

**Effekt av ferskvassbehandling på gjeller hjå  
laks (*Salmo salar* L.) med amøbegjellesjukdom  
(AGD): gjellepatologi, prevalens og tettleik av  
*Paramoeba perurans***

**Master i fiskehelse**

**Søgni Wiik**



**Institutt for biovitenskap**

**Universitetet i Bergen**

**Juni 2020**



# Innholdsliste

<b>Forord</b> .....	I
<b>Samandrag</b> .....	II
<b>Forkortingar</b> .....	IV
<b>1. Innleiing</b> .....	1
<b>1.1 Norsk akvakultur</b> .....	1
<b>1.2 Gjellesjukdom i oppdrett</b> .....	1
<b>1.3 <i>Paramoeba perurans</i></b> .....	3
<b>1.4 Amøbegjellesjukdom</b> .....	4
1.4.1 Patologi .....	5
1.4.2 Risikofaktorar .....	7
1.4.3 Diagnostikk og påvising av AGD .....	9
<b>1.5 Vertsregister, reservoar og smittespreiing</b> .....	10
<b>1.6 Behandling</b> .....	11
<b>1.7 Mikrobiota</b> .....	12
<b>1.8 Mål med studien</b> .....	15
<b>2. Material og metode</b> .....	16
<b>2.1 Beskriving av isolat (<i>P. perurans</i>)</b> .....	16
<b>2.2 Smitteforsøk</b> .....	17
2.1.1 Smitte av laks med <i>P. perurans</i> .....	17
2.1.2 Ferskvassbehandling .....	17
2.1.3 Vassmiljøparametrar .....	18
<b>2.2 Prøveuttak</b> .....	18
2.2.1 Gjellescoring .....	19
2.2.2 Uttak.....	21

<b>2.3 Kvantitativ berekning av <i>P. perurans</i> RNA-nivå i gjelleprøver</b> .....	23
2.3.1 RNA-ekstraksjon frå gjellevev .....	23
2.3.2 Real-time RT-PCR.....	24
2.3.4 Berekning av normaliserte ekspresjonsverdiar for <i>P. perurans</i> RNA-nivå.....	26
<b>2.4 Histologi</b> .....	26
<b>3. Resultat</b> .....	28
<b>3.1 Screening av fisk i forkant av forsøket</b> .....	28
<b>3.2 Smitteforsøk</b> .....	28
<b>3.3. Gjellescore</b> .....	30
Del 1.....	31
Gjennomsnittleg gjellescore .....	31
Frie flater .....	33
Del 2.....	34
Gjennomsnittleg gjellescore .....	34
Frie flater .....	37
Del 1 og del 2 samla.....	38
Gjellescore per gjelleflate.....	38
<b>3.4 Real-time RT-PCR analyser</b> .....	40
Del 1 .....	40
Prevalens av <i>P. perurans</i> .....	40
Mengde <i>P. perurans</i> i gjellevev .....	41
Del 2.....	43
Prevalens av <i>P. perurans</i> .....	43
Mengde <i>P. perurans</i> i gjellevev .....	44
RNA-nivå av <i>P. perurans</i> per gjelleboge.....	47

<b>3.5 Korrelasjon mellom gjellescore og real-time RT-PCR resultat</b> .....	49
Del 1 og del 2 samla.....	49
Gjellescore og RNA-nivå av <i>P. perurans</i> for HS2 ved alle uttak i forsøket .....	49
Del 2.....	51
Gjellescore og <i>P. perurans</i> RNA-nivå for kvar enkelt gjelleboge .....	51
<b>3.6 Histologi</b> .....	57
Del 2.....	57
Histopatologiske funn .....	57
<b>4. Diskusjon</b> .....	69
<b>Mengde <i>P. perurans</i> RNA i dei ulike gjellebogane</b> .....	71
<b>Samsvar mellom real-time RT-PCR analysar og gjellescore</b> .....	72
<b>Effekt av ferskvassbehandling</b> .....	73
<b>Referanseliste</b> .....	83
<b>6. Appendiks</b> .....	96
6.1 Tabellar.....	96
6.2 Oppskrifter.....	96
6.3 Formlar .....	97
6.4 Programvare.....	97

## Forord

Denne masteroppgåva er ein del av profesjonsstudiet i fiskehelse hjå Universitetet i Bergen (UiB) ved det matematiske-naturvitskaplege fakultet. Arbeidet har vore knytt til prosjektet «Effekter av behandling mot lakselus, amøbegjellesykdom (AGD), og notrengjøring på gjellehelse hos laks i oppdrett» (FHF-901514), som er eit samarbeid mellom UiB, Stiftelsen Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB), Pharmaq Analytiq, NORCE og Universitetet i Stirling.

Først og fremst vil eg takke mine to rettleiarar Are Nylund og Linda Andersen for god hjelp og støtte gjennom masterperioden, sjølv om siste innspurt våren 2020 ikkje vart optimal med tanke på restriksjonar og heimekontor som følgje av koronaviruspandemien.

Vidare vil eg takke Christiane Trösse for grundig og god opplæring på lab.

Takk til Steffen H. Blindheim for svar på både store og små spørsmål rundt detaljar i prosjektet.

Takk til Alf S. Dalum for god hjelp med å tolke dei histologiske snitta, og for å gi grundige og oppklarande svar på alle mine spørsmål om ulike histologiske funn.

Eg vil rette ein stor takk til alle medstudentane mine på fiskehelse for å ha bidratt til ei svært fin studietid i Bergen, og for godt samhold på lesesalane i 3.etg. Det var vel ikkje akkurat slik vi hadde sett for oss at fem år med studie saman skulle ende, men vi får ta igjen feiringa ved nærmaste anledning. Eg ser veldig fram til å sjå dykk igjen på ulike konferansar og samankomstar i framtida.

Til slutt vil eg takke familie, venner og romkameraten min i kollektivet for å ha haldt ut med meg gjennom heile masterperioden. Tusen takk for støtte og gode råd, og for fine og naudsynte avbrekk frå skrivinga.

Bergen, 16.06.20

Søgni Wiik

## Samandrag

Eit av dei største problema ein opplever i sjøfasen hjå oppdrettslaks er dårleg gjellehelse. Det har eit komplekst årsakstilhøve og er ofte assosiert med eit breitt spekter av patogen. Eit av patogene som kan infisere gjellene hjå laks er amøben *Paramoeba perurans* som forårsakar amøbegjellesjukdom (AGD). Sidan 2012 har denne sjukdomen ført til vesentlege tap i norsk lakseoppdrett. For å halde kontroll på sjukdomsutbrot er ein ofte nøydd å behandle fisken, og ein av dei vanlegaste metodane for behandling av AGD er ferskvassbehandling. Likevel kan slike behandlingar medføre stress for fisken, og under til dømes ferskvassbehandling, der ein får ei rask endring i vassmiljø, kan det tenkjast at det vil føre til endringar i til dømes mikrobiotaen på gjellene. Ein har lite kunnskap rundt dynamikken mellom produksjonsstress, mikrobiota og gjellehelse.

Denne masteroppgåva er ein del av eit større FHF-prosjekt (nr. 901514) der hovudmålet er å undersøke korleis produksjonsstress (m.a. behandling av AGD eller mot lakselus, og spyling av nøter) påverkar gjellehelsa til laks. Eit delmål i dette prosjektet var å kartlegge effekten av behandling mot AGD ved bruk av ferskvatn i eit eksperimentelt oppsett med berre *P. perurans* til stade. Difor gjennomførte ein eit smittforsøk på ILAB med Atlantisk laks i kontrollert miljø. Fisken vart smitta med eit klonalt isolat av *Paramoeba perurans*, opphavelig isolert i oktober 2013 frå oppdrettslaks med AGD i Hordaland, Vest-Norge. Ferskvassbehandling vart gjennomført 16 dagar etter smitte, med ein varigheit på 3 timar. Effekt av ferskvassbehandling vart gjennom denne studien målt ved gjellescore, kvantifisering av amøbemengde i gjellelev målt ved real-time RT-PCR og histologi av gjeller. Ein nytta òg tal på frie flater (gjelleflater utan gjellescore) som eit mål på effekt av behandling.

Denne studien bekreftar resultat frå tidlegare litteratur om ferskvassbehandling av AGD, då ein såg at behandlinga hadde ein reduserande effekt på gjellescore, og på prevalens og RNA-nivå av *P. perurans*. Behandlinga førte òg til at ein i snitt fekk fleire frie flater per fisk i behandla grupper samanlikna med ubehandla grupper. Histologiske funn var foreinleg med tidlegare beskriven AGD-patologi, men ein kunne ikkje sjå ein klar effekt av behandling på histologiske snitt.

Dette er det første studiet som har undersøkt fordeling av *P. perurans* RNA-nivå mellom dei åtte gjellebogane hjå Atlantisk laks gjennom eksperimentelt smittforsøk med utvikling av AGD. Ein såg at det ikkje var betydelege skilnadar mellom gjellebogane ved høg prevalens, og difor er alle gjellebogane like eigna for uttak av vevsprøver til PCR-analysar. Ved låg

prevalens såg ein at RNA-nivået av *P. perurans* varierte mellom gjellebogane, og difor anbefalast det å ta ut prøver frå fleire gjeller, eller frå mange fisk, for å få eit best mogleg bilde av korleis effekt av behandling har vore.



## Forkortingar

<b>Forkorting</b>	<b>Betydning</b>
AGD	Amøbegjellesjukdom
ASPV	Atlantisk laks Paramyxovirus
CDG	«Complex Gill Disease», Kompleks gjellesjukdom
CFU	«Colony-forming unit», Kolonidannande eining
CMS	Kardiomyopatisyndrom
Ct-verdi	Terskel syklusverdi
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Dpi	Dagar etter smitte
Dpt	Dagar etter behandling
E	Effektivitet (tilknytt assay i real-time RT-PCR)
EL1A	Elongeringsfaktor 1 alfa for Atlantisk laks (assay)
FAO	FNs organisasjon for ernæring og landbruk
FHF	Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering
F-primer	«Forward»-primer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
HE	Hematoksylin og eosin
HS1	1. gjelleboge på høgre side
HS2	2. gjelleboge på høgre side
HS3	3. gjelleboge på høgre side
HS4	4. gjelleboge på høgre side
ILAB	Stiftelsen Industrielaboratoriet i Bergen
ILAV	Infeksiøs lakseanemi virus
IPNV	Infeksiøs pankreasnekrose virus
L	Liter
mg	Milligram
mL	Milliliter
MYB	Malt-gjær-buljong
N	Tal på individ
NCGD	«Non-cultured gill-derived», ikkje-kultivert gjelleavleia
NE	Normalisert ekspresjon

nM	Nanomolar
NTC	Negativ templatkontroll
<i>P. branchiphila</i>	<i>Paramoeba branchiphila</i>
<i>P. pemaquidensis</i>	<i>Paramoeba pemaquidensis</i>
<i>P. perurans</i>	<i>Paramoeba perurans</i>
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PD	Pankreas sjukdom
PGI	Proliferativ gjelleinflammasjon
PMCV	Piscine myokarditt virus
Pperu	Assay mot <i>Paramoeba perurans</i>
PRV	Piscine orthoreovirus
PSU	«Practical salinity units», Praktiske salinitetseiningar
Realtime RT-PCR	Sanntids revers transkriptase polymerasekjedereaksjon
RK	Reinsekontroll
RNA	Ribonukleinsyre
R-primer	«Revers»-primer
RT	Revers transkriptase
SGPD	«Salmon gill poxvirus disease»
SGPV	Salmonid gjellepoxvirus
sp.	Art (ukjent) innad slekta
spp.	Artar innad slekta
SSB	Statistisk sentralbyrå
UiB	Universitetet i Bergen
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
VS1	1. gjelleboge på venstre side
VS2	2. gjelleboge på venstre side
VS3	3. gjelleboge på venstre side
VS4	4. gjelleboge på venstre side

# 1. Innleiing

## 1.1 Norsk akvakultur

Norge er blant dei ti ledande landa i verda på akvakulturproduksjon, og nummer to i verda når det kjem til eksport av sjømat (FAO, 2019). Tal henta frå SSB viser at det i 2018 vart seld 1,28 millionar tonn Atlantisk laks (*Salmo salar* Linnaeus, 1758), og 68 345 tonn regnbogeare (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). Dette gjer at Norge er verdas største produsent av laksefisk. Den samla førstehandsverdien etter sal av desse to artane utgjorde 67,5 milliardar kroner i 2018 (SSB, 2020). Laks åleine utgjorde 94,6% av total produksjon i norsk akvakultur, medan regnbogeare berre utgjorde 5% av totalen. Dette viser at oppdrettsnæringa er ei særskilt viktig næring i Norge, og det er forventa at den kjem til å fortsette å vere det i framtida om ein klarar å løyse utfordringane ein har. Ei av dei store utfordringane er sjukdom som gjev dårleg vekst, redusert fiskevelferd og dødelegheit, og som fører til økonomiske tap for næringa. I 2019 vart infeksjon med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer, 1837), virussjukdomane PD (pankreassjukdom, Salmonid alphavirus) og CMS (Kardiomyopatisyndrom/«Hjartesprikk», Piscine myokarditt virus), sårproblematikk (forårsaka av t.d. bakteriar), og kompleks/multifaktoriell gjellesjukdom meldt inn blant «topp ti problem på matfisk laks» i Fiskehelse rapporten (Sommerset *et al.*, 2020).

## 1.2 Gjellesjukdom i oppdrett

Eit av dei største problema ein opplever i sjøfasen hjå oppdrettslaks er dårleg gjellehelse, og dette har eit komplekst årsakstilhøve. Det har over fleire år vore eit velferdsmessig problem, og førekomsten av gjellesjukdomar er aukande (Sommerset *et al.*, 2020). Denne auka kan delvis forklarast med at ein har fått større fokus på gjellehelse og diagnostikk. Sidan sjukdomen ofte er multifaktoriell kan det vere vanskeleg å seie nøyaktig kva som er årsaka til gjelleskadane (Herrero *et al.*, 2018). Faktorar som kan påverke sjukdomsbildet er til dømes temperatur, vassmiljø, algeoppblomstringar, fisken sin generelle helsestatus, handtering av fisken, og kva patogen som er til stades (Nylund *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2018). Gjellesjukdom er ikkje er meldepliktig og det er difor vanskeleg å vite nøyaktig omfanget av dette i oppdrettsnæringa. Sjølv om det er usikkert kor stor førekomsten er, viser tal frå Fiskehelse rapporten 2019 at det har vore ei auke i tal påvisingar av gjellebetennelse frå 2018 til 2019 (Sommerset *et al.*, 2020). For lakseoppdrett globalt er gjellesjukdomar òg eit aukande

problem, men framleis har ein mange kunnskapshøl (Mitchell og Rodger, 2011; Rodger *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2018; Rozas-Serri, 2019).

Der finns ei rekke patogen som er assosiert med ulike gjellesjukdomar, og ofte vert fleire påvist samtidig (sjå tabell 1.1). Sjukdomsnamn som «epiteliocystis», «proliferativ gjellebetennelse» (PGI) og «kompleks gjellesjukdom» (CGD, «Complex gill disease») vert gjerne brukt litt om kvarandre. Likevel er epiteliocystis hovudsakleg assosiert med bakteriar i Chlamydiales ordenen (*Ca. Piscichlamydia salmonis*, *Ca. Clavichlamydia salmonicola*, og *Ca. Syngnamydia salmonis*) og  $\beta$ -proteobakterien *Ca. Branchiomonas cysticola* (Nylund, Kvenseth og Isdal, 1998; Draghi *et al.*, 2004; Karlsen *et al.*, 2008; Steinum *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2013; Nylund *et al.*, 2015). Mikrosporidien *Desmozoon lepeophtherii* (syn. *Paranucleospora theriidion*) er assosiert med PGI og «haustsjuka» (Nylund *et al.*, 2010; Nylund *et al.*, 2011; Steinum *et al.*, 2010). *Ichthyobodo salmonis* er òg assosiert med gjellesjukdom, og kan forårsake Ichthyobodose («Costia») (Isaksen *et al.*, 2011; Isaksen *et al.*, 2012). Eit virus som ofte har vorte assosiert med gjellesjukdomar er salmonid gjellepoxvirus (SGPV) (Nylund *et al.*, 2008; Nylund *et al.*, 2011; Gjessing *et al.*, 2017). Paramyxovirus (ASPV) har òg vorte påvist i samanheng med gjellesjukdom, men har i etterkant ikkje vist seg å vere så viktig (Fridell, Devold og Nylund, 2004; Kvellestad, Dannevig og Falk, 2003; Kvellestad *et al.*, 2005; Steinum *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2018). Amøben *Paramoeba perurans* forårsakar amøbegjellesjukdom (AGD) (Young *et al.*, 2007), og har sidan 2012 ført til vesentlege tap i norsk lakseoppdrett (Sommerset *et al.*, 2020; Mo *et al.*, 2015). *Tenacibaculum maritimum* som er knytt til gjelleproblem i oppdrett av Atlantisk laks i British Columbia (Canada), har dei siste åra òg vorte påvist i norsk lakseoppdrett (Frisch *et al.*, 2018).

**Tabell 1.1** Oversikt over gjellepatogen hjå laks i Norge.

<b>Patogen</b>	<b>Sjukdom</b>
<i>Ca. Branchiomonas cysticola</i>	Epiteliocystis
<i>Ca. Piscichlamydia salmonis</i>	Epiteliocystis
<i>Ca. Syngnamydia salmonis</i>	Epiteliocystis
<i>Ca. Clavichlamydia salmonicola</i>	Epiteliocystis

<i>Desmozoon lepeophtherii/ Paranucleospora theriidion</i>	PGI/«Haustsjuka»
<i>Ichthyobodo</i> spp. ( <i>salmonis</i> )	Ichthyobodose/«Costia»
Poxvirus (SGPV)	SGPD
Paramyxovirus (ASPV)	Ikkje aktuell
<i>Paramoeba perurans</i>	AGD
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Tenacibaculose

### 1.3 *Paramoeba perurans*

*Paramoeba perurans* vert taksonomisk plassert i slekta *Paramoeba*, familie Paramoebidae, orden Dactylopodia, subklasse Flabellinea, klasse Discosea og rekke Amoebozoa (Smirnov *et al.*, 2011; Kudryavtsev, Pawlowski og Hausmann, 2011). *Neoparamoeba perurans* vert brukt synonymt i litteraturen, men namnebruken er mykje omdiskutert då det ikkje finns klare skilje mellom slektene *Neoparamoeba* og *Paramoeba*, verken morfologisk eller genetisk (Feehan *et al.*, 2013). I denne oppgåva vert forslaget til Feehan *et al.* (2013) følgt, og dei aktuelle artane vert referert til som *Paramoeba* spp.

Amøben er ein eincella mikroorganisme, og opptrer som ein fritt-levande fakultativ ektoparasitt (Oldham, Rodger og Nowak, 2016). Cella har ikkje tydelege strukturar på overflata, men har ein klart definert plasmamembran (Young *et al.*, 2007; Oldham *et al.*, 2016; Wiik-Nielsen *et al.*, 2016). Den har to typar cytoplasma; hyalint/transparent ektoplasma, og granulært/kornete endoplasma. Ektoplasmaen kan danne utløparar frå cella i varierende lengder og former, og det er desse som vert kalla pseudopodier (Page, 1987). Endoplasmaen inneheld organellane, næringsvakuolene og cellekjernen (3,3 – 6,0 µm) (Young *et al.*, 2007; Wiik-Nielsen *et al.*, 2016).

I tillegg innehar den alltid ein eller fleire parasom (*Perkinsela* spp.) i nærleik til cellekjernen, ein eukaryotisk endosymbiont som er i nær slekt med parasittiske flagellatar (*Ichthyobodo necator*) (Page, 1987; Dyková *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2014; Tanifuji *et al.*, 2011; Wiik-Nielsen *et al.*, 2016). Funksjonen til parasoma er ikkje kjent, men sidan amøben alltid har minst ein parasom til stades, er denne symbiosen truleg obligatorisk og mutualistisk (Dyková *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2014). Det er vist at symbiosen er obligat i *P. pemaquidensis* (Tanifuji *et al.*, 2017). Ein intracellulær bakterie, *Ca. Syngnamydia salmonis*

(*Chlamydiales*, *Simkaniaceae*), kan òg vere til stades i *P. perurans*, og i forsøk der bakterien vart samdyrka i amøben vart det vist at den er i stand til å formeire seg i amøben (Nylund *et al.*, 2018).

Frittflytande, runde amøbar kan ha ein diameter på rundt 20-30  $\mu\text{m}$ , medan adherente amøbar har vorte målt til over 50  $\mu\text{m}$  (Karlsbakk *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2007). *P. perurans* i kultur kan ha stor variasjon i morfologien, og kan vere alt frå distinkte runde celler, til polymorfe celler med tydelege pseudopodier (Wiik-Nielsen *et al.*, 2016). Amøben har ikkje ekte cystedanning med dobbelt cellevegg, men kan danne opprunda stadium som liknar på cyster og vert kalla pseudocyster (Lima, Taylor og Cook, 2017). Det er vist at *P. perurans* kan overleve akutt osmotisk stress ved å danne pseudocyster, og det er føreslått at det òg kan vere ein strategi for å beskytte seg i situasjonar med avgrensa areal tilgjengeleg for adhesjon eller redusert tilgang til næring (Lima *et al.*, 2017; Wiik-Nielsen *et al.*, 2016). Den fullstendige livssyklusen og reservoara til *P. perurans* er ukjent (Oldham *et al.*, 2016).

## 1.4 Amøbegjellesjukdom

Amøbegjellesjukdom (AGD) hjå Atlantisk laks og regnbogeare i sjøoppdrett vart først beskrive på midten av 1980-talet i Tasmania, Australia (Munday *et al.*, 1990). Sidan då har det utvikla seg til å verte det mest alvorlege helseproblemet i marint oppdrett av laksefisk i Tasmania (Oldham *et al.*, 2016). Dei seinare åra har sjukdomen òg ført til store problem i Europa, med betydelege tap i oppdrettsnæringa i Irland og Skottland (Rodger, 2014). I dag førekjem AGD globalt, og er påvist hjå 17 forskjellige fiskeartar spreidd over heile verda (Oldham *et al.*, 2016; Hvas *et al.*, 2017).

Etiologien til AGD hjå laks var i mange år ukjent, og ulike amøbeartar vart foreslått som agens. Artane *Paramoeba pemaquidensis* og *Paramoeba branchiphila* vart hyppig isolert frå gjeller frå fisk med AGD, og difor sterkt assosiert med sjukdomen (Kent, Sawyer og Hedrick, 1988; Munday, Zilberg og Findlay, 2001; Dykova *et al.*, 2005). Problemet var at ein ikkje klarte å framkalle sjukdomen i eksperimentelle smitteforsøk (Morrison *et al.*, 2005). Young *et al.* (2007) oppdaga seinare, ved bruk av artsspesifikke oligonukleotidprobar, at probane for *P. pemaquidensis* og *P. branchiphila* ikkje festa seg til amøbar assosiert med AGD. Det vart derimot påvist ein annan ukjent amøbeart, ved bruk av ein probe for ein ikkje-kultivert gjelleavleia (NCGD, «non-cultured gill-derived») amøbe, som vi i dag kjenner som arten *P. perurans*. Young *et al.* (2008) testa vidare prøver frå 4 forskjellige fiskeartar med AGD frå 6

ulike land for nærvær av *P. perurans*, og viste at denne amøben var einaste agens til stades ved desse utbrota. Crosbie *et al.* (2012) gjennomførte seinare eit smittforsøk som oppfylte Koch's postulat, og bekrefta slik at *P. perurans* er agenset som forårsakar AGD hjå laks. Nyare forskning frå Tasmania har vist at 11 fleire amøbeartar kan kolonisere gjellene hjå laks med AGD samstundes som *P. perurans*, men rolla deira i sjukdomen er framleis uklar (English *et al.*, 2019).

Her i Norge vart amøben *P. perurans* først påvist i 2006, assosiert med gjellesjukdom og høg dødelegheit hjå laks ved fire ulike lokalitetar på Vestlandet (Nylund *et al.*, 2007; Nylund *et al.*, 2008; Steinum *et al.*, 2008). På det eine anlegget vart det registrert dødelegheit på 80%, men fordi det òg vart registrert PGI ved utbrotet er det usikkert i kor stor grad dødelegheita var direkte årsaka av AGD. Etter desse utbrota av AGD vart det ikkje gjort nye påvisingar før i 2012 og 2013, med høvesvis 5 og 56 tilfelle (Hjeltnes, 2014), altså med ei kraftig auke i denne korte perioden (tidobling). I 2014 hadde tal påvisingar ytterlegare auka til 69 utbrot (Bornø og Lie Linaker, 2015). I desse åra frå 2012-2014 var det mange anlegg i Sør-Norge som opplevde auka dødelegheit og store tap då dei blei hardt ramma av AGD. Sidan den gong har sjukdomen vorte sett på som ein av dei mest alvorlege gjellesjukdomane òg her til lands med årlege utbrot (Mo *et al.*, 2015; Bornø og Lie Linaker, 2015; Hjeltnes *et al.*, 2018; Sommerset *et al.*, 2020). I 2019 hadde ein påvisingar frå Rogaland i sør, til Nordland i nord, men førebels har ein i følgje Veterinærinstituttet ikkje gjort påvisingar nord for dette og i Finnmark (Sommerset *et al.*, 2020). Handtering av AGD vert gjort gjennom behandling med mellom anna ferskvatn, og saman med hyppige undersøkingar med molekylære metodar som real-time PCR («screening») har det bidrege til betre sjukdomskontroll (Sommerset *et al.*, 2020). Tal på sjukdomsutbrot varierer etter sesong. Det observerast flest utbrot i perioden frå august til november, men det kan starte allereie i juni og vare til februar-mars året etter (Mo *et al.*, 2015). Rensefisk, mellom anna berggylt (*Labrus bergylta* Ascanius, 1767), rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* Linnaeus, 1758), blåstål/rødnebb (*Labrus mixtus* Linnaeus, 1758) og grøngylt (*Symphodus melops* Linnaeus, 1758), som vert nytta til biologisk avlusing i stor grad i oppdrett i Norge, har òg fått påvist AGD (Karlsbakk *et al.*, 2013; Haugland *et al.*, 2017; Steigen *et al.*, 2018).

#### **1.4.1 Patologi**

Klinisk ser ein «svimarar» med respirasjonsproblem, gjerne i form av auka respirasjonsrate, utståande gjellelokk og redusert appetitt (Kent *et al.*, 1988; Munday *et al.*, 1990; Steinum *et*

*al.*, 2008). Patologien avgrensar seg hovudsakleg til gjellene. Amøben vert ofte assosiert med gjelleepitelet der den prolifererar (Adams og Nowak, 2004b). I affiserte område vil det skje endringar lokalt, og makroskopisk kan ein observere kvite og slimete områder eller flekkar (engelsk: «patchar») på gjelleoverflatene som er verten sin respons på infeksjonen i møte med patogenet (Clark og Nowak, 1999; Adams og Nowak, 2001). Hjø Atlantisk laks speglar omfanget av lesjonane ofte sjukdomen si alvorsgrad, og på grunn av det kan ein vurdere utviklinga av sjukdomen enkelt ved å undersøke grad av skadar eller lesjonar på gjelleflatene, ved såkalla gjellescoring (Taylor *et al.*, 2009b).

I smittforsøk med AGD har det vorte observert skilnadar i fordeling av flekkar på gjellebogane, der dei fleste lesjonane oppstod dorsalt og ventralt på gjelleflata, altså i områda på gjella som er orientert nærmast hovud og buk på fisken (Hytterød *et al.*, 2018). Lesjonane kan oftast påvisast i desse områda gjennom eit sjukdomsforløp. Ein kan òg sjå at lesjonar først oppstår inn mot brusken enn ytst på gjellebogen mot dei frie gjellefilamenta (Hytterød *et al.*, 2018). I tillegg har ein sett at gjelleboge 2 og 3 kan få ein signifikant høgare gjellescore enn dei andre gjellebogane (Hytterød *et al.*, 2018). Det vert difor spekulert rundt om dette kan komme av at ein har ein større vassgjennomstrøyming mellom gjelleboge 2 og 3 (som demonstrert av Paling (1968)), dersom mengda av *P. perurans* er ein bestemmande faktor for gjellescoreutvikling og mengde agens vert styrt av vassgjennomstrøyminga (Hytterød *et al.*, 2018).

Histologisk er AGD assosiert med hyperplasi av epitelceller, samanvaksne sekundærlamellar og danning av interlamellære vesiklar (lakuner, kavitering) (Kent *et al.*, 1988; Munday *et al.*, 1990; Clark og Nowak, 1999; Adams og Nowak, 2001). Amøbar har vorte observert inni desse lakunene (Kent *et al.*, 1988; Adams og Nowak, 2001), eller i nærleik til epitelet langs det affiserte området (Bustos *et al.*, 2011). Tilstrøyming av immunceller (leukocytter) er òg assosiert med affiserte områder i gjellevevet, både nøytrofiler, makrofagar og eosinofile granulære celler har vorte observert (Adams og Nowak, 2001; Lovy *et al.*, 2007). På grunn av auka slimproduksjon vert det òg observert auke i tal slimceller (Munday *et al.*, 1990; Zilberg og Munday, 2000; Adams og Nowak, 2003). I områder med store lesjonar i form av hyperplasi kan tal på kloridceller vere redusert (Munday *et al.*, 1990; Adams og Nowak, 2003), og ved danning av mindre lesjonar har det vorte observert avstøyting av kloridceller (Adams og Nowak, 2003). I nokre alvorlege tilfelle har det òg vorte observert histopatologiske endringar i indre organ, med multifokale nekrosar i levervev (Rodger, 2014).



Dei patologiske endringane vil føre til at den funksjonelle overflata til gjellene vert redusert. Dette kan gjere respirasjon og osmoregulering vanskeleg, og føre til at fisken får respiratorisk acidose (Powell, Fisk og Nowak, 2000). Sjølv om gassutvekslinga over gjellene er redusert, kjem truleg ikkje dødelegheita av akutt respiratorisk svikt. Det er vist at fisk med AGD i hypoksisk miljø kan kompensere for redusert gjelleoverflateareal ved å redistribuere blodgjennomstrøyminga i gjellene eller ved å auke perfusjonen gjennom gjellene (Powell *et al.*, 2000). Andre effektar ein har sett av sjukdomen er vasokonstriksjon og hypertensjon som viser at ein kan ha signifikante endringar i den kardiovaskulære fysiologien under infeksjon (Leef *et al.*, 2007). Sjølv om ein ikkje veit heilt sikkert kva dødsårsaka for AGD er, er det truleg ein samanheng mellom respirasjons- og sirkulasjonsforstyrningar som fører til død (Powell, Reynolds og Kristensen, 2015). Patologien som har vorte funne i levervev i samanheng med AGD er foreinleg med slike sirkulasjonsforstyrningar, og kan ofte sjåast seint i forløpet (L. Andersen, pers. kom). Dødelegheita oppstår gjerne i samanheng med behandlingar og handtering av fisken, sidan sjuk fisk vil vere meir utsett for stress i slike situasjonar (Powell *et al.*, 2015).

Sjølv om tilhøvet mellom vert og patogen er nøye undersøkt for AGD, kan ein framleis ikkje forklare alt som omhandlar verten sin immunrespons under infeksjon med *P. perurans* (Benedicenti *et al.*, 2015). På eit tidleg stadium av infeksjonen er det foreslått at *P. perurans* triggar ein klassisk inflammasjonsrespons, med infiltrering av T-celler i gjellevev og auka uttrykking av cellulære markørar assosiert med antigenbærande celler og B-celler (Pennacchi *et al.*, 2014). Seinare i sjukdomsforløpet er det vist at fisken kan ha ein immundempande strategi som er tilsvarande det ein ser under infeksjon med helmintiske parasittar, der cellemedierte drapsmekanismar vert undertrykt (Benedicenti *et al.*, 2015). Det òg vist at det kan skje oppregulering av proinflammatoriske cytokin i seine stadium av sjukdomen (Morrison, Young og Nowak, 2012; Bridle *et al.*, 2006). Elles er det framleis store kunnskapshøl her.

#### **1.4.2 Risikofaktorar**

Globalt er det vanskeleg å finne trendar i kva som triggar utbrot fordi *P. perurans* er lite vertsspesifikk og kan infisere mange ulike fiskeartar over heile verda (Oldham *et al.*, 2016; Hvas *et al.*, 2017). Sjukdomsutbrota såg ut til å vere avgrensa til periodar med høg sjøtemperatur (>12 °C) og høg salinitet (Clark og Nowak, 1999; Douglas-Helders *et al.*, 2001). I Tasmania var utbrota assosiert med sjøtemperaturar mellom 15-20 °C i sommar/haust

halvåret (Munday *et al.*, 1990), og i mange andre tilfelle vart det vist at det kunne vere ein samanheng mellom periodar med unaturlege høge temperaturar og etablering av AGD i nye områder (Oldham *et al.*, 2016). Det har òg vorte reflektert rundt om klimaendringar, med tanke på høgare temperaturar, kan vere med å påverke utbrot av AGD med ein sterkare effekt på lakseoppdrettsnæringa enn før (Nowak og Archibald, 2018). Eit anna aspekt ved høg temperatur er at det kan overstige den kritiske grensa for kva Atlantisk laks toler, som er rundt 20 °C (Elliott, 1994 sitert i (Jonsson og Jonsson, 2009)), og difor kan det tenkjast at fisken då vert meir mottakeleg for sjukdom på grunn av andre fysiologiske utfordringar, heller enn at virulensen til amøben har auka (Clark og Nowak, 1999; Oldham *et al.*, 2016). Sjølv om ein kan sjå fleire utbrot av AGD ved temperaturar over 12 °C, kan det òg førekomme utbrot ved lågare temperaturar (Clark og Nowak, 1999; Douglas-Helders *et al.*, 2001; Rodger, 2014; Mo *et al.*, 2015). I Norge er det dokumentert kliniske utbrot ved temperaturar heilt ned til 6-7 °C (Steinum *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2015).

Salinitet har vist seg å vere den viktigaste miljøfaktoren for utbrot av AGD (Clark og Nowak, 1999). Salinitet over 25‰ er forbunde med risiko, og lokalitetar som har høg salinitet (> 32 ‰) er mest utsett for sjukdomsutbrot (Clark og Nowak, 1999; Douglas-Helders *et al.*, 2001; Munday *et al.*, 2001; Steinum *et al.*, 2008). *P. perurans* er ein marin amøbe og har låg toleranse for ferskvatn (Oldham *et al.*, 2016), og Bridle *et al.* (2015) viste i eit forsøk at det var samanheng mellom salinitet og amøben si evne til å feste seg i cellekulturflasker (CHSE-214). Tal på amøbar som hadde festa seg var signifikant høgare ved 30 ‰ enn ved 20 ‰ (Bridle *et al.*, 2015). Collins *et al.* (2019) fant at populasjonar av *P. perurans* dyrka *in vitro* hadde optimal vekst ved 15 °C og 35 ‰. Den lågaste temperaturen og salinitet for vekst låg mellom 4-8 °C og 20-25 ‰.

Andre faktorar som har vist seg å kunne påverke utvikling av sjukdomen er tettleik av fisk, immunstatusen til fisken, storleik på fisken, genetikk, behandlingar, om der er andre gjellepatogen til stades, algeoppblomstringar og vasskvalitet på lokaliteten (Adams og Nowak, 2001; Munday *et al.*, 2001; Bermingham og Mulcahy, 2004; Crosbie *et al.*, 2010; Rodger, 2007; Douglas-Helders *et al.*, 2004; Bermingham og Mulcahy, 2007; Clark og Nowak, 1999; Kube, Taylor og Elliott, 2012). Kor stor dose med amøbar fisken har vorte eksponert for vil òg påverke alvorgrad av sjukdomen, der ein har observert at dess høgare konsentrasjonen av amøbar er, dess meir alvorleg vert forløpet (Zilberg, Gross og Munday, 2001). I smittforsøk med *P. perurans* gjennomført ved UiB og ILAB har ein òg registrert at det førekom variasjonar mellom fiskepopulasjonar, og mellom individ i populasjonane (Kindt,

2017). Det er vist at Atlantisk laks har genetiske resistensmekanismer mot AGD og at desse er arvelege (Taylor *et al.*, 2009a; Kube *et al.*, 2012). Dette kan bety at det varierer kor mottakeleg laks er for amøben. Ein har likevel ikkje fullstendig kunnskap om korleis alt dette spelar inn på infeksjonsforløpet.

Intensiveringa av lakseoppdrett, med påfølgande auke i fisketettleik og biomasse som vert oppdretta, og miljøtilhøva i merdane har vorte rapportert som signifikante risikofaktorar for utbrot av AGD (Nowak, 2007; Oldham *et al.*, 2016), men per dags dato føreligg det likevel ikkje bevis på at akvakulturaktivitet er hovudpådrivaren for den auka framveksten av AGD (Nowak og Archibald, 2018). Delar av denne auka kan likevel forklarast av eit større fokus på gjellesjukdomar, og utvikling av fleire og betre metodar for å påvise agens med.

Douglas-Helders *et al.* (2000) observerte at *Paramoeba* spp. kan overleve på gjellene til dødfisk i over 30 timar, og er vidare er i stand til å formeire seg og infisere gjeller til naive fisk gjennom denne perioden. På grunn av dette er det viktig å fjerne all dødfisk fordi det potensielt kan utgjere ei viktig kjelde til spreiding av smitte ved utbrot av AGD (Oldham *et al.*, 2016).

### **1.4.3 Diagnostikk og påvising av AGD**

Klinisk diagnose vert ofte gjeve på bakgrunn av lesjonane (fleckane) som ein finn på gjellene til Atlantisk laks med AGD. Grad av sjukdom bestemast gjennom å bruke eit scoringssystem som vurderer gjellene på ein skala frå 0 til 5 (Taylor *et al.*, 2009b), der 0 er gjeller utan score eller lesjonar, medan 5 er kraftig affiserte gjeller. Systemet er vidt brukt i kommersielt oppdrett, og kan vere ein god indikator på sjukdomen dersom scoringa vert gjennomført av personar med mykje erfaring frå feltet (Clark og Nowak, 1999; Adams, Ellard og Nowak, 2004; Bridle *et al.*, 2010; Oldham *et al.*, 2016). Nyare studiar har derimot vist at systemet ikkje kan overførast direkte til marine artar som berggylt og rognkjeks (Dahle, 2015; Haugland *et al.*, 2017; Dahle *et al.*, 2020 i trykk). Ulempa er at ein ikkje kan påvise at amøbar er til stades ved bruk av dette systemet, ettersom det er verten sin respons i møte med patogenet som målast, og andre patogen enn *P. perurans* kan medføre auka slimproduksjon og liknande «patchar» på gjellene (Adams *et al.*, 2004; Nylund *et al.*, 2011; Quaglio *et al.*, 2016). Ein metode som kan nyttast for å påvise amøbar er å ta våtutstryk frå affiserte gjeller, med påfølgande undersøking i mikroskop. Det vanlegaste for å påvise amøben er likevel å nytte molekylære metodar som real-time PCR på svaber («swabs») eller vev frå gjeller, der

det har vorte utvikla ulike spesifikke assay for *P. perurans* (Fringuelli *et al.*, 2012; Downes *et al.*, 2015; Nylund *et al.*, 2018). På histologiske snitt av gjeller kan ein finne AGD-patologi med hyperplasi av epitelceller, samanvaksne sekundærlamellar og danning av lakuner, i tillegg til amøbar (med parasom) (Nowak, 2012). PCR-analysar og histologi vert difor viktige metodar for å kunne differensiere AGD frå andre gjellesjukdomar.

## 1.5 Vertsregister, reservoar og smittespreiing

*P. perurans* har vist seg å vere lite vertsspesifikk då den har vorte påvist på 17 forskjellige artar frå 14 ulike slekter globalt (Oldham *et al.*, 2016; Hvas *et al.*, 2017). I Norge er den påvist hjå Atlantisk laks, regnbogeare, blåstål/rødnebb, kultivert og villfanga berggyllt, grøngyllt og rognkjeks (Nylund *et al.*, 2007; Nylund *et al.*, 2008; Steinum *et al.*, 2008; Karlsbakk *et al.*, 2013; Haugland *et al.*, 2017; Steigen *et al.*, 2018). Det er antyda at amøben er opportunistisk fordi den har så stor utbreiing og låg vertsspesifitet (Young *et al.*, 2008). *P. perurans* har òg vorte isolert frå overflater til lakselus (Nowak, Bryan og Jones, 2010), men det er uklart om det har nokon betyding for smitte og reservoar.

Sjølv om det har vorte gjennomført fleire studiar for å kartlegge reservoaret til *P. perurans*, har ein så lagt ikkje klart å finne ut kva det naturlege reservoaret er. Generelt er nakenamøbar (*Lobosa*) svært utbreidd i det marine miljø, og kan finnast i store konsentrasjonar i dei fleste habitat, frå opne hav til elvemunningar ved kysten (Page, 1983; Rogerson og Laybourn-Parry, 1992; Oldham *et al.*, 2016). *Paramoeba* sp. har vorte funne i marine og eustarine sediment, på nøter i merdane, og vorte påvist i nokre marine invertebratar som til dømes kråkeballar og krabbar (Tan, Nowak og Hodson, 2002; Crosbie, Nowak og Carson, 2003; Dykova *et al.*, 2005; Dyková *et al.*, 2007). Rensefisk kan utgjere ein risiko med tanke på at dei kan vere berarar av smitte, og slik fungere som potensielle reservoar for *P. perurans* (Karlsbakk *et al.*, 2013; Haugland *et al.*, 2017). Dei kan òg ha amøbar til stades på gjellene utan at det kan sjåast som flekkar (Haugland *et al.*, 2017; Dahle *et al.*, 2020 i trykk).

Dei detaljerte mekanismene for korleis smitte av amøbar spreier seg til og mellom ulike lokalitetar er ikkje fullt kartlagd enda (Nowak *et al.*, 2010; Adams, Crosbie og Nowak, 2012). Smitte mellom individ skjer horisontalt, og i eksperimentelle oppsett har ein oppnådd det ved bruk av kohabitantar eller ved direkte eksponering av naïve fisk for amøbar (Crosbie *et al.*, 2012; Dahle, 2015; Haugland *et al.*, 2017; Dahle *et al.*, 2020 i trykk).

## 1.6 Behandling

For å kontrollere sjukdomen og for å forsøke å unngå høg dødelegheit i fiskepopulasjonen må ein behandle fisken, og til tidlegare ein klarar å sette diagnosen og behandle, til meir effektiv vil behandlinga vere. Det er gjort observasjonar på at dess meir alvorleg sjukdomsutbrotet er, dess vanskelegare er det å behandle (Rodger, 2014). Dei to metodane som vert brukt kommersielt er badbehandling med ferskvatn eller hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ).

Ferskvassbehandlingar vart først beskrive på slutten av 1980-talet, men er framleis ein av dei mest effektive og brukte metodane for behandling (Munday *et al.*, 1990; Oldham *et al.*, 2016).

Det er skånsamt for fisken, utgjer liten risiko for biverknadar og er miljøvenleg (Powell, Parsons og Nowak, 2001; Powell *et al.*, 2015; Hytterød *et al.*, 2017). Likevel kan det vere krevjande å få gjennomført på grunn av krav om nærliggande ferskvasskjelde og logistikk i høve til transport av vatnet, både med tanke på produksjonskostnadar og kvaliteten på behandlinga (Munday *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2012; Rodger, 2014; Powell *et al.*, 2015).

Behandlingsmetoden har vorte brukt i Australia, Irland, Skottland og Norge både terapeutisk og profylaktisk (Rodger, 2014; Powell *et al.*, 2015). Ferskvatnet induserer osmotisk sjokk i amøben, og reduserer viskositeten på slimet slik at laget med slim og amøbar lettare vert fjerna (Clark, Powell og Nowak, 2003; Adams og Nowak, 2004a; Roberts og Powell, 2008).

Behandlinga vert gjennomført ved at fisken i merden overførast til brønnbåt, eller ved å legge presenning rundt merden som skal behandlast, for så å halde fisken i ferskvatn (salinitet < 3 ‰) i 2-3 timar (Parsons *et al.*, 2001; Rodger, 2007; Adams *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2015).

Sjølv om behandlinga kan ha god effekt på gjellelesjonane, kan fisken verte reinfisert med AGD igjen etter første behandling og må då potensielt behandlast på nytt (Clark *et al.*, 2003).

Av den grunn er det vanleg med fleire behandlingar i løpet av produksjonssyklusen i Tasmania (Clark og Nowak, 1999; Adams og Nowak, 2004a). Nyleg vart det òg gjennomført ein studie som testa ut om gjenteken kortvarig ferskvassbehandling på Atlantisk laks kunne nyttast til å halde kontroll på sjukdomen (Wright *et al.*, 2018). Dette vart hovudsakleg gjennomført for å ha ein metode der ein kan unngå sannsynet for evolusjon av

ferskvassresistente amøbar (Wright *et al.*, 2018). For rensefisk som er marine fiskeartar kan ein ikkje bruke rein ferskvassbehandling. Ein må heller nytte brakkvatn med ein salinitet som fjernar amøben og opprettheld god fiskevelferd. Behandling ved 15 ‰ over fleire dagar har vist seg å ha god effekt (Dahle, 2015; Dahle *et al.*, 2020 i trykk).

Hydrogenperoksid vert ofte føretrekt i staden for ferskvatn på grunn av dei utfordringane ein kan oppleve med logistikken og reguleringa som er assosiert med ei ferskvassbehandling

(Adams *et al.*, 2012), men òg der ein nyttar renseskild sidan ikkje alle artar har like stor toleranse for direkte eksponering til ferskvatn (Moltumyr, 2017). I tillegg har det vore vanleg å nytte hydrogenperoksid til behandling av lakselus (Bruno og Raynard, 1994; Grave *et al.*, 2004; Helgesen, Horsberg og Tarpai, 2020). Det har vist seg å ha like god effekt som ferskvatn på milde tilfelle av AGD (Adams *et al.*, 2012), men ved bruk på laks kan ein oppleve utfordringar knytt til dødelegheit og gjelleskader. Ved bruk av hydrogenperoksid må ein ta ekstra omsyn til temperaturen i vatnet. Under behandling med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har ein berre eit lite sikkerheitsområde, og det er ikkje anbefalt å bruke det ved temperaturar over 13,5 °C eller i tilfelle der gjellescoren er over 3 (Rodger, 2014). Frå eksperimentelle smitteforsøk er det vist at hydrogenperoksidbehandling mot AGD ved temperaturar over 12 °C ga negative effektar på fisken (Hytterød *et al.*, 2017). Ingen av behandlingsformene har derimot vist seg å ha 100% effektivitet på fisk med meir alvorleg grad av AGD (Parsons *et al.*, 2001; Hytterød *et al.*, 2017; Martinsen, Thorisdottir og Lillehammer, 2018).

Det er litteratur som tyder på at tidlegare smitta og behandla fisk vil vere meir resistent mot sjukdomen ved reinfeksjon, men tida etter første smitte er truleg avgjerande for kor godt beskytta fisken er (Vincent, Morrison og Nowak, 2006). Fisk som vart behandla to gonger eller heldt i 4 veker i ferskvatn var meir resistente for reinfeksjon, men det blei antatt at denne resistensen er forbunde med stimulering av det uspesifikke immunforsvaret (Findlay og Munday, 1998). Andre studiar viser at fisken ikkje vert resistent mot reinfeksjon (Gross *et al.*, 2004). Ein kan likevel ikkje vite dette sikkert, då denne litteraturen er frå tida før ein hadde identifisert kva for ein art av *Paramoeba* som faktisk var årsak til AGD. Seinare studiar har rapportert om at resistens mot AGD kan vere arveleg, og selektiv avl har vorte foreslått som eit alternativ til behandling og andre kontrollmetodar, for å auke resistensen mot AGD (Taylor *et al.*, 2009a; Kube *et al.*, 2012; Boison *et al.*, 2019; Lillehammer *et al.*, 2019).

Behandlingar i felt inneber mykje handtering og trenging som kan medføre stress for fisken. Sjølv om ein behandlar for å unngå dødelegheit, kan også ei mekanisk behandling medføre auka dødelegheit i etterkant. I dette forsøket skal fisken ikkje trengast, og ein skal berre sjå på effekten av ferskvatn på gjellene.

## 1.7 Mikrobiota

Mange marine amøbar er bakterivore artar og dyrkingsvilkår der bakteriar samdyrkast er kritisk for å oppnå ein vellykka kultur (Bovee, Sawyer og Service, 1979; Jellett og Scheibling,

1988). Amøbar som vert isolerte frå sitt naturlege miljø vert vanlegvis assosiert med bakteriar i kultur, sjølv om dei vert overflatedesinfisert på førehand (Dykova og Kostka, 2013 sitert i Nowak og Archibald (2018)). Basert på ultrastrukturelle undersøkingar, kunne Dykova *et al.* (2005) observere at nokre *Paramoeba* «trofozoittar» ikkje primært var bakterivore når dei vart haldne i kultur, men isolat frå sedimentprøver i same studie viste bakteriar i cytoplasma.

Tilhøvet mellom *Paramoeba* og bakteriar er meir komplekst enn å berre vere ei næringskjelde, men det er framleis ikkje fullt ut forstått (Nowak og Archibald, 2018). Sjølv om det er lite studert, så er der potensielt ein samanheng mellom gjellemikrobiota og/eller patogene bakteriar og alvorsgrad av AGD. Ein kan difor ikkje sjå bort i frå at infeksjon med *P. perurans* kan verte assosiert med enten ko-infeksjon med patogene bakteriar eller med ubalanse i gjellemikrobiota (Egan og Gardiner, 2016; Nowak og Archibald, 2018). Egan og Gardiner (2016) har foreslått at fleire infeksiøse sjukdomar i det marine miljø kjem av mikrobiell dysbiose og ubalanse i mikrobiota, noko som viser at det er naudsynt med vidare studiar på tilhøvet mellom mikrobiota på laksegjeller og sjukdomar som til dømes AGD. Prosjektet som masteroppgåva er ein del av skal ta for seg noko av denne problematikken.

Mesteparten av studiane som allereie er gjort på fisk om mikrobiota er frå mage/tarm (om tarmfloraen), og det er difor lite som har vorte rapportert om bakteriefloraen på gjellene (Merrifield og Rodiles, 2015; Nowak og Archibald, 2018). Fleire undersøkingar frå både ferskvass- og marin fisk har likevel demonstrert at gjellene kan vere kolonisert av eit breitt spekter av bakterieslekter (Merrifield og Rodiles, 2015), og det er rapportert om at bakteriemengda på gjeller til fisk (m.a. regnbogeaure) kan overstige  $10^6$  CFU per gram gjellevev (Trust, 1975). Frå studiar gjennomført i Tasmania er det vist at slekta *Psychroserpens* (*Flavobacteriaceae*) var dominerande i laks infisert med AGD (Bowman og Nowak, 2004). Ein annan studie fann to gjellebakteriar (*Winogradskyella* spp. og *Staphylococcus* spp.) som òg var meir dominante hjå AGD-infisert laks (Embar-Gopinath *et al.*, 2008), og i eksperimentelle smitteforsøk vart det bekrefta at *Winogradskyella* hadde betydning for omfanget av AGD (Embar-Gopinath, Butler og Nowak, 2005; Embar-Gopinath, Crosbie og Nowak, 2006). Ko-infeksjon med *Yersinia ruckeri* har ikkje vist seg å ha signifikant påverknad på omfang av AGD (Valdenegro-Vega *et al.*, 2015). I ein nyare studie gjort av Benedicenti, Secombes og Collins (2019b) identifiserte ein to nye slekter, *Joostella* spp. og *Muricauda* spp. (familie *Flavobacteriaceae*) frå mikrobiotaen i *P. perurans* kulturar. Denne studien, saman med eit forsøk gjennomført av Collins *et al.* (2017), såg virulensskilnadar mellom klonar og kulturar av *P. perurans* (Benedicenti *et al.*, 2019b).

Mikrobiota vart føreslått som ein faktor som kan påverke vekst og virulens av *P. perurans* kulturar, då ein fann signifikante skilnader i bakteriesamansetninga mellom isolata som vart dyrka (Benedicenti *et al.*, 2019b).

Framleis er det mange kunnskapshøl når det gjeld kva rolle mikrobiota på gjellene til laks har av betydning for fiskehelse, kva samanheng det er mellom gjellemikrobiota og infeksjon av *P. perurans* i gjellevevet, og korleis behandlingar eventuelt vil spele inn på dette. Cahill (1990) føreslo at stressfaktorar som dårleg vasskvalitet, temperaturendringar, ernæringsmanglar, for høg tettleik av fisk, traume, infeksjon med parasittar eller primærinfeksjonar av virus kunne ha innverknad på mikrobiota på hud og gjeller. Seinare har ein funne bevis på at sesongvariasjonar (m.a. temperatur) (Al-Harbi og Uddin, 2007), og dårleg vasskvalitet (Masouleh, Sharifpour og Arani, 2006) er faktorar som kan påverke gjellemikrobiotaen (Merrifield og Rodiles, 2015). Under behandling, som til dømes ved ferskvassbehandling av AGD, kan det tenkast at ei rask endring i vassmiljø vil påverke mikrobiotaen som er til stades på gjellene. I kontrollert miljø, som i smitteforsøk, utan andre patogen til stades kan det gå bra, sidan fisken då stort sett kan allokere meir energi til å rette opp igjen normal balanse i mikrobiota. I felt, der det vil vere mange andre patogen til stades, vil det truleg vere meir utfordrande og potensielt føre til redusert gjellehelse. Det trengs difor meir kunnskap rundt korleis behandling vil påverke gjellehelsa til laks.



## 1.8 Mål med studien

Denne masteroppgåva er del av eit større prosjekt (FHF nr. 901514) der hovudmålet er å undersøke korleis produksjonsstress (m.a. behandling mot AGD/lakselus og spyling av nøter) påverkar gjellehelsa til laks. Eit delmål i dette prosjektet er å kartlegge effekten av behandling mot AGD ved bruk av ferskvatn i eksperimentelt oppsett med berre *P. perurans* til stade, og det er dette som vert hovudmålet for masteroppgåva. Ved å gjennomføre eit slikt smitteforsøk kan ein skilje mellom effekt av ferskvassbehandling i kontrollert miljø, og behandling i felt der laksen kan vere smitta med fleire patogen og samtidig er utsett for mekanisk stress. I masteroppgåva skal ein ha hovudfokus på effekt av behandling på gjellescore, og på prevalens og RNA-nivå av *P. perurans* i gjellevevet. Ein skal kartlegge om det er skilnadar i RNA-nivå av *P. perurans* mellom alle åtte gjellebogane hjå laks med AGD, og undersøke om det er samanheng mellom RNA-nivå og gjellescore hjå den enkelte gjelleboge. Det skal òg undersøkast om *P. perurans* RNA-nivået i andre gjelleboge er representativt for *P. perurans* RNA-nivået i alle gjellebogane, då ein ofte nyttar denne gjellebogen for å ta ut prøver til PCR-analysar.

## 2. Material og metode

Denne masteroppgåva er ein del av eit større Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansierings-prosjekt (FHF, prosjekt nr. 901514) som vart starta opp i 2018, og er planlagt avslutta i 2021. Hovudmålet var å undersøke korleis produksjonsstress (m.a. behandling av AGD eller mot lakselus, og spyling av nøter) påverkar gjellehelsa til laks. Eit delmål i dette prosjektet var å kartlegge effekten av behandling mot AGD ved bruk av ferskvatn i eit eksperimentelt oppsett med berre *Paramoeba perurans* (*P. perurans*) til stade. Det har difor vorte gjennomført eit smitteforsøk på ILAB med patogenfri laks. Forsøket bestod av to delar, der den første delen fokuserte på gjellepatologi, nivå av amøbar før og etter behandling, og effekt av ferskvassbehandling på gjelleoverflater med tanke på reduksjon i amøbenivå. Den andre delen fokuserte på å undersøke samsvar mellom amøbenivå frå kvantitativ PCR, prøvetakingsområdet frå dei ulike gjellebogane og gjellescore.

Fisken som vart nytta i dette forsøket var Atlantisk laks (*Salmo salar*, L.) henta inn som augerogn frå Island (Stofnfiskur Iceland), og klekka og heldt på ILAB fram til bruk i forsøket (Batch: ILAB/18/500). Ved første uttak (-1 dpi) var snittvekta  $187,7 \pm 25,4$  gram. Maksvekta var 264,6 g, og minimumsvekta var 137,7 g. Gjennomsnittleg K-faktor var  $1,16 \pm 0,07$ . Fisken var ferdig smoltifisert og uvaksinert, og vart akklimatisert til forsøksvilkåra i 12 dagar før den vart smitta med amøbar (*P. perurans*). Temperatur ved innsett av fisken var 10 °C. Etter fire dagar vart temperaturen justert opp til 12 °C, og etter ytterlegare fire dagar vart den justert opp til 14 °C. Saliniteten ved innsett av fisken var 25 ‰. Etter 8 dagar vart den justert opp til 34 ‰.

All fisk som vart brukt på ILAB vart sjekka for ulike patogen i forkant av forsøka. Prøver frå 17 fisk vart tatt ut i november 2018. Forsøksfisken vart undersøkt for nærvær av infeksjøs lakseanemi virus (ILAV, «Salmon isavirus»), infeksjøs pankreasnekrose virus (IPNV, «Infectious pancreatic necrosis virus»), piscine myokarditt virus (PMCV, «Piscine myocarditis virus»), og piscine orthoreovirus (PRV). I tillegg vart gjelleprøvene frå det første uttaket (-1 dpi) sjekka for fleire patogen som salmonid gjellepoxvirus (SGPV), *Ca. Branchiomonas cysticola*, *Ca. Piscichlamydia salmonis*, og *Ichthyobodo* spp. («Costia»).

### 2.1 Beskriving av isolat (*P. perurans*)

Isolatet av *P. perurans* som vart brukt i dette forsøket vart isolert i oktober 2013 frå oppdrettslaks med AGD i Hordaland, Vest-Norge (Haugland *et al.*, 2017). Dette isolatet vart

klona i 2014 (L. Andersen, ILAB, pers.comm) og heldt vidare i kontinuerleg kultur ved ILAB i malt-gjær-buljong (MYB: 0,01 % maltekstrakt, 0,01 % gjærekstrakt, 34 PSU saltvatn) på 15 °C, som beskrive i Haugland et al., 2017. Kloning av isolatet vart gjort som beskrive i Nylund *et al.* (2018). Klonen som vart nytta i dette forsøket hadde over 100 passasjar.

## **2.2 Smitteforsøk**

Forsøket vart utført i ein av ILAB sine akvahallar (AH10) i perioden 1.august til 7. september 2019. Totalt i forsøket vart det nytta 360 fisk. Dei vart fordelt på 6 kar, med 60 fisk per kar. Størrelsen på kara var 450 L (400 L vatn).

### **2.1.1 Smitte av laks med *P. perurans***

Fisken vart smitta med amøbar 12 dagar etter innsett, ved å gjennomføre badsmitte i kvart enkelt kar. Det vart gjort ved å senke vasstanden i kara og stoppe vasstilførselen. Oksygen vart tilført ved trykkluft under heile smittetida. Smittevolumet vart då 300 L i kvart kar, og smittedosen var satt til 1000 amøbar/L. For å berekne riktig mengd smittestoff vart det brukt ein CASY Model TT Cell counter (Innovatis, Roche Diagnostics) som fant tal på levande amøbar per ml (Haugland *et al.*, 2017). Smittestoffet vart så overført til 6 flasker (300 000 amøbar per flaske). Alle veggane i flaskene vart skrapa med ein celleskraper før ein tilsette smittestoffet i kara. Dette var for å få med alle amøbane som eventuelt kunne ha festa seg på flaskeveggane. Innholdet i flaskene vart så fordelt i vassvolumet i kvart sitt kar, og flaskene vart skylt med vatn frå karet for å få med alle amøbane. Starttidspunktet for smitte vart notert ned, og åtferda til fisken vart observert. Etter 60 minutt med smitte vart vasstilførselen skrudd på igjen.

### **2.1.2 Ferskvassbehandling**

Sjukdomsutviklinga vart vurdert ved ei ikkje-dødeleg gjellescoring på bedøvd fisk 10 dagar etter smitte (sjå avsnitt 2.2 og 2.2.1). Etter at fisken hadde utvikla mild AGD (score 2, sjå tabell 2.1) vart 3 av kara behandla med ferskvatn. Behandlinga vart gjennomført 16 dagar etter smitte ved å midlertidig endre vasskvaliteten i dei aktuelle kara, frå 34 ‰ sjøvatn til ferskvatn. Behandlingstida starta når saliniteten kom under 2 ‰ i kara. Fisken vart eksponert

for ferskvatn i 3 timar, før vasskvaliteten vart endra tilbake til 34 ‰ sjøvatn. I alt tok denne prosessen omtrent 5 timar.



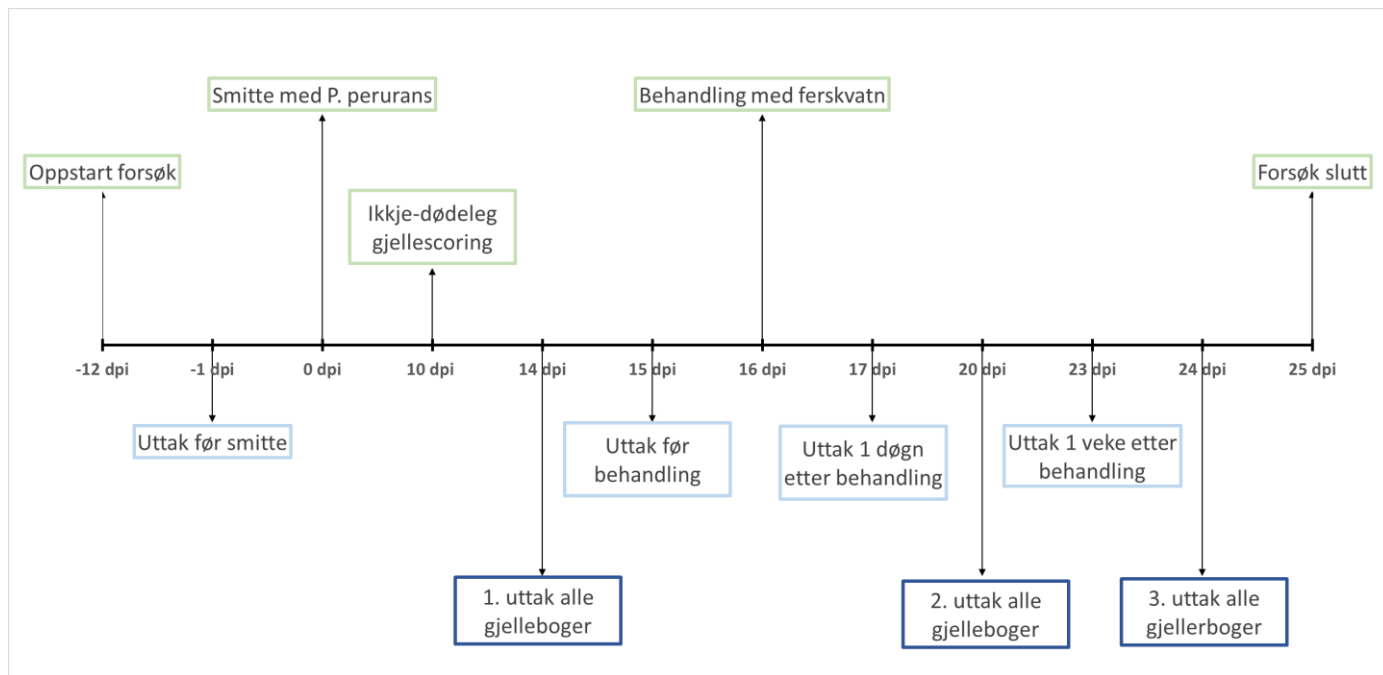
**Figur 2.1** Bilde A viser utforminga på kara som vart nytta i forsøket. Bilde B viser fisk i kar under ferskvassbehandling 16 dpi.

### 2.1.3 Vassmiljøparametrar

Etter tilvenning til sjøvatn vart saliniteten heldt konstant på 34 ‰, med unntak under behandling. Temperaturen vart heldt konstant på 14 °C. Lysregimet var satt til 12 timar lys, og 12 timar mørke. Vassgjennomstrøyminga («flow») i kara ved oppstart var 1000 L/time. Etter 22 dagar vart «flowen» justert opp til 1500 L/time på grunn av fallande nivå av oksygen (80-90%), og fordi fisken vaks raskt ved denne temperaturen. Det vart gjennomført dagleg røkting av fisken gjennom heile forsøket.

## 2.2 Prøveuttak

Totalt vart det utført sju uttak av vevsprøver gjennom smitteforsøket (figur 2.2). Undervegs i forsøket vart det òg gjennomført ei ikkje-dødeleg gjellescoring for å sjekke om ein hadde nådd ønska sjukdomsstadium for behandling (score 2). Denne scoringa vart utført 10 dagar etter smitte på bedøvd fisk (Finquel vet., 100 mg/L) og av tre personell. Det vart scora gjeller på ti fisk frå kvart kar (totalt 60 fisk). Sjå neste avsnitt (2.2.1) for kriteria rundt scoringa.



**Figur 2.2** Tidslinje for forsøket frå oppstart 12 dagar før smitte, til forsøket vart avslutta 25 dagar etter smitte. Dpi står for «days post infection», dagar etter smitte. Alle uttak er vist under linja. Andre hendingar i forsøket er vist over linja med grønt omriss. Uttaka i del 1 av forsøket har lyseblått omriss. Uttaka i del 2 av forsøket er vist med mørkeblått omriss.

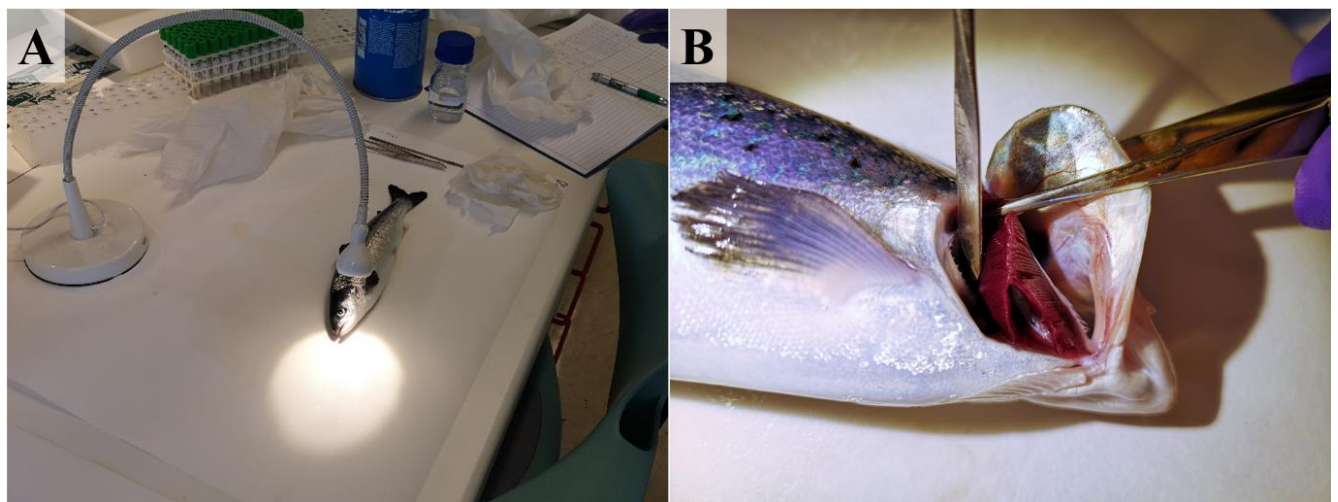
### 2.2.1 Gjellescoring

Før å følgje utviklinga av sjukdomen, og for å skildre omfang og alvorsgrad av sjukdomen vart det brukt ein skala for gjellescoring (Taylor *et al.*, 2009b). Denne skalaen vart brukt på kvart prøveuttak, og ved ikkje-dødeleg gjellescoring. Alle gjelleoverflatene vart scora med ein verdi mellom 0 og 5 (Tabell 2.1). Det er verdt å merke seg at ved den ikkje-dødelege gjellescoringa nytta ein berre maksscore for å bedømme sjukdomsutviklinga, dette for å ikkje skade fisken. Det vil seie at ein baserte scoren på den mest affiserte gjelleoverflata, slik som til dømes vart gjort i Haugland *et al.* (2017). Ved prøveuttaka scora ein kvar gjelleflate individuelt, og tok omsyn til gjennomsnittleg gjellescore basert på alle 16 gjelleflatene. Her vart det nytta same gjellescoringsmetode («laboratoriescoremetoden»/ «gjellematrise») som beskrive i Hytterød *et al.* (2018). Denne vart tatt i bruk for å få eit meir heilskapleg bilde på utvikling av gjellescore under smitteforsøk, då ein frå tidlegare AGD-forsøk såg at ein gjellescoreverdi basert på den mest affiserte gjellebogen ikkje gav eit godt mål på korleis gjellescoren frå dei 16 gjelleflatene faktisk hadde endra seg etter ei behandling (Hytterød *et al.*, 2017). I scoringsskjemaet som vert nytta får ein oversikt over gjellescore for alle 16

gjelleflatene per fisk, gjennomsnittsscore for fisken, maksscore, minimumsscore, samla sum av alle scoreverdiar, og tal frie flater (sjå figur 1 på side 8 i Hytterød *et al.* (2018)).

**Tabell 2.1** Skalaen for gjellescore som vart brukt for å vurdere omfang av AGD. Oversett frå Taylor *et al.* (2009b).

Infeksjonsnivå	Gjellescore	Skildring
Ingen infeksjon	0	Ingen teikn til infeksjon, og jamn, raud farge på gjellevevet
Svært lett	1	1 kvit flekk, og svake teikn på danning av arr eller skade/nekrose i gjellevevet
Lett	2	2-3 små, slimete flekkar
Moderat	3	Etablerte tjukke slimflekke som til saman dekker opptil 20 prosent av gjellene
Uttalt	4	Flekkar/lesjonar som dekker opp til 50% av gjellevevet
Alvorleg	5	Størstedelen av gjellevevet er dekket av lyse, slimete flekkar/lesjonar



**Figur 2.3** Bilete av gjellescoring under prøveuttak. Bilde A: Viktig med god lyskilde ved scoring av gjeller. Bilde B: Pinsett og spatel vart brukt under gjellescoring for å enkelt kunne skilje gjellebogane frå kvarandre.

## 2.2.2 Uttak

### Del 1:

Det vart gjennomført fire uttak i del 1 i løpet av smitteforsøket. Det vart tatt eit uttak før smitte, eit uttak før behandling, eit uttak eitt døgn etter behandling og eit uttak ei veke etter behandling. Ved kvart uttak vart det tatt ut 10 fisk frå kvart kar, totalt 60 fisk per uttak. Fisken vart avliva ved bruk av ein overdose med metacain (Finquel vet., >135 mg/L).

For kvar fisk vart det målt vekt og lengde («gaffellengde»), og gjort vurdering av eventuelle ytre endringar og lesjonar. Det vart så tatt blodprøve på heparinrør, som vart overført til 1,5 mL sentrifugerør. Desse vart sentrifugert i ein Eppendorf MiniSpin sentrifuge, før plasma vart pipettert ut. Vidare vart det tatt avskrap av mucus frå venstre side av fisken i området langs sida mellom ryggfinne og halefinne, og så tatt ut hud til histologi. Hudbiten vart tatt i området under ryggfinnen på nivå med sidelinja. Kvar fisk vart så gjellescora for kvar av dei 16 gjelleflatene individuelt, før det vart tatt ut prøver frå gjellene (sjå tabell 2.2).

**Tabell 2.2** Oversikt over prøver som vart tatt ut frå gjellene ved uttak -1dpi, 15 dpi, 17 dpi og 23 dpi.

Gjelleboge	Prøver	Oppbevaring/fiksering	Formål
1. gjelleboge, venstre side (VS1)	Svabra med filter festa på ei spesialklype, som kunne klype rundt gjellebogen utan å komme borti dei andre gjellebogane.	Filtera vart lagt i Longmire's (sjå Appendix 6.2) i Sarstedt rør.	For å undersøke mikrobiota på gjelleoverflata. For å unngå å få med gjellevev.
2. gjelleboge, venstre side (VS2)	Heile gjellebogen tatt ut.	Formaldehyd 4%, VWR.	Til histologi.
1. gjelleboge, høgre side (HS1)	Heile gjellebogen, delt i to.	Øvste del lagt i 1 ml RNAlater (Sigma-Aldrich) i Nunc rør, og nedste del i 1 ml	Som backup i tilfelle metoden med filter ikkje viste seg å vere optimal. For å

		Longmire's i Sarstedt rør.	undersøke mikrobiota på gjellene.
2. gjelleboge, høyre side (HS2)	Tatt ut bit frå apeksen (sjå figur 2.4 B). Resten av gjellebogen til «backup».	Lagt i Safe lock rør. «Backup» vart lagt på på Nunc rør 1,8 mL (Thermo Scientific).	Real-time RT-PCR analysar.
3. gjelleboge, høyre side (HS3)	Heile gjellebogen tatt ut.	Lagt i 100% metanol (saman med VS3).	Proteomikk (MALDI-TOF).

Vidare vart venstre nasehole skjert ut og lagt på formalin til histologi. Til slutt vart det gjort vurdering av dei indre organa, og ein bit av nyre vart tatt ut og lagt på Nunc rør 1,8 mL (Thermo Scientific). I tillegg vart 3. gjelleboge venstre side (VS3) tatt ut frå 6 fisk (2 stk ved uttak 15 dpi, 3 stk ved 17 dpi, og 1 stk ved 23 dpi ) og lagt på modifisert karnovsky fiksativ (Steigen *et al.*, 2013). For å supplere vevsprøvene vart det òg tatt vassprøver (250 mL frå kvart kar ved kvart uttak), som først vart filtrert gjennom eit 0,4 my filter, så eit 0,2 my filter, før dei vart lagt i Longmire's løysning. Desse vart tatt ut for å kartlegge mikrobiota i vatnet, og vart behandla vidare ved Universitet i Stirling.

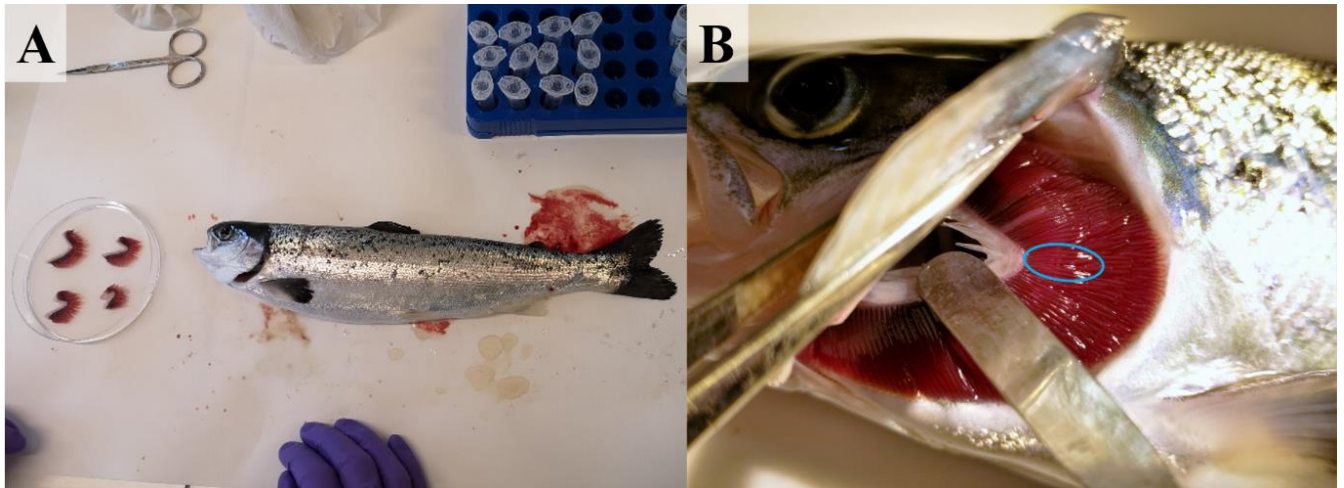
I denne masteroppgåva vart det jobba vidare med gjelleprøvene til real-time RT-PCR (frå HS2) og histologi (frå VS2).

### *Del 2:*

Det vart gjennomført tre ytterlegare uttak i løpet av smitteforsøket for å kunne kartlegge om det var forskjellar mellom gjellebogane det vart tatt ut prøver frå, med tanke på samsvar mellom real-time RT-PCR resultat og gjellescore. Eit uttak var 14 dagar etter smitte, men før behandling, eit uttak var 4 dagar etter behandling, og eit uttak var 8 dagar etter behandling. Ved kvart uttak vart det tatt ut 5 fisk frå kvart kar, totalt 30 fisk per uttak. Fisken vart avliva ved bruk av ein overdose metacain (Finquel vet., >135 mg/L).



For kvar fisk vart det målt vekt og lengde. Det vart òg gjort ei vurdering av eventuelle ytre skadar eller endringar hjå fiskane. Vidare vart fisken gjellescora på alle 16 gjelleoverflater, og deretter tappa for blod. Det vart så tatt ut prøve frå apeksen på alle åtte gjellebogane på kvar fisk (sjå figur 2.4), som vart lagt i Safe Lock rør 2,0 mL (Eppendorf) (til real-time RT-PCR analyse). Resten av gjellebogen vart lagt som backup i Nunc™ rør 1,8 mL (Thermo Scientific). Skalpell og pinsett vart dyppa i 70 % etanol og deretter sterilisert ved hjelp av flamme mellom kvar gjelleboge.



**Figur 2.4** A: Prøvetaking av gjeller frå laks, der det vart tatt ut prøve frå alle gjellebogane. B: Gjeller frå laks. Blå ring indikerer uttaksområde i apeksen for gjelleprøver til real-time RT-PCR.

## 2.3 Kvantitativ berekning av *P. perurans* RNA-nivå i gjelleprøver

### 2.3.1 RNA-ekstraksjon frå gjellevev

Metoden som er beskrive i Gunnarsson *et al.* (2017a) vart følgt, men med nokre endringar.

Rør (Eppendorf Safe Lock 2,0 mL) med gjellevev vart tilsett 1000  $\mu$ L QIAzol Lysis Reagent (Qiagen), og vidare homogenisert i TissueLyser II (Qiagen) i tre minutt ved 30 oscilleringar i sekundet. Etter 5 min inkubasjonstid i romtemperatur vart prøvene tilsett 200  $\mu$ L kloroform (Sigma-Aldrich), og RNAet vart ekstrahert ved å riste prøvene kraftig i 15 sekund. Deretter vart prøvene inkubert i 5 minutt i romtemperatur, før sentrifugering (ThermoFisher Scientific Heraeus Fresco 21) i 15 minutt ved 12 000 x g i 4 °C for å få faseparasjon mellom organisk fase nedst i røret, og vassfase øvst i røret.

Nye rør (Axygen Microtubes 1,5 mL) vart tilsett 500  $\mu$ L 100 % isopropanol (Antibac), og 375  $\mu$ L av det øvste laget frå prøvene vart pipettert over i desse nye røra. Etter overføring vart røra

vendt forsiktig eit par gonger, inkubert 10 minutt i romtemperatur, og sentrifugert i 15 min ved 12 000 x g i 4 °C. Isopropanolen vart fjerna og pelleten vart vaska ved å først tilsette 1000 µL 75 % etanol i røret, vortex i eit par sekund, for så å sentrifugere det i 5 minutt ved 12 000 x g i 4 °C. Etter sentrifugering vart etanolen fjerna, og vaskinga gjentatt med 100 % etanol. Pelleten vart så tørka ved lufttørking i romtemperatur i rundt 10 minutt. Til slutt vart det tilsett 100 µL RNase-fritt vatn (Sigma-Aldrich) oppvarma til 70 °C, etterfølgd av eit par sekund vortex for at pelleten skulle løyse seg i vatnet. Prøvene vart lagra i fryser (-25 °C) fram til vidare analyser.

For å sjekke etter mogleg kontaminering i reinseprosessen vart det satt opp reinsekontrollar (RK) undervegs, der reinseprosessen vart gjennomført samtidig som dei vanlege prøvene, men utan vev. For å sjekke kvaliteten på reinseprosessen og konsentrasjonen av RNA vart absorbanse målt i prøvene ved bruk av Nanodrop ND 1000 Spectrofotometer.

### 2.3.2 Real-time RT-PCR

Prøvene vart analysert ved å bruke AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (ThermoFisher Scientific) og Applied Biosystems® QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Mastermix og templat vart fordelt i eit brett med 96 brønnar (Applied Biosystems® MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate). Først blei 10,5 µL mastermix tilsett i kvar brønn, og deretter 2,0 µL templat slik at totalvolumet i kvar brønn vart 12,5 µL. Mastermixen bestod av 2X RT-PCR buffer (Applied Biosystems®), F-primer, R-primer, probe (TaqMan), 25X RT-PCR enzym mix (Ambion) og RNase-fritt vatn (Sigma-Aldrich) (Tabell 2.2). For kvart assay vart det også køyrt analyse på minst ein RK og ein negativ kontroll (NTC, non template control).

**Tabell 2.3** Oversikt over komponentar nytta i mastermix under real-time RT-PCR av gjellevev. Mengda tilsvare éin analyse gitt i µL, med resulterande konsentrasjon i parentes.

Komponent	EL1A	Pperu
2X RT-PCR Buffer	6,25	6,25
F primer	1,00 (800 nM)	1,00 (800 nM)
R primer	1,00 (800 nM)	1,00 (800 nM)
Probe	0,22 (175nM)	0,28 (225nM)

25X RT-PCR Enzym mix	0,25	0,25
Vatn (RNase fritt)	1,78	1,72
Templat	2	2
Totalt volum	12,5	12,5

Reaksjonsforløpet starta med 10 minutt på 45 °C (revers transkripsjon), deretter 10 minutt på 95 °C (revers transkriptase (RT) inaktivering og polymerase aktivering). For amplifisering av måltemplatet vart det køyrt 45 syklusar med 15 sekund på 95 °C (DNA dissosiasjon) og 45 sekund på 60 °C (annealing og elongering).

Amplifikasjonskurvene vart analysert ved å bruke QuantStudio Design™ & Analysis Software v.1.5.1, og terskelverdien vart manuelt satt til 0,1 for alle utførte analyser.

Alle gjelleprøvene vart undersøkt for *P. perurans* ved å nytte Pperu assayet (Tabell 2.3). Det vart òg nytta eit assay (EL1A, Tabell 2.3) retta mot elongeringsfaktor i laks. Gjelleprøvene frå det første uttaket før smitte (-1dpi) vart i tillegg undersøkt for fleire patogen som salmonid gjellepoxvirus (SGPV), *Ca. Branchiomonas cysticola*, *Ca. Piscichlamydia salmonis*, og *Ichthyobodo* spp., sjå appendiks 6.1, tabell 6.1.

**Tabell 2.4** Oversikt over primarar og probar til assay nytta under real-time RT-PCR analyse av gjellelev.

Assay	Primer- og probesekvensar	Litteratur
Elongeringsfaktor 1 alfa for laks (EL1A)	<b>F-</b> CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA <b>R-</b> CAC ACG GCC CAC AGG TAC A <b>P-</b> ATC GGT GGT ATT GGA AC	Olsvik <i>et al.</i> (2005)
<i>Paramoeba perurans</i> (Pperu)	<b>F-</b> GAT AAC CGT GGT AAA TCT AGA GCT AAT A <b>R-</b> TGG CAT TGG CTT TTG AAT CT <b>P-</b> CTG GTT CTT TCG RGA GC	Nylund <i>et al.</i> (2018)

**Tabell 2.5** Oversikt over effektiviteten til assay for gjelleprøver.

Assay	Effektivitet (E) Gjellevev	Litteratur
Elongeringsfaktor 1 alfa for laks (EL1A)	1,987	Sveen <i>et al.</i> (2012)
<i>Paramoeba perurans</i> (Pperu)	1,97	Nylund <i>et al.</i> (2018)

### 2.3.4 Beregning av normaliserte ekspresjonsverdier for *P. perurans* RNA-nivå

Analysane frå real-time RT-PCR av gjelleprøvene vart normalisert mot referansegenet EL1A (tabell 2.3 og tabell 2.4). Assay mot referansegen vert nytta for å korrigere mot forskjellig mengde gjellevev ved prøvetaking. Normalisert ekspresjon (NE) for *P. perurans* RNA-nivå i gjellevev vart rekna ut ved å bruke formel (1):

$$(1) NE_{Gjellevev} = \frac{(E_{ref})^{Ct\ referansegen}}{(E_{mål})^{Ct\ målgen}} \quad (\text{Simon, 2003})$$

Normaliserte ekspresjonsverdier vart rekna om til NE-fold ved å sette det lågaste *P. perurans* RNA-nivået (NE) som 1, og dele dei andre NE-verdiane på det lågaste (Andersen, Hodneland og Nylund, 2010).

## 2.4 Histologi

Gjelleprøvene vart fiksert (4% formaldehyd, VWR) under uttaka (avsnitt 2.2.2), og sendt til Pharmaq Analytiq, før dei vart vidaresendt til Idexx (Wetherby, England) for vidare preparering av dei histologiske snitta. Der vart formalinfiksert gjellevev støypt inn i parafin, og klargjort for histologiske analyser ved bruk av standard prosedyrar (Bancroft og Gamble, 2008). Gjellene vart snitta i sagittalplanet ved 2 µm tjukkeleik, lagt på poly-L-lysinbelagde objektglas (SuperfrostPlus, Thermo Scientific, Tyskland) og farga med hematoksylin og eosin (HE) (Dahle *et al.*, 2020).

Histologiske undersøkingar av gjellene vart gjennomført for å kunne studere endringar i celle- og vevsstrukturar, og for å lokalisere *P. perurans* i gjellevevet. For undersøking av dei histologiske snitta vart det nytta eit Leica DM500 lysmikroskop, og eit Zeiss® Axio Scope.A1 med Axiocam 105 color-kamera. Bildebehandling vart gjennomført i ZEN lite 2012 versjon 1.1.2.0.

### 3. Resultat

#### 3.1 Screening av fisk i forkant av forsøket

I forkant av studiet var ingen av prøvene frå forsøksfisken positive for infeksjons lakseanemi virus (ILAV), infeksjons pankreasnekrose virus (IPNV), piscint myokarditt virus (PMCV), eller piscine orthoreovirus (PRV). Ingen av gjelleprøvene frå første uttak (før smitte, -1 dpi) var positive for patogena Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), *Candidatus* Piscichlamydia salmonis, *Candidatus* Branchiomonas cysticola, og *Ichthyobodo* spp. (Costia).

#### 3.2 Smitteforsøk

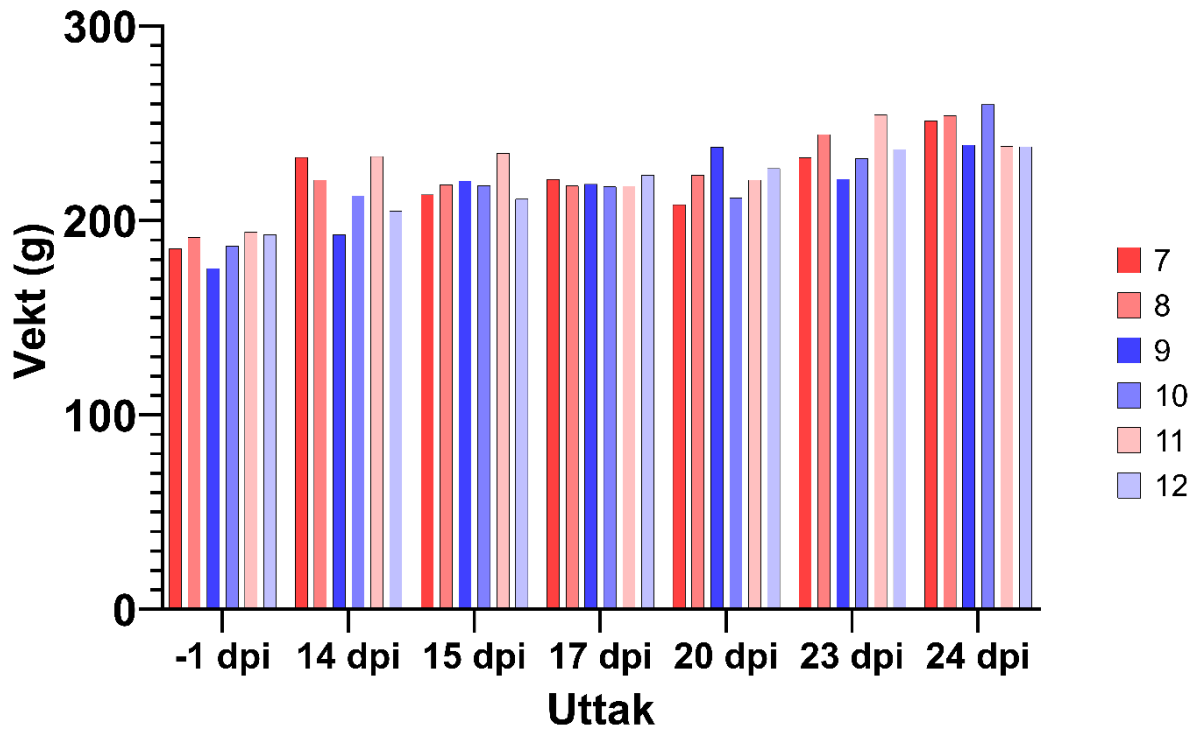
Det vart observert innslag av fisk med enkelte ytre endringar ved nokre av uttaka i forsøket. Uttaket 15 dpi skilte seg ut ved at 19 av totalt 60 fisk vart registrert med skjelltap, men ved uttak 17 dpi var det berre fire individ med skjelltap. I tillegg vart det registrert 7 individ med erodert ryggfinne, og 7 individ med forkorta brystfinner (15 dpi). Det vart gjort funn av to individ med erodert ryggfinne og eitt individ med forkorta brystfinner ved uttak 17 dpi. Ved desse uttaka (15 dpi og 17 dpi) vart det òg observert høvesvis 10 og 11 individ med blodige finnar. Elles vart det berre registrert enkelte individ med andre ytre endringar som finneslitasje, gjellelokkdeformitetar og små blødingar (petekkier) på buk og ved finnebasis.

Hjå fire fisk vart det observert «patch»-liknande områder på gjellene ved uttaket før smitte (-1 dpi). Tre av individa var frå kar 11, medan det siste individet var frå kar 12. I kar 11 vart det beskrive som «store «patch»-liknande områder på fleire gjellebogar».

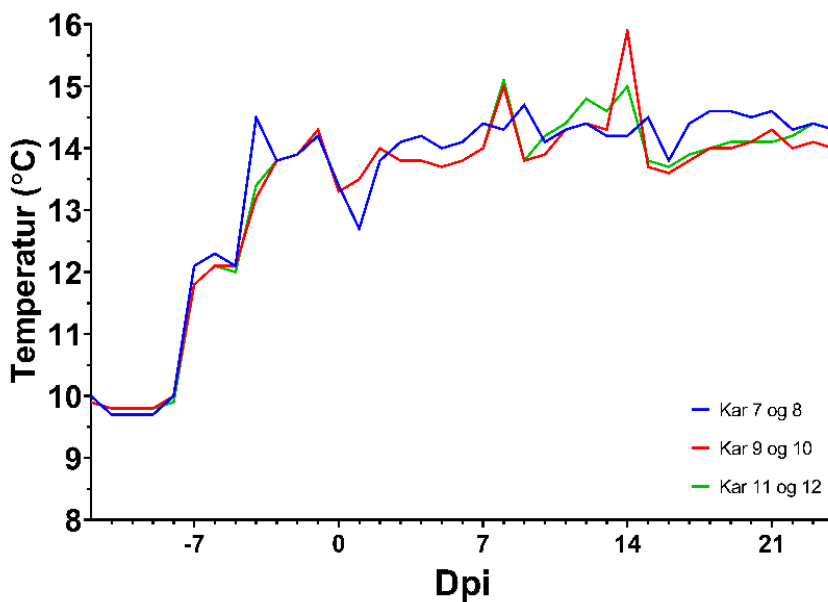
Det vart ikkje registrert dødelegheit i løpet av smitteforsøket.

Gjennomsnittleg vekt auka gjennom forsøket (figur 3.1). Ved første uttak (-1 dpi) var snittvekta  $187,7 \pm 25,4$  gram (N = 60), og ved siste uttak (24 dpi) var snittvekta  $246,7 \pm 34,1$  gram (N = 30). Gjennomsnittleg kondisjonsfaktor var relativ jamn gjennom forsøket. Ved første uttak (-1 dpi) var den  $1,16 \pm 0,07$  (N = 60), og ved siste uttak (24 dpi) var den  $1,23 \pm 0,07$  (N = 30).

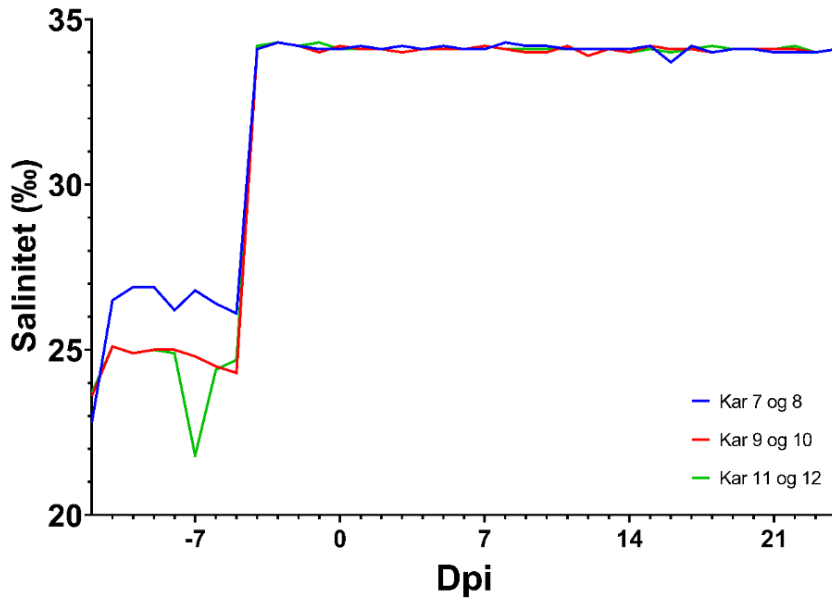
Temperatur gjennom forsøket (etter ferdig akklimatisering, -4 dpi) var  $14,2 \pm 0,4$  °C i kar 7 og 8,  $14,0 \pm 0,5$  °C i kar 9 og 10, og  $14,1 \pm 0,4$  °C i kar 11 og 12 (Figur 3.2). Salinitet (etter ferdig akklimatisering, -4 dpi) var  $34,1 \pm 0,1$  ‰ i alle kara (Figur 3.3).



**Figur 3.1** Gjennomsnittsvekt i kvart kar ved kvart uttak gjennom forsøket. N = 10 fisk per kar ved uttak -1 dpi, 15 dpi, 17 dpi og 23 dpi. N = 5 fisk per kar ved uttak 14 dpi, 20 dpi og 24 dpi. Fargekode for kvart kar (7-12) er vist til høyre.



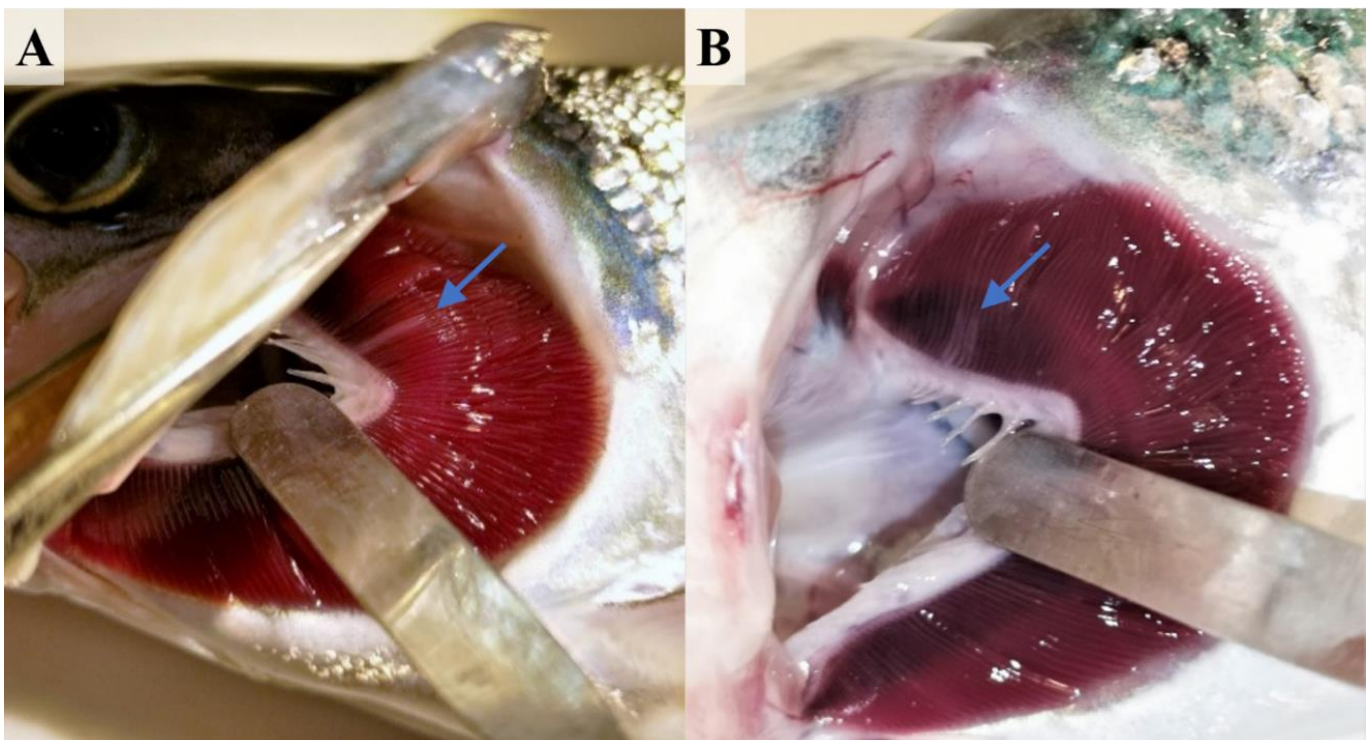
**Figur 3.2** Registrert temperatur gjennom heile forsøket. Etter akklimatiseringa var ferdig (-4 dpi) vart temperaturen forsøkt heldt stabil på 14 °C.



**Figur 3.3** Registrert salinitet gjennom heile forsøket. Etter akklimatiseringa var ferdig (-4 dpi) vart saliniteten heldt stabil på 34 ‰.

### 3.3. Gjellescore

Gjellelesjonar vart observert som såkalla «patchar» eller kvite flekkar på gjelleoverflata. Målet var at fisken skulle utvikle AGD og behandlast medan sjukdomen enda var mild, rundt når fiskane hadde score 2 i snitt. Døme på lesjonar som ein kunne finne på gjellene i forsøket er vist i figur 3.4.





**Figur 3.4** Gjeller hjå laks i forsøket 14 dagar etter smitte med *P. perurans*. Blå piler indikerer lesjonar («patchar») ein kunne finne på gjellene. Bilde A: fisk frå kar 9. Bilde B: fisk frå kar 11.

### *Del 1*

#### **Gjennomsnittleg gjellescore**

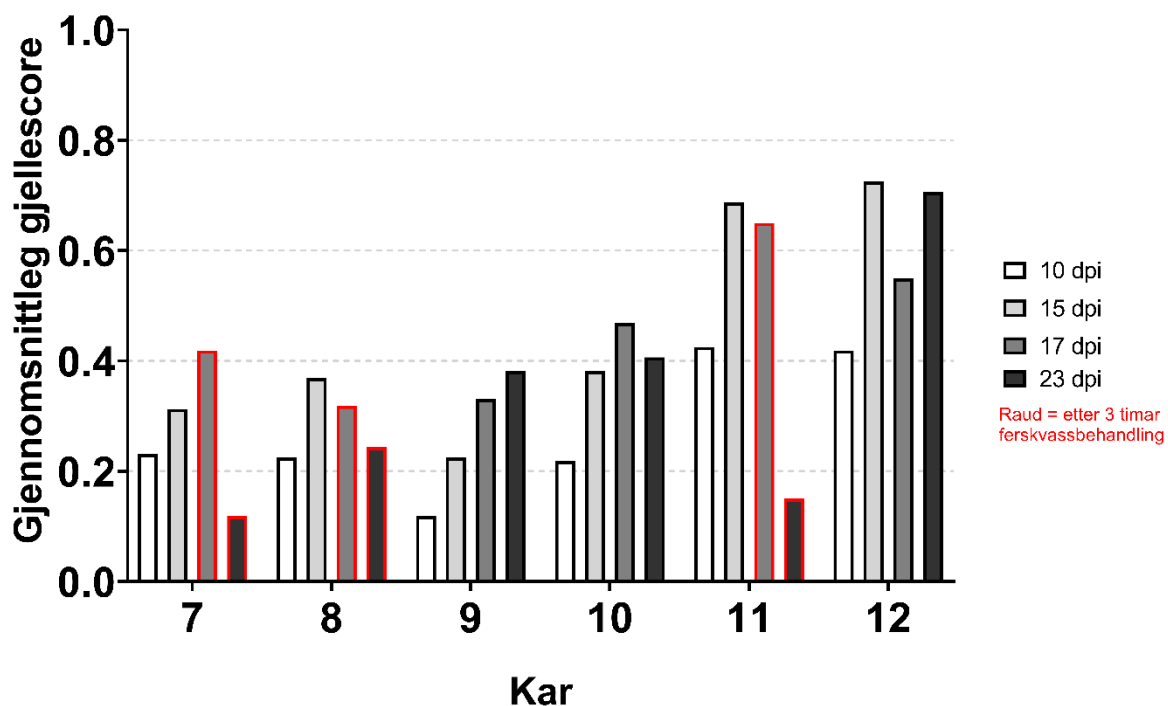
Før smitte (uttak -1 dpi) vart det ikkje funne gjellelesjonar, det vil seie at alle fiskane hadde score 0. Ti dagar etter smitte, ved ikkje-dødeleg gjellescoreing, varierte den gjennomsnittlege gjellescoren i dei ulike kara mellom 0,12 (kar 9) og 0,43 (kar 11), sjå figur 3.5. Den lågaste registrerte gjennomsnittlege gjellescoren hjå enkeltindivid ved 10 dpi var 0 (4 av 60 fisk), og den høgaste var 1,1 (1 fisk i kar 11). Gjennomsnittleg maksscore i dei ulike kara varierte mellom 0,9 (kar 9) og 1,6 (kar 12). Lågaste maksscore hjå enkeltindivid var 0 (4 av 60 fisk) og høgaste maksscore var 2 (23 av 60 individ).

Ved uttaket før behandling (15 dpi) varierte den gjennomsnittlege gjellescoren i dei ulike kara mellom 0,23 (lågast i kar 9) og 0,73 (høgast i kar 12). Det var ein høgare gjennomsnittsscore i kar 11 og 12 enn i dei andre kara ved dette uttaket (figur 3.5).

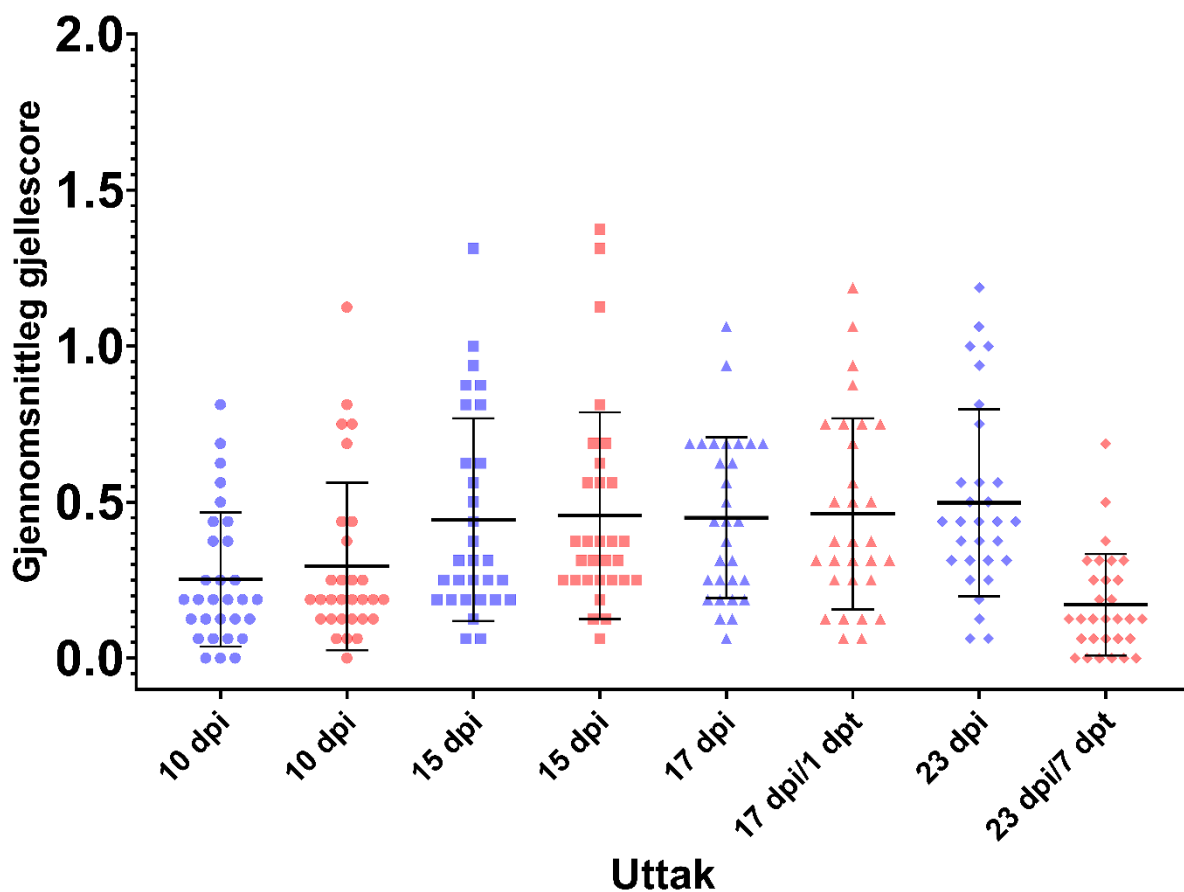
Eitt døgn etter behandling (uttak 17 dpi) varierte den gjennomsnittlege gjellescoren i dei ulike kara mellom 0,32 (lågast i kar 8) og 0,65 (høgast i kar 11). Ved uttak ei veke etter behandling (23 dpi) varierte den gjennomsnittlege gjellescoren i dei ulike kara mellom 0,12 (kar 7) og 0,71 (kar 12). Her ser ein òg at kar 12 skil seg ut med ein tydeleg høgare score enn dei andre ubehandla kara (figur 3.5).

I kara som vart behandla med ferskvatn 16 dpi (kar 7, 8, og 11, figur 3.5) var det nedgang i gjennomsnittleg gjellescore mellom uttaka 17 dpi og 23 dpi. Ein ser størst nedgang i kar 11, frå 0,65 til 0,15 (endring på -0,5). I kar 7 var det ein nedgang på -0,3 (frå 0,42 til 0,12), medan i kar 8 var endringa berre på -0,08 (frå 0,32 til 0,24). Ein ser òg ein liten nedgang i gjellescoren i kar 10 (endring på -0,06), sjølv om karet ikkje var behandla med ferskvatn (figur 3.5).

Ved å sjå på gjennomsnittleg gjellescore per uttak i ubehandla (blå verdiar, figur 3.6) og behandla (raude verdiar, figur 3.6) grupper samla ser ein at scoren var relativt jamn og lik mellom gruppene ved dei tre første uttaka (10 dpi, 15 dpi og 17 dpi, figur 3.6), men det er tydeleg at scoren vart redusert i dei behandla gruppene ei veke etter behandling (raude verdiar, 23 dpi/7 dpt, figur 3.6). Likevel var det stor spreiding i gruppene mellom dei individuelle fiskane, sjølv ei veke etter behandling (figur 3.6).



Figur 3.5 Gjennomsnittlig gjellescore per kar per uttak i del 1 av forsøket. N = 10 fisk (160 gjelleflater) per kolonne. Kolonnar med raude omriss viser verdier frå kar etter behandling med ferskvatn (16 dpi).



**Figur 3.6** Gjennomsnittleg gjellescore i behandla og ubehandla grupper ved uttak i del 2 av forsøket. Lang horisontal svart strek angir gjennomsnittsverdien for gruppa, medan tynne svarte strekar viser standardavviket. Kvant enkelt punkt representerer ein individuell fisk, der gjellescoren er basert på alle 16 gjelleflatene. Raude verdiar er frå fisk i grupper som vart behandla med ferskvatn 16 dpi (kar 7, 8 og 11). Dpt = «days post treatment»/dagar etter behandling. Blå verdiar er frå fisk i ubehandla grupper (kar 9, 10 og 12). N = 30 fisk per gruppe. Sirklar = uttak 10 dpi, firkantar = uttak 15 dpi, trekantar = uttak 17 dpi, rombar = uttak 23 dpi.

### **Frie flater**

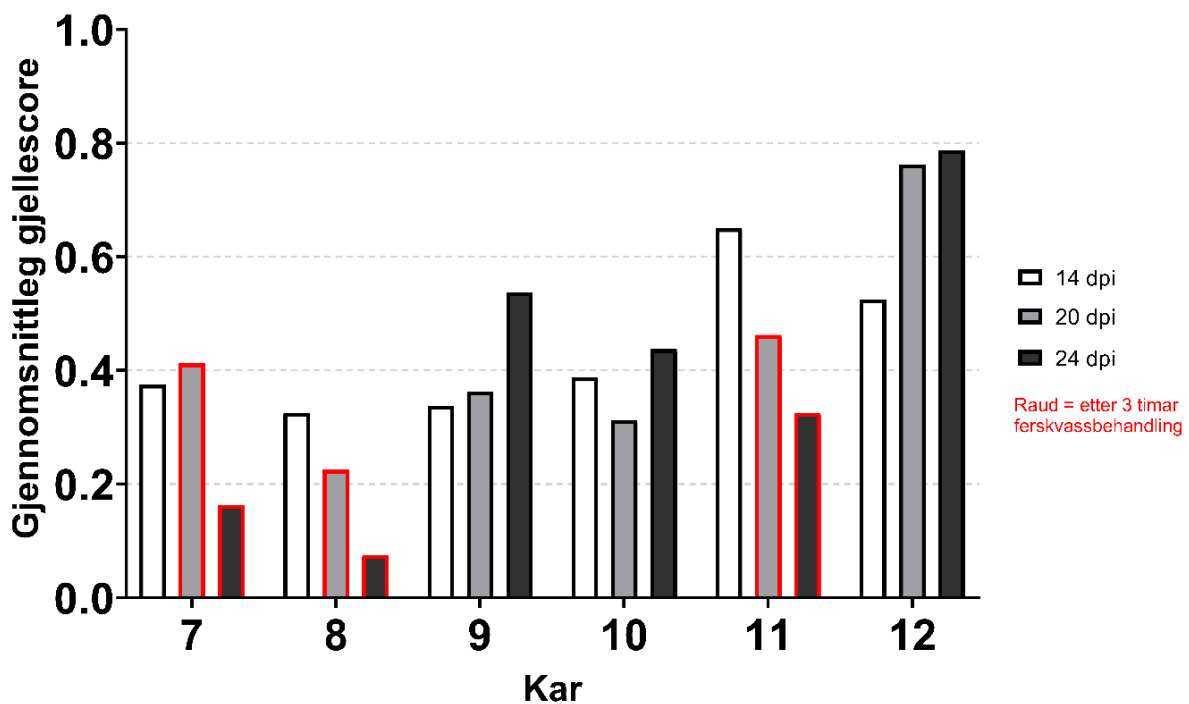
Eit anna godt mål på effekt av ferskvassbehandling kan ein få ved å sjå på tal frie flater (FF) (L. Andersen, pers. kom.). Frie flater er gjelleflater heilt utan gjellescore (score 0). Maks tal frie flater per fisk er 16. Metoden har vorte brukt i tidlegare prosjekt om AGD (Hytterød *et al.*, 2017; Hytterød *et al.*, 2018).

Før smitte (-1 dpi) var det ingen fisk som hadde gjellescore og snittet vart difor 16 frie flater per fisk i alle gruppene (figur 3.7). Ved uttaka 15 dpi og 17 dpi var snittet relativt jamt (10,0-10,4 FF per fisk) i gruppene, sjølv i grupper som var behandla 16 dpi (figur 3.7). Det var først ved uttaket ei veke etter behandling (23 dpi) at ein kunne sjå forskjell mellom ubehandla og behandla grupper, der snittet i behandla grupper var tydeleg høgare (13,8 FF) samanlikna med ubehandla grupper (9,8 FF) (figur 3.7).

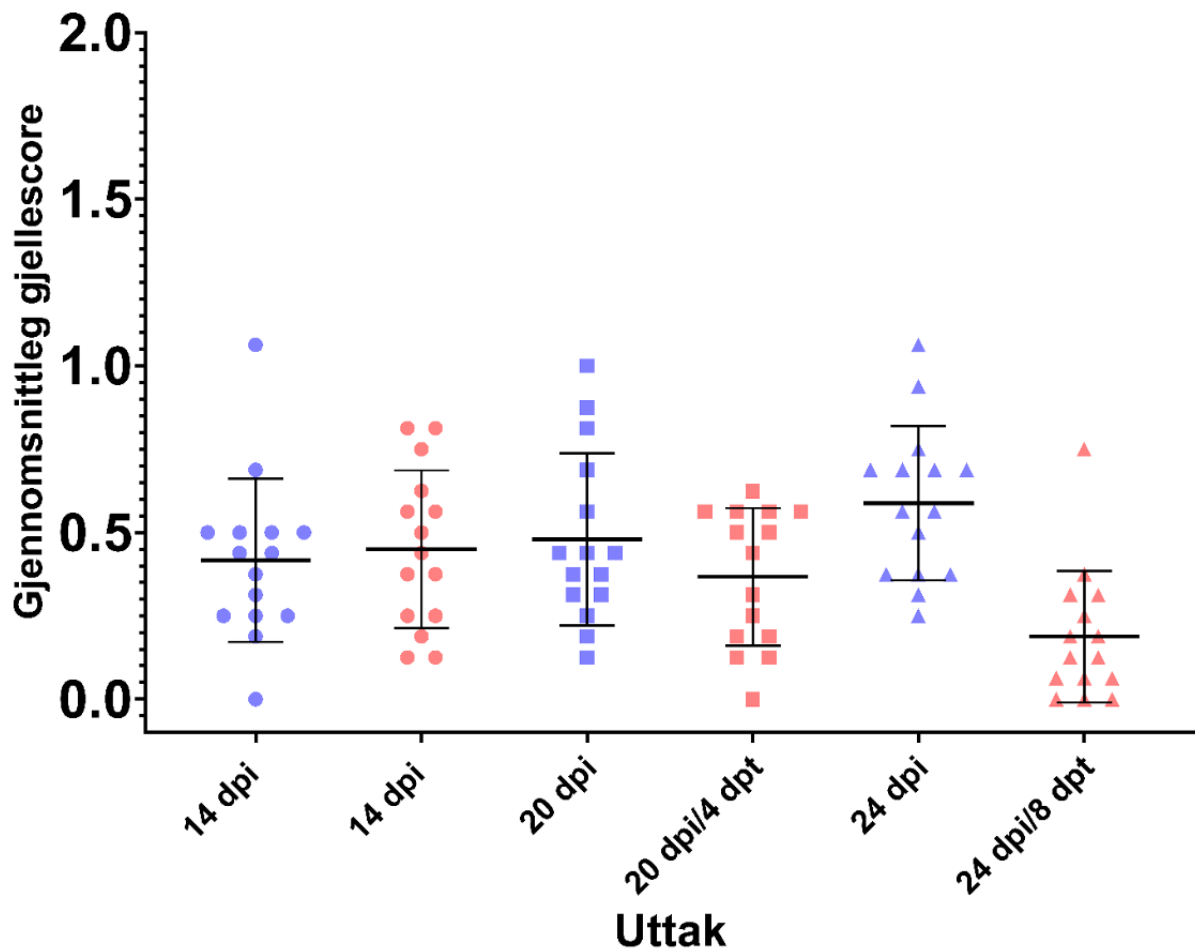


uttak, medan kar 8 hadde ein nedgang på -0,25. I kar 7, som òg vart behandla 16 dpi, ser ein derimot ein svært liten auke (+0,04) i gjennomsnittsscoren mellom uttak 14 dpi og 20 dpi, men nedgang mellom uttak 20 dpi og 24 dpi (endring på -0,25), sjå figur 3.8.

Ved å sjå på gjennomsnittleg gjellescore per uttak i ubehandla og behandla grupper samla ser ein tydeleg at scoren vart redusert i dei behandla gruppene (raude verdiar, figur 3.9), medan scoren auka i dei ubehandla gruppene (blå verdiar, figur 3.9). Likevel var det stor spreing i gruppene mellom dei individuelle fiskane, sjølv åtte dagar etter behandling (24 dpi, figur 3.9).



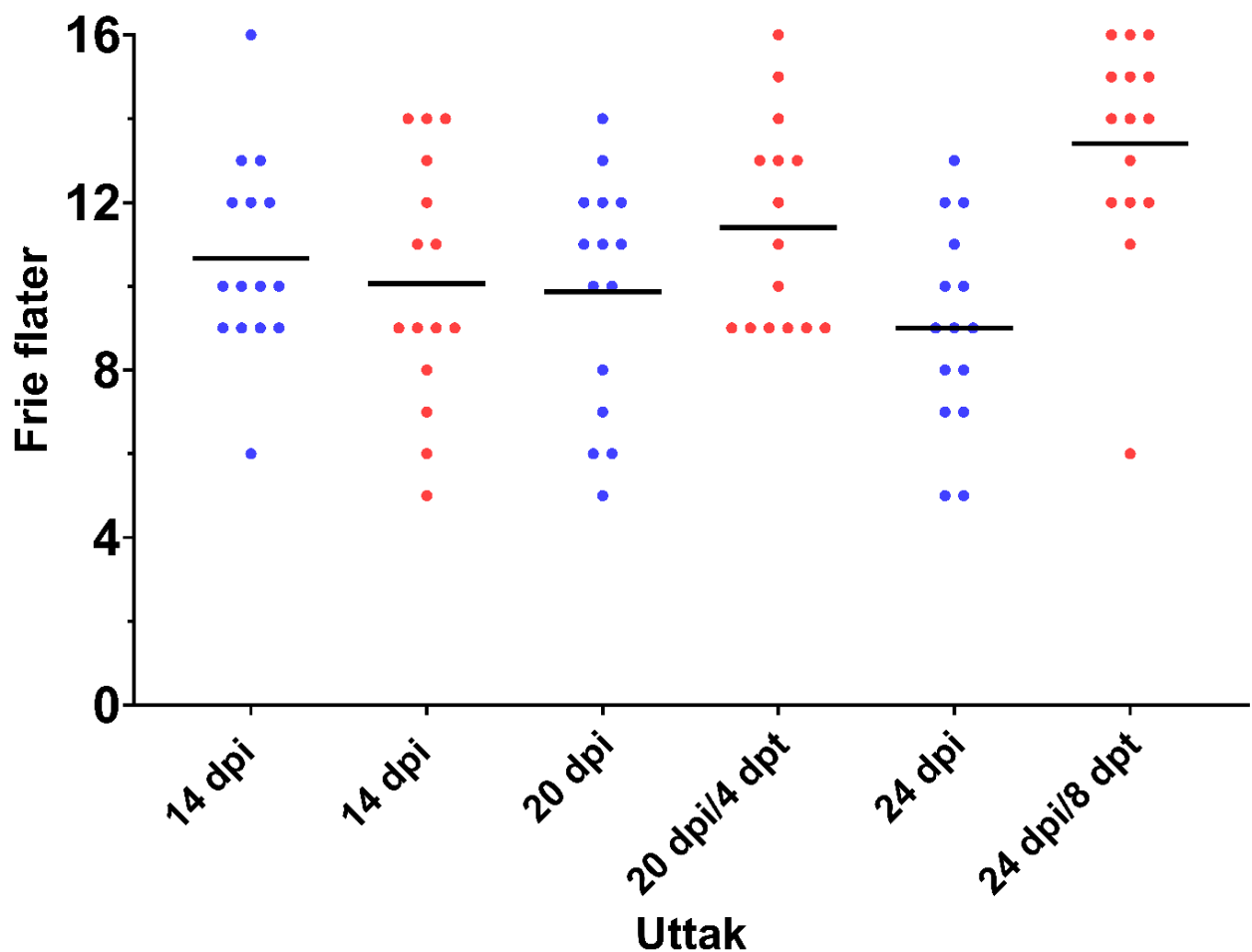
**Figur 3.8** Gjennomsnittleg gjellescore per kar per uttak i del 2 av forsøket. N = 5 fisk (80 gjelleflater) per kolonne. Kolonnar med raude omriss viser verdiar frå kar etter behandling med ferskvatn (16 dpi).



**Figur 3.9** Gjennomsnittleg gjellescore i behandla og ubehandla grupper ved uttak i del 2 av forsøket. Lang horisontal svart strek angir gjennomsnittsverdien for gruppa, medan tynne svarte strekar viser standardavviket. Kvant enkelt punkt representerer ein individuell fisk, der gjellescoren er basert på alle 16 gjelleflatene. Raude verdier er frå fisk i grupper som vart behandla med ferskvatn 16 dpi (kar 7, 8 og 11). Dpt = «days post treatment»/dagar etter behandling. Blå verdier er frå fisk i ubehandla grupper (kar 9, 10 og 12). N = 15 fisk per gruppe. Sirklar = uttak 14 dpi, firkantar = uttak 20 dpi, trekantar = 24 dpi.

## Frie flater

Ved det første uttaket 14 dpi, to dagar før behandling, låg snittet på frie flater rundt 10 per fisk (10,1-10,7 FF) i gruppene (figur 3.10). Fire dagar etter behandling (20 dpi) kunne ein derimot observere ein liten forskjell mellom ubehandla og behandla grupper, der snittet i behandla grupper var høgare (11,4 FF) enn i ubehandla grupper (9,9 FF), altså kunne ein observere fleire frie gjelleflater hjå den behandla fisken samanlikna med den ubehandla. Ved det siste uttaket 24 dpi, åtte dagar etter behandling, såg ein tydeleg forskjell mellom gruppene. Snittet i behandla grupper var 13,4 FF per fisk, medan det var 9,0 FF per fisk i ubehandla grupper (figur 3.10).



**Figur 3.10** Tal på frie flater i behandla og ubehandla grupper ved uttak i del 2 av forsøket. Lang horisontal svart strek angir gjennomsnittsverdien for gruppa. Raude verdiar er frå fisk i grupper som vart behandla med ferskvatn 16 dpi (kar 7, 8 og 11). Dpt = «days post treatment»/dagar etter behandling. Blå verdiar er frå fisk i ubehandla grupper (kar 9, 10 og 12). N = 15 fisk per gruppe.

## *Del 1 og del 2 samla*

### **Gjellescore per gjelleflate**

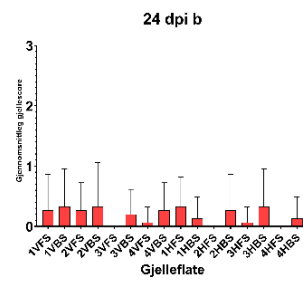
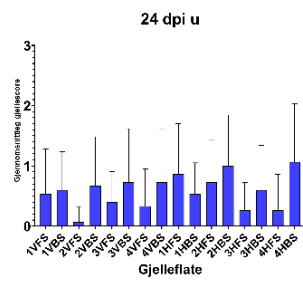
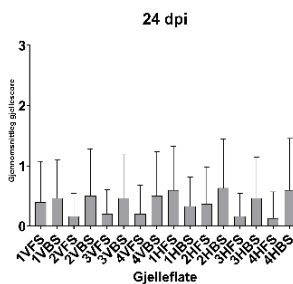
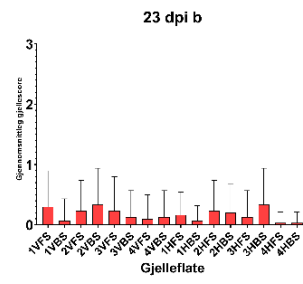
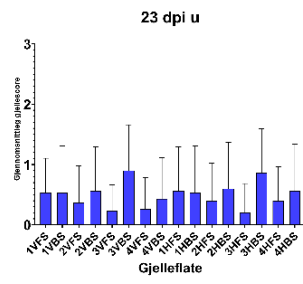
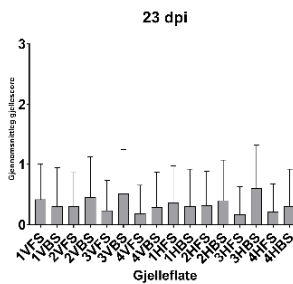
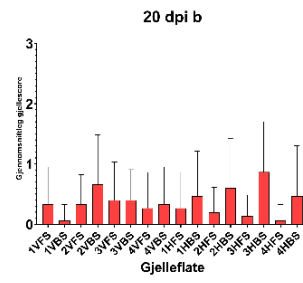
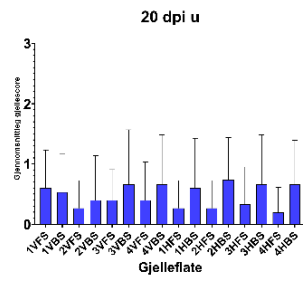
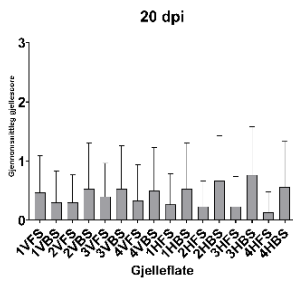
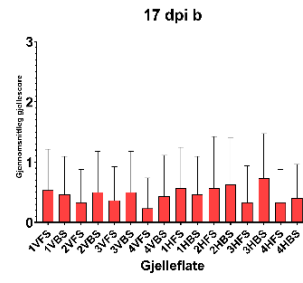
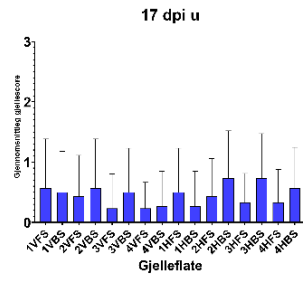
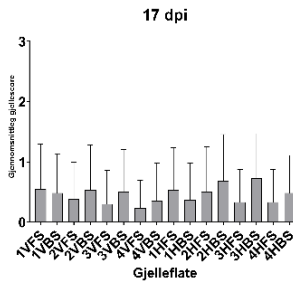
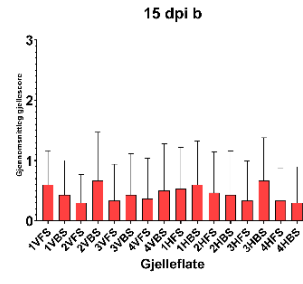
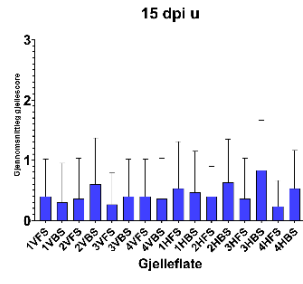
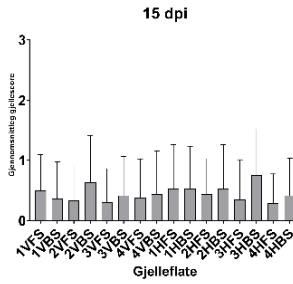
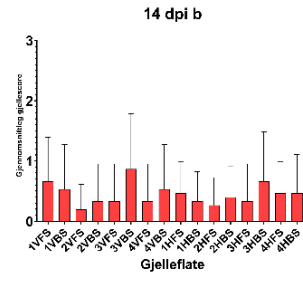
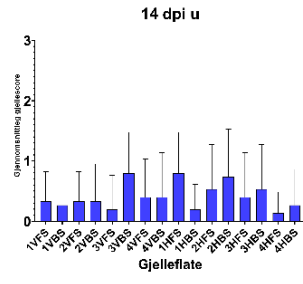
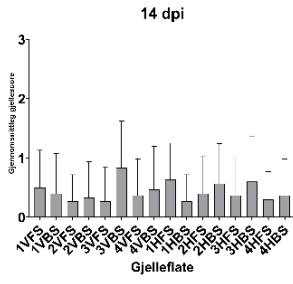
Distribusjonen av AGD-lesjonar over dei 16 gjelleflatene var relativt jamt fordelt per gjelleflate ved alle uttaka. Ein kunne ikkje observere at det var enkelte gjelleflater som vart meir affisert enn andre (grå kolonnar, figur 3.11).

Fire dagar etter behandling, ved uttak 20 dpi, kunne ein berre sjå ein liten forskjell på fordelinga mellom ubehandla og behandla grupper. Snittscoren var lågare på fleire gjelleflater i behandla grupper (raude kolonnar, 20 dpi, figur 3.11) samanlikna med ubehandla grupper (blå kolonnar, 20 dpi, figur 3.11).

Det var først ved uttak 23 og 24 dpi at ein kunne sjå tydeleg forskjell mellom gruppene. Dei behandla gruppene (raude kolonnar, 23 og 24 dpi, figur 3.11) hadde lågare snittscore per gjelleflate samanlikna med gjelleflatene i dei ubehandla gruppene (blå kolonnar, 23 og 24 dpi, figur 3.11). Ved det siste uttaket (24 dpi) var det òg fleire gjelleflater som var heilt utan gjellescore (frie flater) i behandla grupper (3VFS, 2HFS og 4HFS, raude kolonnar, 24 dpi, figur 3.11).

**Figur 3.11** Gjellescore per gjelleflate per uttak. Dei grå kolonnane er basert på alle fisk per uttak, både frå ubehandla og behandla grupper. Dei blå kolonnane er basert på fisk frå ubehandla (u) grupper (kar 9, 10 og 12). Raude kolonnar er basert på fisk frå gruppene som vart behandla (b) med ferskvatn 16 dpi (kar 7, 8 og 11). Tynn svart strek viser standardavviket. Tal = gjelleboge 1-4. V = venstre side av fisken. H = høgre side av fisken. FS = framside av gjellebogen. BS = bakside av gjellebogen. N = 60 per grå kolonne og N = 30 per blå og raud kolonne ved uttak 15, 17 og 23 dpi. N = 30 per grå kolonne og N = 15 per blå og raud kolonne ved uttak 14, 20 og 24 dpi.





### 3.4 Real-time RT-PCR analyser

#### Del 1

#### Prevalens av *P. perurans*

Det vart ikkje påvist *P. perurans* i vevsprøver frå uttaket dagen før smitte. Ved uttak før behandling (15 dpi) var prevalensen 100% i alle kara utanom kar 9, som hadde 80% prevalens av *P. perurans*.

Eitt døgn etter behandling (17 dpi) var det 100% prevalens i dei tre kara som ikkje var behandla (kar 9, 10 og 12). I kara som var behandla, derimot, var prevalensen høvesvis berre 10%, 20% og 30% i kar 7, 8 og 11.

Ved uttak 23 dpi som var ei veke etter behandling vart det ikkje påvist *P. perurans* i kara som vart behandla 16 dpi (7, 8 og 11). I kara som ikkje vart behandla var prevalensen til samanlikning høvesvis 90%, 100% og 90% i kar 9, 10 og 12. Sjå tabell 3.1.

**Tabell 3.1** Tal på fisk positive for *P. perurans* per kar per uttak i del 1 av forsøket. N = 10 (Unntak: N = 9 for kar 10 ved uttak 23 dpi). \* Behandla med ferskvatn 16 dpi. Dpt = «days post treatment»/dagar etter behandling.

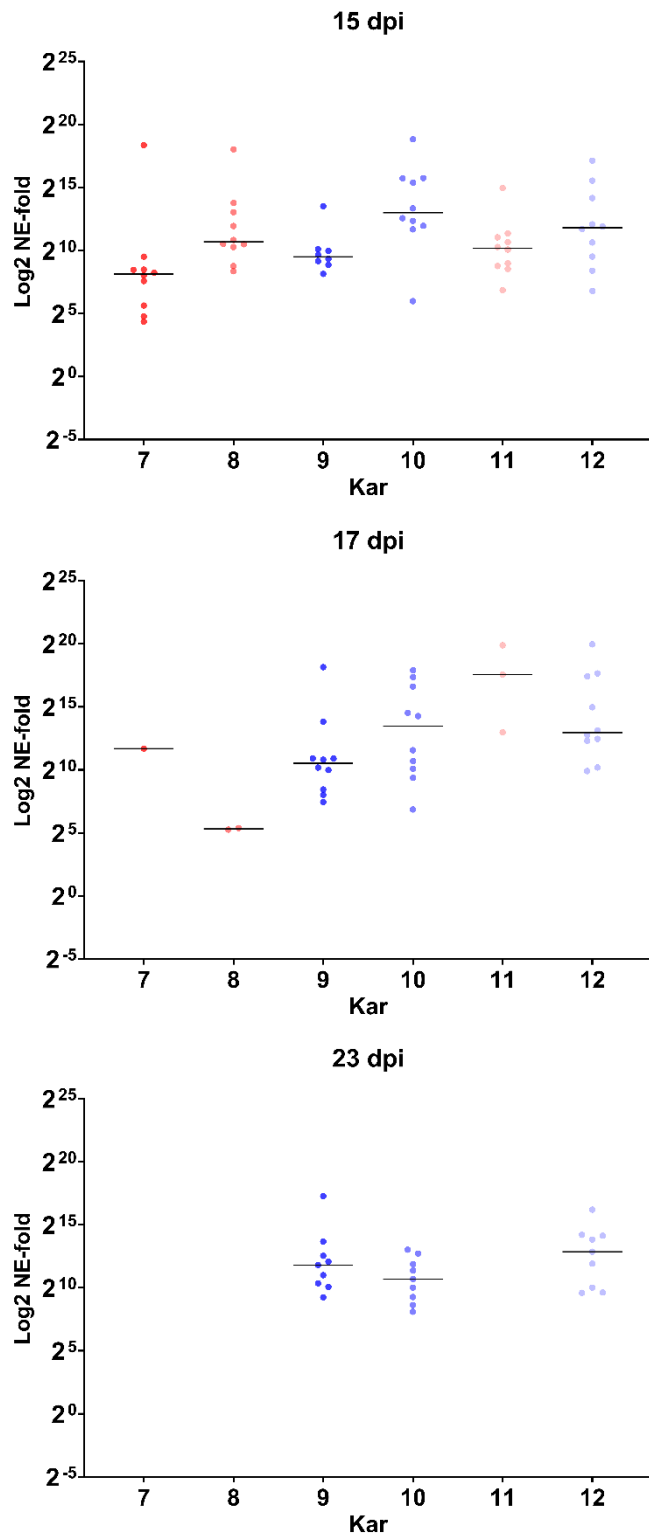
Kar	-1 dpi	15 dpi	17 dpi/1 dpt	23 dpi/7 dpt
7*	0	10	1	0
8*	0	10	2	0
9	0	8	10	9
10	0	10	10	9
11*	0	10	3	0
12	0	10	10	9

### **Mengde *P. perurans* i gjellevev**

RNA-nivåa av *P. perurans* varierte ein del mellom dei ulike kara ved uttak ein dag før behandling (15 dpi, figur 3.12). Lågast amøbenivå var det i kar 7 (median av NE-fold verdiane = 281), medan kar 10 og 12 hadde høgast RNA-nivå av alle kara (høvesvis median av NE-fold verdiane= 8211 og 3600). Kar 9 skilde seg ut ved å ha lågare tal på prøver positive for *P. perurans* enn dei andre kara (8/10 positive, 15 dpi, figur 3.12).

Eitt døgn etter behandling (17 dpi) såg ein tydeleg at tal på prøver positive for *P. perurans* var redusert i dei behandla gruppene, frå 10 positive fisk i kvart kar til høvesvis 1, 2 og 3 positive i kar 7, 8 og 11 (17 dpi, Figur 3.12). Basert på dei få positive prøvene i kar 7 og 11 var RNA-nivåa framleis høge (median var høvesvis 3297 og 193 424), men var lågare i kar 8 (endring i median frå 1652 til 40). Kar 11 hadde høgast RNA-nivå av alle gruppene (median = 193 424), medan kar 10 og 12 hadde høgast RNA-nivå av dei ubehandla gruppene (median var høvesvis 11 363 og 7945).

Ei veke etter behandling, ved uttak 23 dpi, var det ingen positive prøver i dei behandla gruppene (kar 7, 8 og 11, figur 3.12). Kar 12 hadde høgast RNA-nivå av *P. perurans* (median = 7419), medan det var blitt tydeleg redusert i kar 10 samanlikna med uttak 17 dpi (endring frå 11 363 til 1647). Til samanlikning hadde nivået auka litt i kar 9 sidan førre uttak, frå 1474 til 3575 (figur 3.12).



**Figur 3.12** Mengde *P. perurans* RNA i gjeller ved alle uttak i del 1 av forsøket (15, 17 og 23 dpi). RNA-nivåa er presentert som Log<sub>2</sub> NE-fold. Svart strek angir median. Raude verdier er fisk frå grupper som vart behandla 16 dpi. Blå verdier er fisk frå grupper som var ubehandla. N = 10 fisk for kvart kar ved kvart uttak (Unntak: N = 9 i kar 10 ved 23 dpi).

## Del 2

### Prevalens av *P. perurans*

Ved det første uttaket av alle gjellebogane (14 dpi) varierte prevalensen av *P. perurans* i gjellevev frå fisk i dei ulike kara frå 72,5% til 100% (tabell 3.2). Kar 11 og 12 skilde seg ut ved å ha høgast prevalens, der 97,5-100% av gjellebogane var positive for *P. perurans*.

Fire dagar etter behandling (20 dpi) var amøbenivåa i kara som vart behandla tydeleg redusert, frå 72,5% til ingen påvisingar i kar 7, frå 80% til berre 2,5% i kar 8, og frå 100% til 47,5% i kar 11 (tabell 3.2). I kara som ikkje vart behandla hadde nivåa auka sidan førre uttak, til høvesvis 85%, 90% og 100% prevalens i kar 9, 10 og 12 (tabell 3.2).

Åtte dagar etter behandling (24 dpi) hadde prevalensen av *P. perurans* vorte ytterlegare redusert i to av kara som vart behandla, til fråvær av *P. perurans* RNA i kar 8 og berre 10% i kar 11, medan den hadde auka i kar 7 frå ikkje detekterbare nivå i prøvene som vart undersøkt, til 22,5% (tabell 3.2). Av kara som ikkje vart behandla hadde amøbenivåa auka i kar 9 og 10 (100% i begge kar), men vorte litt redusert i kar 12 (frå 100% til 95%), sjå tabell 3.2.

**Tabell 3.2** Prevalens av *P. perurans* per kar per uttak i del 2 av forsøket. N = 40 gjellebogar per kar per uttak. Alle tal oppgitt i prosent. \*Behandla med ferskvatn 16dpi. Dpt = «days post treatment»/dagar etter behandling.

Kar	14 dpi	20 dpi/4 dpt	24 dpi/8 dpt
7*	72,5	0	22,5
8*	80	2,5	0
9	67,5	85	100
10	72,5	90	100
11*	100	47,5	10
12	97,5	100	95

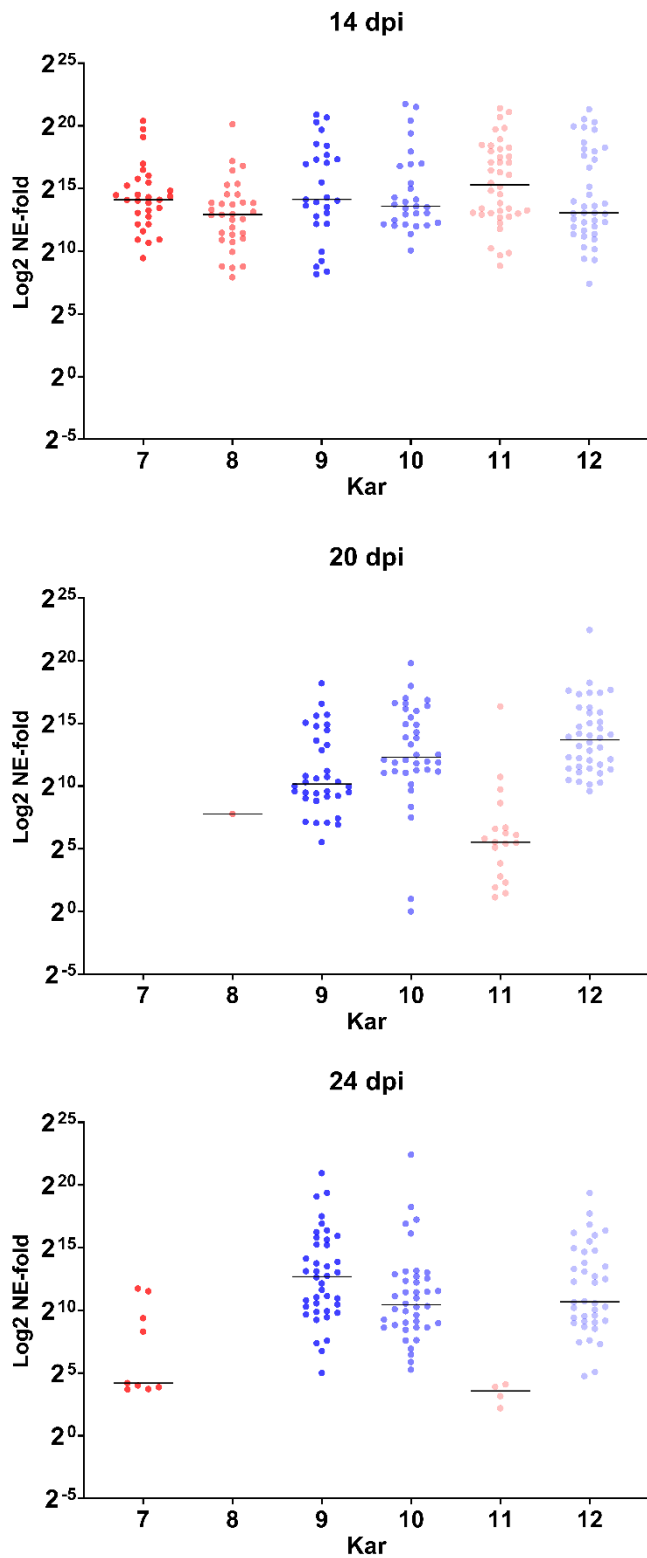
### **Mengde *P. perurans* i gjellevev**

To dagar før behandling, ved første uttak av prøver frå alle gjellebogane (14 dpi, figur 3.13) var mengde *P. perurans* i alle gruppene relativt jamn. Einaste karet som skilde seg ut var kar 11, der det gjennomsnittlege RNA-nivået var tydeleg høgare enn i dei andre kara (median av NE-fold verdiane var 40 329).

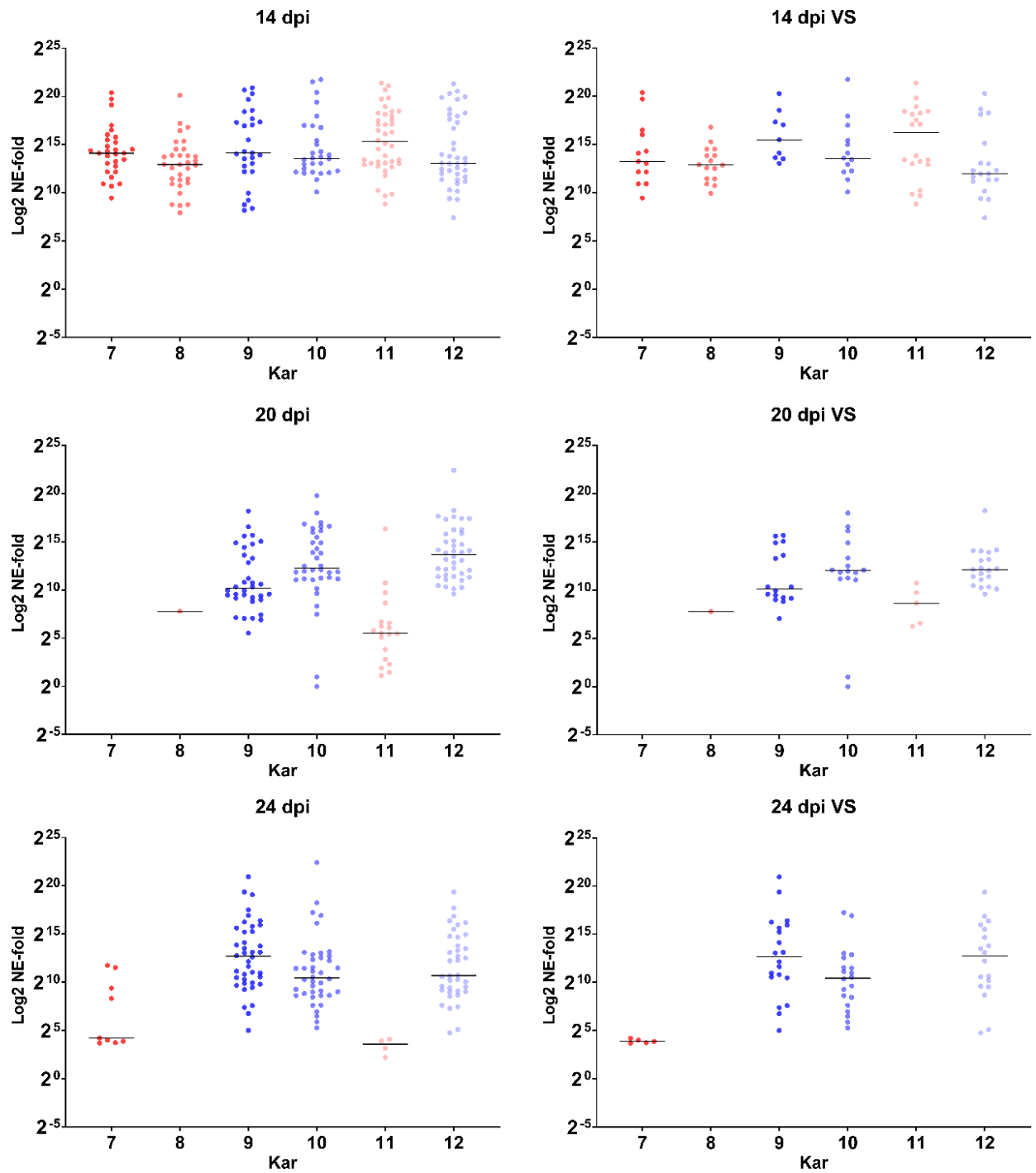
Fire dagar etter behandling (20 dpi) såg ein at i behandla kar var tal på gjellebogar positive for *P. perurans* tydeleg redusert, og RNA-nivåa var lågare (figur 3.13). Kar 11 hadde likevel fleire positive påvisingar enn kar 7 og 8 (høvesvis 19, mot 0 og 1), men lågare amøbenivå enn kar 8 (median var 46 i kar 11, og 220 i kar 8). Av dei ubehandla gruppene var det kar 12 som hadde høgast nivå av *P. perurans* (median var 13 094, mot høvesvis 1150 og 5058 i kar 9 og 10), sjå figur 3.13.

Ved det siste uttaket 24 dpi, åtte dagar etter behandling, skilde kar 7 seg ut frå dei behandla kara ved å ha auka tal på positive prøver sidan førre uttak, frå 0 til 9. Dermed gjekk òg RNA-nivået i karet opp (median frå 0 til 18), sjå figur 3.13. I kar 8 og 11 hadde tal på positive prøver tydeleg gått ned, og amøbenivåa var òg redusert samanlikna med førre uttak (frå 220 til 0 i kar 8, og frå 46 til 12 i kar 11). Av dei ubehandla kara såg ein at det var kar 9 som hadde dei høgaste *P. perurans* nivåa (median var 6610). I kar 10 og 12 hadde mengda *P. perurans* gått litt ned samanlikna med førre uttak, til 1384 i kar 10 og 1643 i kar 12. Sjø figur 3.13.

Ved desse uttaka tok ein altså ut gjellebogar frå både venstre og høgre side av fisken, og ved å plote berre gjellebogane frå venstre side i ein graf og samanlikne med den opphavslege grafen kunne ein sjå at der var ein viss forskjell mellom sidene når det kom til RNA-nivå av *P. perurans* (figur 3.14). Det kom mest tydeleg fram ved uttak 24 dpi, der det såg ut til at gjellebogane på venstre side av fisken hadde eit lågare RNA-nivå enn dei på høgre side (kar 7, 24 dpi, figur 3.14). I kar 11 var det ingen positive gjellebogar på venstre side ved dette uttaket (24 dpi, figur 3.14).



**Figur 3.13** Mengde *P. perurans* RNA i alle gjellebogane ved alle uttak i del 2 av forsøket (14, 20 og 24 dpi). RNA-nivåa er presentert som Log<sub>2</sub> NE-fold. Svart strek angir median. Raude verdier er gjellebogar frå fisk i grupper som vart behandla 16dpi. Blå verdier er gjellebogar frå fisk i grupper som var ubehandla. N = 40 gjellebogar for kvart kar ved kvart uttak.



**Figur 3.14** Mengde *P. perurans* RNA i gjellebogane ved alle uttak i del 2 av forsøket (14, 20 og 24 dpi). RNA-nivåa er presentert som Log2 NE-fold. Svart strek angir median. Til venstre ser ein verdiar frå alle gjellebogane frå alle kar ved dei ulike uttaka. N = 40 gjellebogor for kvart kar per uttak. Til høgre ser ein berre verdiar frå gjellebogor frå venstre side av fisken frå alle kar ved dei ulike uttaka. N = 20 for kvart kar per uttak. Raude verdiar er gjellebogor frå fisk i grupper som vart behandla 16dpi. Blå verdiar er gjellebogor frå fisk i grupper som var ubehandla.



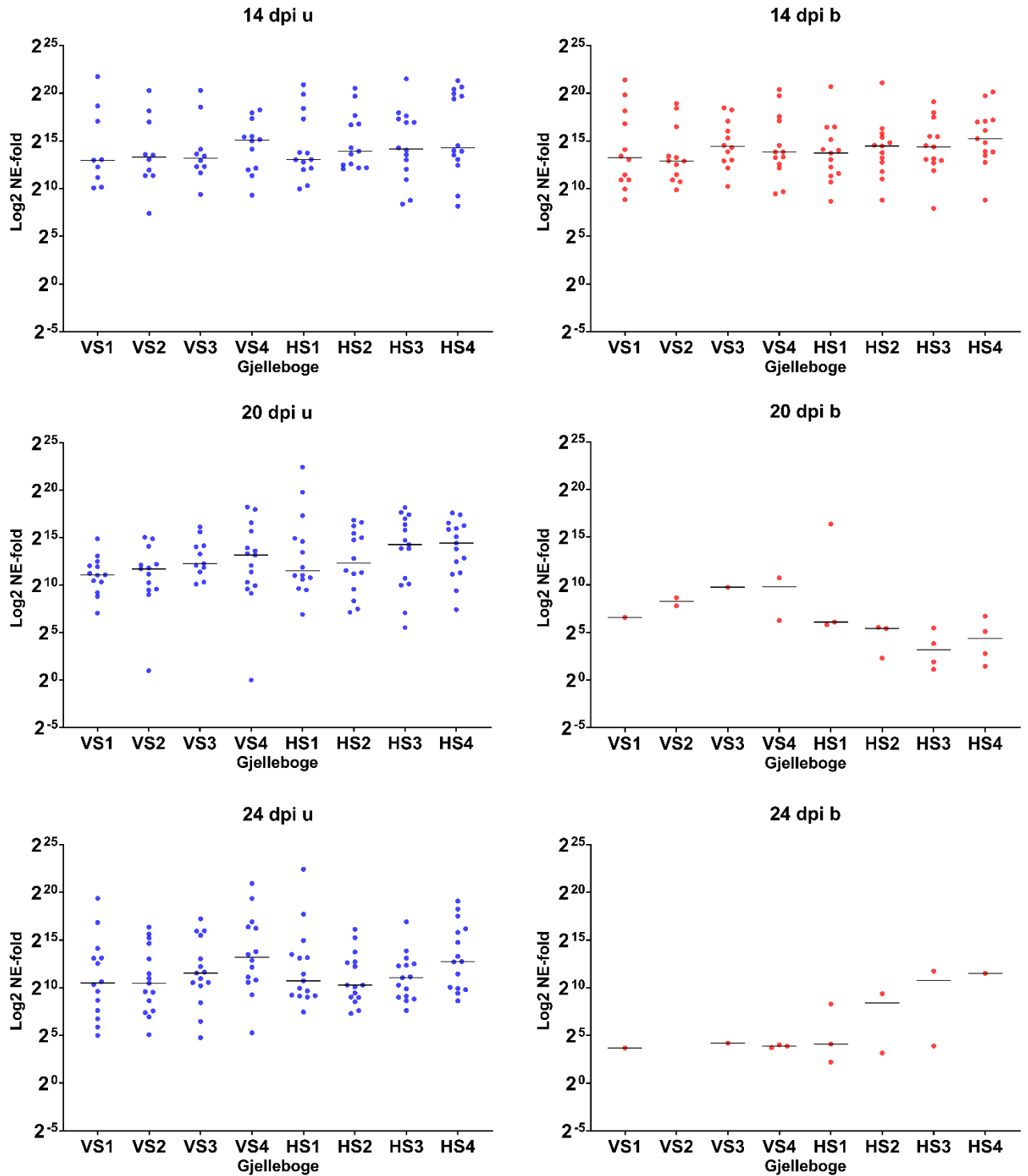
### **RNA-nivå av *P. perurans* per gjelleboge**

Ved det første uttaket av prøver frå alle gjellebogane (14 dpi), to dagar før behandling, var RNA-nivåa på dei ulike gjellebogane relativt like i alle gruppene (figur 3.15). Einaste som skilde seg ut i grupper som ikkje skulle behandlast var 4. gjelleboge på venstre side (VS4, 14 dpi u, blå verdiar, figur 3.15) som hadde litt høgare RNA-nivå (median av NE-fold = 34 475) enn dei andre gjellebogane. I grupper som skulle behandlast skilde HS4 seg frå dei andre ved å ha litt høgare RNA-nivå (median av NE-fold = 38 626), medan VS1 og VS2 hadde litt lågare nivå (høvesvis median av NE-fold = 9691 og 7643) (14 dpi b, raude verdiar, figur 3.15).

Fire dagar etter behandling (20 dpi) varierte RNA-nivåa ein god del i gruppene. I ubehandla grupper hadde HS3 og HS4 tydeleg høgare RNA-nivå enn dei andre gjellebogane (høvesvis median = 20 012 og 22 262) (20 dpi u, figur 3.15). VS4 hadde òg eit høgare nivå (median = 9 285), men det var ikkje like tydeleg (20 dpi u, figur 3.15). I behandla grupper såg ein tydeleg at prevalensen av positive PCR-påvisingar var redusert for alle gjellebogane samanlikna med førre uttak, men RNA-nivå var framleis litt høgare på nokre gjellebogar (VS3 og VS4, median høvesvis = 857 og 887) samanlikna med dei andre (20 dpi b, figur 3.15). Gjellebogane med høgast prevalens (HS3 og HS4, begge 4/15 positive gjellebogar) hadde lågast RNA-nivå (median høvesvis = 9 og 21) (20 dpi b, figur 3.15).

Ved uttaket 24 dpi, åtte dagar etter behandling, var generelt RNA-nivåa lågare i ubehandla grupper samanlikna med førre uttak (figur 3.15), det vil seie at mengd RNA-nivå såg ut til å ha minka noko i perioden mellom 20 og 24 dpi sjølv om gruppene var ubehandla. Den bakarste gjellebogen på begge sider av fisken, VS4 og HS4, skilde seg ut frå dei andre gjellebogane i ubehandla grupper ved å ha høgare RNA-nivå (høvesvis median = 9468 og 6871) (24 dpi u, figur 3.15). I behandla grupper var RNA-nivåa tydeleg høgare på HS2, HS3 og HS4 (median høvesvis = 337, 1719 og 2934) samanlikna med dei andre gjellebogane (20 dpi b, figur 3.15).

Generelt såg ein at ved lågare prevalens varierte RNA-nivåa meir mellom gjellebogane (figur 3.15).



**Figur 3.15** Mengde *P. perurans* RNA per gjelleboge i ubehandla (u) og behandla (b) grupper ved alle uttak i del 2 av forsøket (14, 20 og 24 dpi). RNA-nivåa er presentert som Log2 NE-fold, og viser kor mange gongar meir *P. perurans* RNA det er i prøvene samanlikna med lågaste nivå detektert. Svart strek angir median. Blå verdiar er gjellebogar frå fisk i grupper som var ubehandla (kar 9, 10 og 11). Raude verdiar er gjellebogar frå fisk i grupper som vart behandla 16dpi (kar 7, 8 og 11). V = venstre side av fisken. H = høgre side av fisken. Tal = gjelleboge 1-4. N = 15 for kvar gjelleboge ved kvart uttak i både ubehandla og behandla grupper.

### 3.5 Korrelasjon mellom gjellescore og real-time RT-PCR resultat

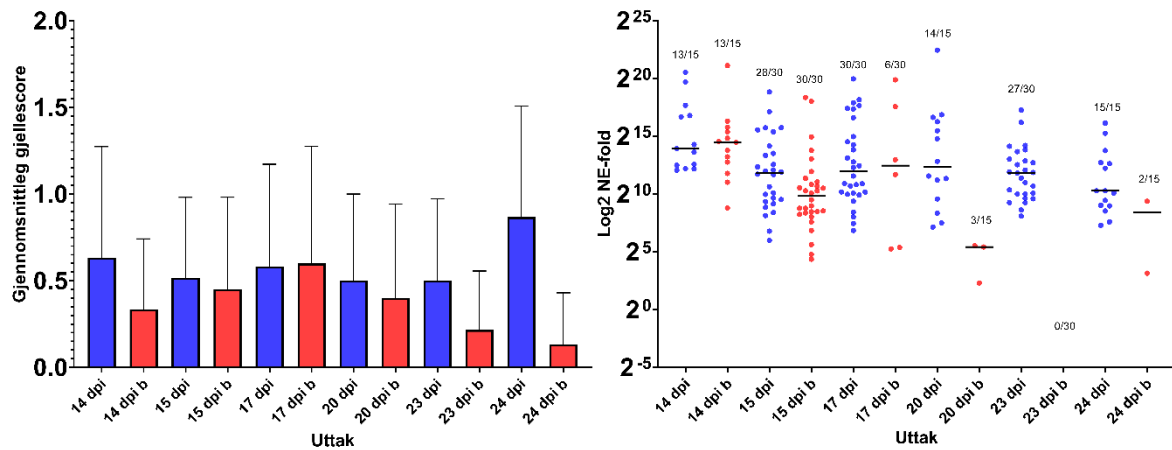
*Del 1 og del 2 samla*

#### **Gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* for HS2 ved alle uttak i forsøket**

For å kunne samanlikne alle uttaka må ein nytte verdiane frå andre gjelleboge på høgre side (HS2), sidan ein ikkje har RNA-analyser frå alle gjellebogane ved uttak -1 dpi, 15 dpi, 17 dpi og 23 dpi. Tal på prøver tatt ut ved dei ulike delforsøka var forskjellig, og det er difor knytt større usikkerheit til uttaka med færre tal prøver undersøkt. I figur 3.16 ser ein på både gjennomsnittleg gjellescore og NE-fold for HS2 ved alle uttaka utanom -1 dpi (dagen før smitte), i ubehandla og behandla grupper.

Ved det første uttaket dagen før smitte var ingen av HS2-gjellebogane positive for *P. perurans*, og alle hadde ein gjellescore på 0.

Då det var kort tidsrom mellom ein del av uttaka var det vanskeleg å vite om det var reell oppgang og nedgang ein observerte, eller om det kom frå individvariasjon ut frå kva individ som vart prøvetatt. Trenden ein kunne sjå var likevel at sjølv om RNA-nivåa varierte ein del i gruppene ved dei tidlege uttaka, så var nivåa av *P. perurans* låge i behandla grupper ved uttak 20, 23 og 24 dpi etter behandling (figur 3.16). Prevalensen gjekk tydeleg ned i dei behandla gruppene etter behandling ved uttak 17, 20, 23 og 24 dpi. Gjellescoren gjekk òg ned i dei behandla gruppene etter behandling (mellom uttak 17 dpi og 24 dpi). Til samanlikning varierte den gjennomsnittlege gjellescoren litt i dei ubehandla gruppene mellom alle uttaka, men hadde tydeleg auke ved siste uttak 24 dpi. Derimot haldt prevalensen og RNA-nivåa av *P. perurans* seg relativt stabilt. Nivået gjekk derimot litt ned ved siste uttak 24 dpi. Sjå figur 3.16.



**Figur 3.16 Til venstre:** Gjennomsnittlig gjeslescore for HS2 per uttak i ubehandla og behandla (b) grupper. Raude kolonnar er frå grupper som vart behandla 16dpi. Blå kolonnar er frå ubehandla grupper. N=30 per kolonne ved uttak 15dpi, 17dpi og 23dpi. N=15 per kolonne ved uttak 14dpi, 20dpi og 24dpi. **Til høgre:** Mengde RNA-nivå av *P. perurans* i HS2 ved kvart uttak i ubehandla og behandla (b) grupper. Data er presentert som Log2 NE-fold, og svart strek angir median. Raude verdiar er frå grupper som vart behandla 16dpi. Blå verdiar er frå ubehandla grupper. Tal på positive er angitt over kvar gruppe. N=30 per gruppe ved uttak 15dpi, 17dpi og 23dpi. N=15 per gruppe ved uttak 14dpi, 20dpi og 24dpi.

## Del 2

### **Gjellescore og *P. perurans* RNA-nivå for kvar enkelt gjelleboge**

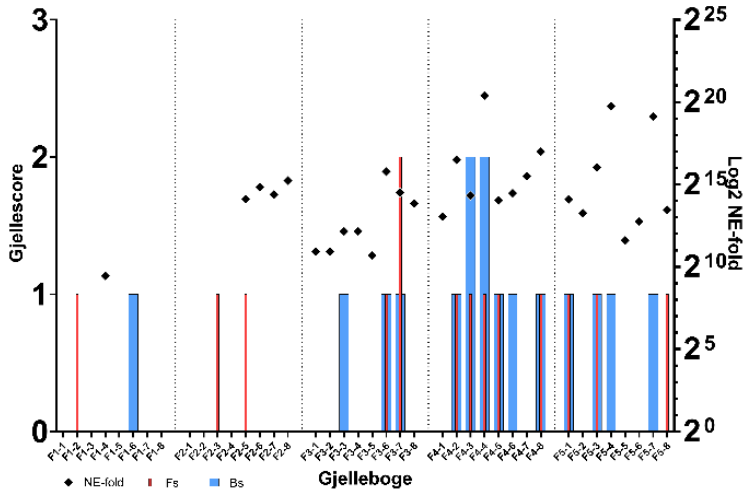
Det første uttaket var to dagar før behandling (14 dpi) og her viser grafen at smitteutviklinga hadde vore relativt jamn i kar 7-10, medan kar 11 og 12 såg ut til å ha tendens til litt høgare amøbenivå ut frå vurdering av både PCR- og gjellescore (figur 3.17). Fleire enkelte gjellebogar var meir affisert (score 2) i desse kara (kar 11 og 12, figur 3.17) samanlikna med dei andre.

Fire dagar etter behandling (20 dpi) ser ein at RNA-nivåa vart tydeleg redusert i dei behandla kara (kar 7, 8 og 11, figur 3.18). Dei enkelte gjellebogane hadde likevel framleis gjellescore med tydeleg slimdanning, og i kar 7 finn ein til dømes den høgste scoren som vart registrert gjennom forsøket sjølv om karet var behandla (score 3, gjelleboge F34-8, figur 3.18). Kar 12 skilde seg frå dei to andre ubehandla kara ved å framleis ha fleire enkelte gjellebogar med score 2 samanlikna med kar 9 og 10.

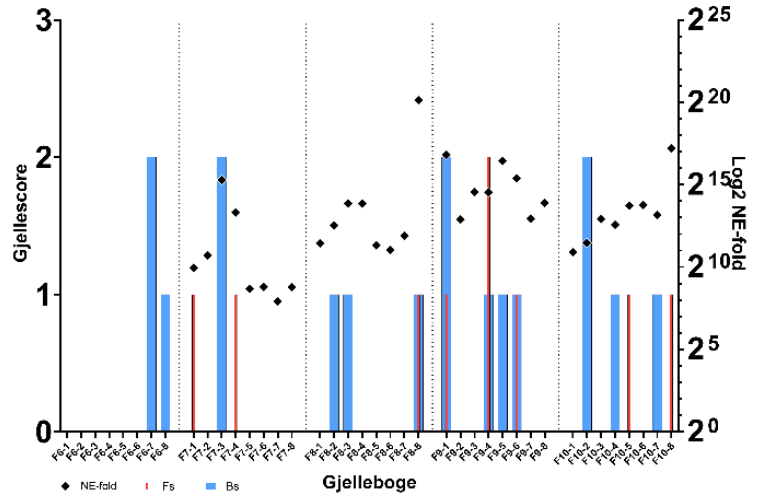
Ved det siste uttaket 24 dpi, åtte dagar etter behandling, ser ein at det var ytterlegare færre gjellebogar som hadde gjellescore i dei behandla kara (kar 7, 8 og 11, figur 3.19). Likevel var det fleire enkelte gjellebogar som var positive for *P. perurans* i kar 7 samanlikna med førre uttak, og heile 7 av totalt 9 gjellebogar som var positive for *P. perurans* hadde ikkje gjellescore (kar 7, figur 3.19). Kar 12 skilde seg framleis frå dei to andre ubehandla kara ved å ha fleire enkelte gjellebogar med score 2, men det var òg høgare førekomst av gjellebogar med score 2 i kar 9 og 10 samanlikna med førre uttak.

# 14 dpi

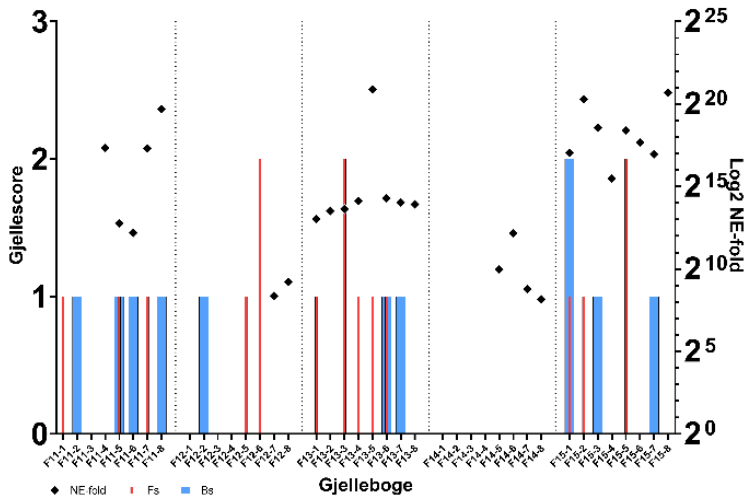
Kar 7



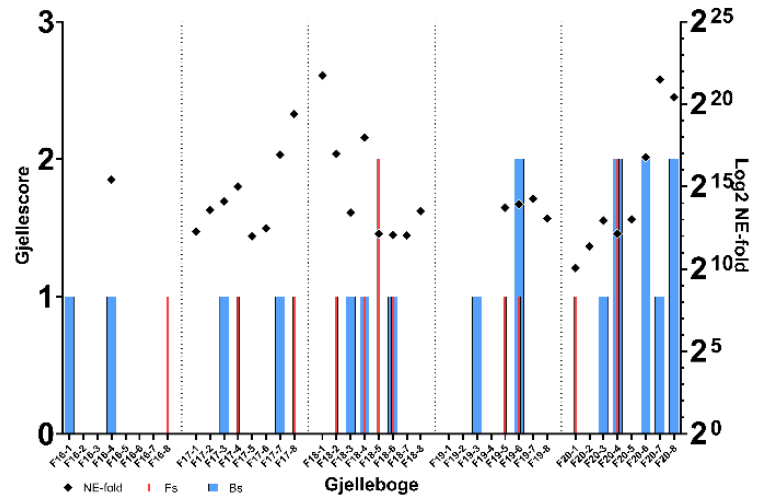
Kar 8



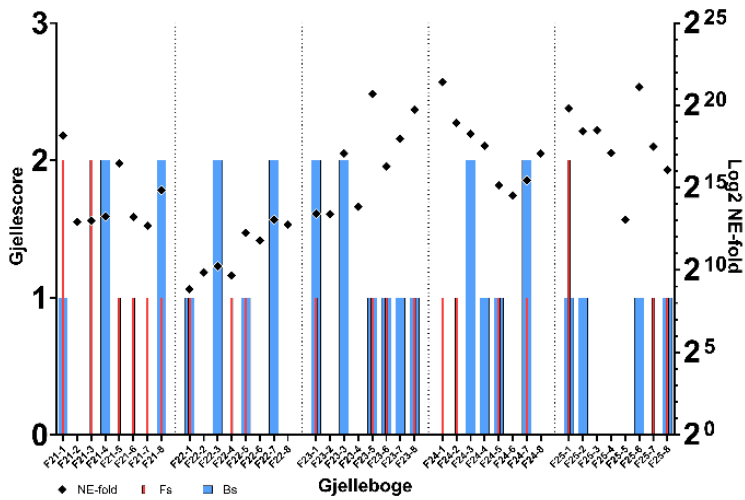
Kar 9



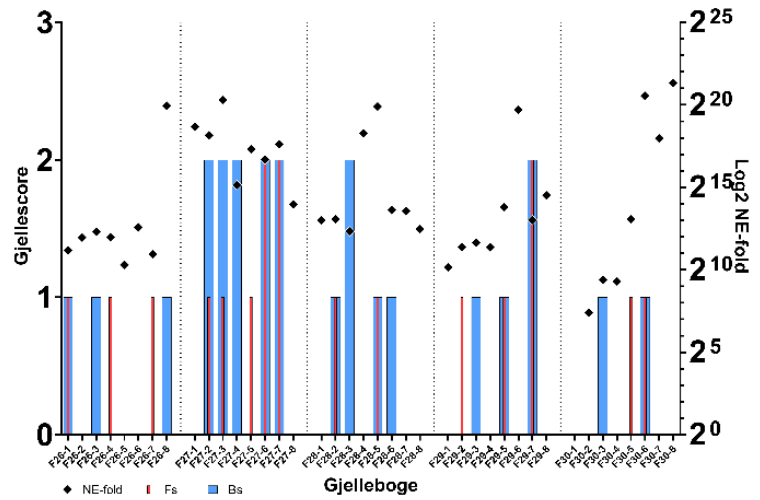
Kar 10



Kar 11



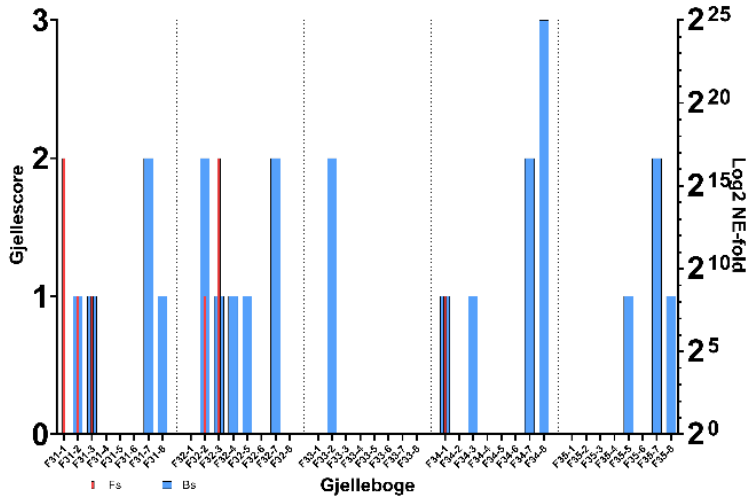
Kar 12



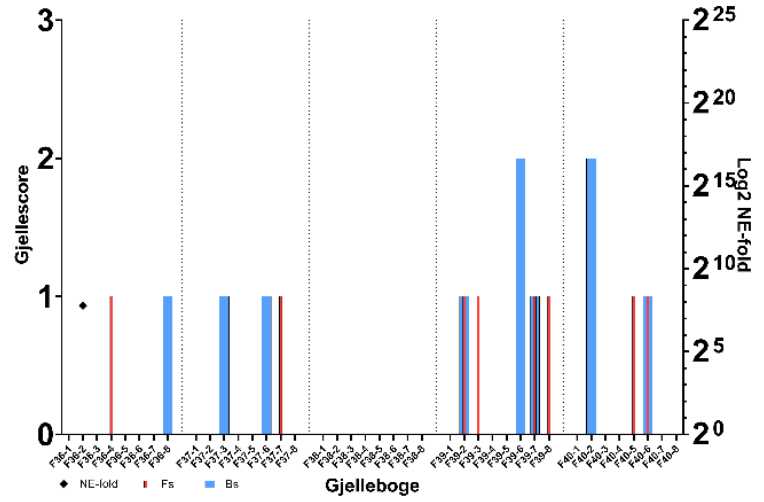
**Figur 3.17** Gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* for alle gjellebogane frå kvar enkelt fisk ved uttak 14 dpi, presentert kar for kar. Fiskane er nummerert frå 1-30 (F1-F30). Gjellebogane frå kvar fisk er nummerert frå 1-8, der 1-4 er frå venstre side (VS1-4) og 5-8 er frå høgre side (HS1-4) av fisken. Raude kolonnar er gjellescore på framsida (Fs) av den enkelte gjellebogen. Blå kolonnar er gjellescore på baksida (Bs) av den enkelte gjellebogen. Svarte punkt viser RNA-nivået av *P. perurans* for den enkelte gjelleboge, presentert som Log<sub>2</sub> NE-fold. N = 5 fisk per kar.

# 20 dpi

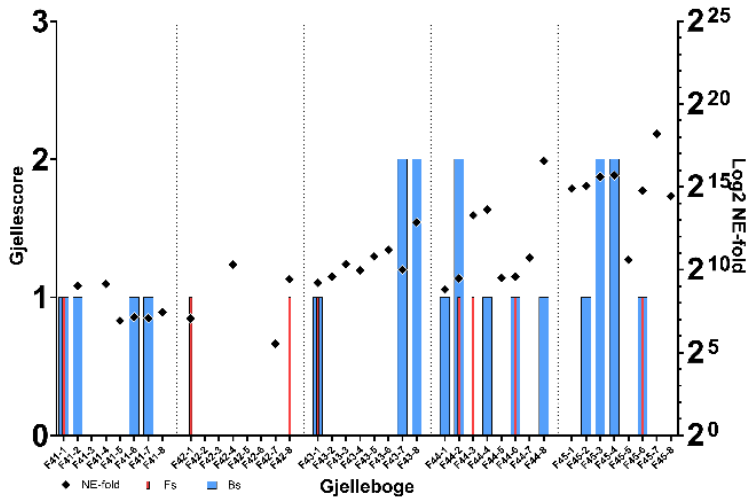
Kar 7



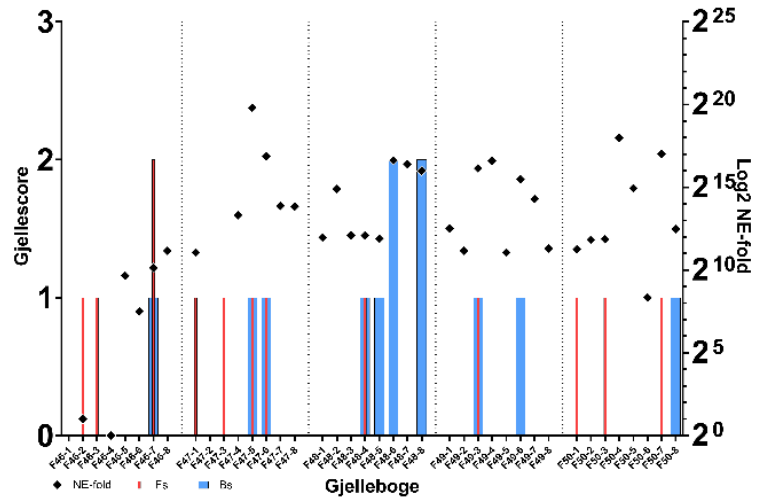
Kar 8



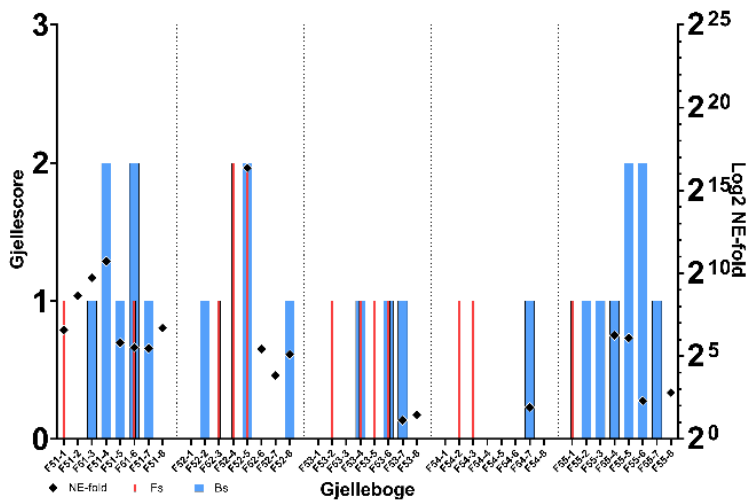
Kar 9



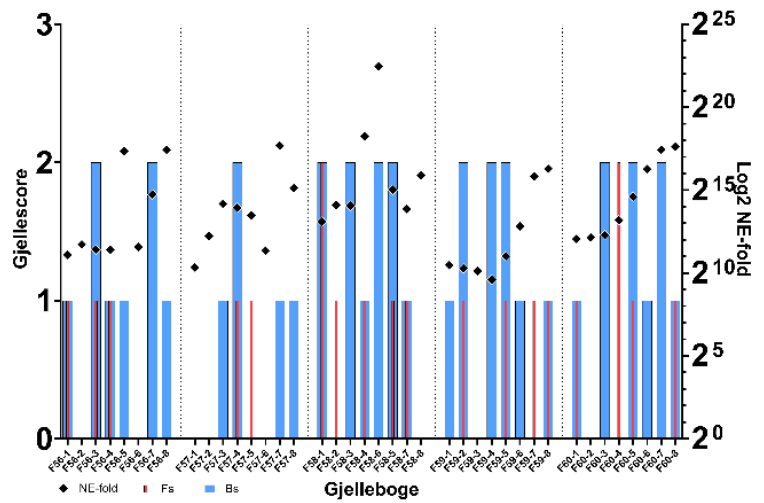
Kar 10



Kar 11



Kar 12

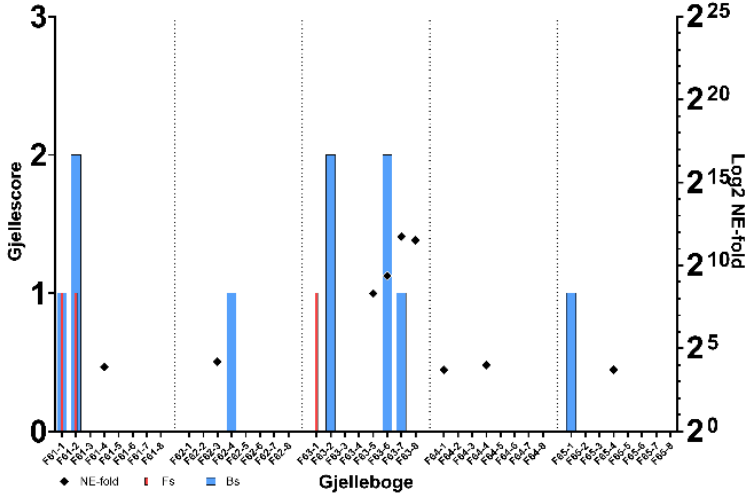




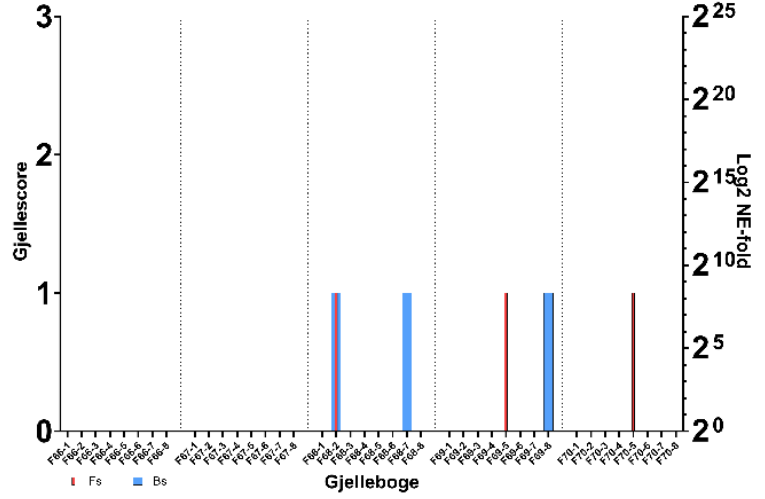
**Figur 3.18** Gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* for alle gjellebogane frå kvar enkelt fisk ved uttak 20 dpi, presentert kar for kar. Fiskane er nummerert frå 31-60 (F31-F60). Gjellebogane frå kvar fisk er nummerert frå 1-8, der 1-4 er frå venstre side (VS1-4) og 5-8 er frå høgre side (HS1-4) av fisken. Raude kolonnar er gjellescore på framsida (Fs) av den enkelte gjellebogen. Blå kolonnar er gjellescore på baksida (Bs) av den enkelte gjellebogen. Svarte punkt viser RNA-nivået av *P. perurans* for den enkelte gjelleboge, presentert som Log<sub>2</sub> NE-fold. N = 5 fisk per kar.

# 24 dpi

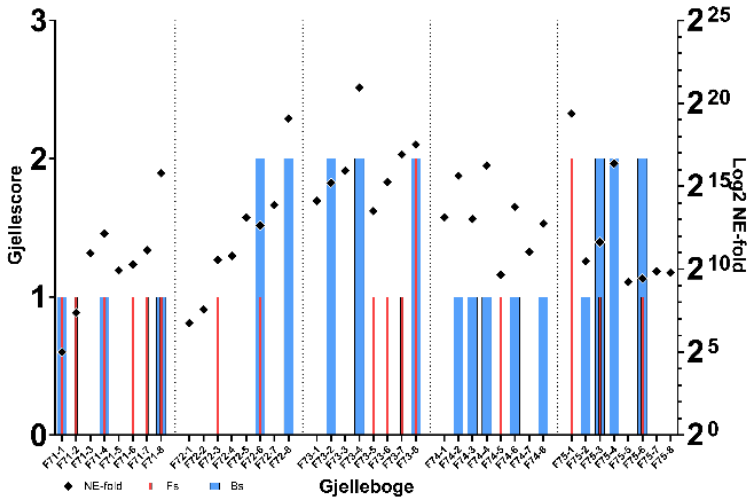
Kar 7



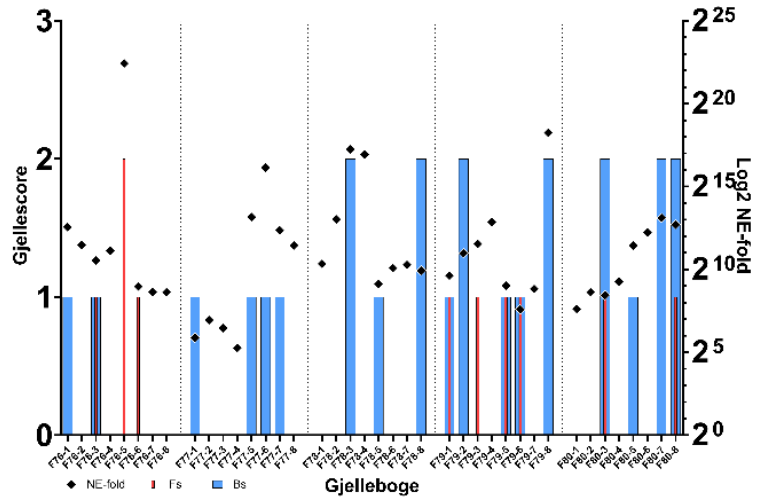
Kar 8



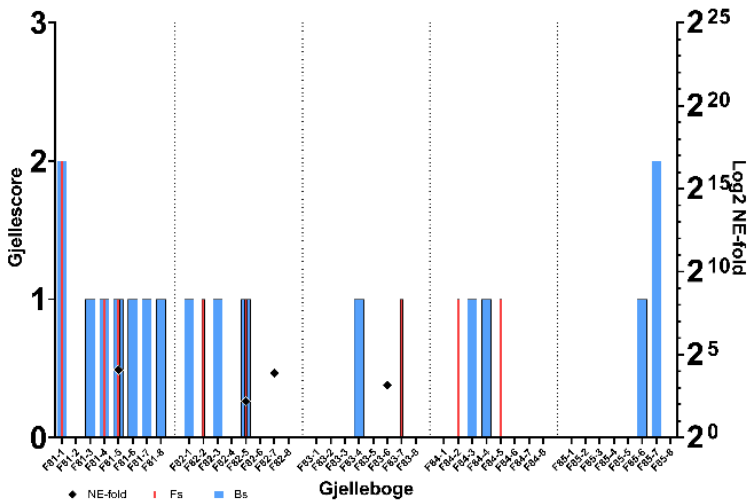
Kar 9



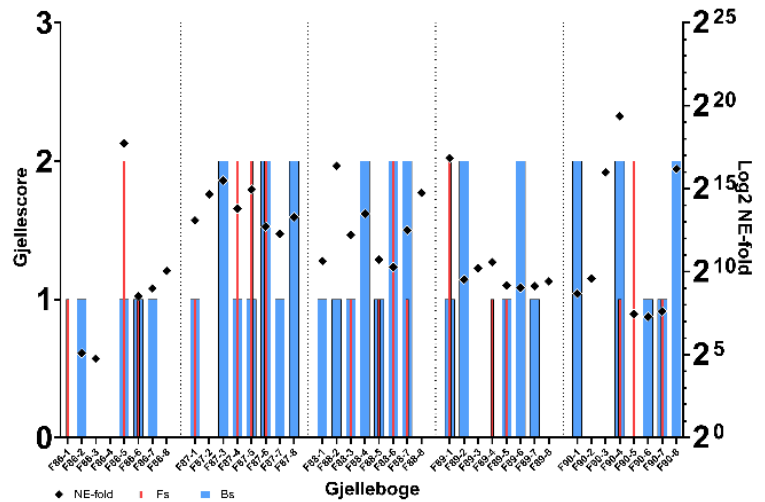
Kar 10



Kar 11



Kar 12



**Figur 3.19** Gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* for alle gjellebogane frå kvar enkelt fisk ved uttak 24 dpi, presentert kar for kar. Fiskane er nummerert frå 61-90 (F61-F90). Gjellebogane frå kvar fisk er nummerert frå 1-8, der 1-4 er frå venstre side (VS1-4) og 5-8 er frå høgre side (HS1-4) av fisken. Raude kolonnar er gjellescore på framsida (Fs) av den enkelte gjellebogen. Blå kolonnar er gjellescore på baksida (Bs) av den enkelte gjellebogen. Svarte punkt viser RNA-nivået av *P. perurans* for den enkelte gjelleboge, presentert som Log<sub>2</sub> NE-fold. N = 5 fisk per kar.

## 3.6 Histologi

### Del 2

#### Histopatologiske funn

Histologi vart nytta for å kartlegge patologiske endringar i gjellevev etter smitte med *P. perurans*, og før og etter behandling. Dei histologiske snitta var frå andre gjelleboge på venstre side (VS2) av fisken. Alle Ct-verdiar i figur 3.20-3.35 var frå andre gjelleboge på høgre side (HS2) av same fisken. Gjennom forsøket vart det observert ulike patologiske funn, som varierte i omfang.

Før smitte var gjellene normale og utan patologi (figur 3.20).

Etter smitte, men før behandling (uttak 15 dpi) kunne ein finne små områder med fokal epitelial hyperplasi og samanvaksne sekundærlamellar (figur 3.21, og 3.22). Det vart òg funne områder med epitelial hyperplasi med danning av lakuner (figur 3.23). Ein kunne observere vakuoliserande degenerasjon av hyperplastisk epitel (figur 3.24), og slimceller på sekundærlamellar (figur 3.25). Typiske «tidlege AGD-endringar» vart observert på fleire fisk ved uttak 15 dpi (figur 3.26 og 3.27) med store områder med segmental epitelial hyperplasi. I desse snitta vart det og påvist amøbar (figur 3.26 B og 3.27 B). Strukturar i amøben var godt synleg, sjå til dømes parasom i figur 3.26 B og 3.27 B.

Det var òg amøbar til stades i snitt frå prøvetaking 17 dpi (eitt snitt frå kar 8, og eitt snitt frå kar 12) og 23 dpi (eitt snitt frå kar 8, og eitt snitt frå kar 9).

I ubehandla grupper kunne ein framleis observere alt frå små områder med segmental epitelial hyperplasi ved både uttak 17 dpi (figur 3.28) og 23 dpi (figur 3.29), til svært affiserte gjeller med fleire filament med epitelial hyperplasi, samanvaksne sekundærlamellar, og slimceller ved 23 dpi (figur 3.30).

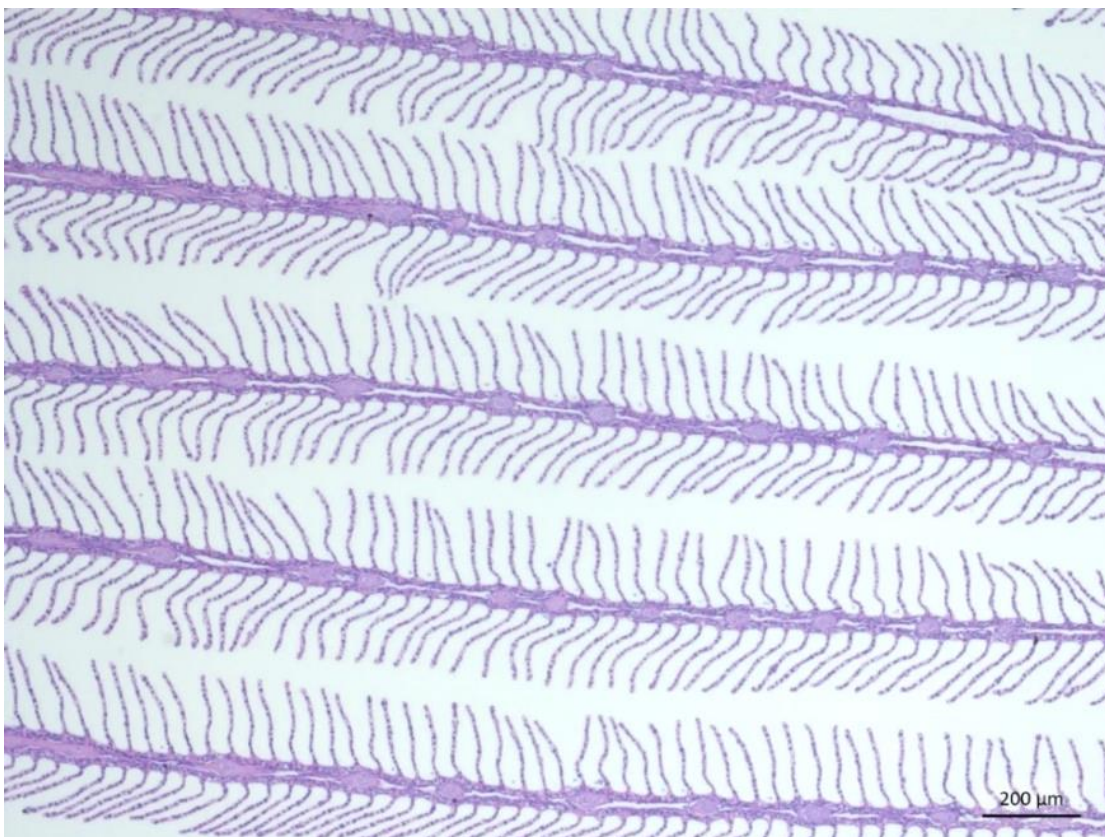
I behandla grupper kunne ein òg finne svært affiserte filament med segmental epitelial hyperplasi, samanvaksne sekundærlamellar og slimceller eitt døgn etter behandling (17 dpi)

(figur 3.31). Ved dette uttaket kunne ein òg finne lesjonar som viste redusert grad av hyperplasi (figur 3.32). Hypertrofiske slimceller vart òg observert (figur 3.33). Ved siste uttak 23 dpi, ei veke etter behandling, vart det framleis observert lesjonar med epitelial hyperplasi og slimceller på sekundærlamellar (figur 3.34 og 3.35).

Ein kunne observere histopatologiske funn utan at gjellebogen hadde gjellescore (figur 3.20 og 3.28).

Ved uttak før behandling (15 dpi) vart det registrert AGD-patologi i fleire histologiske snitt frå gjeller frå fleire individ i kar 11 og 12 (høvesvis 6 og 5 fisk, av totalt 10 fisk frå kvart kar), samanlikna med dei andre kara, der AGD-patologi kunne sjåast hjå 2-3 fisk av totalt 10 fisk i kar 7, 8 og 10. I kar 9 hadde ingen fisk AGD-patologi ved dette uttaket (15 dpi). Eitt døgn etter behandling, ved uttak 17 dpi, var det fleire fisk med AGD patologi i behandla grupper (totalt 9 av 30 fisk) enn i ubehandla grupper (totalt 5 av 30 snitt). Ei veke etter behandling (23 dpi) var det omvendt, då var det fleire fisk med AGD-patologi i ubehandla grupper (totalt 7 av 30 fisk) samanlikna med behandla grupper (totalt 4 av 30 snitt).

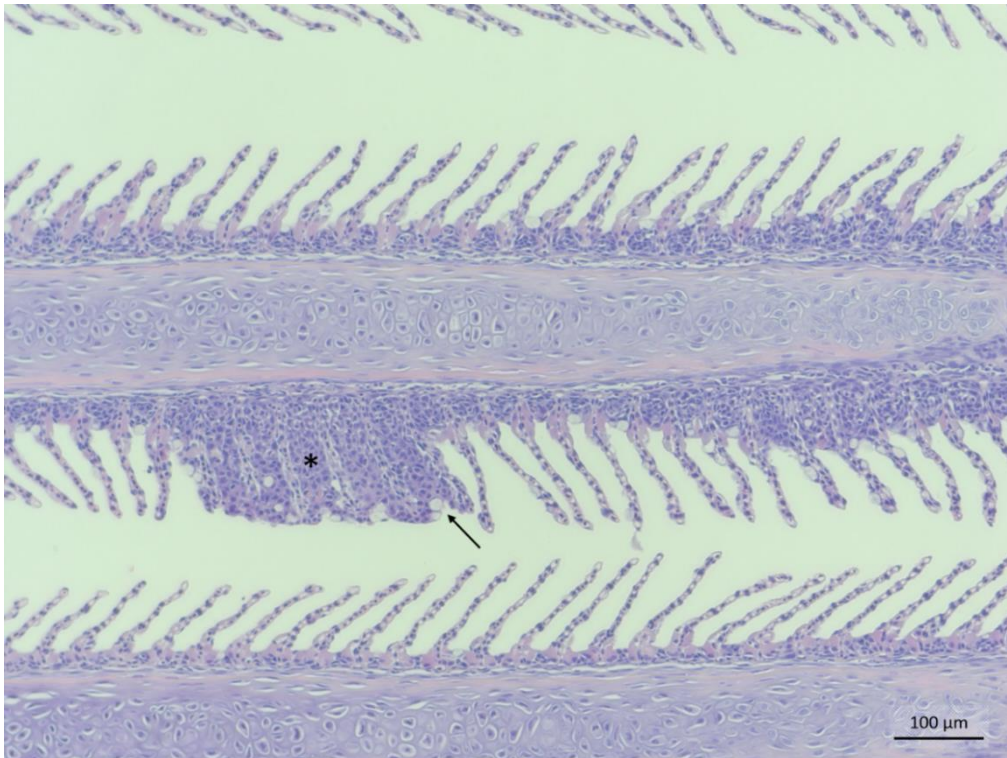
#### **Før smitte:**



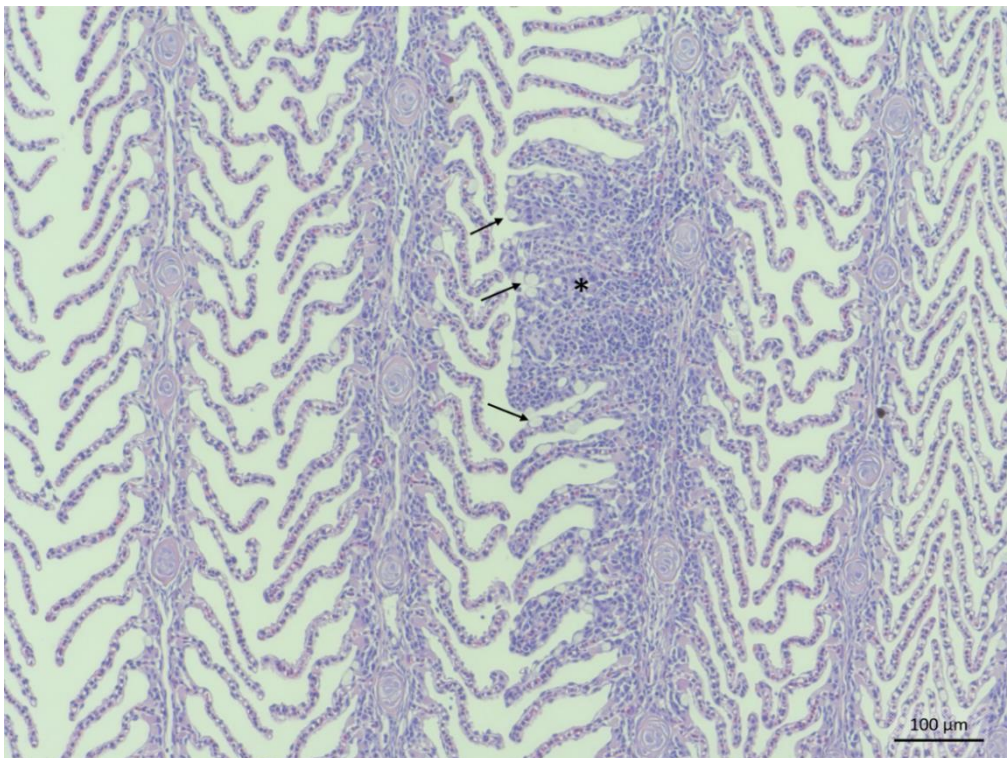
**Figur 3.20** Normale gjeller utan patologi. F53, kar 12, uttak -1 dpi. 2,5x forstørring. Gjellescore Fs/Bs: 0/0. Ct-verdi HS2: Neg.



**Etter smitte, før behandling:**

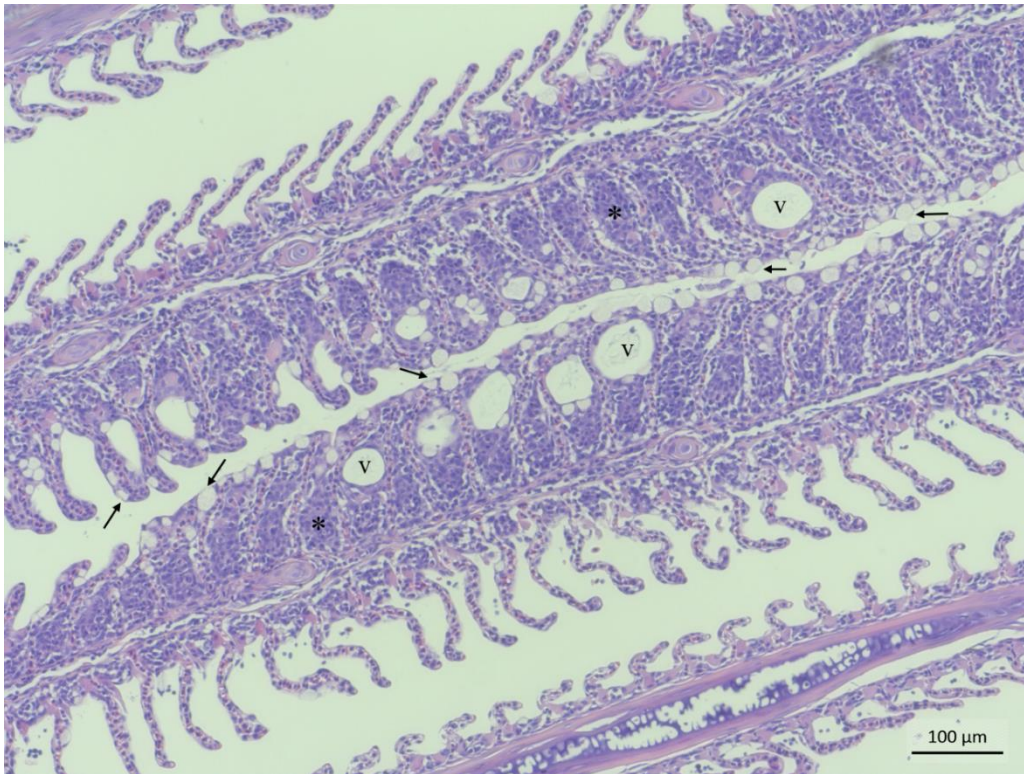


**Figur 3.21** Lite område med avgrensa (fokal) epitelial hyperplasi (\*) og samanvaksne sekundærlamellar. Slimceller kan sjåast ytst på lesjonen (svart pil). 5x forstørring. F102, kar 11, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/0. Ct-verdi HS2: 28,7.

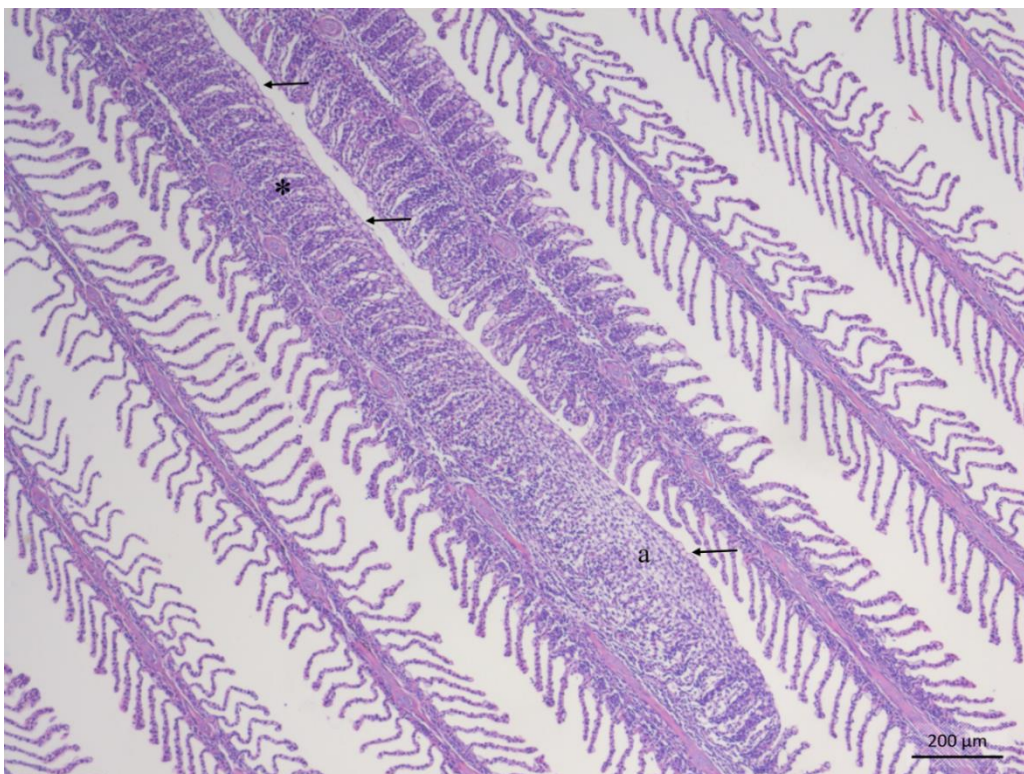


**Figur 3.22** Lite område med avgrensa epitelial hyperplasi (\*), nokre samanvaksne sekundærlamellar, og slimceller (nokre er indikert med svarte piler). 5x forstørring. F114, kar 12, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs:1/1. Ct-verdi HS2: 26,7.

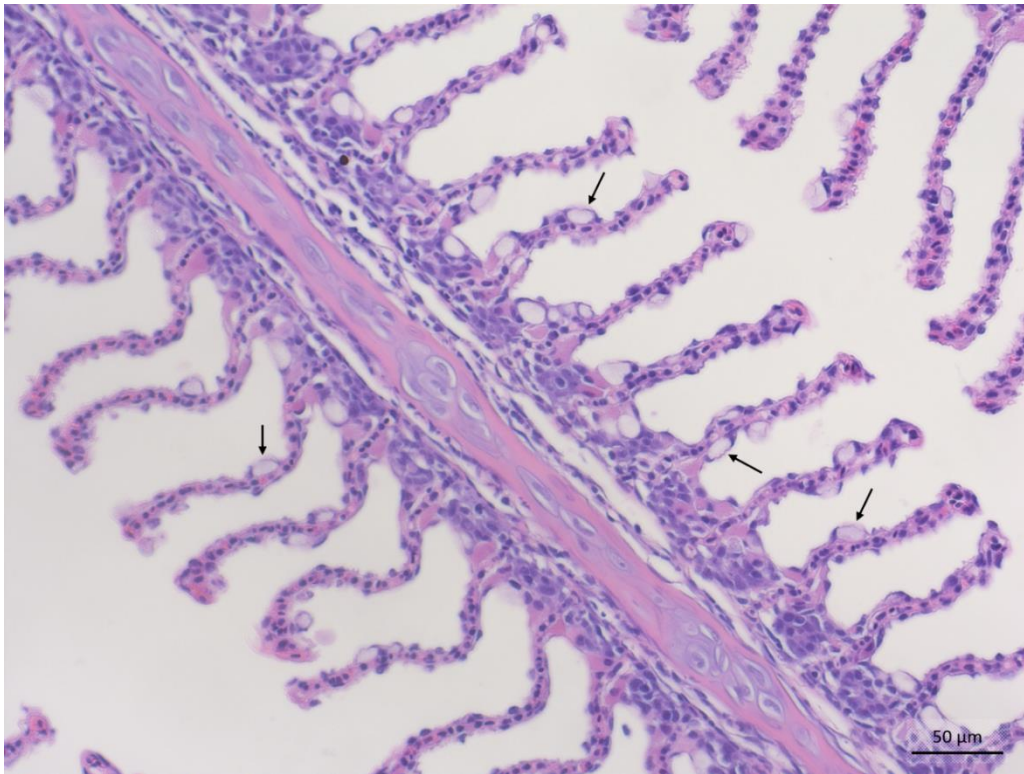




**Figur 3.23** Område med epitelial hyperplasi (\*), samnavksne sekundærlamellar med danning av lakuner (hølrø, nokre er indikert med v), og slimceller (nokre er indikert med svarte piler). 5x forstørring. F115, kar 12, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/2. Ct-verdi HS2: 22,5.

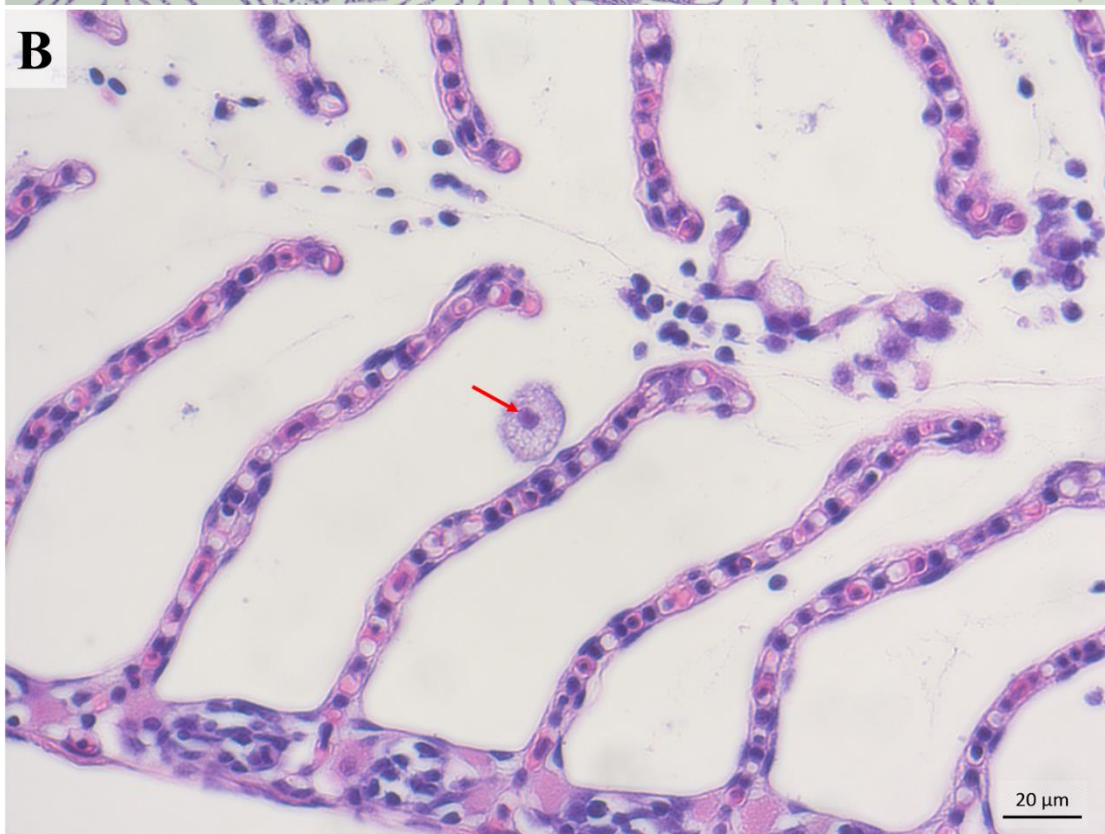
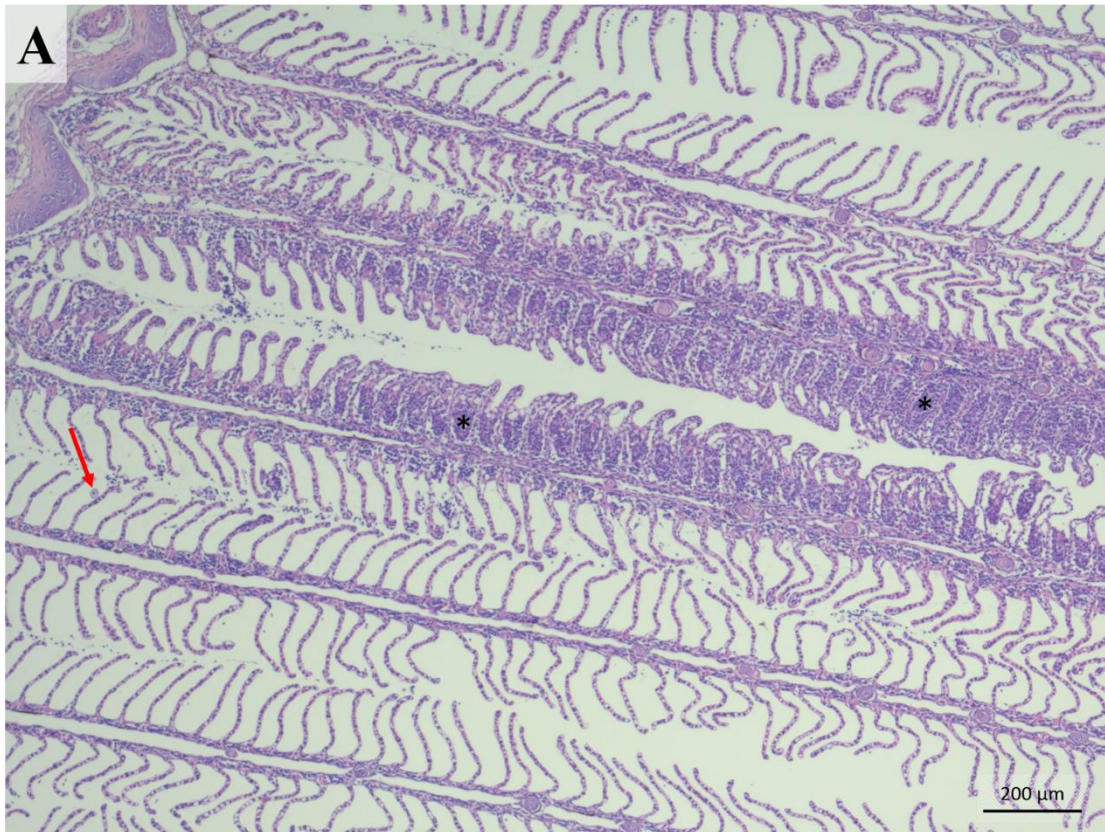


**Figur 3.24** To filament som er tydeleg affisert. Segmental, epitelial hyperplasi (\*), samnavksne sekundærlamellar og slimceller (nokre er indikert med svarte piler). I tillegg ser ein vakuoliserande degenerasjon av hyperplastisk epitel (a) som dekker apikale del av sekundærlamellar innlemma i hyperplasi. 2,5x forstørring. F69, kar 7, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 1/1. Ct-verdi HS2: 30,5.



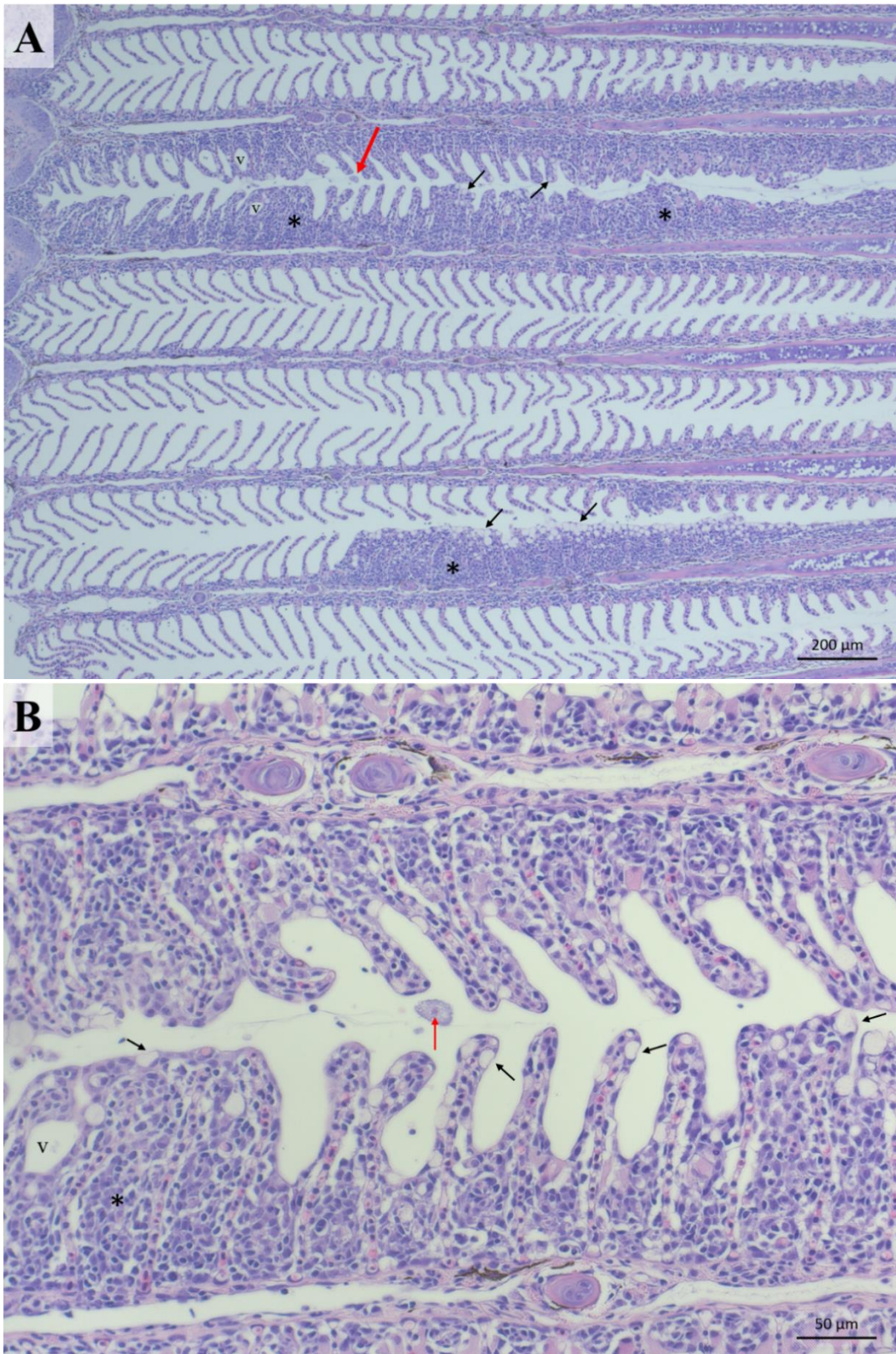
**Figur 3.25** Slimceller (nokre er indikert med svarte piler) på sekundærlamellar. 10x forstørring. F69, kar 7, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 1/1. Ct-verdi HS2: 30,5.





**Figur 3.26 A:** To filament som er tydeleg affiserte. Epitelial hyperplasi (\*) og samanvaksne sekundærlamellar. Amøbe indikert med raud pil. 2,5x forstørring. **B:** Amøbe. Parasom er indikert med raud pil. 20x forstørring. F92, kar 10, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 2/2. Ct-verdi HS2: 27,6.

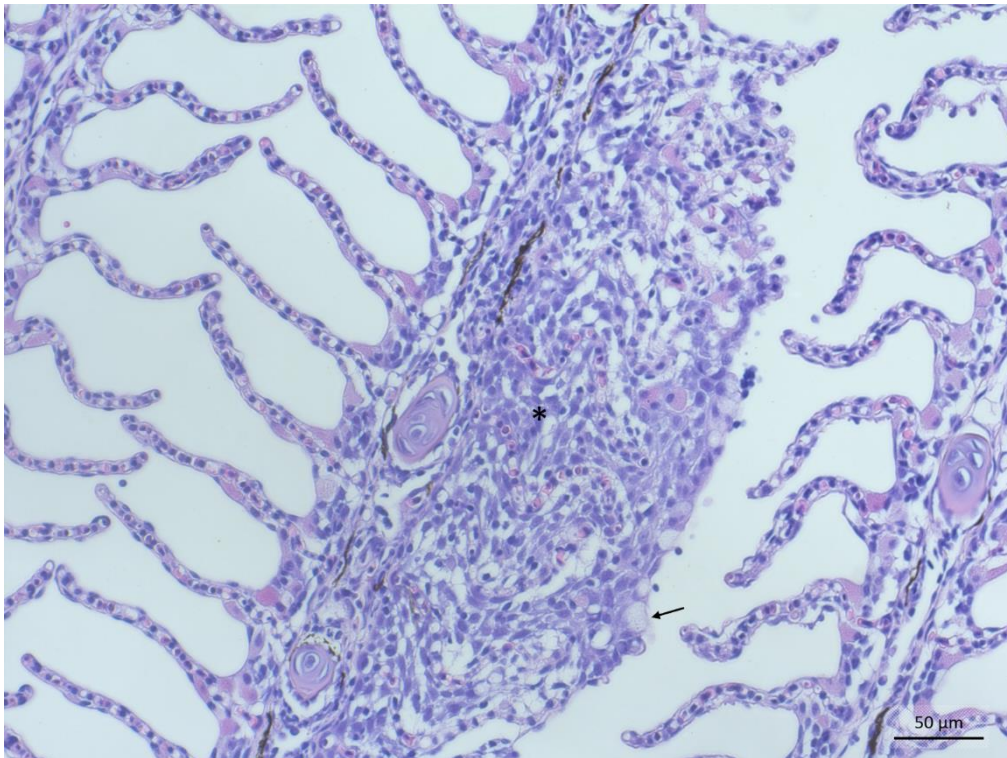




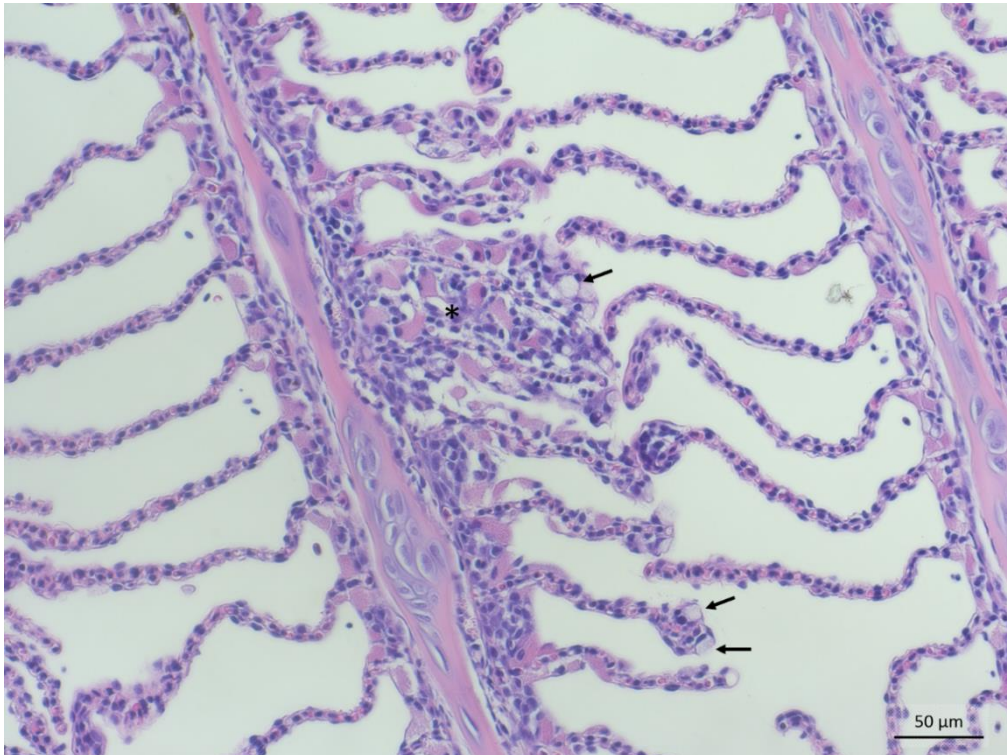
**Figur 3.27 A:** Større områder på fleire filament med epitelial hyperplasi (\*) og samanvaksne sekundærlamellar med danning av lakuner (v). Ein ser slimceller (svarte piler) langs lamellane og langs ytste del av lesjonane. Amøbe er indikert med raud pil. 2,5x forstørring. **B:** Amøbe (parasom indikert med raud pil) observert i område med affisert gjellevev. Epitelial hyperplasi (\*), og samanvaksne sekundærlamellar med danning av lakune (v). Slimceller kan sjåast langs lamellane, og ytst på lesjonen (svarte piler). 20x forstørring. F101, kar 11, 15 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/2. Ct-verdi HS2: 28,7.



**Etter behandling: Ubehandla grupper**

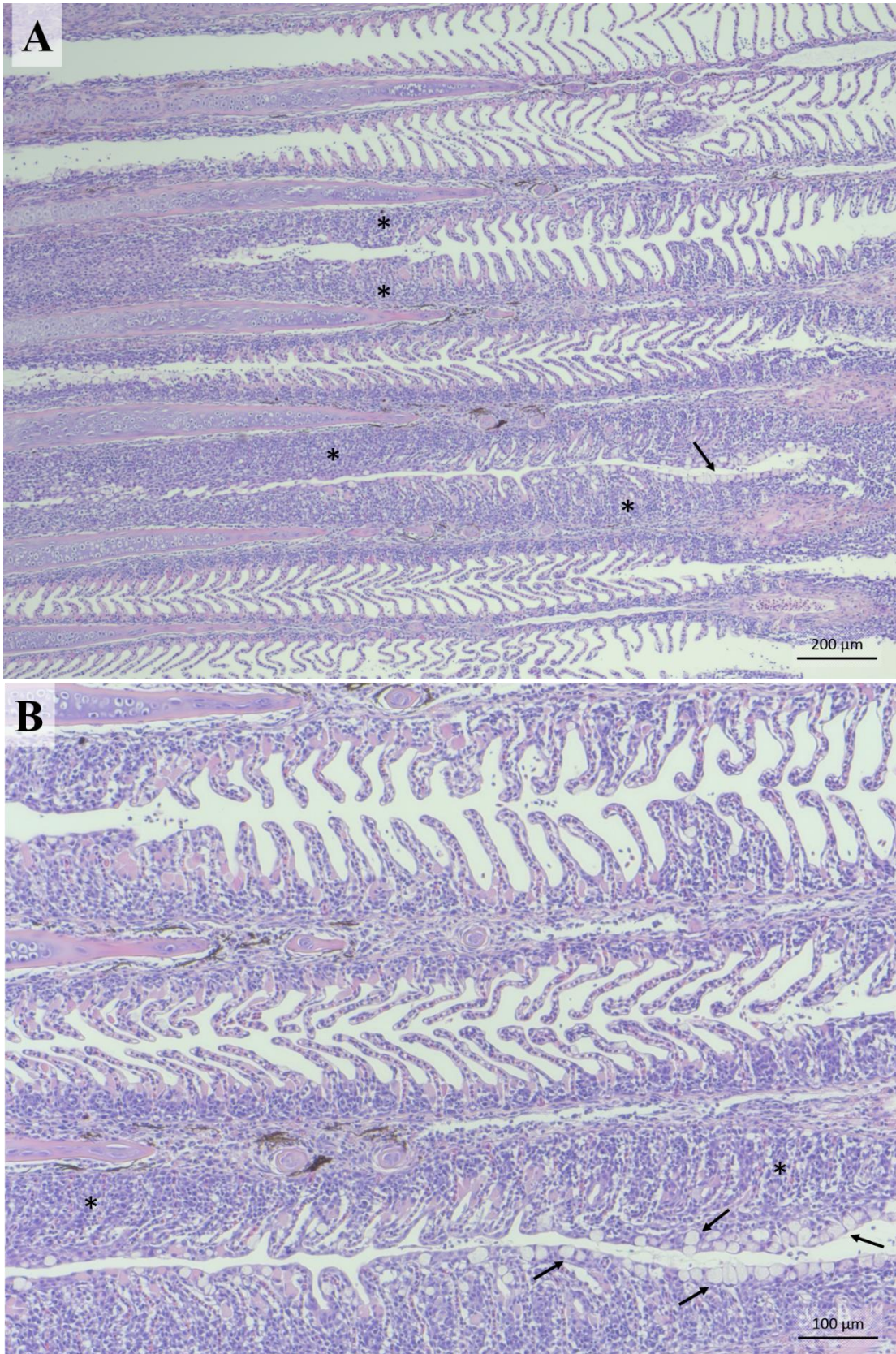


**Figur 3.28** Lite område med segmental epitelial hyperplasi (\*) observert på ein gjelleboge utan gjellescore. Slimcelle indikert med svart pil. 10x forstørring. F145, kar 9, 17 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/0. Ct-verdi HS2: 21,7.



**Figur 3.29** Veldig lite (fokalt) område med epitelial hyperplasi (\*), med slimceller ytst på nokre sekundærlamellar (svarte piler). 10x forstørring. F219, kar 10, 23 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/1. Ct-verdi HS2: 28,2.

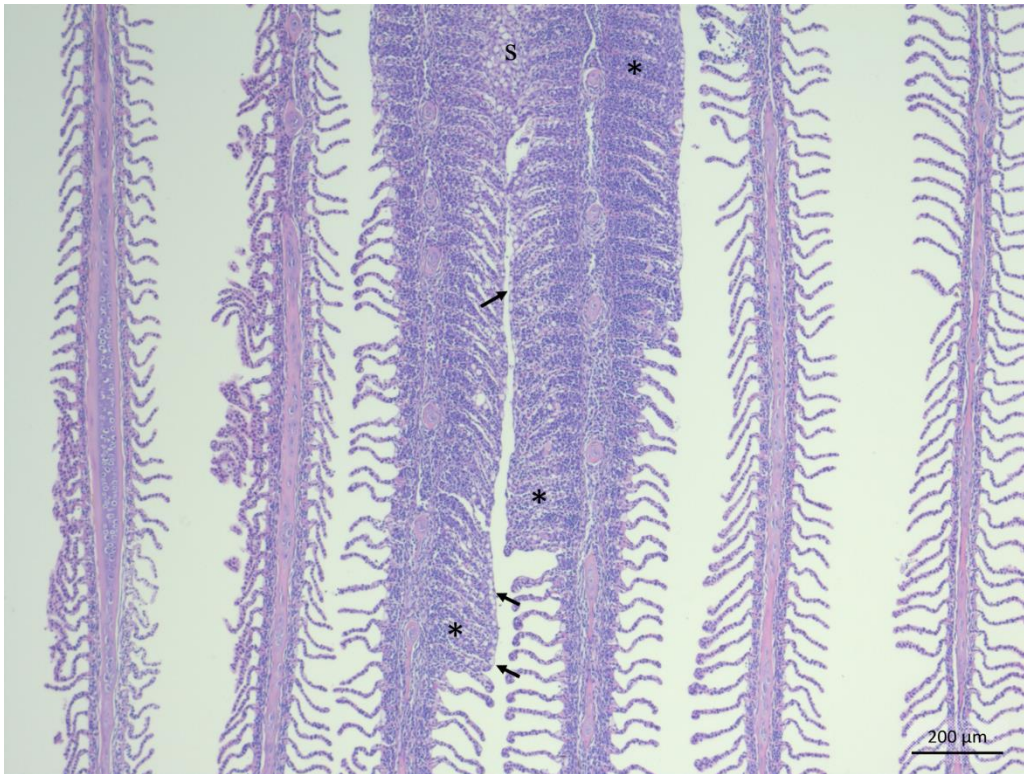




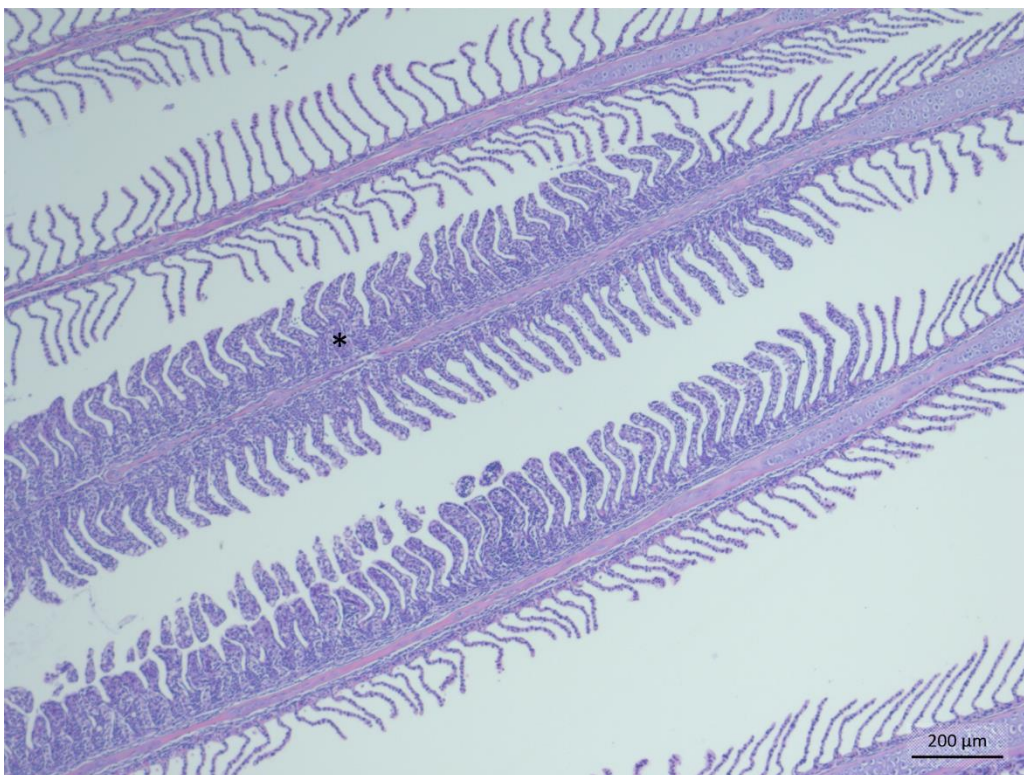
**Figur 3.30 A:** Stort område med fire affiserte filament. Epitelial hyperplasi (\*) med samanvaksne sekundærlamellar, og slimceller langs lesjon (svart pil). 2,5x forstørring. **B:** Affiserte filament med epitelial hyperplasi (\*), samanvaksne sekundærlamellar og slimceller langs ytste del av lesjon (svart piler). 5x forstørring. F201, kar 9, 23 dpi. Gjellescore Fs/Bs: 0/1. Ct-verdi HS2: 27,8.



**Etter behandling: Behandla grupper**

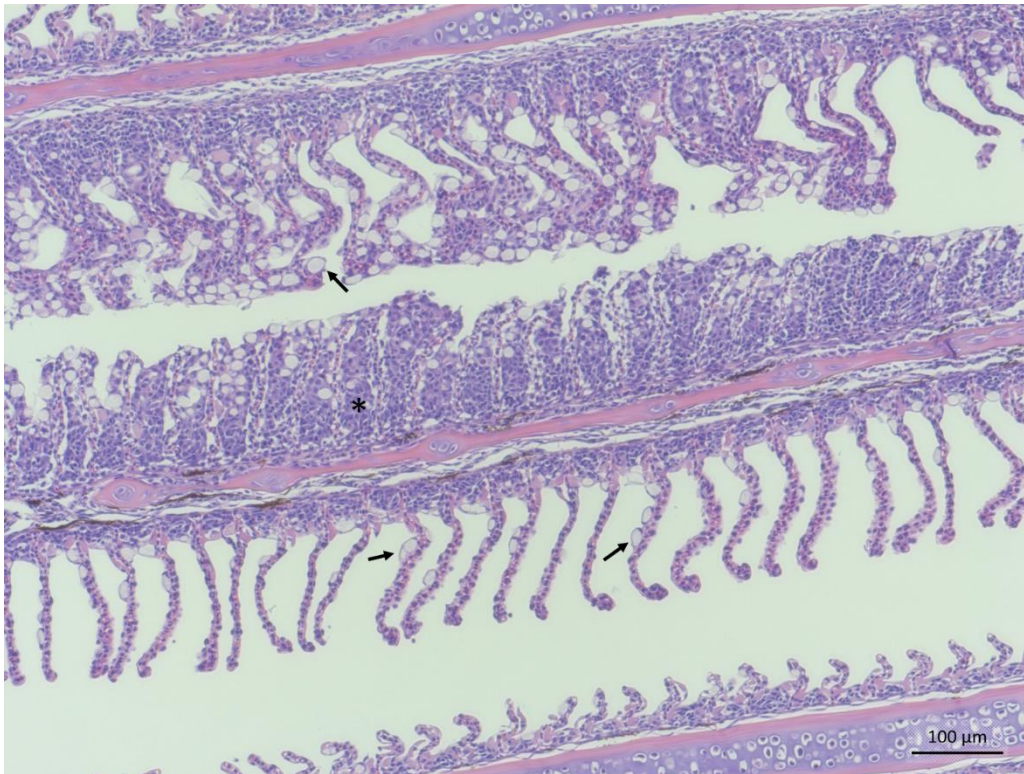


**Figur 3.31** To samnavksne (område indikert med S) filament som er tydeleg affisert. Segmental epitelial hyperplasi (\*), samnavksne sekundærlamellar og slimceller (svart pil). 2,5x forstørring. F126, kar 7, 17 dpi, 1 dpt. Gjellescore Fs/Bs: 0/1. Ct-verdi HS2: Neg.

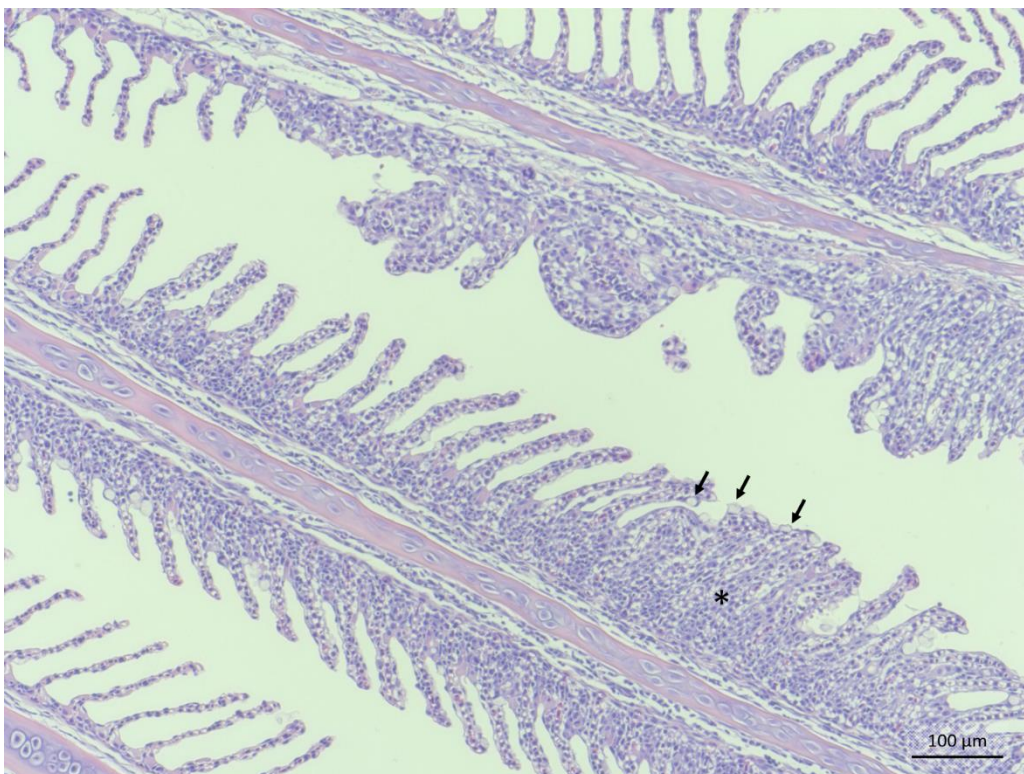


**Figur 3.32** To affiserte filament, men med noko redusert grad av epitelial hyperplasi (\*). 2,5x forstørring. F132, kar 8, 17 dpi, 1 dpt. Gjellescore Fs/Bs: 0/2. Ct-verdi HS2: Neg.

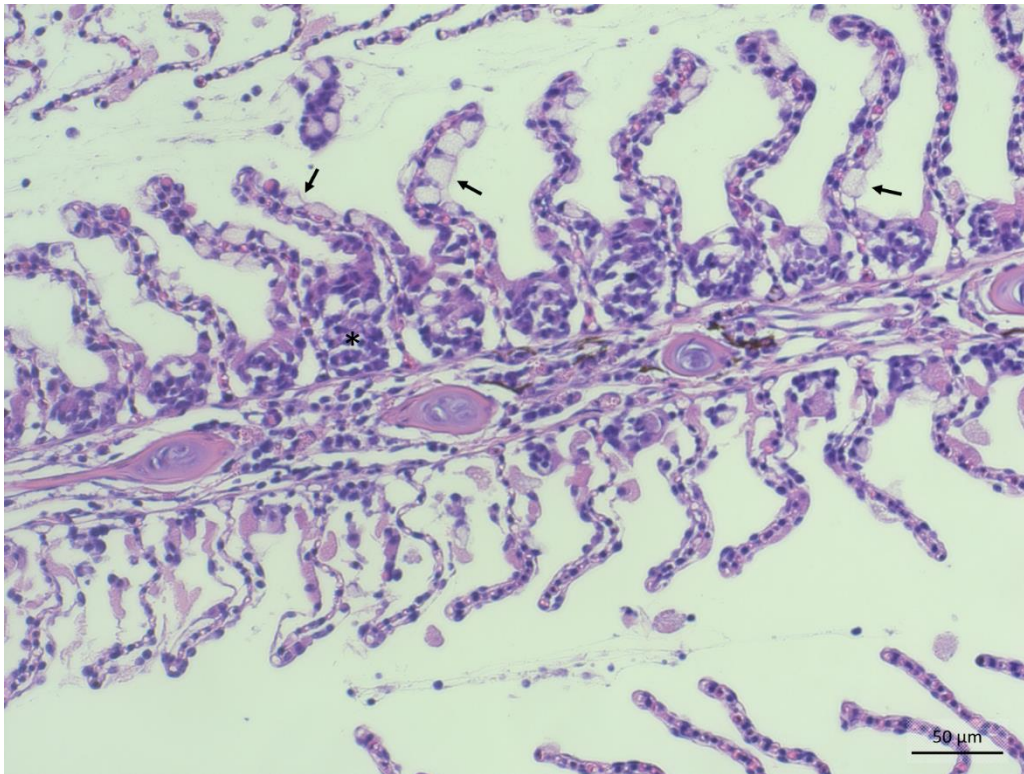




**Figur 3.33** Slimceller (hypertrofiske, nokre indikert med svarte piler) observert langs sekundærlamellar. Epitelial hyperplasi (\*) og samanvaksne sekundærlamellar 5x forstørring. F165, kar 11, 17 dpi, 1 dpt. Gjellescore Fs/Bs: 1/1. Ct-verdi HS2: Neg.



**Figur 3.34** Epitelial hyperplasi (\*), og litt slimceller (svarte piler) observert nedste filament. Endringar i øvste filament kan truleg vere arvev etter mekanisk skade. 5x forstørring. F197, kar 8, 23 dpi, 7 dpt. Gjellescore Fs/Bs: 2/0. Ct-verdi HS2: Neg.



**Figur 3.35** Slimceller langs lamellane (svarte piler). Hyperplasi av epitelceller (\*) meir basalt mot filamentet. 10x forstørring. F225, kar 11, 23 dpi, 7dpt. Gjellescore Fs/Bs: 1/0. Ct-verdi HS2: Neg.

## 4. Diskusjon

Ferskvassbehandling mot AGD vart først beskrive på 1980-talet i Tasmania (Munday *et al.*, 1990), og er framleis ein av dei mest effektive og brukte metodane for behandling (Oldham *et al.*, 2016). Effekten av behandlinga på sjukdomen har vore nøye studert og dokumentert ved fleire anledningar (Parsons *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003; Adams og Nowak, 2004a; Hytterød *et al.*, 2017). I felt vert behandlinga normalt gjennomført med ein varigheit på 2-3 timar (Parsons *et al.*, 2001), med ein effekt som er dokumentert å kunne fjerne inntil 86% av levande amøbar frå gjellene (Clark *et al.*, 2003). Sjølv om behandling av AGD er meint for å kontrollere utbrot slik at ein kan unngå at fisken vert alvorleg sjuk og døyr, kan det potensielt vere ei stor belastning for fisken med tanke på stress sidan den må handterast. Ein har lite kunnskap rundt korleis slikt produksjonsstress, som til dømes behandlingar, påverkar gjellehelsa hjå oppdrettslaks.

Dei siste åra har det vorte eit større fokus på gjellesjukdomar, deriblant AGD, og på den måten òg meir merksemd rundt gjellehelse og mikrobiota (Rodger *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2012; Egan og Gardiner, 2016; Rozas-Serri, 2019; Benedicenti *et al.*, 2019b). Per dags dato er det lite som har vorte rapportert om bakteriefloraen på gjeller, då mesterparten av studiane som er gjort på fisk og mikrobiota er frå mage/tarm (Merrifield og Rodiles, 2015; Nowak og Archibald, 2018). Likevel har fleire undersøkingar frå både ferskvass- og marin fisk demonstrert at gjellene kan vere kolonisert av eit breitt spekter av bakterieslekter (Merrifield og Rodiles, 2015), og det er rapportert om at bakteriemengda på gjeller til fisk kan overstige  $10^6$  CFU per gram gjellevev (Trust, 1975). Egan og Gardiner (2016) har foreslått at fleire infeksjose sjukdomar i det marine miljø kjem av mikrobiell dysbiose og ubalanse i mikrobiota, noko som viser at det er naudsynt med vidare studiar på tilhøvet mellom mikrobiota på laksegjeller og sjukdomar som til dømes AGD.

Amøbar har i fleire tilfelle vorte assosiert med bakteriar, då mange artar er bakterivore og må samdyrkast med bakteriar for å oppnå vellykka kulturar (Bovee *et al.*, 1979; Jellett og Scheibling, 1988). Tilhøvet mellom *Paramoeba* og bakteriar er ikkje enda fullt ut forstått, men ein ser at det er meir komplekst enn at bakteriane berre er ei næringskjelde (Nowak og Archibald, 2018). Sjølv om det er lite studert, så er der potensielt ein samanheng mellom gjellemikrobiota og/eller patogene bakteriar og alvorsgrad av AGD. I ein nyare studie gjort av Benedicenti *et al.* (2019b) vart nemleg mikrobiota føreslått som ein faktor som kan påverke vekst og virulens av *P. perurans* kulturar, sidan ein fann signifikante skilnadar i bakteriesamansetninga mellom ulike isolat som vart dyrka. Ein kan difor ikkje sjå bort i frå at



infeksjon med *P. perurans* kan verte assosiert med enten ko-infeksjon med patogene bakteriar eller med ubalanse i gjellemikrobiota (Egan og Gardiner, 2016; Nowak og Archibald, 2018).

Ved behandling av fisk, der ein får ei rask endring i vassmiljø, kan det tenkjast at det vil føre til endringar i til dømes mikrobiotaen på gjellene. Korleis dette igjen vil påverke gjellehlsa har ein liten kunnskap om. Prosjektet, som denne masteroppgåva er ein del av, skal ta for seg noko av denne problematikken som er knytt til produksjonsstress (m.a. mekanisk behandling mot lakselus, og ferskvassbehandling av AGD), gjellehelse og mikrobiota hjå laks. For å kunne kartlegge forskjellar i endringar mellom patogenfrie miljø og i felt, vert det mellom anna gjennomført smitteforsøk i kontrollerte omgjevnader der ein ser på kva effekt ulike behandlingar har på gjellehlsa (til dømes endring i gjellemikrobiota). Denne oppgåva tar for seg effekten av ferskvassbehandling på gjeller hjå laks smitta med *Paramoeba perurans*.

Dei tidlegaste smitteforsøka med *P. perurans* var gjerne basert på primærisoleringar av amøbar frå sjuk fisk, eller polykulturar der det kunne førekome andre organismar, men dei siste åra har det vorte gjennomført fleire forsøk der ein nyttar klonar (Crosbie *et al.*, 2012; Bridle *et al.*, 2015; Dahle, 2015; Røed, 2016; Wiik-Nielsen *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2017; Kindt, 2017; Benedicenti *et al.*, 2019a; Dahle *et al.*, 2020 i trykk). Fordelen med det er at ein no har kontroll på kva amøbeart ein smittar med i forsøk, og slik kan vere sikre på at eventuelle patologiske endringar er knytt til ein kjent klon av *P. perurans*. Likevel har ein ikkje kontroll på mikrobiotaen som er til stades i kulturane, og korleis det eventuelt spelar inn på virulensen til amøben treng ein meir kunnskap om (Benedicenti *et al.*, 2019b). Frå dei tidlege AGD-forsøka kunne ein altså ikkje vere sikker på at det var det rette agenset ein smitta med, og det er difor knytt større usikkerheit til resultatata frå desse forsøka (Findlay og Munday, 1998; Zilberg og Munday, 2000; Zilberg *et al.*, 2001; Adams og Nowak, 2004b; Gross *et al.*, 2004; Morrison, Crosbie og Nowak, 2004; Embar-Gopinath *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2005; Bridle *et al.*, 2006; Embar-Gopinath *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2006). Det gjeld òg resultatata frå studiar med ferskvassbehandlingar som vart gjort før ein fant ut at det var *P. perurans* som forårsaka AGD (Findlay og Munday, 1998; Parsons *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003; Adams og Nowak, 2004a)

I dette forsøket vart Atlantisk laks smitta med eit klonalt isolat av *Paramoeba perurans*, for så å verte behandla med ferskvatn. Effekt av ferskvassbehandling vart gjennom denne studien målt ved gjellescore, kvantifisering av amøbemengde i gjellevev målt ved real-time RT-PCR og histologi av gjeller.



Dette er første studie som fokuserer på forskjellar mellom *P. perurans* RNA-nivå i alle åtte gjellebogane hjå laks med AGD.

### **Mengde *P. perurans* RNA i dei ulike gjellebogane**

Ved å studere RNA-nivået av *P. perurans* i kvar enkelt gjelleboge, kan ein seie noko om kor eigna gjellebogen er for uttak til PCR-analysar. Ein viktig observasjon som vart gjort i dette studiet var at ved uttak før behandling (14 dpi) var det eit jamt RNA-nivå mellom alle dei ulike gjellebogane (figur 3.15), det vil seie at ved høg prevalens av *P. perurans* er meir eller mindre alle gjellebogane eigna for uttak av vevsprøver. Etter behandling derimot, var det meir varierende RNA-nivå og lågare prevalens i dei behandla gruppene. I slike tilfelle kan det difor vere stor sjans for å ikkje få positiv påvising ut frå kva gjelleboge ein vel, og sannsynet for at det skjer er større åtte dagar etter behandling samanlikna med fire dagar etter behandling. Difor bør ein gjerne ta prøver frå fleire gjellebogar ved uttak etter behandling, eller ta prøver frå mange fisk, for å kunne få eit meir korrekt bilde av korleis effekten av behandlinga har vore.

For å undersøke om retninga på vasstraumen i kara kan ha hatt innverknad på gjellescoreutvikling og amøbenivå, vart det undersøkt om det var skilnadar mellom venstre og høgre side av fisken. Ut frå resultata ser det ut til at fordelinga var jamn, då RNA-nivåa var tilnærma like på begge sidene ved høg prevalens (figur 3.15). Det har difor lite å seie kva side av fisken ein vel å ta ut prøve frå. Ved låg prevalens var situasjonen noko annleis, og ein kunne observere nokre små forskjellar mellom sidene etter behandling i dette forsøket. Venstre side av fisken hadde tendens til å ha lågare tal positive påvisingar enn høgre side ved låg prevalens, og ved siste uttak åtte dagar etter behandling hadde høgre side eit høgare RNA-nivå av *P. perurans* enn venstre side i behandla grupper (sjå figur 3.14 og 3.15). Ein såg best forskjellen i kar 11 ved 24 dpi (figur 3.14), der ingen av gjellebogane på venstre side hadde påvisingar av *P. perurans*, men nokre på høgre side var positive. Dette viser at det i smitteforsøk i kar (lukka system) er viktig å ta ut prøver frå fleire gjellebogar for å kunne påvise om fisken framleis er positiv for *P. perurans* etter behandling. Det er ikkje kjent om ei slik skeivfordeling òg vil kunne førekome i opne merdar.

Det vanlegaste ved prøveuttak av gjeller til PCR-analysar er nemleg å ta ut vev frå ein gjelleboge frå kvar fisk, nærmare bestemt ofte andre gjelleboge. Ein annan metode som vert brukt for uttak til PCR-analysar er svaberprøver («swabs») frå gjelleoverflata (Bridle *et al.*,

2010). Tanken bak det er at metoden skal vere mindre krevjande for operatøren då ein ikkje treng å avlive fisken for å ta ut gjellevev til kvantifisering av amøbemengda på gjellene, samt at det er meir skånsamt for fisken. Likevel kan det tenkjast at slik handtering (med svaber rett mot gjellevev) kan føre til mekaniske skader på gjellene.

I dette forsøket valde vi altså òg å ta ut vevsprøver frå alle åtte gjellebogane frå 90 fisk, og på den måten ha moglegheit til å kunne observere om det var forskjellar i RNA-nivå av *P. perurans* mellom gjellebogane.

Det ein kunne observere av forskjellar var at dei bakerste gjellebogane hadde ein tendens til å ha eit litt høgare RNA-nivå enn dei fremste ved høg prevalens av *P. perurans*. Det er tidlegare vist at vassgjennomstrøyminga er størst over gjelleboge 2 og 3, deretter over gjelleboge 1, og minst over gjelleboge 4 (Paling, 1968). Då det i dette forsøket var dei bakerste gjellebogane som skilde seg ut, kan det tenkjast at det er på grunn av at det er minst vassgjennomstrøyming over 4. gjelleboge, og at det då vil akkumulere smitte her sidan det kanskje ikkje vil forsvinne like mykje slim her som ved dei andre gjellebogane. Det er vist at fisk med AGD har auka slimproduksjon ved gjellene (Munday *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 2003), og ved større vassgjennomstrøyming vil det kanskje vere meir utskifting.

### **Samsvar mellom real-time RT-PCR analysar og gjellescore**

Ved å ta ut alle åtte gjellebogane frå så mange ulike fisk fekk ein moglegheita til å kunne sjå på samsvar mellom gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* per gjelleboge. Det viktigaste funnet frå dette var at ein ikkje kunne sjå ein tydeleg samanheng mellom desse to metodane på dei enkelte gjellebogane ved dei tre uttaka (14, 20 og 24 dpi). Ein kunne ha gjellescore utan at gjellebogen var positiv for *P. perurans*, og omvendt, både før og etter behandling. Det ein ikkje veit er om til dømes «patchen» var akkurat der vevsprøva vart tatt, og kva det eventuelt har av betydning for amøbenivået. I felt under utbrot av AGD har det òg blitt rapportert om at individ kan vere positive ved real-time RT-PCR analysar utan at det vart observert flekkar på gjellene (Downes *et al.*, 2015). Det har òg vorte observert i smitteforsøk med Atlantisk laks (Røed, 2016). Frå smitteforsøk med berggyllt har ein òg registrert liknande resultat, der fisken kan vere positiv for *P. perurans* på gjellene, men ikkje vise respons i form av gjellescore (Dahle *et al.*, 2020 i trykk).

Ved å berre sjå på verdiar frå andre gjelleboge på høgre side (HS2) kunne ein samanlikne resultat frå gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* mellom alle uttaka i forsøket (både del 1

og del 2). Metodane representerer to ulike måtar å måle grad av sjukdom på. Gjellescore er eit mål på verten sin respons (Taylor *et al.*, 2009b), medan real-time RT-PCR analysar påviser nærvær av arvestoff frå amøben (Downes *et al.*, 2015; Nylund *et al.*, 2018). Begge metodane vert ofte brukt i felt for å overvake sjukdomsutvikling.

I dette forsøket såg ein ikkje eit tydeleg mønster mellom desse to metodane frå resultatata frå andre gjelleboge på høgre side (HS2). Det ein kunne observere var at gjellescore og prevalens gjekk ned i behandla grupper etter 17 dpi. RNA-nivået kunne likevel vere høgt sjølv om prevalensen var låg i behandla grupper ved uttak åtte dagar etter behandling (figur 3.15). I dei ubehandla gruppene kunne ein derimot ikkje sjå ein slik samanheng. Ved siste uttak gjekk gjellescoren betydeleg opp, medan RNA-nivået gjekk ned i ubehandla grupper (figur 3.15).

Dette viser at det er naudsynt å nytte begge metodane for å få eit best mogleg inntrykk av sjukdomsutviklinga.

## **Effekt av ferskvassbehandling**

### **Gjellescore og frie flater**

Gjellescore er eit mål på verten sin respons på patogenet (Taylor *et al.*, 2009b), og kan difor variere mellom fiskegrupper avhengig av fiskestorleik, genetikk, immunstatus og andre faktorar. Det er òg ein meir subjektiv måte å evaluere sjukdomen på samanlikna med til dømes PCR-analysar, sidan det avheng av personen som scorar gjellene. I dette forsøket brukte ein same person til å score gjellene ved kvart av prøveuttaka, og det er difor knytt mindre usikkerheit til resultatata mellom dei ulike uttaka, enn om ein hadde brukt fleire ulike personar til gjellescoreing.

Ved å sjå på dei ubehandla og behandla gruppene samla såg ein at ferskvassbehandlinga hadde ein reduserande effekt på gjellescore i behandla grupper. Ved uttaket eitt døgn etter behandling var gjellescoren omtrent lik som før behandling, men i løpet av den resterande tida av forsøket vart gjennomsnittleg gjellescore tydeleg redusert. Dette samsvarar med funn frå fleire tidlegare studiar som har vist at ferskvassbehandling kan ha ein reduserande effekt på førekomsten av «patchar» på gjellene (Parsons *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003). Likevel kunne det framleis vere innslag av gjellebogar med score 2-3, sjølv om gjennomsnittscoren gjekk ned. Generelt tok det altså litt tid før effekten av behandlinga vart synleg makroskopisk.

Gjellescoren gjekk også ned i kar 10 mellom uttak 17 dpi og 23 dpi, sjølv om karet ikkje var behandla. Det kan vere mange grunnar til at ein ser ein slik reduksjon i ubehandla kar, og noko av det kan vere avhengig av fiskegruppe, fiskestorleik, vekt, og fisken si evne til å bekjempe infeksjonen.

Det vart ikkje observert forskjellar i fordeling av lesjonar mellom gjelleflatene, då ingen enkelte gjelleflater vart meir affisert enn andre (figur 3.11). Det har derimot i tidlegare forsøk vist seg at fordeling av lesjonar kan fordele seg ulikt mellom dei ulike gjellebogane (Adams og Nowak, 2001; Røed, 2016; Hytterød *et al.*, 2018), som kan kome frå ulik vassgjennomstrøyming over gjellene. Ut frå observasjonar frå 780 fisk der ein scora alle 16 gjelleflatene observerte Hytterød *et al.* (2018) at gjelleboge 2 og 3 hadde høgare gjellescore enn 1 og 4 (figur 6-10, side 13-16). Det vart difor spekulert rundt om dette kunne komme av at ein har større vassgjennomstrøyming mellom gjelleboge 2 og 3 enn ved dei andre gjellespaltene (som demonstrert av Paling (1968)), dersom mengda av *P. perurans* er ein bestemmende faktor for gjellescoreutvikling og mengde agens vert styrt av vassgjennomstrøyminga (Hytterød *et al.*, 2018). Det vart òg observert forskjell i fordeling av «patchar» på gjellebogane, der dei fleste lesjonane oppstod dorsalt og ventralt på gjelleflata, altså i områda på gjella som er orientert nærmast hovud og buk på fisken (Hytterød *et al.*, 2018). Lesjonane kunne oftast påvisast i desse områda gjennom sjukdomsforløpet. Dei observerte òg at lesjonar først oppstod inn mot brusken enn ytst på gjellebogen mot dei frie gjellefilamenta (Hytterød *et al.*, 2018).

Eit anna verdifullt mål på effekt av behandling mot AGD er tal på frie flater (FF) per fisk. Frie flater er gjelleflater heilt utan gjellescore (score 0), og maks tal frie flater per fisk er 16. Det vil seie at dess høgare snittet av frie flater er per fisk, dess mindre lesjonar har fisken på gjellene. I dette forsøket kunne ein sjå forskjell mellom dei ubehandla og behandla gruppene først fire dagar etter behandling, der snittet var høgare i behandla grupper samanlikna med ubehandla grupper. Det tok altså litt tid før effekten av behandlinga vart synleg makroskopisk som frie flater. Dette samsvarar med gjellescoren, som heller ikkje gjekk ned rett etter behandling. Sjølv om ein ikkje kan registrere forskjell i gjellescore og frie flater rett etter behandling, kan ein likevel sjå tydelege makroskopiske endringar som til dømes mindre slim på gjellene og lesjonane (L. Andersen, pers.kom.). Ved åtte dagar etter behandling var det ytterlegare fleire frie flater i behandla grupper, og desse funna bekreftar det ein har sett ved andre forsøk som òg har sjekka effekt av ferskvassbehandling mot AGD, nemleg at det vert fleire frie flater etter behandling (L. Andersen, pers. kom.).

Ein av fordelane med å heller vurdere frie flater, er at det er meir objektivt enn dei andre scorane ein nyttar (maks- og gjennomsnittsscore), og gjev eit betre bilde på kor «reine» gjelleflatene til fisken har vorte etter behandling. Metoden ein valde å bruke i dette forsøket («laboratoriescoringsmetoden») vart tatt i bruk for å få eit meir heilskapleg bilde på utvikling av gjellescore under smitteforsøk, då ein frå tidlegare AGD-forsøk såg at ein gjellescoreverdi basert på den mest affiserte gjellebogen ikkje gav eit godt mål på korleis gjellescoren frå dei 16 gjelleflatene faktisk hadde endra seg etter ei behandling (Hytterød *et al.*, 2017). Hytterød *et al.* (2018) observerte at gjellescore for enkeltfisk kunne variere med nesten to heile scoreverdiar avhengig av om ein oppgav den mest affiserte gjelleflata eller gjennomsnittsverdien av scoren på dei 16 gjelleflatene. Dette viser at det i forsøk er viktig med ein detaljert gjellescoring for å best mogleg kunne fange opp og dokumentere sjølv små endringar i gjellescore etter til dømes ei behandling.

Hjå fire fisk vart det observert «patch»-liknande områder på gjellene ved uttaket før smitte (-1 dpi). Tre av individa var frå kar 11, medan det siste individet var frå kar 12. I kar 11 vart det beskrive som «store «patch»-liknande områder på fleire gjellebogar». Det vart ikkje påvist patogen i gjelleprøvene ved dette uttaket (sjå avsnitt 3.1). Dersom andre patogen hadde vore til stades kunne det hatt innverknad på forsøket, sidan det er vist at gjelleendringar i form av kvite flekkar og auka slimproduksjon òg kan førekomme ved infeksjon med andre patogen enn *P. perurans* (Nylund *et al.*, 2011; Quaglio *et al.*, 2016). Gjellelesjonane frå første uttak i dette forsøket kan truleg ha vore mekanisk skade på gjellene. Eit studie gjort av Adams, Gross og Nowak (2009) føreslo at mekaniske skadar på gjeller ikkje førte til større moglegheit for amøben til å kolonisere gjelleepitelet hjå laks under eksperimentelt smitteforsøk med *P. perurans*. Så med tanke på observasjonane som vart gjort ved uttaket før smitte er det ikkje sikkert det ville spelt inn på smitten i desse kara dersom fleire fisk i karet hadde mekaniske skader på gjellene. Likevel vart det observert eit høgare «smittenivå» i desse kara basert på observasjonar frå gjellescore. Det er òg mogleg at mekanisk skade på gjellene kan ha vorte lest av som flekkar på gjellene, men sidan førekomsten av desse «patchane» var svært låg ved uttaket før smitte, har det truleg ikkje hatt store konsekvensar for gjellescoringa i resten av forsøket, ettersom det ikkje såg ut til å vere så utbreidd i fiskegruppene basert på førekomsten i uttaket før smitte.

I dette forsøket studerte ein berre fisken i åtte dagar etter behandling. Ein kan difor ikkje seie noko om kor lang tid det eventuelt ville gått før infeksjonen blussa opp igjen, og fisken til dømes byrja å utvikle høgare gjellescore igjen. I andre studiar der ein har observert fisken

over lenger tid har det vorte vist at gjellescoren kan auke igjen etter behandling både i felt og i smitteforsøk (Adams og Nowak, 2004a; Hytterød *et al.*, 2017). I smitteforsøka viste ein òg at det kan vere avhengig av temperatur, for ved 10 °C var gjellescoren framleis minkande i den behandla gruppa 21 dagar etter behandling, medan den var aukande i behandla grupper ved 16 °C ved same tid (Hytterød *et al.*, 2017).

### **Prevalens og RNA-nivå av *P. perurans***

Analysar frå real-time RT-PCR av gjellevev er ein meir objektiv måte å vurdere sjukdomen på enn gjellescoring, då det ikkje er i like stor grad avhengig av personen som utfører analysane. Likevel viser det berre om amøben er til stades eller ikkje ettersom metoden påviser arvestoff for amøben, og kan ikkje måle verten sin fysiske respons på infeksjonen. I dette forsøket nytta ein assayet «Pperu» for relativ kvantifisering av amøbar (*P. perurans*) i gjellevev (sjå tabell 2.4 og 2.5). Assayet er spesifikt mot amøben *P. perurans*.

I dette forsøket vart prevalensen av gjelleprøver positive for *P. perurans* tydeleg redusert allereie eitt døgn etter behandling i dei behandla gruppene. Dette er òg vist i tidlegare smitteforsøk som gjennomførte 3 timars ferskvassbehandling på fisk med både score 1, 2 og 3 (Hytterød *et al.*, 2017). Infeksjon med AGD fører til auka slimproduksjon på gjellene (Powell *et al.*, 2001), og ved behandling med ferskvatn vil mykje av det slimet, saman med amøbar i slimet, verte fjerna frå gjellene (Munday *et al.*, 2001; Adams og Nowak, 2004a). Det kan truleg vere difor ein ser ein så rask endring i prevalens etter behandling.

Nyare studiar frå felt observerte òg at ferskvassbehandling førte til reduksjon i prosentandelen PCR-positive fisk (Downes *et al.*, 2015), som samsvarar med funn frå eldre studiar der ein såg reduksjon av tal på amøbar etter behandling (Clark *et al.*, 2003). I studien frå Downes *et al.* (2015) var det berre 10% av fiskane som var positive for *P. perurans* fire dagar etter behandling. I dette forsøket varierte prevalensen i dei behandla kara 0-47,5% fire dagar etter behandling, men ein viktig forskjell er at ved dette uttaket tok ein ut alle åtte gjellebogane frå kvar fisk medan i studien frå Downes *et al.* (2015) tok ein berre prøver frå ein gjelleboge per fisk. Det kan forklare at ein ser ein så stor forskjell i prevalens. I tillegg var studien frå Downes *et al.* (2015) gjort på merdar i felt i Irland som gjer at vassmiljøet har vore forskjellig frå det ein hadde i kara i dette forsøket.

I del 1 av dette forsøket der ein såg på RNA-nivå frå ein gjelleboge per fisk vart det ikkje påvist amøbar på gjellene ved uttak ei veke etter behandling (23 dpi). Det vart det derimot ved uttaka i del 2 av forsøket der ein tok ut prøver frå alle åtte gjellebogane. Her gjekk plutsleg prevalensen tydeleg opp ved siste uttak (24 dpi) i kar 7, som var eit av dei behandla kara. RNA-nivået var likevel lågt i forhold til dei ubehandla gruppene (figur 3.13). Om ein ser på resultatata frå ei veke etter behandling kunne ein sagt at effekten av behandlinga var 100%, men ein dag seinare hadde ein amøbar til stades i behandla kar, noko som kan tyde på at infeksjonen blussar opp igjen.

Det er tidlegare vist at amøbar i nokre tilfelle kan opphalde seg inne i lakunene som vert danna i gjellevevet (Kent *et al.*, 1988; Adams og Nowak, 2001), og desse kan utgjere ein risiko for reinfeksjon om dei overlev behandling (Parsons *et al.*, 2001). Likevel viser ofte desse amøbane teikn til degenerasjon og nekrose, og kan vere døyande eller allereie daude (Adams og Nowak, 2001). Dette bør ein vere klar over dersom ein nyttar molekylære metodar, som til dømes real-time RT-PCR, til å vurdere effekt av behandling, sidan nærvær av daude amøbar og restar frå desse kan gje positive prøveresultat sjølv om dei ikkje er levedyktige (Dahle *et al.*, 2020 i trykk). Difor bør ein forsøke å re-isolere amøbar på agar etter behandling, for å undersøke overlevelse, som vart gjort i Dahle *et al.* (2020 i trykk).

Ein annan moglegheit der amøbane kan overleve behandling er viss ferskvatnet ikkje kjem til tilstrekkeleg i alt vev på gjellene, og at det kan avhenge av varigheit på behandlinga og korleis lesjonane er. I smitteforsøk er det vist at ein time med eksponering for ferskvatn ikkje hadde god nok effekt på amøbenivåa, men det var betre ved 2-3 timar (Hytterød *et al.*, 2017).

I studien frå Clark *et al.* (2003) var amøbenivåa tilbake til same mengd som det var før behandling 10 dagar etter ferskvassbehandling. I smitteforsøk med AGD er det vist at prevalens av *P. perurans* kan auke igjen etter behandling med ferskvatn, men det var avhengig av temperatur, varigheit på behandling og utgangsscore før behandling (Hytterød *et al.*, 2017). I dette forsøket studerte ein berre fisken i åtte dagar etter behandling. Ein kan difor ikkje seie noko om kor lang tid det eventuelt ville gått før mengde amøbar i gjellevevet hjå fisken (målt som prevalens og RNA-nivå av *P. perurans*) hadde auka igjen.

Ved uttaka i del 2 av dette forsøket vart prøvetakinga av gjellebogar utført av tre ulike personar (masterstudenten og to teknikarar). Sidan ein brukte fleire personar gav det moglegheit for individuelle skilnadar i korleis prøvetakinga vart utført, både med tanke på kor nøyaktig på gjellebogen prøven vart tatt, og kor stor bit av gjellevevet som vart tatt ut. Då

dette studiet skulle undersøke forskjellar mellom gjellebogane var det viktig at vevsprøvene vart tatt ut frå same område på gjellebogane (vist i figur 2.4 B) slik at samanlikningsgrunnlaget vart best mogleg. På grunn av mistydingar vart det ikkje gjort konsekvent for prøver frå høgre side av fisken ved første uttak 14 dpi, for halvparten av prøvene frå høgre side ved uttak 20 dpi, og for nokre få prøver frå høgre side ved siste uttak 24 dpi. Likevel vart det ikkje registrert betydeleg skilnad i Ct-verdi for EL1A mellom venstre og høgre side av fisken ved desse gjellebogane, prøvetaking har difor ikkje påverka referansegenet og det har truleg vore av liten betydning for resultatane.

For normalisering av analysane frå real-time RT-PCR av gjellevevsprøvene nytta ein assay «EL1A» (tabell 2.4 og 2.5), som har vist seg å vere godt eigna som referansegenet for Atlantisk laks i fleire vevstypar (Olsvik *et al.*, 2005). Generelt låg EL1A jamt ved ein Ct-verdi tilnærma lik ( $\approx$ ) 16 i gjellevevsprøvene gjennom forsøket, men med noko variasjon.

Det var òg viktig å ha steril teknikk der ein brente av utstyret mellom kvar enkelt gjelleboge ved prøvetaking. Dette vart ikkje gjort konsekvent for prøvene frå høgre side av fisken ved første uttak 14 dpi, og for halvparten av prøvene frå høgre side ved uttak fire dagar etter behandling 20 dpi. Truleg har det kanskje ikkje hatt så mykje å seie for resultatane i dette forsøket, då ein ser same mønster av RNA-nivå på både venstre og høgre side ved høg prevalens.

Ved låg prevalens førekom det variasjonar mellom sidene i RNA-nivå av *P. perurans*. Likevel, ved å sjå på Ct-verdiane for *P. perurans* der det vart registrert skilnadar mellom sidene (kar 11 ved 20 dpi, og kar 7 og 11 ved 24 dpi), såg ein at dei fleste av desse gjellebogane låg på ein Ct-verdi mellom 26,6-36,8 (unntak: ein gjelleboge med Ct-verdi 20,7). Det betyr at skilnaden ikkje nødvendigvis var så stor, då ein amøbe har vist å gje ein Ct-verdi på 27 (A. Nylund, pers. kom), og at desse funna ved låg prevalens var kanskje meir tilfeldige (det vil seie om den aktuelle gjellebogen var positiv for *P. perurans* eller ikkje ved prøvetaking).

## Histologi

Dei histopatologiske endringane som vart observert i dette forsøket var i samsvar med patologi som har vorte beskrive før for AGD (Adams og Nowak, 2004a; Adams *et al.*, 2004; Leef, Harris og Powell, 2005; Steinum *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009b; Crosbie *et al.*, 2012).



Eit funn som ein ofte kan observere for AGD-lesjonar er vakuoliserande degenerasjon av hyperplastisk epitel, som òg vart observert på histologiske snitt i dette forsøket.

Det vart ikkje observert tydelege kvalitative skilnadar mellom AGD-lesjonar observert i histologiske snitt i ubehandla og behandla grupper i dette forsøket. Sjølv om det vart observert histologiske snitt med redusert grad av hyperplasi på nokre snitt i behandla grupper, virka dette meir som tilfeldige funn heller enn at det var på grunn av behandling, då førekomsten var låg. Ein kunne heller ikkje sjå tydeleg skilnad mellom gruppene når det gjaldt tal på fisk som viste AGD-patologi. Ved uttak før behandling var det likevel samsvar mellom kva kar som hadde høgast smitteutvikling og flest snitt med AGD-patologi (kar 11 og 12), men ved uttaka etter behandling såg ein derimot ikkje noko mønster i dette, då tal på snitt med patologi generelt var lågt i alle gruppene.

Frå tidlegare litteratur har det vorte rapportert om at histologiske undersøkingar kan underestimere førekomsten av AGD, spesielt ved tilfelle der prevalensen er låg (Clark og Nowak, 1999; Adams *et al.*, 2004). Dette handlar nok òg mykje om kva gjelleboge som vert tatt ut til histologiske undersøkingar. Infeksjonen i dette forsøket var mild, og ut frå gjellescoreresultatata kunne ein sjå at det framleis var ein del frie flater i ubehandla kar ved siste uttak som kan forklare kvifor ein kunne observere fleire snitt frå ubehandla kar utan patologi. Det vart derimot òg observert histopatologiske funn på gjellebogar utan gjellescore, og dette er truleg òg på grunn av at infeksjonen var mild, slik at ein del lesjonar ikkje vart synleg makroskopisk som flekkar på gjellene. Ein studie av Adams *et al.* (2004) såg på samanhengen mellom gjellescore og histopatologi, og dei indikerte at lesjonar som påverka mindre enn ti sekundærlamellar ikkje kunne oppdagast ved klinisk undersøking. Det samsvarar med funna i dette forsøket. Sjølv om andre studiar har rapportert om at ein ikkje finn histologiske teikn på AGD ei veke etter behandling (Adams og Nowak, 2004a), vart det registrert AGD-patologi i snitt frå behandla kar i dette forsøket ved uttak ei veke etter behandling. Ut frå desse funna kan ein ikkje sjå at ferskvassbehandling av fisk med AGD har hatt effekt på mengda histopatologiske endringar som kunne observerast i dette forsøket.

Kva eigenskapar hjå amøben *P. perurans* som faktisk fører til at det vert skader i gjellevevet er ikkje kjent enda, men hjå andre frittlevande amøbar som til dømes *Acanthamoeba* sp. er det påvist utskiljing av proteasar (Kong, Kim og Chung, 2000). Det er òg vist hjå humanpatogene amøbar, der proteasar frå *Entamoeba histolytica* bryt ned protein og fremjar endringar i vev ved interaksjonar mellom vert og patogen (Serrano-Luna *et al.*, 2013). Slik vert det òg ein viktig virulensfaktor (Serrano-Luna *et al.*, 2013). Bridle *et al.* (2015) observerte endringar i

cellekulturar (CHSE-214) som kunne vere cytopatiske effektar frå ekstracellulære produkt (ECP) frigjort av klona isolat av *P. perurans*, og føreslo at EPC kunne vere ein virulensfaktor assosiert med AGD. Det har òg vorte vist cytopatiske effektar frå EPC frå *Paramoeba* sp. i ei laksecellelinje (Butler og Nowak, 2004).

## Generelt om smitteforsøket

Målet var at fisken skulle utvikle gjellescore 2, før behandling med ferskvatn. Det er tidlegare vist at det er ein positiv korrelasjon mellom smittedose og utvikling av AGD (Zilberg *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2017). Standard prosedyre i smitteforsøk gjennomført hjå ILAB er å sette smittedosen til 1000 amøbar/L (L. Andersen, pers. kom), og det vart òg gjort i dette forsøket.

Gjennom forsøket vart det observert nokre skilnader i gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* mellom kara. Ved dei to uttaka før behandling (14 dpi og 15 dpi) såg ein tydeleg at både kar 11 og 12 hadde ein høgare gjennomsnittleg gjellescore enn dei andre kara. Ved uttak 14 dpi samsvarte det med RNA-nivå av *P. perurans* der kar 11 hadde høgast nivå, men ved uttak 15 dpi var det kar 10 som hadde høgast RNA-nivå. Kar 12 hadde nest høgt nivå ved dette uttaket. Desse resultata kan indikere at det var noko ujamn smitteutvikling mellom kara. Ved uttak 17 dpi var framleis gjellescoren høgst i desse kara, sjølv om kar 11 vart behandla med ferskvatn 16 dpi. Gjellescoren i kar 12 fortsette å vere høgst ved dei påfølgande uttaka, medan den vart redusert i kar 11. Desse forskjellane i smittenivå kan ha kome frå ulike kareffektar, som til dømes at det har vore noko ulik «flow» i kara, eller at det var individskilnader i fiskestorleik mellom gruppene.

Dette viser fordelene med at ein nyttar fleire replikat i forsøk, for då klarar ein å plukke opp slike forskjellar mellom utvikling av smitte i gruppene. I dette forsøket fekk ein då delt det opp slik at ein behandla eit av dei kara som hadde høgare smitteutvikling, i tillegg til to kar med lågare smitteutvikling. Infeksjonen i dette forsøket var mild, så er det ein moglegheit at infeksjonsdynamikken ville sett annleis ut ved meir alvorleg AGD og høgare gjellescore. Det er ikkje sikkert ein hadde sett like godt forskjellane mellom kara då.

Det var ikkje veldig store forskjellar på vekt mellom kara. Ved uttak 15 dpi hadde kar 11 likevel litt høgare gjennomsnittsvekt enn dei andre kara, men vekta i kar 12 låg under snittet. Tanken bak at vekt kan påverke smitteresultatet handlar om gjellearealet hjå fisken, og at auka

gjelleareal kan ha betydning for kor mange amøbar som vert produsert gjennom eit smitteforsøk, som føreslått av Dahle *et al.* (2020 i trykk). Gjellearealet vil nemleg auke saman med auke i kroppsvekt, men det er mogleg ein ser reduksjon i relativt gjelleareal ved auke i kroppsvekt (Hughes, 1984). Fisken i dette forsøket vart ikkje individvegne inn ved oppstart, så det var tilfeldig kva fisk som hamna i kvart kar. Ein hadde difor ikkje kontroll på korleis vekta fordelte seg i kara, men eit slikt innvegingssteg krev mykje handtering av fisken og er arbeidskrevjande.

Måten fisken vart smitta på i dette forsøket kan òg ha spelt ei rolle i smitteutviklinga i kara. Ein smitta fisken kar for kar, og ikkje saman i eit felles kar. Det kan ha vore forskjellar på mengd levande amøbar i flaskene med smittestoff, men det kan òg vere at ein ikkje har klart å løyse alle amøbane frå flaskeveggane før ein helte smittestoffet ned i kvart sitt respektive kar. Likevel er dette ein innprenta prosedyre hjå ILAB, og det er difor mindre sannsynleg at dette er grunnen til ujamn smitteutvikling.

## **Konklusjon:**

Ferskvassbehandling hadde effekt på AGD. Prevalens av *P. perurans*, RNA-nivå og gjellescore vart redusert etter behandling. Dette bekreftar resultat frå tidlegare forsøk som viser det same (Parsons *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2003; Downes *et al.*, 2015).

Frie flater, som i dette forsøket vart nytta for å vise effekt av ferskvassbehandling på gjellene, bør vurderast å verte nytta som ein velferdsindikator i samband med AGD, då det er enklare å vurdere samanlikna med gjellescore.

Histopatologiske funn i dette forsøket var foreinleg med tidlegare beskrive AGD-patologi. Ein såg ikkje at ferskvassbehandling av laks med AGD hadde ein klar effekt på mengda histopatologiske endringar som kunne observerast i dette forsøket.

Ein kunne ikkje sjå tydeleg samsvar mellom gjellescore og RNA-nivå av *P. perurans* på dei enkelte gjellebogane i dette forsøket. Det viser at det er naudsynt å nytte begge metodane for å få eit best mogleg inntrykk av sjukdomsutviklinga.

Dette er det første studiet som har undersøkt fordeling av *P. perurans* RNA-nivå mellom dei åtte gjellebogane hjå Atlantisk laks gjennom eksperimentelt smittforsøk med utvikling av AGD. Det betyr lite kva gjelleboge ein vel å ta ut prøver frå ved høg prevalens før behandling.

Etter behandling kan det vere lurt å ta ut prøver frå fleire gjellebogar, eller mange fisk, for å vere sikker på at ein får rett bilde av kva effekt behandlinga har hatt.

### **Framtidsperspektiv:**

Det vert viktig å sjå resultata frå denne oppgåva i samanheng med resultata frå analysane av gjellemikrobiota. Dette for å sjå om mikrobiota spelar inn på til dømes smitteutvikling, og om det endrar seg etter behandling. Kunnskap om samanheng mellom mikrobiota og gjellehelse kan vere til stor nytte for vurdering av behandling.

## Referanseliste

- Adams, M. B. og Nowak, B. F. (2001) Distribution and structure of lesions in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease, *Journal of Fish Diseases*, 24, s. 535-542.
- Adams, M. B. og Nowak, B. F. (2003) Amoebic gill disease: sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L., *J Fish Dis*, 26, s. 601-614.
- Adams, M. B., Ellard, K. og Nowak, B. F. (2004) Gross pathology and its relationship with histopathology of amoebic gill disease (AGD) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., *Journal of Fish Diseases*, 27(3), s. 151-161. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00526.x.
- Adams, M. B. og Nowak, B. F. (2004a) Sequential pathology after initial freshwater bath treatment for amoebic gill disease in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L., *J Fish Dis*, 27, s. 163-173.
- Adams, M. B. og Nowak, B. F. (2004b) 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(2), s. 105-113. doi: DOI 10.1111/j.1365-2761.2004.00522.x.
- Adams, M. B., Gross, K. A. og Nowak, B. F. (2009) Branchial mechanical injury does not accelerate the progression of experimentally induced amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon *Salmo salar* L., *Aquaculture*, 290(1-2), s. 28-36. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.007.
- Adams, M. B., Crosbie, P. B. og Nowak, B. F. (2012) Preliminary success using hydrogen peroxide to treat Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with experimentally induced amoebic gill disease (AGD), *J Fish Dis*, 35(11), s. 839-848. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01422.x.
- Al-Harbi, A. H. og Uddin, M. N. (2007) Seasonal Trends in Gill Bacterial Flora of Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, *Journal of Applied Aquaculture*, 19(1), s. 61-70. doi: 10.1300/J028v19n01\_06.
- Andersen, L., Hodneland, K. og Nylund, A. (2010) No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Virol J*, 7, s. 198. doi: 10.1186/1743-422X-7-198.
- Bancroft, J. D. og Gamble, M. (2008) *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- Benedicenti, O., Collins, C., Wang, T., McCarthy, U. og Secombes, C. J. (2015) Which Th pathway is involved during late stage amoebic gill disease?, *Fish Shellfish Immunol*, 46(2), s. 417-425. doi: 10.1016/j.fsi.2015.07.002.
- Benedicenti, O., Pottinger, T. G., Collins, C. og Secombes, C. J. (2019a) Effects of temperature on amoebic gill disease development: Does it play a role?, *J Fish Dis*. doi: 10.1111/jfd.13047.
- Benedicenti, O., Secombes, C. J. og Collins, C. (2019b) Effects of temperature on *Paramoeba perurans* growth in culture and the associated microbial community, *Parasitology*, 146(4), s. 533-542. doi: 10.1017/S0031182018001798.

- Bermingham, M. L. og Mulcahy, M. F. (2004) Environmental risk factors associated with amoebic gill disease in cultured salmon, *Salmo salar* L., smolts in Ireland, *J Fish Dis*, 27(10), s. 555-571. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00574.x.
- Bermingham, M. L. og Mulcahy, M. F. (2007) Neoparamoeba sp. and other protozoans on the gills of Atlantic salmon *Salmo salar* smolts in seawater, *Dis Aquat Organ*, 76(3), s. 231-240. doi: 10.3354/dao076231.
- Boison, S. A., Gjerde, B., Hillestad, B., Makvandi-Nejad, S. og Moghadam, H. K. (2019) Genomic and Transcriptomic Analysis of Amoebic Gill Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *Front Genet*, 10, s. 68. doi: 10.3389/fgene.2019.00068.
- Bornø, G. og Lie Linaker, M. (red.) (2015) *Fiskehelse rapporten 2014*. Harstad: Veterinærinstituttet. Tilgjengeleg frå: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2015/fiskehelse rapporten-2014> (Henta: 27.05.20).
- Bovee, E. C., Sawyer, T. K. og Service, U. S. N. M. F. (1979) *Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States. Protozoa; Sarcodina; Amoebae: Eugene C. Bovee and Thomas K. Sawyer*. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service.
- Bowman, J. P. og Nowak, B. (2004) Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease, *J Fish Dis*, 27, s. 483-492.
- Bridle, A. R., Morrison, R. N., Cupit Cunningham, P. M. og Nowak, B. F. (2006) Quantitation of immune response gene expression and cellular localisation of interleukin-1beta mRNA in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected by amoebic gill disease (AGD), *Vet Immunol Immunopathol*, 114(1-2), s. 121-134. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.08.002.
- Bridle, A. R., Crosbie, P. B. B., Cadoret, K. og Nowak, B. F. (2010) Rapid detection and quantification of *Neoparamoeba perurans* in the marine environment, *Aquaculture*, 309(1-4), s. 56-61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.018.
- Bridle, A. R., Davenport, D. L., Crosbie, P. B., Polinski, M. og Nowak, B. F. (2015) *Neoparamoeba perurans* loses virulence during clonal culture, *Int J Parasitol*, 45(9-10), s. 575-578. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.04.005.
- Bruno, D. W. og Raynard, R. S. (1994) Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon., *Aquaculture International*, 2, s. 10-18. doi: 10.1007/BF00118529.
- Bustos, P. A., Young, N. D., Rozas, M. A., Bohle, H. M., Ildefonso, R. S., Morrison, R. N. og Nowak, B. F. (2011) Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile, *Aquaculture*, 310(3-4), s. 281-288. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.001.
- Butler, R. og Nowak, B. F. (2004) In vitro interactions between *Neoparamoeba* sp. and Atlantic salmon epithelial cells, *Journal of Fish Diseases*, 27, s. 343-349.
- Cahill, M. M. (1990) Bacterial Flora of Fishes: A Review, *Microb Ecol*, 19, s. 21-41.

- Clark, A. og Nowak, B. F. (1999) Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania, *Journal of Fish Diseases*, 22, s. 433-443.
- Clark, G., Powell, M. og Nowak, B. (2003) Effects of commercial freshwater bathing on reinfection of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with Amoebic Gill Disease, *Aquaculture*, 219(1-4), s. 135-142. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00020-6.
- Collins, C., Hall, M., Bruno, D., Sokolowska, J., Duncan, L., Yucecel, R., McCarthy, U., Fordyce, M. J., Pert, C. C., McIntosh, R. og MacKay, Z. (2017) Generation of *Paramoeba perurans* clonal cultures using flow cytometry and confirmation of virulence, *J Fish Dis*, 40(3), s. 351-365. doi: 10.1111/jfd.12517.
- Collins, C., Hall, M., Fordyce, M. J. og White, P. (2019) Survival and Growth in vitro of *Paramoeba perurans* Populations Cultured Under Different Salinities and Temperatures, *Protist*, 170(2), s. 153-167. doi: 10.1016/j.protis.2018.11.003.
- Crosbie, P., Nowak, B. og Carson, J. (2003) Isolation of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 from marine and estuarine sediments in Tasmania, *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 23(5), s. 241-244.
- Crosbie, P. B., Bridle, A. R., Cadoret, K. og Nowak, B. F. (2012) In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in Atlantic salmon and fulfils Koch's postulates, *Int J Parasitol*, 42(5), s. 511-515. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.04.002.
- Crosbie, P. B. B., Bridle, A. R., Leef, M. J. og Nowak, B. F. (2010) Effects of different batches of *Neoparamoeba perurans* and fish stocking densities on the severity of amoebic gill disease in experimental infection of Atlantic salmon, *Salmo salar* L, *Aquaculture Research*, s. no-no. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02522.x.
- Dahle, O. M. V. (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, Universitetet i Bergen.
- Dahle, O. M. V., Blindheim, S. H., Nylund, A., Karlsbakk, E., Breck, O., Glosvik, H. og Andersen, L. (2020 i trykk) Atlantic salmon *Salmo salar* and ballan wrasse *Labrus bergylta* display different susceptibility to clonal strains of *Paramoeba perurans*, *Dis Aquat Organ*. doi: 10.3354/dao03483.
- Dahle, S. W., Bakke, I., Birkeland, M., Nordøy, K., Dalum, A. S. og Attramadal, K. J. K. (2020) Production of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in RAS with distinct water treatments: Effects on fish survival, growth, gill health and microbial communities in rearing water and biofilm, *Aquaculture*, 522. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735097.
- Douglas-Helders, G. M., Nowak, B., Zilberg, D. og Carson, J. (2000) Survival of *Paramoeba pemaquidensis* on Dead Salmon: Implications for Management of Cage Hygiene, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20(4), s. 167-169.

- Douglas-Helders, G. M., Weir, I. J., O'Brien, D. P., Carson, J. og Nowak, B. F. (2004) Effects of husbandry on prevalence of amoebic gill disease and performance of reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 241(1-4), s. 21-30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.07.026.
- Douglas-Helders, M., Saksida, S., Raverty, S. og Nowak, B. F. (2001) Temperature as a risk factor for outbreaks of Amoebic Gill Disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21(3), s. 114-116.
- Downes, J. K., Henshilwood, K., Collins, E. M., Ryan, A., O'Connor, I., Rodger, H. D., MacCarthy, E. og Ruane, N. M. (2015) A longitudinal study of amoebic gill disease on a marine Atlantic salmon farm utilising a real-time PCR assay for the detection of *Neoparamoeba perurans*, *Aquaculture Environment Interactions*, 7(3), s. 239-251. doi: 10.3354/aei00150.
- Draghi, A., Popov, L. V., Kahl, M. M., Stanton, J. B., Brown, C. C., Tsongalis, G. J., West, A. B. og Frasca, S., Jr. (2004) Characterization of "Candidatus piscichlamydia salmonis" (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), *J Clin Microbiol*, 42(11), s. 5286-5297. doi: 10.1128/JCM.42.11.5286-5297.2004.
- Dykova, I., Nowak, B. F., Crosbie, P. B., Fiala, I., Peckova, H., Adams, M. B., Machackova, B. og Dvorakova, H. (2005) *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains, *J Fish Dis*, 28(1), s. 49-64. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00600.x.
- Dyková, I., Fiala, I., Lom, J. og Lukeš, J. (2003) Perkinsiella amoebae-like endosymbionts of *Neoparamoeba* spp., relatives of the kinetoplastid *Ichthyobodo*, *European Journal of Protistology*, 39(1), s. 37-52. doi: 10.1078/0932-4739-00901.
- Dyková, I., Nowak, B., Pecková, H., Fiala, I., Crosbie, P. og Dvoráková, H. (2007) Phylogeny of *Neoparamoeba* strains isolated from marine fish and invertebrates as inferred from SSU rDNA sequences, *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(1), s. 57-65.
- Egan, S. og Gardiner, M. (2016) Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems, *Front Microbiol*, 7, s. 991. doi: 10.3389/fmicb.2016.00991.
- Embar-Gopinath, S., Butler, R. og Nowak, B. (2005) Influence of salmonid gill bacteria on development and severity of amoebic gill disease, *Dis Aquat Organ*, 67(1-2), s. 55-60. doi: 10.3354/dao067055.
- Embar-Gopinath, S., Crosbie, P. og Nowak, B. F. (2006) Concentration effects of *Winogradskyella* sp. on the incidence and severity of amoebic gill disease, *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(1), s. 43-47.
- Embar-Gopinath, S., Bowman, J., Carson, J., Crosbie, P. og Nowak, B. (2008) A culture-dependent 16S rRNA gene-based approach to identify gill bacteria associated with amoebic gill disease in Atlantic salmon, *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 28(1), s. 27.



- English, C. J., Tynl, T., Botwright, N. A., Barnes, A. C., Wynne, J. W., Lima, P. C. og Cook, M. T. (2019) A diversity of amoebae colonise the gills of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) with amoebic gill disease (AGD), *Eur J Protistol*, 67, s. 27-45. doi: 10.1016/j.ejop.2018.10.003.
- FAO (2019) *FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics 2017*. Roma.
- Feehan, C. J., Johnson-Mackinnon, J., Scheibling, R. E., Lauzon-Guay, J. S. og Simpson, A. G. (2013) Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada, *Dis Aquat Organ*, 103(3), s. 209-227. doi: 10.3354/dao02577.
- Findlay, V. L. og Munday, B. L. (1998) Further studies on acquired resistance to amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., *Journal of Fish Diseases*, 21(2), s. 121-125. doi: DOI 10.1046/j.1365-2761.1998.00086.x.
- Fridell, F., Devold, M. og Nylund, A. (2004) Phylogenetic position of a paramyxovirus from Atlantic salmon *Salmo salar*, *Dis Aquat Organ*, 59(1), s. 11-15. doi: 10.3354/dao059011.
- Fringuelli, E., Gordon, A. W., Rodger, H., Welsh, M. D. og Graham, D. A. (2012) Detection of *Neoparamoeba perurans* by duplex quantitative Taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded Atlantic salmonid gill tissues, *J Fish Dis*, 35(10), s. 711-724. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01395.x.
- Frisch, K., Smage, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Brevik, O. J., Klevan, A., Olsen, R. H., Sjaatil, S. T., Gauthier, D., Brudeseth, B. og Nylund, A. (2018) Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada, *J Fish Dis*. doi: 10.1111/jfd.12818.
- Gjessing, M. C., Thoen, E., Tengs, T., Skotheim, S. A. og Dale, O. B. (2017) Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon, *J Fish Dis*, 40(10), s. 1253-1265. doi: 10.1111/jfd.12608.
- Grave, K., Horsberg, T. E., Lunestad, B. T. og Litleskare, I. (2004) Consumption of drugs for sea lice infestations in Norwegian fish farms: methods for assessment of treatment patterns and treatment rate, *Dis Aquat Organ*, 60, s. 123-131.
- Gross, K. A., Morrison, R. N., Butler, R. og Nowak, B. F. (2004) Atlantic salmon, *Salmo salar* L., previously infected with *Neoparamoeba* sp. are not resistant to re-infection and have suppressed phagocyte function, *J Fish Dis*, 27, s. 47-56.
- Gunnarsson, G. S., Blindheim, S., Karlsbakk, E., Plarre, H., Imsland, A. K., Handeland, S., Sveier, H. og Nylund, A. (2017a) *Desmozoon lepeophtherii* (microsporidian) infections and pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 468, s. 141-148. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.09.035.
- Gunnarsson, G. S., Karlsbakk, E., Blindheim, S., Plarre, H., Imsland, A. K., Handeland, S., Sveier, H. og Nylund, A. (2017b) Temporal changes in infections with some pathogens associated with

- gill disease in farmed Atlantic salmon ( *Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 468, s. 126-134. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.011.
- Haugland, G. T., Olsen, A. B., Ronneseth, A. og Andersen, L. (2017) Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) develop amoebic gill disease (AGD) after experimental challenge with *Paramoeba perurans* and can transfer amoebae to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 478, s. 48-55. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.04.001.
- Helgesen, K. O., Horsberg, T. E. og Tarpai, A. (2020) *The surveillance programme for resistance in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2019*. Veterinærinstituttet.
- Herrero, A., Thompson, K. D., Ashby, A., Rodger, H. D. og Dagleish, M. P. (2018) Complex Gill Disease: an Emerging Syndrome in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *J Comp Pathol*, 163, s. 23-28. doi: 10.1016/j.jcpa.2018.07.004.
- Hjeltnes, B. (red.) (2014) *Fiskehelse rapporten 2013*. Oslo: Veterinærinstituttet. Tilgjengelig frå: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2014/fiskehelse rapporten-2013> (Henta: 27.05.2020).
- Hjeltnes, B., Bang-Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A. og Walde, C. S. (red.) (2018) *Fiskehelse rapporten 2017*: Veterinærinstituttet.
- Hughes, G. M. (1984) Measurement of gill area in fishes: practices and problems, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 64, s. 637-655.
- Hvas, M., Karlsbakk, E., Mæhle, S., Wright, D. W. og Oppedal, F. (2017) The gill parasite *Paramoeba perurans* compromises aerobic scope, swimming capacity and ion balance in Atlantic salmon, *Conserv Physiol*, 5(1), s. cox066. doi: 10.1093/conphys/cox066.
- Hytterød, S., Andersen, L., Hansen, H., Blindheim, S. H., Poppe, T. T., Kristoffersen, A. B. og Mo, T. A. (2017) *AGD-behandlingsstrategier Dose-respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann*. (Veterinærinstituttets rapportserie 10). Oslo.
- Hytterød, S., Kristoffersen, A. B., Darrud, M., Kolstø, S., Mo, T. A., Blindheim, S. H., Eide, S. H. og Andersen, L. (2018) *Standardisering av AGD-gjellescore - Enhetlig gjellescore basert på data fra eksperimentelle forsøk og oppdrettsanlegg for laks*.
- Isaksen, T. E., Karlsbakk, E., Watanabe, K. og Nylund, A. (2011) *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Parasitology*, 138(9), s. 1164-1175. doi: 10.1017/S0031182011000916.
- Isaksen, T. E., Karlsbakk, E., Repstad, O. og Nylund, A. (2012) Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites, *Parasitol Int*, 61(4), s. 675-683. doi: 10.1016/j.parint.2012.07.006.
- Jellett, J. F. og Scheibling, R. E. (1988) Virulence of *Paramoeba invadens* Jones (Amoebida, Paramoebidae) from Monoxenic and Polyxenic Culture 1, *The Journal of protozoology*, 35(3), s. 422-424.

- Jonsson, B. og Jonsson, N. (2009) A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow, *J Fish Biol*, 75(10), s. 2381-2447. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02380.x.
- Karlsbakk, E., Olsen, A. B., Einen, A. C. B., Mo, T. A., Fiksdal, I. U., Aase, H., Kalgraff, C., Skar, S. A. og Hansen, H. (2013) Amoebic gill disease due to *Paramoeba perurans* in ballan wrasse (*Labrus bergylta*), *Aquaculture*, 412, s. 41-44. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.007.
- Karlsen, M., Nylund, A., Watanabe, K., Helvik, J. V., Nylund, S. og Plarre, H. (2008) Characterization of 'Candidatus *Clavochlamydia salmonicola*': an intracellular bacterium infecting salmonid fish, *Environ Microbiol*, 10(1), s. 208-218. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01445.x.
- Kent, M. L., Sawyer, T. K. og Hedrick, R. P. (1988) *Paramoeba pemaquidensis* (Sarcomastigophora: Paramoebidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water, *Diseases of Aquatic Organisms*, 5, s. 163-169. doi: 10.3354/dao005163.
- Kindt, M. M. (2017) *Eksperimentell smitte med Paramoeba perurans og utvikling av amøbisk gjellesykdom hos Atlantisk laks (Salmo salar, L)*.
- Kong, H.-H., Kim, T.-H. og Chung, D.-I. (2000) Purification and characterization of a Secretory Serine Proteinase of *Acanthamoeba Healyi* isolated from Gae, *Journal of Parasitology*, 86(1), s. 12-17. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[0012:Pacoas]2.0.Co;2.
- Kube, P. D., Taylor, R. S. og Elliott, N. G. (2012) Genetic variation in parasite resistance of Atlantic salmon to amoebic gill disease over multiple infections, *Aquaculture*, 364, s. 165-172. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.08.026.
- Kudryavtsev, A., Pawlowski, J. og Hausmann, K. (2011) Description of *Paramoeba atlantica* n. sp.(Amoebozoa, Dactylopodida)—a Marine Amoeba from the Eastern Atlantic, with Emendation of the Dactylopodid Families, *Acta Protozoologica*, 50, s. 239-253.
- Kvellestad, A., Dannevig, B. H. og Falk, K. (2003) Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *J Gen Virol*, 84(Pt 8), s. 2179-2189. doi: 10.1099/vir.0.18962-0.
- Kvellestad, A., Falk, K., Nygaard, S. M., Flesja, K. og Holm, J. A. (2005) Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in seawater-reared *Salmo salar*, *Dis Aquat Organ*, 67(1-2), s. 47-54. doi: 10.3354/dao067047.
- Leef, M. J., Harris, J. O. og Powell, M. D. (2005) Respiratory pathogenesis of amoebic gill disease (AGD) in experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*, *Dis Aquat Organ*, 66(3), s. 205-213. doi: 10.3354/dao066205.
- Leef, M. J., Hill, J. V., Harris, J. O. og Powell, M. D. (2007) Increased systemic vascular resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease, *Journal of Fish Diseases*, 30(10), s. 601-613. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00840.x.

- Lillehammer, M., Boison, S. A., Norris, A., Lovoll, M., Bakke, H. og Gjerde, B. (2019) Genetic parameters of resistance to amoebic gill disease in two Norwegian Atlantic salmon populations, *Aquaculture*, 508, s. 83-89. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.04.072.
- Lima, P. C., Taylor, R. S. og Cook, M. (2017) Pseudocyst formation in the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*: a short-term survival strategy to abrupt salinity variation, *J Fish Dis*, 40(8), s. 1109-1113. doi: 10.1111/jfd.12588.
- Lovy, J., Becker, J. A., Speare, D. J., Wadowska, D. W., Wright, G. M. og Powell, M. D. (2007) Ultrastructural examination of the host cellular response in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with amoebic gill disease, *Vet Pathol*, 44(5), s. 663-671. doi: 10.1354/vp.44-5-663.
- Martinsen, K. H., Thorisdottir, A. og Lillehammer, M. (2018) Effect of hydrogen peroxide as treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in different temperatures, *Aquaculture Research*, 49(5), s. 1733-1739. doi: 10.1111/are.13627.
- Masouleh, A. S., Sharifpour, I. og Arani, A. S. (2006) The aerobic bacterial flora of hatchery reared Caspian Sea sturgeon fingerlings, *J. Appl. Ichthyol.*, 22, s. 261-264.
- Merrifield, D. L. og Rodiles, A. (2015) The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues *Mucosal Health in Aquaculture*. s. 273-295.
- Mitchell, S. O. og Rodger, H. D. (2011) A review of infectious gill disease in marine salmonid fish, *J Fish Dis*, 34(6), s. 411-432. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01251.x.
- Mitchell, S. O., Baxter, E. J., Holland, C. og Rodger, H. D. (2012) Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture International*, 20(5), s. 813-825. doi: 10.1007/s10499-012-9504-x.
- Mitchell, S. O., Steinum, T. M., Toenshoff, E. R., Kvellestad, A., Falk, K., Horn, M. og Colquhoun, D. J. (2013) 'Candidatus *Branchiomonas cysticola*' is a common agent of epitheliocysts in seawater-farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway and Ireland, *Dis Aquat Organ*, 103(1), s. 35-43. doi: 10.3354/dao02563.
- Mo, T. A., Hytterød, S., Olsen, A. B. og Hansen, H. (2015) *Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014*. (Veterinærinstituttets rapportserie 9). Oslo.
- Moltumyr, L. (2017) *Rensefiskers toleranse for ferskvanns- og hydrogenperoksidbehandlinger mot amøbisk gjellesykdom*. Masteroppgave i fiskehelse, Universitetet i Bergen.
- Morrison, R. N., Crosbie, P. og Nowak, B. (2004) The induction of laboratory-based amoebic gill disease revisited, *Journal of Fish Diseases*, 27, s. 445-449.
- Morrison, R. N., Crosbie, P. B., Cook, M. T., Adams, M. B. og Nowak, B. F. (2005) Cultured gill-derived *Neoparamoeba pemaquidensis* fails to elicit amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon *Salmo salar*, *Dis Aquat Organ*, 66(2), s. 135-144. doi: 10.3354/dao066135.
- Morrison, R. N., Young, N. D. og Nowak, B. F. (2012) Description of an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) type II interleukin-1 receptor cDNA and analysis of interleukin-1 receptor expression in

- amoebic gill disease-affected fish, *Fish Shellfish Immunol*, 32(6), s. 1185-1190. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.005.
- Munday, B. L., Foster, C. K., Roubal, F. R. og Lester, R. J. G. (1990) Paramoebic gill infection and associated pathology of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Salmo gairdneri* in Tasmania. Pathology in marine science. Proceedings of the Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture, held in Gloucester Point, Virginia, USA, October 2-6, 1988., s. 215-222.
- Munday, B. L., Zilberg, D. og Findlay, V. L. (2001) Gill disease of marine fish caused by infection with *Neoparamoeba pemaquidensis*, *Journal of Fish Diseases*, 24, s. 497-507.
- Nowak, B. F. (2007) Parasitic diseases in marine cage culture--an example of experimental evolution of parasites?, *Int J Parasitol*, 37(6), s. 581-588. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.01.003.
- Nowak, B. F., Bryan, J. og Jones, S. R. (2010) Do salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis*, have a role in the epidemiology of amoebic gill disease caused by *Neoparamoeba perurans*?, *J Fish Dis*, 33(8), s. 683-687. doi: 10.1111/j.1365-2761.2010.01158.x.
- Nowak, B. F. (2012) *Neoparamoeba perurans*, i Woo, P. T. K. og Burchmann, K. (red.) *Fish Parasites: Pathobiology and Protection* CAB International, s. 1-18.
- Nowak, B. F. og Archibald, J. M. (2018) Opportunistic but Lethal: The Mystery of Paramoebae, *Trends Parasitol*, 34(5), s. 404-419. doi: 10.1016/j.pt.2018.01.004.
- Nylund, A., Kvenseseth, A. M. og Isdal, E. (1998) A Morphological Study of the Epitheliocystis Agent in Farmed Atlantic Salmon, *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(1), s. 43-55. doi: 10.1577/1548-8667(1998)010<0043:Amsote>2.0.Co;2.
- Nylund, A., Karlsen, M., Watanabe, K., Karlsbakk, E., Nylund, S., Isaksen, T. E. og Arnesen, C. E. (2007) Gjennombrudd i kampen mot PGI (proliferativ gjellebetennelse), *Norsk fiskeoppdrett*, 32, s. 50-53.
- Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S., Karlsen, M., Saether, P. A., Arnesen, C. E. og Karlsbakk, E. (2008) Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway, *Arch Virol*, 153(7), s. 1299-1309. doi: 10.1007/s00705-008-0117-7.
- Nylund, A., Pistone, D., Trosse, C., Blindheim, S., Andersen, L. og Plarre, H. (2018) Genotyping of *Candidatus* *Syngnamydia salmonis* (chlamydiales; Simkaniaceae) co-cultured in *Paramoeba perurans* (amoebozoa; Paramoebidae), *Arch Microbiol*, 200(6), s. 859-867. doi: 10.1007/s00203-018-1488-0.
- Nylund, S., Nylund, A., Watanabe, K., Arnesen, C. E. og Karlsbakk, E. (2010) *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a Life Cycle in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*), *J Eukaryot Microbiol*, 57(2), s. 95-114. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00451.x.

- Nylund, S., Andersen, L., Saevareid, I., Plarre, H., Watanabe, K., Arnesen, C. E., Karlsbakk, E. og Nylund, A. (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*, *Dis Aquat Organ*, 94(1), s. 41-57. doi: 10.3354/dao02313.
- Nylund, S., Steigen, A., Karlsbakk, E., Plarre, H., Andersen, L., Karlsen, M., Watanabe, K. og Nylund, A. (2015) Characterization of 'Candidatus *Syngnamydia salmonis*' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Arch Microbiol*, 197(1), s. 17-25. doi: 10.1007/s00203-014-1038-3.
- Oldham, T., Rodger, H. og Nowak, B. F. (2016) Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) — An epidemiological review, *Aquaculture*, 457, s. 35-42. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.013.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E., Nilsen, T. O. og Hordvik, I. (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon, *BMC Mol Biol*, 6(1), s. 21. doi: 10.1186/1471-2199-6-21.
- Page, F. C. (1983) *Marine Gymnamoebae*. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology.
- Page, F. C. (1987) The Classification of 'Naked' Amoebae (Phylum Rhizopoda), *Archiv für Protistenkunde*, 133(3-4), s. 199-217. doi: 10.1016/s0003-9365(87)80053-2.
- Paling, J. E. (1968) A method of estimating the relative volumes of water flowing over the different gills of freshwater fish, *J. Exp. Biol.*, 48, s. 533-544.
- Parsons, H., Nowak, B., Fisk, D. og Powell, M. (2001) Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Aquaculture*, 195(3-4), s. 205-210. doi: Doi 10.1016/S0044-8486(00)00567-6.
- Pennacchi, Y., Leef, M. J., Crosbie, P. B., Nowak, B. F. og Bridle, A. R. (2014) Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L, *Fish Shellfish Immunol*, 36(2), s. 563-570. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.013.
- Powell, M. D., Fisk, D. og Nowak, B. F. (2000) Effects of graded hypoxia on Atlantic salmon infected with amoebic gill disease, *Journal of Fish Biology*, 57(4), s. 1047-1057. doi: 10.1111/j.1095-8649.2000.tb02210.x.
- Powell, M. D., Parsons, H. og Nowak, B. (2001) Physiological effects of freshwater bathing of Atlantic salmon as treatment for amoebic gill disease, *Aquaculture*, 199, s. 259-266.
- Powell, M. D., Reynolds, P. og Kristensen, T. (2015) Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: Considerations of water chemistry and fish welfare in Norway, *Aquaculture*, 448, s. 18-28. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.027.
- Quaglio, F., Perolo, A., Bronzatti, P., Gustinelli, A., Menconi, V., Cavazza, G., Caffara, M., Manfrin, A., Gallo, E. og Fioravanti, M. L. (2016) Nodular gill disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy, *J Fish Dis*, 39(9), s. 1139-1142. doi: 10.1111/jfd.12446.

- Roberts, S. D. og Powell, M. D. (2008) Freshwater bathing alters the mucous layer of marine Atlantic salmon *Salmo salar* L, *Journal of Fish Biology*, 72(7), s. 1864-1870. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01853.x.
- Rodger, H. (2007) Gill disorders: an emerging problem for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the marine environment?, *Fish Veterinary Journal*, 9, s. 38-48.
- Rodger, H. D., Murphy, K., Mitchell, S. O. og Henry, L. (2011) Gill disease in marine farmed Atlantic salmon at four farms in Ireland, *Vet Rec*, 168(25), s. 668. doi: 10.1136/vr.d3020.
- Rodger, H. D. (2014) Amoebic gill disease (AGD) in farmed salmon in Europe, *Fish Veterinary Journal*.
- Rogerson, A. og Laybourn-Parry, J. (1992) The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde Estuary., *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 34, s. 187-196.
- Rozas-Serri, M. (2019) Gill diseases in marine salmon aquaculture with an emphasis on amoebic gill disease, *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 14(032). doi: 10.1079/pavsnnr201914032.
- 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*, Universitetet i Bergen.
- Serrano-Luna, J., Pina-Vazquez, C., Reyes-Lopez, M., Ortiz-Estrada, G. og de la Garza, M. (2013) Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors, *J Trop Med*, 2013, s. 890603. doi: 10.1155/2013/890603.
- Simon, P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data, *Bioinformatics*, 19(11), s. 1439-1440. doi: 10.1093/bioinformatics/btg157.
- Smirnov, A. V., Chao, E., Nasonova, E. S. og Cavalier-Smith, T. (2011) A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa), *Protist*, 162(4), s. 545-570. doi: 10.1016/j.protis.2011.04.004.
- Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukas, A. og Brun, E. (red.) (2020) *Fiskehelse rapporten 2019*: Veterinærinstituttet. Tilgjengelig frå: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/fiskehelse rapporten-2019> (Henta: 17.04.2020).
- SSB (2020) *Akvakultur. Årlig, endelige tall*. Tilgjengelig frå: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett> (Henta: 14.04.2020).
- Steigen, A., Nylund, A., Karlsbakk, E., Akoll, P., Fiksdal, I. U., Nylund, S., Odong, R., Plarre, H., Semyalo, R., Skar, C. og Watanabe, K. (2013) 'Cand. *Actinochlamydia clariae*' gen. nov., sp. nov., a unique intracellular bacterium causing epitheliocystis in catfish (*Clarias gariepinus*) in Uganda, *PLoS One*, 8(6), s. e66840. doi: 10.1371/journal.pone.0066840.

- Steigen, A., Nylund, A., Plarre, H., Watanabe, K., Karlsbakk, E. og Brevik, O. (2018) Presence of selected pathogens on the gills of five wrasse species in western Norway, *Dis Aquat Organ*, 128(1), s. 21-35. doi: 10.3354/dao03198.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Rønneberg, L. B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., Nygård, S. M. R., Olsen, A. B. og Dale, O. B. (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences, *Journal of Fish Diseases*, 31, s. 205-214.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Colquhoun, D. J., Heum, M., Mohammad, S., Grontvedt, R. N. og Falk, K. (2010) Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation, *Dis Aquat Organ*, 91(3), s. 201-211. doi: 10.3354/dao02266.
- Sveen, S., Overland, H., Karlsbakk, E. og Nylund, A. (2012) Paranucleospora theridion (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn, *Dis Aquat Organ*, 101(1), s. 43-49. doi: 10.3354/dao02464.
- Tan, C. K. F., Nowak, B. F. og Hodson, S. L. (2002) Biofouling as a reservoir of *Neoparamoeba pemaquidensis* (Page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Aquaculture*, 210, s. 49-58.
- Tanifuji, G., Kim, E., Onodera, N. T., Gibeault, R., Dlutek, M., Cawthorn, R. J., Fiala, I., Lukes, J., Greenwood, S. J. og Archibald, J. M. (2011) Genomic characterization of *Neoparamoeba pemaquidensis* (Amoebozoa) and its kinetoplastid endosymbiont, *Eukaryot Cell*, 10(8), s. 1143-1146. doi: 10.1128/EC.05027-11.
- Tanifuji, G., Cenci, U., Moog, D., Dean, S., Nakayama, T., David, V., Fiala, I., Curtis, B. A., Sibbald, S. J., Onodera, N. T., Colp, M., Flegontov, P., Johnson-MacKinnon, J., McPhee, M., Inagaki, Y., Hashimoto, T., Kelly, S., Gull, K., Lukes, J. og Archibald, J. M. (2017) Genome sequencing reveals metabolic and cellular interdependence in an amoeba-kinetoplastid symbiosis, *Sci Rep*, 7(1), s. 11688. doi: 10.1038/s41598-017-11866-x.
- Taylor, R. S., Kube, P. D., Muller, W. J. og Elliott, N. G. (2009a) Genetic variation of gross gill pathology and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during natural amoebic gill disease challenge, *Aquaculture*, 294(3-4), s. 172-179. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.007.
- Taylor, R. S., Muller, W. J., Cook, M. T., Kube, P. D. og Elliott, N. G. (2009b) Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge, *Aquaculture*, 290(1-2), s. 1-8. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.01.030.
- Trust, T. J. (1975) Bacteria Associated with the Gills of Salmonid Fishes in Freshwater, *J Appl Bact*, 38, s. 225-233.
- Valdenegro-Vega, V. A., Cook, M., Crosbie, P., Bridle, A. R. og Nowak, B. F. (2015) Vaccination with recombinant protein (r22C03), a putative attachment factor of *Neoparamoeba perurans*, against AGD in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and implications of a co-infection with *Yersinia ruckeri*, *Fish Shellfish Immunol*, 44(2), s. 592-602. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.016.



- Vincent, B. N., Morrison, R. N. og Nowak, B. F. (2006) Amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., are resistant to subsequent AGD challenge, *J Fish Dis*, 29, s. 549-559.
- Wiik-Nielsen, J., Mo, T. A., Kolstad, H., Mohammad, S. N., Hytterod, S. og Powell, M. D. (2016) Morphological diversity of *Paramoeba perurans* trophozoites and their interaction with Atlantic salmon, *Salmo salar* L., gills, *J Fish Dis*, 39(9), s. 1113-1123. doi: 10.1111/jfd.12444.
- Wright, D. W., Nowak, B., Oppedal, F., Crosbie, P., Stien, L. H. og Dempster, T. (2018) Repeated sublethal freshwater exposures reduce the amoebic gill disease parasite, *Neoparamoeba perurans*, on Atlantic salmon, *J Fish Dis*, 41(9), s. 1403-1410. doi: 10.1111/jfd.12834.
- Young, N. D., Crosbie, P. B., Adams, M. B., Nowak, B. F. og Morrison, R. N. (2007) *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Int J Parasitol*, 37(13), s. 1469-1481. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.018.
- Young, N. D., Dykova, I., Snekvik, K., Nowak, B. F. og Morrison, R. N. (2008) *Neoparamoeba perurans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease, *Dis Aquat Organ*, 78(3), s. 217-223. doi: 10.3354/dao01869.
- Young, N. D., Dykova, I., Crosbie, P. B., Wolf, M., Morrison, R. N., Bridle, A. R. og Nowak, B. F. (2014) Support for the coevolution of *Neoparamoeba* and their endosymbionts, Perkinsella amoebae-like organisms, *Eur J Protistol*, 50(5), s. 509-523. doi: 10.1016/j.ejop.2014.07.004.
- Zilberg, D. og Munday, B. L. (2000) Pathology of experimental amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the effect of pre-maintenance of fish in sea water on the infection, *J Fish Dis*, 23, s. 401-407.
- Zilberg, D., Gross, A. og Munday, B. L. (2001) Production of salmonid amoebic gill disease by exposure to *Paramoeba* sp. harvested from the gills of infected fish, *Journal of Fish Diseases*, 24, s. 79-82.

## 6. Appendiks

### 6.1 Tabellar

**Tabell 6.1** Oversikt over primarar og probar til assay nytta under real-time RT-PCR analyse av gjellevev frå uttak -1 dpi (før smitte).

Assay	Primer- og probesekvensar	Litteratur
Salmonid gjellepoxvirus (POX MCP)	<b>P:</b> MGB- TTA TAC ACC ATC ACA TTT GTG <b>F:</b> CAG AGG TTT TTC ATA CGC CAG AA <b>R:</b> GAG GTC ACG GTG ATG ACA GAA C	A. Nylund, pers. kom.
<i>Candidatus</i> Branchiomonas cysticola (Epit)	<b>P:</b> MGB-ACT TAG CGA AAG TTA AGC <b>F:</b> GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA GTG <b>R:</b> CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C	Gunnarsson <i>et al.</i> (2017b)
<i>Candidatus</i> Piscichlamydia salmonis (Pch)	<b>P:</b> CAA AAC TGC TAG ACT AGA GT <b>F:</b> TCA CCC CCA GGC TGC TT <b>R:</b> GAA TTC CAT TTC CCC CTC TTG	Nylund <i>et al.</i> (2008)
<i>Ichthyobodo</i> spp. (Costia)	<b>P:</b> MGB-TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G <b>F:</b> ACG AAC TTA TGC GAA GGC A <b>R:</b> TGA GTA TTC ACT YCC GAT CCA T	Isaksen <i>et al.</i> (2012)

### 6.2 Oppskrifter

#### Longmire's løysning:

Longmire's (1 liter) vart laga ved å tilsette (i rekkefølge):

1. 200 ml 0.5M EDTA, Thermo Fisher Scientific (AM9261)
2. 100 ml 1.0M TRIS, Thermo Fisher Scientific (AM9856)
3. 2 ml NaCl 5.0M, Thermo Fisher Scientific (AM9760G)
4. dH<sub>2</sub>O opp til totalt volum på 975 ml
5. 25 ml SDS 20% solution, Thermo Fisher Scientific (AM9820)

### 6.3 Formlar

Til utrekning av K-faktor:

$$K = \frac{Vekt (g)}{(Lengde (cm))^3} * 100$$

### 6.4 Programvare

Alt av grafar vart laga i programmet GraphPad Prism 8 for Windows 64-bit, versjon 8.4.2 (679).