte gjelleflater kan ha tilnærmet like høy score etter behandling som før behandling, mens et stort antall gjelleflater kan være helt frie for lesjoner (Hytterød mfl. 2017). Økning i antall frie flater etter behandling vil derfor ikke bli registrert med gjellescoreberegning som kun er basert på den mest affiserte gjelleflaten. Denne scoremetoden vurderes allikevel som godt egnet der hensikten er å undersøke AGD-utvikling over tid for å avklare om behandlinger har hatt ønsket effekt mot sykdommen.

Todelt gjellescoring

Forandringer som kan observeres på gjellene hos norsk oppdrettslaks har ofte multifaktorielle årsaker (Steinum mfl. 2010, Gjessing mfl. 2017) og makroskopisk gjellescoring kompliseres ved at slike gjelleskader kan forveksles med AGD. Det er derfor viktig å kunne skille mellom lesjoner som skyldes AGD, spesielt de lesjonene som er karakteristiske for AGD i utvikling, og lesjoner som har andre årsaker. For å kunne skille lesjoner som representerer AGD i utvikling fra andre lesjoner på fiskens gjeller, er det nødvendig med et todelte scoresystem. Fiskehelsetjenesten FoMAS AS har utviklet et todelte gjellescoresystem som har vært i bruk siden 2014. Systemet har vist seg som godt egnet til gjellescoring i oppdrettsanlegg, både på fisk tidlig og sent i sykdomsforløpet. Systemet viste seg som velegnet til scoring av fisk i anlegg der fisken hadde makroskopiske gjelleforandringer i tillegg til aktiv AGD-score i denne studien. I ett av anleggene som inngikk i denne studien ble fisk med langt fremskredet AGD behandlet med ferskvann i prosjektperioden. Ved prøveuttak 10 dager etter behandling ble aktiv AGD-score vurdert til å være null på de fleste fiskene, mens total gjellescore var tilnærmet lik som før behandling grunnet synlige hvite områder i gjellevevet (arrvev). Behandlingen hadde virket effektivt mot AGD, og dette ble fanget

opp av det todelte scoresystemet. Likevel var det tydelig at store deler av gjellevevet var skadet eller hadde arrvev etter AGD, og at gjellehelsen var svekket, hvilket også ble fanget opp av total gjellescore. Dette viser viktigheten av å kunne skille aktiv AGD-score fra andre gjelleforandringer og arrvev etter tidligere AGD-lesjoner, og det todelte scoresystemet vurderes som godt egnet i denne sammenheng. Under gjellescoringen etter ferskvannsbehandling erfarte prosjektgruppa at scoring av behandlet fisk er utfordrende, særlig der gjellene har høy total gjellescore. God opplæring er en nødvendighet for å kunne score presist under slike forhold, og erfaring vurderes her som en nødvendighet.

Makroskopisk gjellescore og tilstedeværelse andre agens enn *Paramoeba perurans*

Differansen mellom total gjellescore og aktiv AGD score utgjøres av de makroskopiske skadene som enten skyldes eldre AGD-forandringer (arrvev), mekaniske skader, eller lesjoner forårsaket av andre agens. I prøveuttakene i denne studien lå denne forskjellen mellom 0,6 og 1 scoreverdi. Det var imidlertid ikke mulig å vurdere hvorvidt lesjonene var forårsaket av *P. theridion*, *Ca. B. cysticola*, SGPV, andre agens eller mekaniske skader. Eldre AGD skader er imidlertid en lite sannsynlig forklaring på differansen i score ved prøveuttakene i disse anleggene, ettersom fisken var satt i sjø 25 - 89 dager før våre prøveuttak, og anleggene hadde ingen langvarig AGD-historikk. Anlegget som ble behandlet for AGD i prosjektperioden er et unntak, der differansen mellom aktiv AGD-score og total score (2,6) trolig i stor grad kan tilskrives arrvev fra tidligere AGD-lesjoner.

Alle fire agens som ble påvist i vev fra laksegjeller ved PCR-analyser i de tre oppdrettsanleggene høsten 2017 er assosiert med proliferativ gjellebetennelse (proliferative gill inflammation - PGI), en betegnelse på kronisk betennelse i gjellene hos laks (Steinum mfl. 2015). Det var også funn av mikroskopiske forandringer i de histologiske snittene, som var forenelig med det som er beskrevet ved PGI, nemlig betennelse, proliferasjon og celledød (Steinum mfl 2015). Disse forandringene ble imidlertid vurdert til å være svært milde eller milde. Det er uklart i hvilken grad de ulike agensene bidrar til PGI, og dermed er det også vanskelig å fastslå om makroskopiske forandringer som ble observert i denne studien skyldes de undersøkte agensene. Oss bekjent, har ingen lyktes med å dyrke *P. theridion*, *Ca. B. cysticola* og SGPV, og det har dermed ikke vært mulig å gjennomføre kontrollerte smitteforsøk som kan avklare deres rolle.

AGD-gjellescoring i laboratorieforsøk

I laboratorieforsøk der AGD studeres er det viktig med et gjellescoresystem som kan fange opp selv små forskjeller mellom enkeltfisker og fiskegrupper på best mulig måte. Fremgangsmåten som er anbefalt for scoring av laksegjeller i oppdrettsanlegg, der fiskens scoreverdi angis basert på høyeste score på enkeltgjelleflate, har svakheter når det gjelder å fange opp små forskjeller mellom fiskegrupper. Dette kom tydelig frem under laboratorieforsøk der behandling med hydrogenperoksid og ferskvann ble studert (Hytterød mfl. 2017). Der måtte det en mer detaljert gjellescoring til for å bedre fange opp små forskjeller mellom gruppene som gjennomgikk ulike typer behandlinger, og det var også tydelig at scoreverdien på den mest affiserte gjelleflaten ikke alltid dokumenterte behandlingseffekter på en tilfredsstillende måte. Under behandlingsforsøkene ble derfor laboratoriescoremetoden utviklet og etablert, der individuelle score for alle 16 gjelleflater ble registrert. Ved scoring med denne metoden kan enkeltscoreverdiene for en gruppe på 10 fisker (n = 160 gjelleflater) betraktes som en gjellescorematrise (figur 1). Denne matrisen gir et godt grunnlag for å studere detaljer i gjellescoreutviklingen hos individer eller innenfor en gruppe. Den gir for eksempel mulighet til å beregne gjellescore som gjennomsnittet av de 16 enkeltscoreverdier hos hver fisk, en beregningsmåte som skiller forskjeller mellom forsøksgrupper på en god måte. Matrisen kan også brukes til å finne antallet gjelleflater som er frie for score, og hvor mange gjelleflater som er frie for lesjoner innenfor matrisen. Det ble for eksempel vist at når høyeste scoreverdi på en enkeltgjelleflate defineres til å være 3, så har de aller fleste av fiskens 16 gjelleflater synlige lesjoner. Verd score 1 og 2 derimot, vil antallet frie flater variere mye mellom enkeltfisker. Ved studier der gjellescore brukes som metode for å vurdere behandlinger, vil det detaljerte systemet egne seg godt til å studere selv små forskjeller i effekt mellom de ulike behandlingene. Vi anbefaler derfor at det skisserte registreringssystemet brukes i eksperimentelle forsøk der målet er å studere effekter av ulike AGD-behandlingsmetoder, eller i andre typer smitteforsøk der det vil være viktig å fange opp små forskjeller i gjellescore mellom forsøksgruppene.

Fordeling av lesjoner på gjellebuer og gjelleflater

Gjellevevet hos fisk er beskrevet som et ideelt område/sted for parasittiske infeksjoner på grunn av stor blodgjennomstrømning og god oksygenering (Hughes mfl. 1973). Parasitter som transporteres i de frie vannmassene kan komme i kontakt med gjellene og fester seg der når fisken pumper vann over gjellene for gassutveksling, ioneregulering og ekskresjon av avfallsstoffer. Infeksjonsgraden er trolig relatert til ventilasjonsvolumet og til strømningsforholdene gjennom gjelleapparatet (Hughes mfl. 1973). Paling (1968) viste at vanngjennomstrømningen er størst i den tredje gjellespalten, det vil si mellom gjellebue 2 og 3. Deretter følger gjellespalte 2 og 4 med moderat vanngjennomstrømning, mens vanngjennomstrømningen er lavest i gjellespalte 1 og 4. Det er grunn til å anta at *P. perurans* transporteres fritt med vannmassene og at vanngjennomstrømningen over gjellene er bestemmende for infeksjonsgraden av amøber på gjellebuene. Data fra smitteforsøkene viser at gjellebue 2 og 3 oppnår den høyest gjellescoren. Hvis mengden *P. perurans* er en bestemmende faktor for gjellescoreutvikling og mengden agens er styrt av vanngjennomstrømning, kan den høye vanngjennomstrømningen mellom gjellebue 2 og 3 være en forklaring på at disse buene oppnår de høyeste gjellescoreverdien.

Denne studien viser også at de fleste lesjonene oppstår på gjellebue 2, og dette er signifikant sammenlignet med når lesjonene er synlig på de andre gjellebuene. Dette er med og støtter antakelsen om at det fester seg mest *P. perurans* på de midterste gjellebuene under smitte. Paling (1968) viste at elvemuslinglarver festet seg med høyes antall på gjellebue 2 og 3. Denne parasitten transporteres fritt i vannmassene på samme måte som *P. perurans* og resultatet støtter hypotesen om at mengden amøber på hver gjellebue er relatert til vanngjennomstrømning. Det anses som viktig i næringen å kunne oppdage *P. perurans* på fiskegjeller så tidlig som mulig. Dette gir mulighet til å overvåke sykdomsutvikling og forberede eventuelle behandlingstiltak hvis dette er nødvendig. En vevsprøve fra gjellebue 2 er standard prosedyre for uttak av gjellevev til screening for *P. perurans* og andre gjelleagens. Uavhengig av bakgrunnen for denne prosedyren, viser våre resultater at gjellebue 2 trolig er et godt valg, da tidlig utvikling av lesjoner på denne gjellebuen trolig henger sammen med forekomst av amøber.

Forekomst- og fordeling av lesjoner på de ulike områdene på gjelleflaten

Resultatene fra laboratorieforsøket viser at de fleste lesjonene oppstod dorsalt og ventralt på gjelleflaten, det vil si i områdene på gjellen som er orientert nærmest fiskens hode og buk, og at lesjoner oftest kan påvises her gjennom sykdomsforløpet. Det var også et tydelig mønster der lesjonene først oppstod inn mot brusken framfor ytterst på gjellebuene med de frie filamentene. Årsaken til at lesjoner finnes i disse regionene i større grad enn i de andre områdene har trolig sammenheng med strømningsforhold lokalt på gjelleflatene. Det er grunn til å tro at området inn mot brusken har en mer laminær vannstrøm enn området ut mot de frie filamenter der vannstrømmen er mere turbulent. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor makroskopiske lesjoner utvikler seg først og kraftigst inn mot brusken, men her trengs det mere forskning for å kunne konkludere.

Oppsummering

Et makroskopisk AGD-gjellescoresystem til bruk i oppdrettsanlegg skal gi et godt bilde av status for AGD på scoretidspunktet, og over tid kunne gi informasjon om hvordan AGD utvikler seg hos fisken i den aktuelle merden. Et godt system må altså gjøre det enkelt å plassere sykdomsstatus på riktig sted innenfor en definert skala, og samtidig gi et riktig inntrykk av fiskens generelle gjellehelse. I tillegg er det en stor fordel med et entydig system som har god praktisk anvendbarhet og som samtidig er relativt enkelt å lære og å forstå. Under norske forhold er det også behov for et system som kan skille AGD-forandringer fra andre gjelleskader. Det todelte gjellescoresystemet som er testet og evaluert i denne studien oppfyller etter våre vurderinger disse forutsetningene.

I laboratorieforsøk med AGD sammenlignes ofte sykdomsutviklingen mellom fisk i ulike forsøksgrupper. I slike forsøk er det viktig med et scoresystem som gir et detaljert bilde av sykdomsutviklingen slik at selv små forskjeller mellom forsøksgrupper kan fanges opp på en god måte. Laboratoriescoresystemet som er beskrevet i denne studien er godt utprøvd gjennom en rekke AGD-smitteforsøk og oppfyller etter våre vurderinger de nevnte kriteriene. Laboratoriescoremetoden fanger også opp hvor mange flater som blir

frie for lesjoner etter behandling, og dermed kan denne metoden avdekke forskjeller i behandlingseffekt mellom grupper på en god måte.

AGD-lesjonene fordelte seg ujevnt utover gjelleflatene, og de fleste lesjonene ble observert i områder dorsalt og ventralt, samt inn mot brusken på gjelleflatene. Lesjoner ble også påvist tidligere på gjellebue 2 enn på de andre gjellebuene.

Referanser

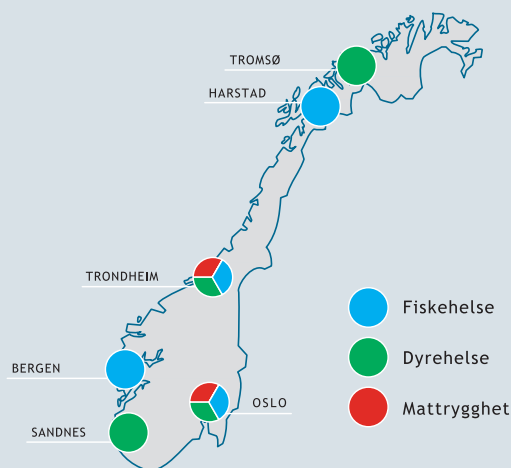
1. Adams, M.B., Nowak B.F. (2003). Amoebic gill disease (AGD): sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 26, 601-614.
2. Adams, M.B., Nowak, B.F. (2004). Experimental amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: further evidence for the primary pathogenic role of *Neoparamoeba* sp (Page, 1987). *Journal of Fish Diseases* 27, 105-113.
3. Baxter EJ, Sturt MM, Ruane NM, Doyle TK, McAllen R, Rodger HD. Biofouling of the hydroid *Ectopleura larynx* on aquaculture nets in Ireland: implications for finfish health. *Fish Vet J.* 2012; 13:17-29.
4. Gjessing MC, Thoen E, Tengs T, Skotheim SA, Dale OB. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases.* 2017; 40(10):1253-65. pmid: 28105681.
5. Hjeltne B, Bang-Jensen B, Bornø G, Haukaas A, Walde C S (red), Fiskehelserapporten (2017), Veterinærinstituttet 2018.
6. Hughes, G.M., Morgan, M. (1973). The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biol. Rev.* (1973), 48, pp. 419-475. BRCPAH 48-3
7. 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.
8. 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, 36s.
9. Munday, B.L. (1986). Diseases of salmonids. In: Humphrey, J.D., Langdon, J.S. (Eds.), *Proceedings of the Workshop on Diseases of Australian Fish and Shellfish* (Benalla, Victoria).
10. Oldham, T., Rodger, H., Nowak, B.F. (2016). Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) - An epidemiological review. *Aquaculture* 457 (2016) 35-42.
11. Paling, J.E. (1968). A method of estimating the relative volumes of water flowing over the different gills of freshwater fish. *J. Exp. Biol.* (1968), 48, 533-544.
12. Persson, D., Kolstø, S., Pedersen, TM. (2015). The use of a double gill scoring system for field evaluation of gill health in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). EAAP 2015. Poster.
13. Rodger, H.D., McArdle, J.F. (1996). An outbreak of amoebic gill disease in Ireland. *Vet. Rec.* 139, 348-349.
14. Taylor R.S., Muller W.J., Cook M.T., Kube P.D., Elliott N.G. (2009). Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture* 290, 1-8.
15. Steinum T, Kvellestad A, Colquhoun DJ, Heum M, Mohammad S, Grøntvedt RN. (2010). Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of Aquatic Organisms.* 2010; 91(3):201-11. pmid:21133320.
16. Steinum, T.M., Brun, E., Colquhoun, D., Gjessing, M., Lie, K.L., Olsen, A.B., Tavnorpanich, S., Gjevre, A.G. (2015). Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann - patologi, utvalgte agens og risikofaktorer. Veterinærinstituttets rapportserie 8, 24s.
17. Young, N. D., Crosbie, P. B., Adams, M. B., Nowak, B. F., & Morrison, R. N. (2007). *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int J Parasitol*, 37(13), 1469-1481. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.018.

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