

**Betydning av *Paranucleospora theridion* og Salmonid
Alfavirus (SAV) for utvikling av sykdom hos Atlantisk
laks (*Salmo salar* L.)**

- Dobbelsmitte av laks med *P. theridion* og SAV, og betydning av temperatur for densitet av *P. theridion* i laks.

Master i Fiskehelse
Catrine Smørås



Institutt for Biologi

Universitetet i Bergen

Juni 2014

Forord

Først og fremst vil jeg takke min dyktige veileder professor Are Nylund for hans engasjement og gode oppfølging under arbeidet med oppgaven. Jeg vil også rette en ekstra stor takk til min biveileder Steffen Blindheim for hjelp, velvilje og oppmuntring underveis.

Videre vil jeg takke Heidrun Nylund og Kuninori Watanabe som alltid har vært behjelpelig og gitt meg grundig opplæring på lab.

Jeg vil også takke mine medstudenter på fiskehelse for et kjekt og motiverende studiemiljø. Spesielt vil jeg nevne Helene Katrine Kvam for trygt og godt vennskap og som med sitt sprudlende og smittende humør har gjort studiehverdagen lettere.

Avslutningsvis vil jeg takke mamma, pappa, Monica og Christoffer, for støtte, omtanke og oppmuntring. Dette har vært til stor hjelp i arbeidet med oppgaven.

Bergen, juni 2014

Catrine Smørås

Sammendrag

Sykdomsproblemer som rammer lakseoppdrettnæringen på Vestlandet er i stor grad knyttet til gjelleproblemer, Pankreassykdom (PD) og lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Disse sykdommene fører til redusert fiskevelferd og dødelighet. Mikrosporidien *Paranucleospora theridion* er assosiert med gjellesykdommer og har en livssyklus med både laks og lakselus som vert. *P. theridion* er muligens en medvirkende faktor ved SAV-infeksjon og utvikling av PD. Det er observert i felt at utvikling av paranucleosporose som følge av mikrosporidien kan være temperaturavhengig, ettersom sykdommen blir observert ved temperaturer over 10 °C. Hvordan *P. theridion* infiserer fisk er foreløpig ukjent, men det er antatt at sporer frigitt fra lakselus entrer laksen via gjellene.

For å se på samspillet mellom *P. theridion* og SAV, ble det gjennomført et smitteforsøk hvor fisk som var naturlig smittet med *P. theridion* i felt ble utsatt for kohabitantsmitte med SAV i kontrollerte omgivelser. Videre ble det sett på forskjeller i sykdomsutvikling ved ulike temperaturer hvor fisken ble holdt ved 8 og 16 °C. Et badsmitte-forsøk med laks der det ble brukt *P. theridion* sporer høstet fra lakselus ble utført for å undersøke infektiviteten til mikrosporidiesporene. Gjennom forsøkene ble det tatt prøver til histologi og real-time RT-PCR for å undersøke tilstedeværelse og mengde av *P. theridion* og andre patogener.

Resultater fra real-time RT-PCR fra gjeller for *P. theridion*, viste en reduksjon i mengde ved 8 °C, mens det ved 16 °C ble observert en økende mengde i løpet av forsøket. Histopatologiske undersøkelser viste at all fisken hadde betydelige endringer på gjellene, men ikke endringer som relateres til *P. theridion*. Infeksjon av feltfisk med SAV var ikke vellykket, men det ble observert *P. theridion* på sheddere som ble tilsatt i karene. Dette kan indikere horisontal smitte. Badsmitten som ble gjennomført resulterte ikke i infeksjon med *P. theridion*, til tross for at vannbåren smitte er observert i felt.

Innholdsfortegnelse

Forord	2
Sammendrag.....	3
Introduksjon	6
Gjelleproblemer på Vestlandet.....	6
Pankreassykdom.....	8
Lepeophtheirus salmonis.....	9
<i>Paranucleospora theridion</i>	9
Mål med studiet.....	11
Material og metode.....	12
Forsøk A.....	12
Smitte	14
Forsøk B.....	14
Smitte	16
Prøvetaking.....	16
RNA rensing.....	17
Real-time RT-PCR	17
Histologi	19
Resultater.....	20
Forsøk B.....	20
Forsøk A.....	21

Prøveuttak før oppstart	21
Temperatur og salinitet.....	22
Dødelighet	23
Prøvetaking og disseksjon	25
Real-time RT-PCR-resultater	29
Histopatologi	36
Diskusjon.....	40
Utvikling av Paranucleospora theridion	40
Spredning av Paranucleospora theridion.....	41
Kohabitantsmitte med SAV	43
Årsak til dødelighet	43
Konklusjon og fremtidsperspektiver	46
Referanser.....	47

Introduksjon

I norsk oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar*) er det store utfordringer med tanke på fiskens helse og velferd. De største helseproblemene i oppdrett av laks i sjøvannsfasen er for tiden infeksjøs sykdommer som lakselus-infestasjon (*Lepeophtheirus salmonis*), pankreassykdom (PD), hjerte- og skjellettmuskelbetennelse (HSMB), kardiomyopatisyndrom (CMS) og sår- og gjelleproblemer. På Vestlandet er det i dag hovedsakelig lakselusproblematikken, gjellesykdommer og PD som preger sykdomsbildet (Hjeltnes (red), 2014).

Gjelleproblemer på Vestlandet

Gjellesykdommer kan forårsakes av mange ulike patogener, og de fleste av disse skaper problemer på Vestlandet. Unntaket er parasitten *Parvicapsula pseudobranchicola* som er assosiert med gjelleproblemer og dødelighet hovedsaklig i Nord-Norge (Karlsbakk et al., 2002, Nylund et al., 2005, Sterud et al., 2003).

Proliferativ gjellebetennelse (PGI) er en gjellesykdom med uklar primærårsak som gir bleke gjeller, betennelse, hyperplasi og hypertrofi og fører til respirasjonsproblemer hos laksen (Kvellingstad et al., 2005). Viruset Atlantic salmon Paramyxovirus (ASPV) er antatt å være en medvirkende faktor når fisk blir syk med PGI (Kvellingstad et al., 2003, Kvellingstad et al., 2005). De siste årene er det imidlertid ikke funnet tilstedeværelse av viruset i de fleste undersøkte tilfeller med PGI (Nylund et al., 2011, Steinum et al., 2010). Et annet patogen som er antatt å ha en sammenheng med PGI er mikrosporidien *Paranucleospora theridion* (syn. *Desmozoon lepeophtheirii*) hvor det har vært observert en positiv korrelasjon mellom mengde mikrosporidier og alvorlighetsgrad av PGI (Nylund et al., 2011, Steinum et al., 2010). Det er også funnet et poxvirus, Salmon gill poxvirus (SGPV), som assosieres med proliferativ gjellesykdom (PGD) og dødelighet, men ingen betennelse (Nylund et al., 2008).

Det er flere bakterier som er assosiert med gjellesykdommer på laks, blant annet *Flavobacterium branchiophila* som assosieres med bakteriell gjellesykdom (BGD) (Wakabayashi et al., 1989), *Tenacibaculum* sp. som normalt forbindes med hudsår og finneråte (Handlinger et al., 1997, Olsen et al., 2011, Powell et al., 2004), og bakterier som forårsaker epiteliocystis. Epiteliocystis er en sykdom som fører til hyperplasi og hypertrofi av epitelcellene på gjellene, og er ofte assosiert med PGI. I de hypertrofe cellene som er infisert ser man store inklusjoner som er fylt med ulike stadier av kokkoide, Chlamydia-lignende

bakterier (Draghi et al., 2004, Nylund et al., 1998). Draghi et al. (2004) foreslo navnet ‘*Candidatus* Piscichlamydia salmonis’ på bakterien de fant i cystene hos atlantisk laks. Denne bakterien var lenge antatt å være ansvarlig for de fleste tilfellene av epiteliocystis hos sjøsatt atlantisk laks. Nylig er det også oppdaget en annen bakterie i forbindelse med epiteliocystis som ikke tilhører *Chlamydiae*, men *Betaproteobacteria*, med foreslått navn ‘*Candidatus* Branchiomonas cysticola’. Denne bakterien ble observert i større mengder og høyere prevalens enn ‘*Ca. P. salmonis*’ (Mitchell et al., 2013, Toenshoff et al., 2012). Man har funnet tilstedeværelse av ‘*Ca. B. cysticola*’ i fisk både med og uten epiteliocystis, men Mitchell et al. (2013) observerte en signifikant korrelasjon mellom mengde bakterier og antall epiteliocyster på gjellene. Det ble også undersøkt fisk fra ferskvannsfasen, men det ble ikke funnet ‘*Ca. B. cysticola*’ på noen av disse (Mitchell et al., 2013).

Et annet patogen som også er en medvirkende faktor på gjelleproblemer er ektoparasittene *Ichthyobodo* spp. som infiserer gjeller og hud på fisk. I Norge er det så langt kjent to typer *Ichthyobodo* som infiserer laks; *Ichthyobodo necator sensu stricto* (s.s) og *Ichthyobodo salmonis*, hvor *I. necator* (s.s) så langt kun er registrert i ferskvann og infiserer hovedsakelig huden, samt gjellene, mens *I. salmonis* derimot er euryhalin og infiserer hovedsakelig gjellene (Isaksen et al., 2010, Isaksen et al., 2007, Isaksen et al., 2011, Todal et al., 2004). *Ichthyobodo*-infeksjoner kan føre til at fisken får et grått slimlag over huden på grunn av økt slimproduksjon, og man kan se «blinking» i karet/merden som kommer av at fisken klør seg (Isaksen et al., 2010). Infeksjoner på huden fører til hyperplasi og felling av epidermalceller som kan føre til osmoregulatorisk sammenbrudd, mens infeksjoner på gjellene kan føre til hyperplasi og fusjon av lamellene som gir fisken respiratoriske problemer (Bruno, 1992, Roubal et al., 1987).

Tilstedeværelsen av de nevnte gjelle-patogenene i ulik grad, samt opportuniste og ektoparasitter som tricodinider og ikke-infeksiøse faktorer som blant annet maneter, gjør det vanskelig å finne primærårsaken til gjellesykdommer (Baxter et al., 2011a, Baxter et al., 2011b). Sykdomstilstanden hos Atlantisk laks er i dag antatt å ha en multifaktoriell årsak (Kvellestad et al., 2003, Kvellestad et al., 2005, Mitchell et al., 2010, Nylund et al., 2008, Steinum et al., 2010, Toenshoff et al., 2012).

Amøbeindusert gjellesykdom (AGD) er en sykdom som fører til respiratoriske problemer for laksefisk i mange land, og i 2006 ble det for første gang registrert utbrudd av sykdommen i

Norge (Steinum et al., 2008, Young et al., 2008). I 2013 ble det også oppdaget AGD på oppdrettet berggylt (*Labrus bergylta*) som brukes som rensefisk i oppdrettsnæringen (Karlsbakk et al., 2013). AGD forårsakes av amøben *Paramoeba perurans* (syn. *Neoparamoeba perurans*, se Feehan et al. (2013)) (Crosbie et al., 2012, Karlsbakk et al., 2013, Steinum et al., 2008, Young et al., 2007, Young et al., 2008), og kan føre til redusert appetitt, svimere og dødelighet. På gjellene kan det sees hvite flekker og økt slimproduksjon. Histologisk vil man se hypertrofi og hyperplasi av epitelceller og helt eller delvis sammenvoksing av lameller (Karlsbakk et al., 2013, Steinum et al., 2008, Young et al., 2008). På Vestlandet ser AGD ut til å være et økende problem, da antall utbrudd økte fra 5 i 2012 til 56 i 2013 på anlegg langs kysten fra Vest-Agder til Møre og Romsdal (Hjeltnes (red), 2014).

Pankreassykdom

Pankreassykdom (PD) hos atlantisk laks og sleeping disease (SD) hos regnbueørret forårsakes av viruset Salmonid alfavirus (SAV) som tilhører slekten *Alphavirus*, som sammen med slekten *Rubivirus* utgjør familien *Togaviridae* (Nelson et al., 1995, Strauss & Strauss, 1994, Weston et al., 2002). PD er en av de mest alvorlige virussykdommene ved oppdrett av laksefisk i Nord-Europa, og har forårsaket store økonomiske tap i blant annet Norge og Irland (Aunsmo et al., 2010, Rodger & Mitchell, 2007). I Norge ble PD lenge kun forårsaket av SAV subtype 3, men i 2011 ble det oppdaget laks infisert med SAV 2 og de siste årene er det observert en økning i antall utbrudd med denne subtypen. SAV 2 og SAV 3 ser ut til å avgrense seg til hver sine geografiske områder; SAV 3 på Vestlandet (2 utbrudd i Finnmark i 2013) og SAV 2 i Trøndelag (Hjeltnes (red), 2014, Hjortaas et al., 2013, Jansen et al., 2014). PD-utbrudd kan forekomme hele året og varer gjerne i 3-4 måneder, men de fleste utbruddene oppstår i sommerhalvåret med økende temperaturer, da dødeligheten kan variere mellom 3-20% (McVicar, 1987, Taksdal et al., 2007). Kliniske tegn ved PD er redusert appetitt, apatisk fisk og fisk som legger seg på bunnen av merden. Ved disseksjon kan det observeres tom magesekk og gult, slimete innhold i tarmen samt redusert mengde buk fett (McLoughlin et al., 2002, McVicar, 1987, Taksdal et al., 2007). I tillegg er det til tider observert tegn på sirkulasjonsproblemer, blekt- eller sprukket hjerte, eller punktblødninger i pylorusområdet (McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007). Histologisk ser man gjerne tap av eksokrin pankreas, nekrose av myocytter, inflammasjon i hjertet og rød muskulatur, og degenerering av hvit muskulatur (McLoughlin et al., 2002, McVicar, 1987, Taksdal et al., 2007).

Lepeophtheirus salmonis

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en ektoparasitt som beiter på fiskens hud og gjeller, hvor de spiser slim, hud- og blodceller og fører til irritasjon og skader på laksen (Bjørn & Finstad, 1998, Jones et al., 1990). Lakselusen har direkte livssyklus med 8 livsstadier og skallskifte mellom hvert stadium, henholdsvis nauplie 1 og 2, copepoditt, chalimus 1 og 2, pre-adult 1 og 2, og adult (Hamre et al., 2013). De to første stadiene er nauplielarver som lever fritt i vannet og spres med vannstrømmene (Schram, 1993). Etter nauplie-stadiet utvikles lakselusen til en copepoditt som er dels frittlevende og dels fastsittende, og det er dette stadiet som infiserer laksen (Johnson & Albright, 1991b, Schram, 1993). De to neste stadiene, chalimus 1 og 2 er også fastsittende, og først etter utvikling til pre-adult 1 kan lusen bevege seg fritt på laksen (Bron et al., 1991, Jones et al., 1990, Schram, 1993). Etter to stadier som pre-adult, utvikler lusen seg til adult-stadiet (Johnson & Albright, 1991b). En adult hunnlus kan ha to eggstrenger på opp til 20 mm som begge kan inneholde 15-17 egg per millimeter (Schram, 1993). Tiden det tar for en lus å utvikle seg fra egg til adult er temperaturavhengig og vil ved 10°C ta omtrent 40-50 dager, mens det vil gå betydelig raskere ved 15°C (Bjørn & Finstad, 1998, Johnson & Albright, 1991a). Lakselus har lenge vært et stort problem i oppdrettsnæringen på grunn av dens raske og direkte livssyklus, og i senere år har utvikling av resistens mot de fleste tilgjengelige behandlingsmidler ført til store utfordringer (Hjeltnes (red), 2014).

Paranucleospora theridion

Paranucleospora theridion er en mikrosporidie som er et viktig gjellepatogen på Vestlandet, og parasitterer både atlantisk laks (*Salmo salar*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og skottelus (*Caligus elongatus*) (Freeman et al., 2003, Nylund et al., 2011, Nylund et al., 2010). Livssyklusen til *P. theridion* er delt opp i tre sykluser som alle ender i dannelsen av forskjellige typer sporer. De to første gjennomføres i laksen og den siste i lusen, som er parasittens hovedvert. Sporene består av en posterior vakuole, én eller to kjerner, endo- og eksospore, polhette og en poltube som brukes til å infisere celler ved å skyte poltuben inn i cytoplasma eller nukleoplasma til vertscellen (Nylund et al., 2010, Vávra & Larsson, 1999). Det er usikkert hvordan sporene som dannes i lusen infiserer laksen, men man antar at *P. theridion* som er frigitt til vannet infiserer laksen via gjellene (Sveen et al., 2012). Den første syklusen foregår i cytoplasma til fagocytter, endotel- og epitleceller på gjellene og

gir opphav til små (1,1µm), diplokaryotiske, tynnveggede sporer med kort poltube. I den andre syklusen dannes det større (2,4-2,7µm x 2,0-2,1µm), tykkveggede miljøsporer i nukleoplasma i fiskens epitelceller. Også disse sporene er diplokaryotiske og normalt sett finner man bare en eller to sporer i hver cellekjerne. Det er fortsatt usikkert hvordan sporene ender opp i epitelcellene (Nylund et al., 2011, Nylund et al., 2010). Lakselusene beiter blant annet på fiskens epitelceller og det er naturlig å tro at lusene får i seg miljøsporene på denne måten (Nylund et al., 2010, Sveen et al., 2012).

P. theridion er antatt å ha en sammenheng med PGI ettersom parasitten blir observert i betydelig større mengder i anlegg med PGI enn anlegg uten PGI (Nylund et al., 2011, Steinum et al., 2010). Patologi hos laks som er infisert med *P. theridion* er bleke gjeller, blødninger i huden, hypertrofi og hyperplasi på gjellene samt økt slimproduksjon (Matthews et al., 2013, Nylund et al., 2010). Ettersom *P. theridion* blant annet infiserer laksens immunceller er det naturlig å anta at parasitten kan ha en negativ effekt på vertens immunforsvar og dermed gjøre fisken mer mottakelig for sekundærinfeksjoner eller påvirke utvikling av andre sykdommer som for eksempel PD. Dette er også sett hos *Nucleospora salmonis*, en annen mikrosporidie som også infiserer immunceller hos laksefisk (Hedrick et al., 1990, Morrison et al., 1990, Shaw & Kent, 1999).

Ettersom det i flere smitteforsøk med SAV er sett at man ikke får den samme patologien og dødelighet i eksperimentelt infisert fisk som det man finner hos PD-syk fisk i felt (Christie et al., 2007, Desvignes et al., 2002, McLoughlin et al., 1996), kan det spekuleres i om *P. theridion* kan være en medvirkende faktor på Vestlandet. Det er observert stor forskjell i densitet av *P. theridion* på Vestlandet og i Nord-Norge, hvor det er langt høyere nivåer på Vestlandet enn i Nord-Norge. Det er mulig at mikrosporidiens livssyklus er temperaturavhengig og kun gir sykdom ved temperaturer over 10°C (Nylund et al., 2011, Sveen et al., 2012). Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor både *P. theridion* og PD er mer utbredt på Vestlandet.

Mål med studiet

Målet med studiet er å se på hvordan temperatur virker inn på infeksjon med *P. theridion* og utvikling av PD i et lukket og kontrollert miljø. Videre ville vi finne ut om fisk som er infisert med *P. theridion* har en høyere sannsynlighet for å utvikle PD når de blir eksperimentelt smittet med SAV.

Material og metode

Høsten 2013 gjennomførte vi to smitteforsøk med *P. theridion*, forsøk A og B. I forsøk A ble det brukt laks som var naturlig smittet med *P. theridion*, mens det i forsøk B ble brukt naiv fisk som skulle smittes eksperimentelt med parasitten. Deretter skulle fiskene i begge forsøkene smittes med Salmonid Alfavirus (SAV) slik at vi kunne følge med på sykdomsutviklingen. *P. theridion* er antatt å ha en optimaltemperatur >10 °C (Sveen et al., 2012). For å se om data fra felt gir riktig bilde på temperaturpreferanser, og for å se på sykdomsutvikling ved ulike temperaturer, ble begge forsøkene delt i to grupper hvor den ene gruppen gikk ved 8 °C og den andre ved 16 °C.

To dager før smitte ble gjennomført i forsøk A og før oppstart av forsøk B, ble det tatt ut prøver av 10 laks fra den gruppen fisk som skulle injiseres med SAV og som skulle brukes i forsøk B. Disse fiskene var produsert ved Stiftelsen Industrilaboratoriet (ILAB), nylig smoltifisert og uvaksinert. Tidligere var fiskene screenet for Infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV), Piscine myokardittvirus (PMCV) og Piscine reovirus (PRV), derfor sjekket vi kun fisken for SAV og gjellepatogenene *P. theridion*, '*Ca. Branchiomonas cysticola*' og *Ichthyobodo* spp.

Tabell 1: Snittvekt og lengde før forsøksstart på fisk fra felt og fisk fra ILAB. Felt-fisk 1. oktober: 2 uker før inntak til ILAB. Felt-fisk 15. oktober: ved inntak til ILAB. Naiv fisk fra ILAB 23. oktober: 2 dager før oppstart av forsøk A.

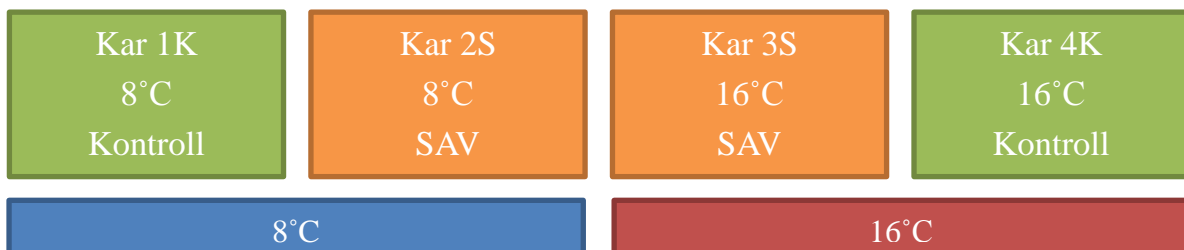
	Lengde (cm)	Vekt (g)
Fisk fra felt 1. oktober 2013	20,2	81
Fisk fra felt 15. oktober 2013	22,4	117,7
Fisk fra ILAB 23. oktober 2013	17,1	54,4

Forsøk A

Ettersom forsøket krevde fisk naturlig smittet med *P. theridion* ble det tatt prøver av nyutsatt smolt fra 3 ulike anlegg på Vestlandet. Gjelleprøver fra disse fiskene ble analysert for *P. theridion*, SAV, IPNV, '*Candidatus* *Piscichlamydia salmonis*', '*Ca. B. cysticola*', '*Candidatus* *Syngnamydia salmonis*' (Nylund et al., Submitted) og *Ichthyobodo* spp. Målet var å finne en fiskegruppe som var infisert med *P. theridion*, men ikke SAV. I tillegg var det

en fordel om den valgte fiskegruppen hadde minimalt med andre agens, særlig gjellepatogener. Gruppen som ble valgt var ved prøvetaking 1. oktober 2013 positiv for *P. theridion* (C_T verdier <25), hadde kun en mindre infeksjon av '*Ca. B. cysticola*' ($C_T >28$, prevalens 50 %), og var negativ for de øvrige patogenene nevnt over. Denne fisken var sjøsatt 14.-15. september 2013. Fisken fra felt var vaksinert med SAV, men tidligere kohabitant smitteforsøk har vist at vaksinering ikke hindrer infeksjon (Are Nylund pers. kom). Det var dessuten viktig for forsøket å simulere situasjonen i oppdrett på Vestlandet i størst mulig grad.

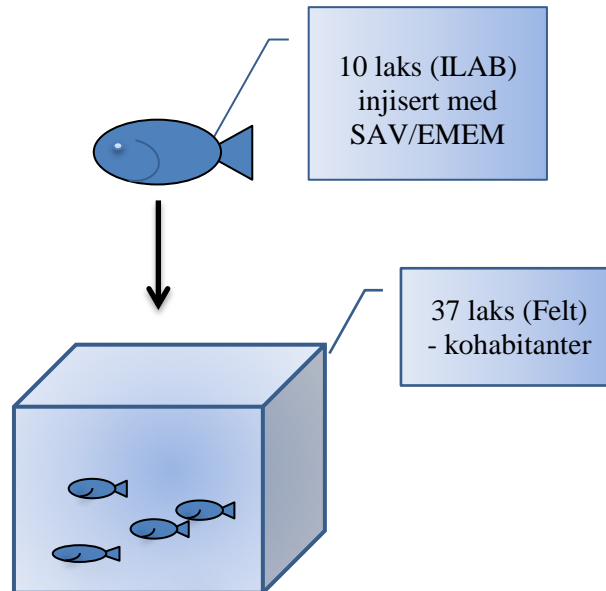
16. oktober 2013 ble smolten flyttet fra anlegget og over til ILAB sine fasiliteter hvor de ble fordelt på fire 150L kar med omtrent 65 fisk i hvert. Temperaturen ble satt til 12°C, tilsvarende temperaturen i sjøen, mens saliniteten ble satt til 25 ‰ for å forhindre sårdannelse på fisken ettersom dette er et vanlig problem ved inntak av fisk fra felt. Fisken gikk ved disse parameterne i en uke før antall fisk ble justert til 37 smolt per kar ved tilsetning av feltfisk som var holdt i et reservekar. Temperaturen ble senket til 8 °C i kar 1 og 2, mens den i kar 3 og 4 ble hevet til 16 °C. Dette ble gjennomført over en periode på 3 dager, fra 24. til 26. oktober, hvor temperaturen ble hevet/senket med 2 °C annenhver dag etter anbefaling fra ILAB. Lysintervallet gjennom hele forsøket var 12 timer lys og 12 timer mørke.



Figur 1: Karoppsett forsøk A. Kar 1 og 2 gikk ved 8 °C, mens kar 3 og 4 gikk ved 16 °C. I kar 2 og 3 ble sheddere injisert med SAV, mens kar 1 og 4 var kontrollkar ved hver temperatur og sheddere ble injisert med EMEM.

Smitte

I kar 2 (8 °C) og kar 3 (16 °C) skulle det gjennomføres en kohabitant-smitte med SAV, mens de gjenværende karene skulle fungere som kontrollgrupper ved hver temperatur (se figur 1).



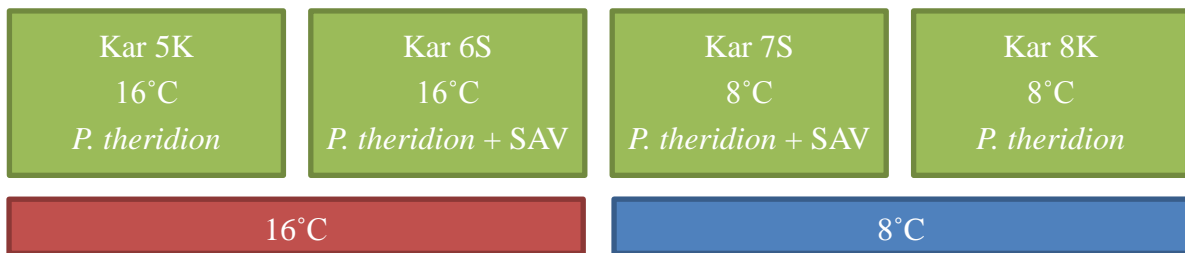
Figur 2: Kohabitant-smitte. 10 stk fisk fra ILAB injiseres med SAV/EMEM og tilsettes i karet med 37 laks fra felt.

Naive laks levert fra ILAB (Batch nr: ILAB/13/200) ble brukt som sheddere, ti per kar (se figur 2). Før smitte ble disse bedøvd med Finquel[®] vet. (50 mg/l), og merket med klipping av fettfinnen for å kunne skille dem fra feltfisk. I kontrollkarene, kar 1 (8 °C) og 4 (16 °C), ble shedderene injisert intraperitonalt (i.p) med cellemedium (EMEM), mens fiskene tilsatt i kar 2 (8 °C) og 3 (16 °C) ble injisert (i.p) med 0,1 mL SAV3 isolert fra laks i Nord-Norge. Dette ble gjennomført 3 ganger i løpet av forsøket ettersom vi opplevde en del dødelighet blant fisken som skulle fungere som sheddere. Fiskene ble injisert med SAV og EMEM 25. oktober (10 fisk per kar), 6. november (5 fisk per kar) og 13. desember (10 fisk per kar). I tillegg ble det tilsatt 10 ubehandlede «ILAB-fisk» i hvert kar 11. desember 2013 for å se på mulig horisontal smitte av *P. theridion*. Forsøket gikk i totalt 91 dager etter første tilsetning av sheddere.

Forsøk B

Parallelt med forsøk A ble det satt opp et tilsvarende forsøk hvor all smolt som ble brukt var levert fra ILAB. Denne fisken skulle smittes eksperimentelt med sporer av *P. theridion*, og etter påvist smitte skulle to av karene, på lik linje med forsøk A, smittes med SAV ved kohabitant smitte og de to andre være kontroller. Fisken ble flyttet inn i forsøkskarene 5-8 den

23. oktober 2013 ved 12 °C, 30 ‰ og 12/12 lys. Temperaturen ble så gradvis hevet og senket til henholdsvis 16 og 8 °C på samme måte som beskrevet i forsøk A (se figur 3).



Figur 3: Karoppsett med planlagt SAV smitte. Kar 5 og 6 gikk ved 16 °C, mens kar 7 og 8 gikk ved 8 °C. Kar 5 til 8 ble eksperimentelt smittet med *P. theridion*. Videre skulle kar 6 (16 °C) og 7 (8 °C) infiseres med SAV, mens kar 5 (16 °C) og 8 (8 °C) skulle være kontrollkar.

For å få tak i sporer til badsmitte, ble det samlet inn lakselus fra slaktelinjen på et slakteri på Vestlandet 1. november 2013. Disse ble oppbevart ved 11 °C i sjøvann under transport fra slakteriet. Lusene ble sortert slik at de som sannsynligvis var positive for *P. theridion* ble tatt vare på til badsmitten. Sorteringen ble gjennomført ved hjelp av lupe (se figur 5). Dagen før smitte skulle gjennomføres, 5. november, ble disse lusene presset gjennom et filter (100µm) sammen med litt sjøvann slik at mest mulig sporer og minst mulig lusevev gikk gjennom. Homogenatet ble så justert til omtrent 45 mL (figur 4) sjøvann og sporene oppbevart på kjøll ved 11 °C over natten til smitten ble igangsatt påfølgende morgen.



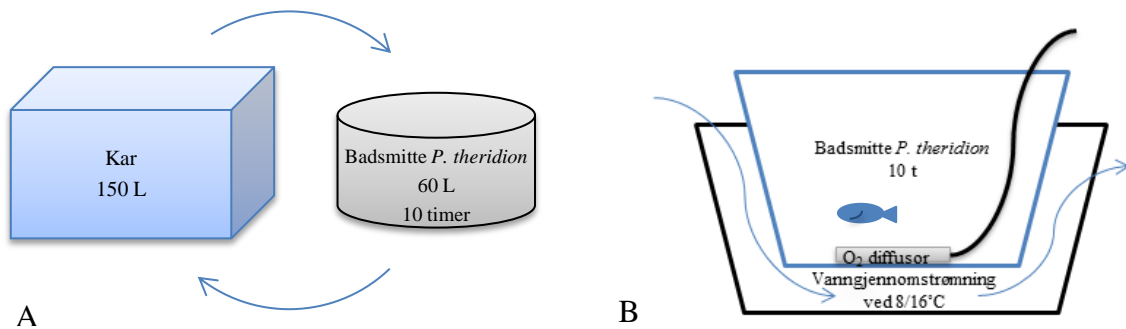
Figur 4: Homogenat med sporer og sjøvann.



Figur 5: Tre lakselus infisert med *P. theridion* og én uinfisert. De to lusene til venstre og den lengst til høyre er kraftig infisert med *P. theridion*, mens lusen som er helt lys, nummer to til høyre, er uinfisert (Foto: A. Nylund).

Smitte

6. november ble 50 laks fra hvert kar overført til stamper (60L), en stamp per kar, hvor sporer av *P. theridion* ble tilsatt (figur 6). Smitten foregikk over 10 timer og det ble tilsatt både trykkluft og oksygen i hver stamp for å holde oksygenivået mellom 80 og 100 %. Dette ble



Figur 6: Badsmitte med *P. theridion*. **A)** Overføring fra kar til stamper hvor 10 timers badsmitte ble gjennomført i 60 L vann tilsatt sporer. **B)** Skjematisk oversikt over oppsett med stamper og vanngjennomstrømning. Stampen med sporer ble plassert oppi en annen stamp med vanngjennomstrømning slik at temperaturen ble holdt ved 8 og 16 °C gjennom hele smitten på 10 timer uten å tynne ut mengden sporer. Oksygen og trykkluft ble tilsatt i hver stamp ved hjelp av diffusorer.

målt og justert regelmessig under smitten. For å holde jevn temperatur gjennom hele smitten uten å tynne ut konsentrasjonen av sporer ble stampen med badsmitte plassert oppi en annen med vanngjennomstrømning slik at temperaturen ble holdt ved 8 og 16 °C (figur 6). Forsøket varte i totalt 70 dager etter smitte. Det ble ikke påvist vellykket infeksjon med *P. theridion* 20 dager etter badsmitte, og følgelig ble ikke kohabitantsmitten med SAV gjennomført.

Prøvetaking

Eventuelle dødfisk eller svimlere fra begge forsøkene ble tatt ut og registrert to ganger om dagen, morgen og ettermiddag, og ble enten prøvetatt øyeblikkelig eller lagt på frys ved -18 °C og prøvetatt senere. Det ble også gjennomført to planlagte prøveuttak etter smitte i forsøket, dag 40 og 80 etter første smitte i forsøk A. Det ble tatt ut 5 laks fra hvert kar som ble avlivet med slag i hodet. Det ble normalt sett tatt prøver fra gjeller, hud, hjerte og nyre, men ved enkelte uttak ble det i tillegg tatt ut prøver fra flere organer og lagret som backup. Prøver til analyse ble lagt på Eppendorf rør med en vevsbit på størrelse med et fyrstikkhode, mens en større vevsbit til backup ble lagt på Nunc rør. Alle prøvene ble oppbevart på frys ved -18 °C. Laksen fra felt som ble brukt i forsøk A, var infisert med lakselus når de ble levert til ILAB.

Disse ble plukket av fra dødfisk, svimere og ved prøveuttakene, og ble lagret ved -18 °C i Eppendorf rør.

Gjelleprøvene ble normalt sett tatt fra 2. gjellebue. Hudprøvene ble tatt fra laksens sidelinje under ryggfinnen. Det ble skåret ut en skive med en bredde på cirka 3mm og inn til ryggraden slik at en fikk med både muskel og hud. For å hindre kontaminering av prøven, ble det ikke skåret gjennom til bukhulen. Analyseprøven fra hjertet ble tatt fra tuppen av ventrikkelen, mens resten ble oppbevart som backup. Prøver fra nyre ble tatt fra hodenyren hvor det er et høyt antall målceller for infeksjon av *P. theridion* (Nylund et al., 2010).

I tillegg til vanlig prøveuttak ble det også tatt ut prøver til histologi fra utvalgte laks. Disse fiskene var nylig avlivet slik at vevet ikke var begynt å degenerere. Organene som ble tatt ut til histologi var normalt gjelle (2. gjellebue), hjerte, hud og hodenyre. Dersom det ble observert noen andre organer med sykdomstegn, ble også disse tatt ut. Vevsbitene var omtrent 2-3 mm brede og ble lagt på modifisert Karnovsky (Nylund et al., 1995), og oppbevart ved 4 °C.

RNA rensing

Rensing av RNA ble gjennomført som beskrevet av Devold et al. (2000) med modifikasjoner. Isol-RNA Lysis Reagent (5-prime) ble brukt for å ekstrahere RNA fra vevet, og RNA ble eluert med 50-100 µL destillert vann etter vask med 70 % og 99 % etanol, og lagret ved -18 °C.

Real-time RT-PCR

De rensede prøvene ble analysert ved hjelp av Real-time RT-PCR med AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies). Totalvolumet i reaksjonen var 12,5 µL hvorav 2µL var templat, 6,25µL 2X RT-PCR Buffer, 1 µL Forward primer, 1 µL Revers primer, 0,22 µL TaqMan probe, 0,25 µL 25X RT-PCR Enzym Mix og 1,78 µL nukleasefritt vann. Til reaksjonene ble det brukt Applied Biosystems® 7500 Real Time PCR System og Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System. Først gikk reaksjonen ved 45 °C i 10 minutter for revers transkripsjon etterfulgt av polymeraseaktivering ved 95 °C i 10 minutter. Deretter ble det kjørt 45 sykluser med først DNA dissosiasjon ved 95 °C i 15 sekunder etterfulgt av annealing og elongering ved 60 °C i 45 sekunder.

Tabell 2: Primer og probesekvenser brukt ved real-time RT-PCR.

Primer / Probe	Sekvens	Kilde
Elongeringsfaktor laks	Forward CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA Revers CAC ACG GCC CAC AGG TAC A Probe FAM ATC GGT GGT ATT GGA AC	(Olsvik et al., 2005)
<i>P. theridion</i>	Forward CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG Revers GGT CCA GGT TGG GTC TTG AG Probe FAM TTG GCG AAG AAT GAA A	(Nylund et al., 2010)
<i>Ca. 'B. cysticola'</i>	Forward GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA GTG Revers CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C Probe FAM ACT TAG CGA AAG TTA AGC	(Tolås, 2012)
<i>Ichthyobodo spp.</i>	Forward ACG AAC TTA TGC GAA GGC A Revers TGA GTA TTC ACT YCC GAT CCA T Probe FAM TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G	(Isaksen et al., 2012)
SAV nsP1	Forward CCG GCC CTG AAC CAG TT Revers GTA GCC AAG TGG GAG AAA GCT Probe FAM TCG AAG TGG TGG CCA G	(Andersen et al., 2007, Hodneland & Endresen, 2006)
<i>Paramoeba spp.</i>	Forward TTG TCA GAG GTG AAA TTC TTG GAT T Revers TGA AAA CAT CTT TGY CAA ATG C Probe FAM ATG AAA GAC GAA CTT CTG	(Dette studiet)
<i>S. salmonis</i>	Forward GGG TAG CCC GAT ATC TTC AAA GT Revers CCC ATG AGC CGC TCT CTC T Probe FAM TCC TTC GGG ACC TTA C	(Duesund et al., 2010)
<i>Ca. 'P. salmonis'</i>	Forward TCA CCC CCA GGC TGC TT Revers GAA TTC CAT TTC CCC CTC TTG Probe FAM CAA AAC TGC TAG ACT AGA GT	(Duesund et al., 2010)
PRV M2	Forward CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA Revers GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG Probe FAM CTG GCT CAA CTC TC	(Repstad, 2011)
Tenacibaculum spp.	-	(Vold, 2014)
Elongeringsfaktor lakselus	Forward TTA AGG AAA AGG TCG ACA GAC GTA Revers GCC GGC ATC ACC AGA CTT Probe FAM ACG TAC TGG TAA ATC CAC	(Frost & Nilsen, 2003)
IPNV VP1	Forward ACC CCA GGG TCT CCA GTC Revers GGA TGG GAG GTC GAT CTC GTA Probe FAM TCT TGG CCC CGT TCA TT	(Watanabe et al., 2006)

Resultatene fra real-time RT-PCR ble normalisert ved hjelp av formelen:

$$NE = \frac{E_{Ela}^{Ct_{Ela}}}{E_x^{Ct_x}}$$

hvor NE står for normalisert uttrykking, E_{Ela} er effektiviteten for Ela-assayet og Ct_{Ela} er Ct-verdien for elongeringsfaktoren. Tilsvarende er E_x og Ct_x effektiviteten for det aktuelle patogenet som skal normaliseres med tilhørende Ct-verdi. Videre ble det regnet ut NE med folds-økning mot for eksempel laveste NE ved 0-prøveuttakene ved hjelp av formelen:

$$NE_{Fold} = NE / NE_{min}$$

Videre ble dette Log2 transformert for å gi et mer oversiktlig bilde av resultatene.

Tabell 3: Oversikt over effektiviteten til de ulike assayene.

Essay	Effektivitet
Elongeringsfaktor	2,04737
<i>P. theridion</i>	2,096884
' <i>Ca. B. cysticola</i> '	2,075285
Tenacibaculum spp.	1,9397
SAV (nsP1)	1,985
<i>Paramoeba spp.</i>	2,2295
<i>Ichthyobodo spp.</i>	2,073606

Histologi

Som nevnt tidligere ble det også tatt ut prøver til histologi. Disse vevsbitene ble skåret i tynne skiver som var omtrent 2-3 mm tykke og ble så lagt på modifisert Karnovsky (Nylund et al., 1995) for fiksering og oppbevart ved 4 °C.

Det ble støpt inn gjelle, nyre, hud og hjerte fra 16 laks. For å klargjøre vevsbitene til innstøping ble de kuttet til passende størrelse og skylt to ganger i grunnmedium i 30 minutter. Deretter ble vevsbitene dehydrert, først med 70 % etanol (2 x 30 minutter), så med 96 % etanol (2 x 30 minutter). Skylling med grunnmedium og dehydrering med 70 % etanol ble gjennomført på is. Dehydrering med 96 % ble utført i romtemperatur. For innstøping av vev til histologi, ble det brukt Technovit® 7100 og deres instruksjoner ble fulgt for pre-innfiltrering, innfiltrering, innstøping og polymerisering. Etter at polymerisering var ferdig, ble stiftene oppbevart ved 4 °C frem til snitting for å forhindre videre herding.

De innstøpte vevsbitene ble snittet med Reichert Jung 2050 Supercut (Leica) i 1,5µm tynne snitt. Snittene ble lagt på destillert vann på objektglass og tørket ved 60 °C. Deretter ble snittene farget med 1 % toluidinblått i 15-30 sekunder over spritbrenner og skylt med destillert vann til man fikk passelig farge på snittene. Til slutt ble de tørket igjen og dekkglass ble limt over. Snittene ble så vurdert ved bruk av lysmikroskop.

Resultater

Forsøk B

Smitten med *P. theridion* i Forsøk B var ikke vellykket ettersom vi kun nådde C_T verdier $>29,3$ på gjellene de første fire dagene etter smitte ved 16°C (se tabell 4). Mengde *P. theridion* ved 0-prøveuttaket 23. oktober 2013 var henholdsvis 35,7 og 37,3 hos to av ti individer som ble undersøkt (se tabell 4). Selv om mengden og prevalens hadde økt noe etter 0-prøveuttaket, regnes økningen som ubetydelig og den eksperimentelle smitten mislykket. Resultatene som beskrives heretter vil derfor kun omhandle Forsøk A.

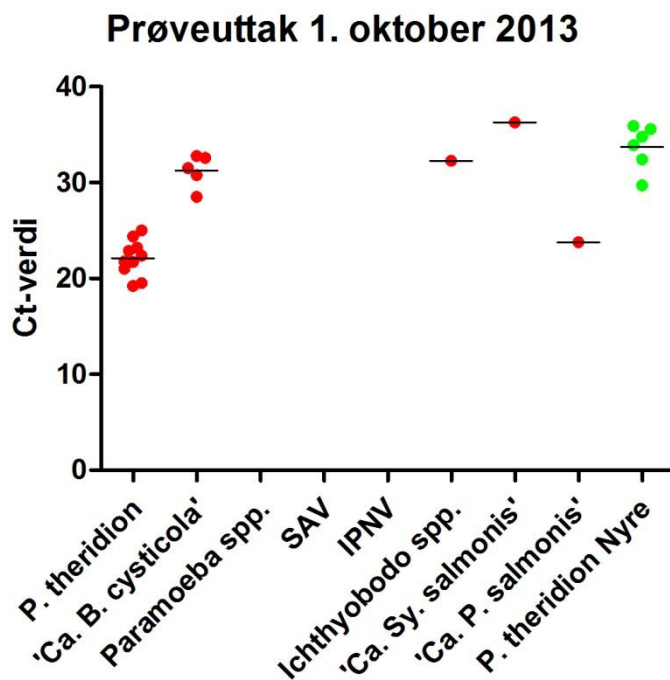
Tabell 4: C_T -verdier for *P. theridion* og prevalens i forsøk B. C_T -verdier ved 0-prøveuttak før oppstart, fra dødfisk i starten av forsøket og ved prøveuttak 20 dager etter smitte ved 8 og 16°C . Antall fisk tatt ut etter 20 dager var 10 fisk fra 8°C og 10 fisk fra 16°C , hvorav én fisk fra 16°C var negativ for *P. theridion*.

	C_T verdi		Prevalens
	8°C	16°C	
0-prøveuttak	$>35,7$		2 av 10
0-4 dager etter smitte		$>29,3$	10 av 10
7-14 dager etter smitte		$>31,9$	4 av 4
20 dager etter smitte	$>32,4$	$>32,8$	19 av 20

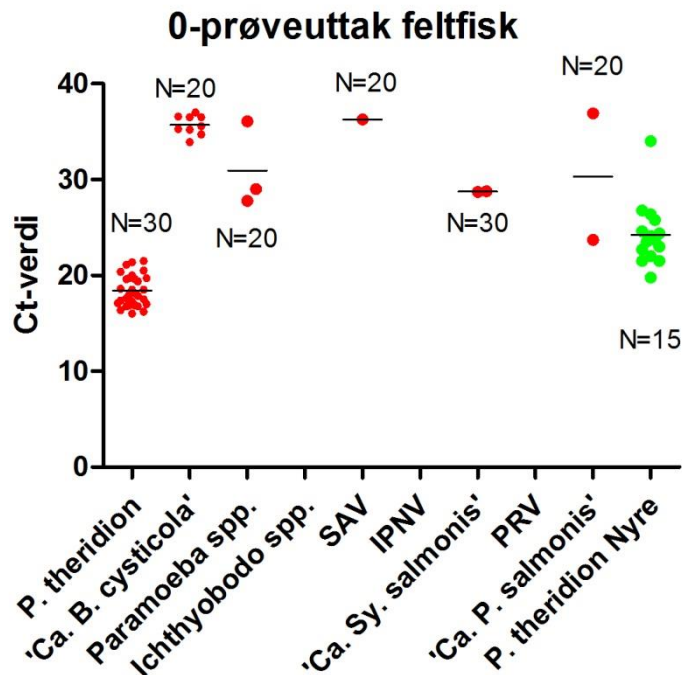
Forsøk A

Prøveuttak før oppstart

Feltfisker som ble brukt i forsøket var positiv for *P. theridion* både på gjeller og nyre, og hadde kun lave nivåer av andre agens i noen få individer 1. oktober 2013 (Figur 7). 2 uker senere ble det tatt ut nytt 0-prøveuttak da fisken ble tatt inn fra felt, og disse ble også screenet for de samme patogenene, samt *Paramoeba* spp. og PRV. På dette tidspunktet var feltfisker blitt mer positiv for *P. theridion* både på gjeller og nyre, mens tilstedeværelsen av de andre patogenene var fortsatt lav (Figur 8). Like før oppstart av forsøket ble det også tatt et 0-prøveuttak fra fisken som ble produsert på ILAB. Disse var allerede screenet for ILAV, IPNV, PMCV og PRV, og ingen av de undersøkte individene var positiv for noen av patogenene. Ved 0-prøveuttaket var fisken negativ for SAV og det var kun lave nivåer av *P. theridion* og 'Ca. B. cysticola'.



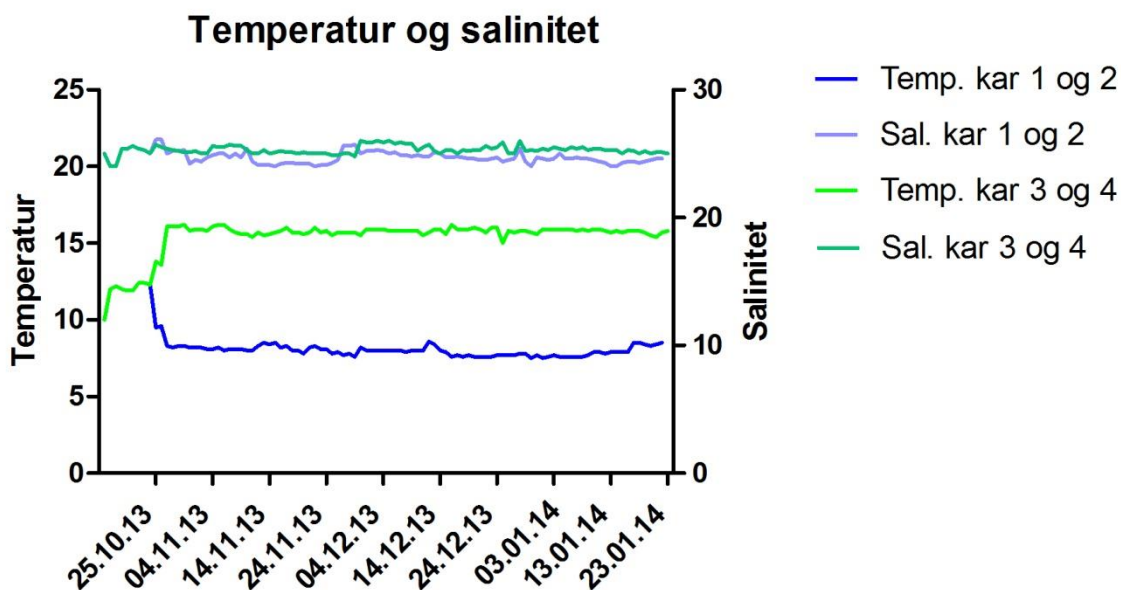
Figur 7: C_t-verdier på gjelle (N=10) og nyre (N=10) ved prøveuttak 1. okt. 2013. De horisontale linjene indikerer gjennomsnittsverdiene



Figur 8: C_T -verdier fra gjeller og nyre ved 0-prøveuttak feltfisk. De horisontale linjene indikerer gjennomsnittsverdiene. 20 fisk var negativ for *Ichthyobodo* spp., IPNV og PRV.

Temperatur og salinitet

Når feltfisken ble tatt inn på ILAB, skulle temperaturen være 12 °C, men da fisken ble flyttet inn i karene, var temperaturen 10 °C. Dette ble justert opp slik at temperaturen var riktig dagen etterpå. «Sett»-verdier for temperatur og salinitet var henholdsvis 8 og 16 °C ($\pm 0,2$), og 25 ‰ (± 1) etter akklimering til de ulike temperaturene. Målte verdier varierte mellom 7,5 til 8,0 °C, og 15,0 til 16,2 i hver temperaturgruppe, mens saliniteten varierte mellom 24,0 og 26,0 ‰ (figur 9 og tabell 5).



Figur 9: Temperatur og salinitet forsøk A. Registrert temperatur og salinitet gjennom hele forsøket.

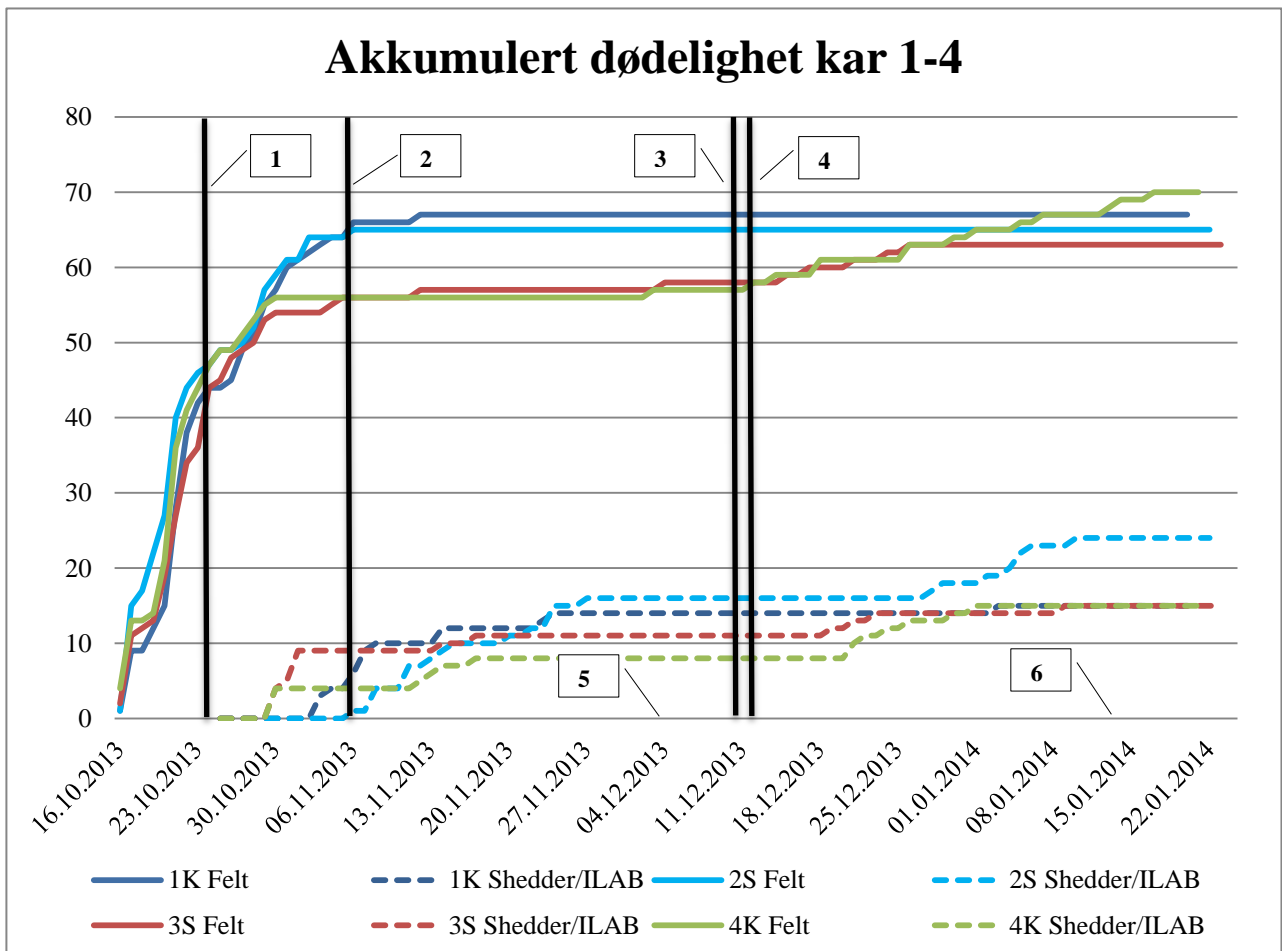
	8 °C	25 ‰	16 °C	25 ‰
Gjennomsnitt	8,0	24,7	15,8	25,3
Maksimum	8,6	25,7	16,2	26,0
Minimum	7,5	24,0	15,0	24,8

Tabell 5: Gjennomsnitt, maks- og minimumsverider for temperatur og salinitet i forsøk A.

Dødelighet

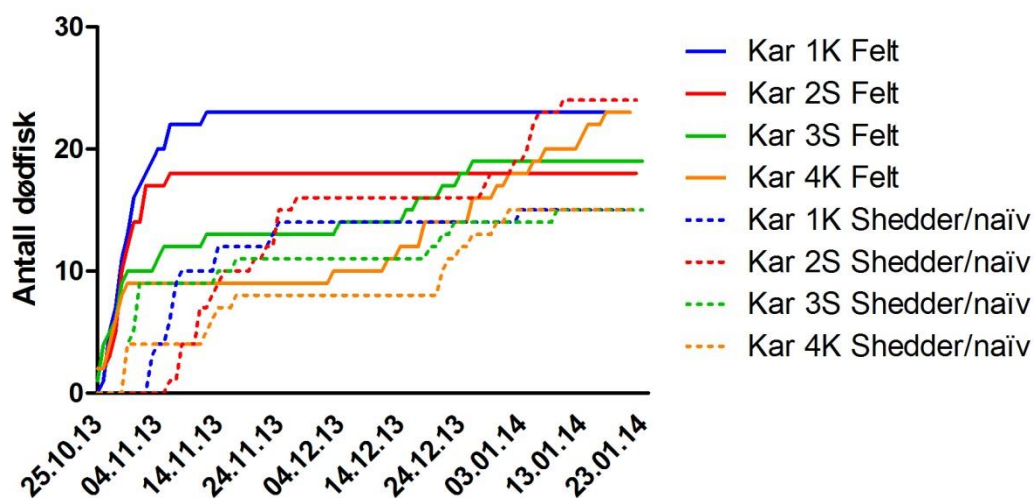
Etter at feltfisken ble tatt inn på ILAB 16. oktober 2013, fulgte en periode med svært mange svimere og dødfisk som ble plukket ut daglig før oppstart av forsøket. Denne dødeligheten fortsatte også noen dager etter oppstart før situasjonen stabiliserte seg i begynnelsen av november. Dødeligheten stanset først i karene ved 16 °C, før det omtrent en uke senere stanset i karene ved 8 °C. Antall dødfisk i kar 1 og 2 (8 °C) var henholdsvis 23 og 18 i midten av november, mens det var 13 og 9 dødfisk i kar 3 og 4 (16 °C) ved samme tidspunkt (se figur 11). I kar 1 og 2 var det ikke mer dødelighet blant feltfisken i den resterende perioden av forsøket. I kar 3 og 4 startet en liten økning i dødelighet i begge karene i begynnelsen av desember, som økte til en jevn dødelighet som varte til slutten av desember i kar 3, mens det i kar 4 fortsatte til forsøket ble avsluttet 22. januar (se figur 10 og 11).

Etter at sheddere ble tilsatt de første to gangene var det relativt stor dødelighet i alle kar og nesten alle sheddere døde. Etter siste tilsetning av sheddere og de ubehandlede fiskene var det derimot svært lite dødelighet sammenlignet med tidligere. Unntaket var kar 2, hvor 24 av 35 ubehandlede fisk og sheddere døde før forsøket ble avsluttet (se figur 10 og 11). Dødeligheten i karene ved 16 °C startet 5 dager etter injeksjon med SAV/EMEM, mens sheddere i karene ved 8 °C fikk dødelighet etter 9 og 12 dager i henholdsvis kar 1 og 2. Etter andre tilsetning av sheddere var det en ny økning i dødelighet i alle karene. Ved 8 °C døde nesten alle shedderene, mens omtrent halvparten av de tilsatte shedderene døde ved 16 °C. De første 3 ukene i desember var det ikke noe dødelighet blant verken sheddere eller ubehandlede fisk, men omtrent 19. desember, 6 dager etter siste tilsetning av sheddere, startet en liten økning i dødelighet i begge karene ved 16 °C som varte til 9. januar. Ved 8 °C var det kun økning i dødelighet i kar 2 som startet noe senere, og med høyere dødelighet enn ved 16 °C.



Figur 10: Akkumulert dødelighet i kar 1 til 4 fra oppstart 16. oktober 2013 til avslutning 24. januar 2014. De svarte linjene indikerer når sheddere og naïve fisk ble tilsatt i karene. **1)** 25. oktober, første tilsats av sheddere (10 fisk per kar) injisert med SAV/EMEM. **2)** 6. november, andre tilsats av sheddere (5 fisk per kar) injisert med SAV/EMEM. **3)** 11. desember, tilsats av ubehandlede fisk (10 fisk per kar). **4)** 13. desember, tredje tilsats av sheddere (10 fisk per kar) injisert med SAV/EMEM. **5)** 4. desember, prøveuttak (5 fisk per kar). **6)** 14. januar 2014, prøveuttak (5 fisk per kar).

Akkumulert dødelighet etter første tilsetning av sheddere



Figur 11: Akkumulert dødelighet blant feltfisk og sheddere/ubehandlede fisk etter første tilsetning av sheddere 25. oktober 2013.

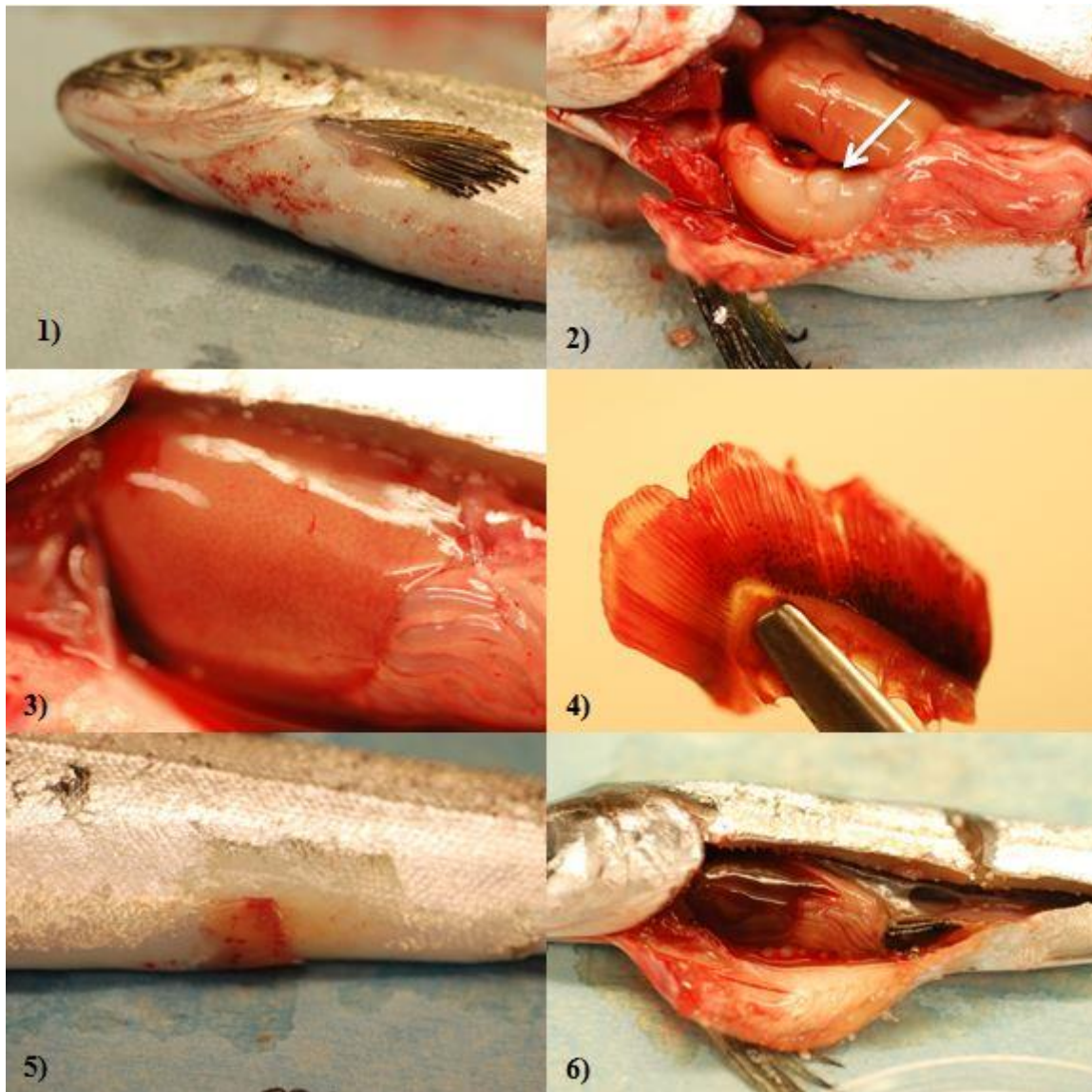
Etter 10. januar var det ikke dødelighet blant sheddere og ubehandlede fisk frem til forsøket ble avsluttet fra 21. til 24. januar 2014.

Det ble også gjennomført to prøveuttak fra alle karene i løpet av smitteforsøket. Ved det første uttaket, 4. desember 2013, ble det tatt ut 5 tilfeldige fisk fra hvert kar, uavhengig om de var sheddere eller feltfisk. Også 14. januar 2014 ble det tatt ut 5 fisk fra hvert kar, men da minst én feltfisk, én shedder og én ubehandlet fisk fra hvert kar. De to resterende ble tatt ut tilfeldig. Fiskene som ble tatt ut i forbindelse med prøveuttaket er ikke med i dødelighetsgrafene i figur 10, men datoene for uttakene er markert med nummer 5 og 6.

Prøvetaking og disseksjon

Vanlige ytre funn ved disseksjon av feltfisk i starten av forsøket var generelt mye erosjon av finner, skjelltap, og til tider også punktblødninger på buken og på gjellene. Indre funn var ofte tom tarm eller store mengder slim i både mage og tarm, og hos noen individer ble det også observert betennelse i baktarmen. Ellers var det ofte væske i svømmeblæren, ascites i bukhulen, lyse flekker i leveren, knudrete eller svullen milt, og redusert eller manglende fettvev i bukhulen (se figur 12). I tillegg hadde alle fiskene noe adheranser og melanin i bukhulen grunnet bivirkninger etter vaksinerings. Alle svimere ble avlivet ved slag i hodet, og i starten av forsøket blødde disse fiskene mye fra gjellene ved avliving. Slike blødninger ble ikke observert senere i forsøket. Det var ikke noen forskjell på dødfisken fra karene ved 8 og 16 °C i den første perioden etter oppstart. Dødeligheten stanset opp i begynnelsen av

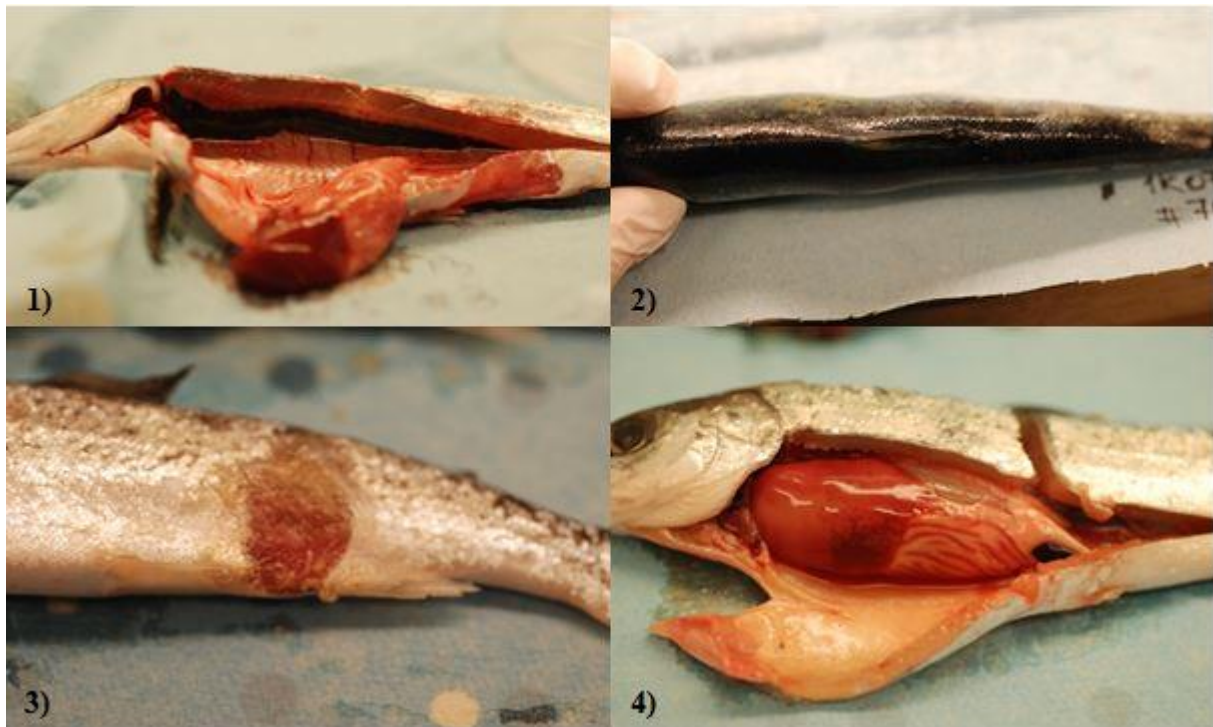
november og dette varte til begynnelsen av desember. 4. desember ble det gjennomført et prøveuttak fra alle karene. Av disse hadde noen av fiskene fra kar 1 og 2 litt erosjon på finner og hud, gult innhold i tarmen eller lite viceralfett. I kar 3 og 4 var det også noen fisk som hadde redusert mengde viceralfett, men de fleste hadde fôr i tarm og dermed god appetitt. Noen dager etter prøveuttaket startet en mindre økning i dødelighet blant feltfiskene i karene ved 16 °C. En del av disse fiskene var svært magre og de fleste hadde lite fettvev i bukhulen. Det var også en del erosjon på finner, samt skjelltap og begynnende sår i disse områdene. Ved prøveuttaket i januar var det ikke betydelig forskjell på fisk tatt fra kar ved 8 eller 16 °C, men fiskene fra 8 °C hadde lite viceralfett, men god appetitt. Fiskene fra 16 °C hadde noe erosjon av finner og skjelltap. Også disse hadde lite viceralfett med gult innhold i tarmen. Ved avslutning av karene ble det i kar 1 observert mye fisk med noe erosjon på finner, mens det i kar 2 var mange fisk med lite viceralfett og tom tarm. I kar 3 ble det observert stort sett det samme som i kar 2, men en del av fiskene hadde også lyse flekker i leveren. I kar 4 hadde mange feltfisk lyse flekker på gjellene i tillegg til at det ble observert skjelltap, blek lever og tom tarm.



Figur 12: Funn ved disseksjon av feltfisk. **1)** Punktblødninger på buken. **2)** Oppblåst magesekk fylt med slim, samt blødninger i viceralfett. Pilen indikerer hvor magesekken er snittet for å vise innholdet. **3)** Lever med lyse flekker. **4)** Gjelle med punktblødninger. **5)** Finneerosjon med skjelltap og punktblødninger i området rundt. **6)** «Pinne-fisk» med mørk lever, blodig ascites og lite viceralfett.

De første shedderene som døde etter injeksjon med SAV/EMEM døde svært raskt uten sviming, spesielt i karene ved 16°C. De fleste fiskene ved begge temperaturene hadde skoliose, noe erosjon på finner og begynnende sår langs halen med skjelltap i området rundt. Innvendig bar de tegn på manglende appetitt ettersom magesekken var tom, og mange hadde gult innhold i tarmen eller oppblåst mage og tarm med gul-hvitt slim, men ikke fôr (se figur 13). Enkelte individer hadde også blødninger eller lyse flekker i leveren. Forskjellen mellom 8 °C og 16 °C var at en del av shedderene som døde i starten ved 8 °C var uten noe synlig patologi, mens noen av dødfiskene fra 16 °C hadde bleke gjeller og hjerte i tillegg til funnene nevnt over. Det ble ikke observert fisk med skoliose etter 27. november 2013. Ved prøveuttaket 4. desember 2013 ble det kun tatt ut én shedder fra hvert kar ved 16 °C hvor fisken fra kar 3 hadde noe knudrete milt, mens fisken fra kar 4 hadde lyse flekker på gjellene, ellers ble det ikke observert noe utenom det vanlige. Etter tilsetning av naïve fisk og siste tilsetning av sheddere startet en ny økning i dødelighet blant både ubehandlede fisk og sheddere. Disse dødfiskene fra både 8 og 16 °C hadde noe erosjon på finner og enten tom tarm eller gult innhold i tarm. Ved uttaket ble det ved begge temperaturene observert erosjon på finner med noe blødninger, og ved 16 °C ble det også funnet knudrete milt hos to fisk. Når forsøket ble avsluttet ble det i kar 1 og 2 funnet en del fisk med slitte finner med blødninger og fôr i tarm. I kar 3 hadde en del fisk gult innhold i tarmen eller tom tarm, i tillegg hadde noen knudrete milt. Sheddere og ubehandlede fisk fra kar 4 hadde svært lite patologi og alle hadde fôr i tarmen. Kun en ubehandlet fisk hadde små-knudrete milt, mens en annen hadde lyse flekker på gjellene.

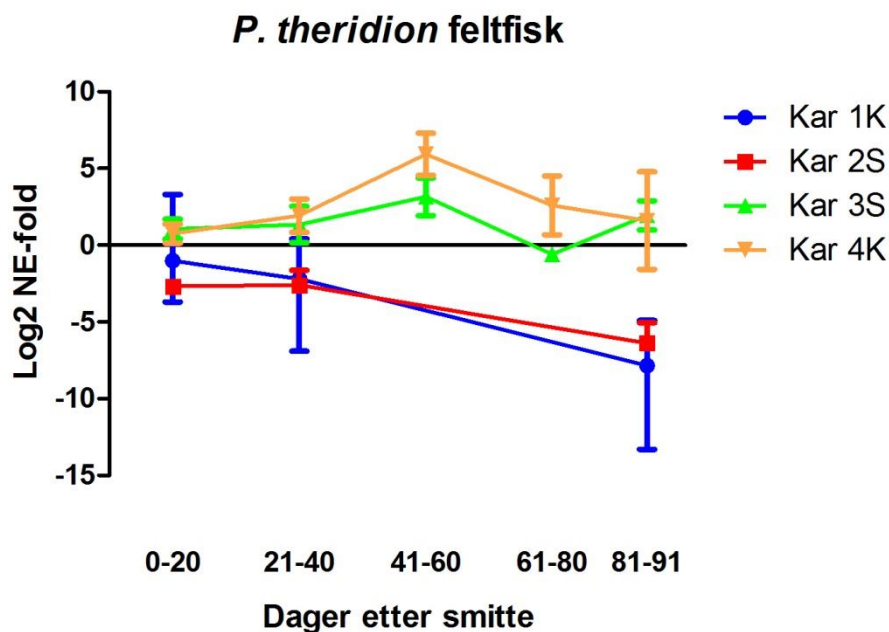
Når fisken fra felt ble tatt inn på ILAB, var de infisert med opp mot 10 lakselus per fisk. De fleste dødfiskene og svimere som ble tatt ut i starten av forsøket hadde også en del lus på seg, men etter hvert som forsøket varte, ble det observert stadig mindre lus. Innimellom ble det også funnet lus på sheddere, men da kun en til tre per fisk. Fra desember og til forsøket ble avsluttet i januar, ble det kun funnet lus på 21 % av fiskene ved 8 °C og 3 % av fiskene ved 16 °C som ble tatt ut og da kun én eller to lus per laks.



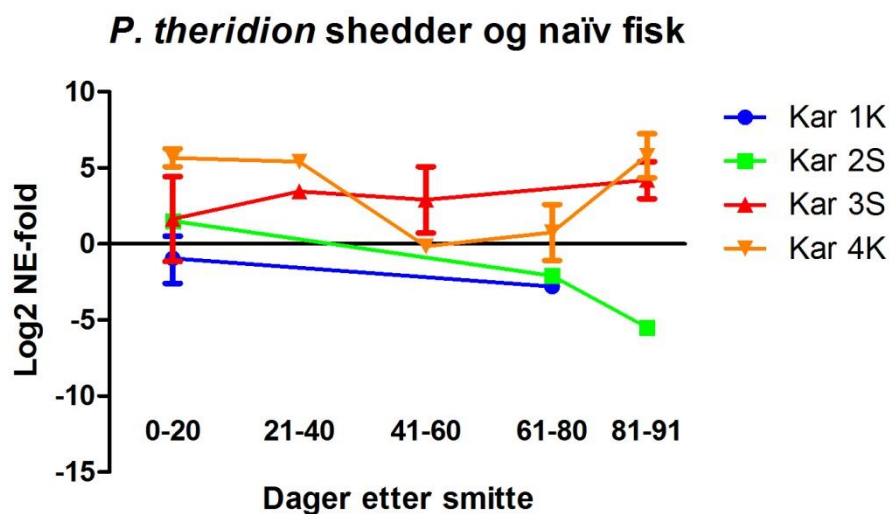
Figur 13: Funnt ved disseksjon av sheddere og naïve fisk. 1) og 2) Skoliose. 3) Sår i haleregionen. 4) Blødninger i leveren.

Real-time RT-PCR-resultater

Mye av fisken som døde i løpet av forsøket ble sjekket for *P. theridion* på gjellene og resultatene er vist som normaliserte verdier med folds-økning mot 0-prøveuttakene, og log₂ transformerte for å bedre visualisere resultatene (se figur 14 og 15). På feltfisken var det et tydelig skille mellom gruppene ved 8 og 16 °C, hvor mengden *P. theridion* gikk jevnt ned i karene ved 8 °C i forhold til gjennomsnittet ved 0-prøveuttaket. Mengden økte noe i karene ved 16 °C, men også her var det en nedgang på gjellene mot slutten av forsøket. Densiteten var likevel høyere enn 0-prøveuttaket. I shedderene og naïve fisk var det jevnere mellom de ulike temperaturgruppene frem mot slutten av forsøket hvor det ble sett en nedgang i mengde *P. theridion* i karene ved 8 °C, mens det var en økning i fiskene ved 16 °C. Også her var mengden *P. theridion* høyere enn 0-prøveuttaket ved 16 °C og lavere ved 8 °C. Ct-verdiene for sheddere og ubehandlede fisk ved siste prøveuttak og avslutning for begge karene ved 16 °C er vist i tabell 6.



Figur 14: Mengde *P. theridion* på gjellene til feltfisk som normaliserte verdier mot gjennomsnittet ved 0-prøveuttaket og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor. Kar 1: $N_{0-20}=18$, $N_{21-40}=5$, $N_{81-91}=4$. Kar 2: $N_{0-20}=18$, $N_{21-40}=5$, $N_{81-91}=5$. Kar 3: $N_{0-20}=13$, $N_{21-40}=4$, $N_{41-60}=4$, $N_{61-80}=1$, $N_{81-91}=5$. Kar 4: $N_{0-20}=8$, $N_{21-40}=4$, $N_{41-60}=4$, $N_{61-80}=7$, $N_{81-91}=3$.

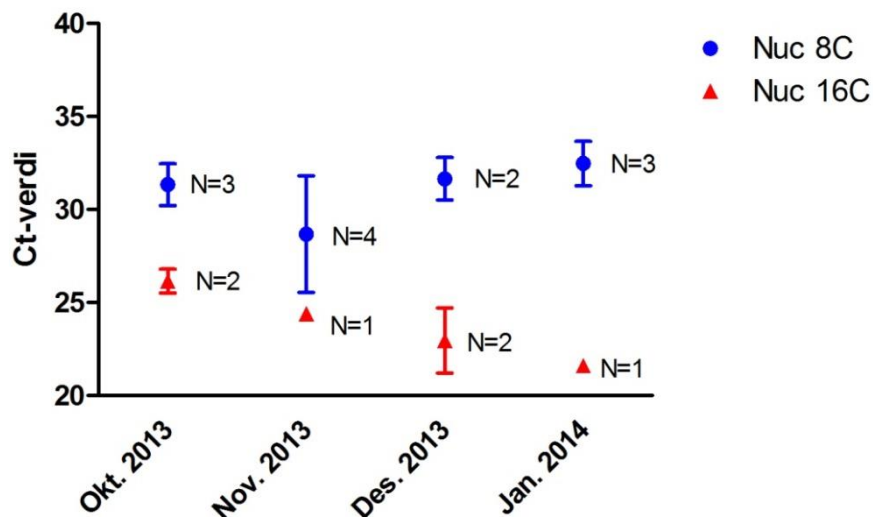


Figur 15: Mengde *P. theridion* på gjellene til sheddere og ubehandlede fisk som normaliserte verdier mot gjennomsnittet ved 0-prøveuttaket og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor. Kar 1: $N_{0-20}=6$, $N_{61-80}=1$. Kar 2: $N_{0-20}=1$, $N_{61-80}=1$, $N_{81-91}=1$. Kar 3: $N_{0-20}=3$, $N_{21-40}=2$, $N_{41-60}=3$, $N_{81-91}=12$. Kar 4: $N_{0-20}=3$, $N_{21-40}=1$, $N_{41-60}=2$, $N_{61-80}=2$, $N_{81-91}=14$.

Tabell 6: Oversikt over Ct-verdier for elongeringsfaktor og *P. theridion* hos sheddere og naïve fisk fra kar 3 og 4 på 16 °C ved prøveuttak 14. januar 2014 og ved avslutning 22. januar (kar 4) og 24. januar (kar 3)

Dato	#		Gjeller		Nyre		Hud	
			Ela	Nuc	Ela	Nuc	Ela	Nuc
Kar 3								
14.01.14	49	Shedder	14,7	26,2	15,6	23,2	17,4	24,7
14.01.14	51	Naïv fisk	15,1	26,9	14,7	Neg	18,7	27,8
24.01.14	56	Shedder	15,2	27,6	16,9	Neg	17,5	29,2
24.01.14	57	Shedder	13,3	28,9	14,3	35,2	17,1	28,5
24.01.14	58	Shedder	15,5	19,0	15,3	15,0	20,1	26,7
24.01.14	59	Shedder	16,9	31,7	16,0	28,5	16,8	27,4
24.01.14	60	Shedder	15,0	28,9	17,4	35,3	16,5	31,4
24.01.14	61	Shedder	13,9	33,2	15,2	Neg	19,4	35,5
24.01.14	62	Naïv fisk	13,6	29,3	16,0	34,5	19,2	28,9
24.01.14	64	Shedder	14,0	29,9	15,1	35,3	15,7	27,5
24.01.14	65	Naïv fisk	15,7	33,2	17,2	35,0	17,4	30,2
24.01.14	66	Naïv fisk	14,8	28,2	17,0	33,9	16,4	28,7
Kar 4								
14.01.14	46	Shedder	14,2	30,7	16,7	Neg	17,8	32,4
14.01.14	47	Naïv fisk	13,9	30,0	15,7	Neg	17,4	28,2
14.01.14	48	Shedder	13,7	18,8	15,7	15,0	16,4	20,0
14.01.14	49	Shedder	14,1	26,7	15,0	18,1	16,3	26,4
22.01.14	53	Naïv fisk	16,7	31,1	16,4	Neg	16,4	26,3
22.01.14	57	Shedder	15,6	27,3	17,0	Neg	16,2	27,5
22.01.14	58	Naïv fisk	14,2	20,4	14,9	19,4	16,3	25,5
22.01.14	59	Naïv fisk	13,8	28,2	15,4	34,6	18,7	30,0
22.01.14	60	Naïv fisk	13,1	29,6	14,4	Neg	16,3	26,8
22.01.14	61	Shedder	14,2	31,2	17,6	Neg	16,1	30,7
22.01.14	63	Naïv fisk	14,5	31,7	18,5	34,7	18,4	30,2
22.01.14	64	Naïv fisk	13,3	28,9	19,0	Neg	15,7	28,6
22.01.14	66	Naïv fisk	15,3	21,3	14,0	18,1	17,2	24,3
22.01.14	68	Naïv fisk	15,7	18,5	14,1	14,5	18,5	15,8

Ct-verdier for *P. theridion* på lakselus



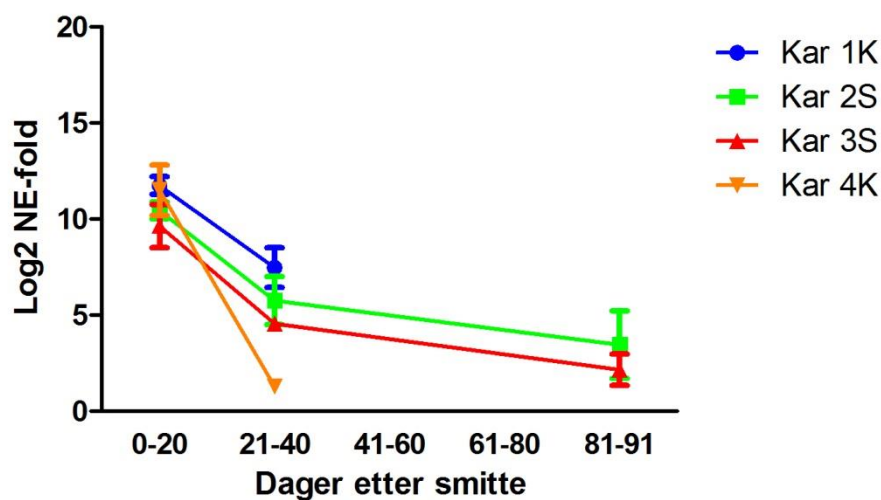
Figur 16: Ct-verdier for *P. theridion* på lus plukket fra fisk ved både 8 og 16 °C i løpet av forsøket. De vertikale linjene viser området Ct-veridene ligger innenfor.

Det ble valgt ut noen lakselus som ble plukket av dødfisk, svimere og ved prøveuttak på omtrent samme tidspunkt i alle karene i oktober, november, desember og januar. Disse lusene ble sjekket for *P. theridion* og resultatene er vist i figur 16. På lik linje med fiskene er det skille mellom gruppene ved hver temperatur, hvor lus ved lav temperatur hadde lite *P. theridion*, mens lus fra 16 °C hadde lavere C_T-verdier.

Kar 2 og 3 ble smittet med SAV ved tilsetting av sheddere, men kun få av feltfiskene i kar 2 var positive for SAV på gjellene ved prøveuttaket 4. desember 2013, og da kun svakt positive (C_t > 25). Ved prøveuttaket 14. januar og ved avslutning av forsøket var feltfiskene negative for SAV. I kar 3 derimot var ingen av de undersøkte feltfiskene positiv for SAV på noe tidspunkt under forsøket eller ved avslutning. Alle undersøkte shedderene fra begge karene var positive.

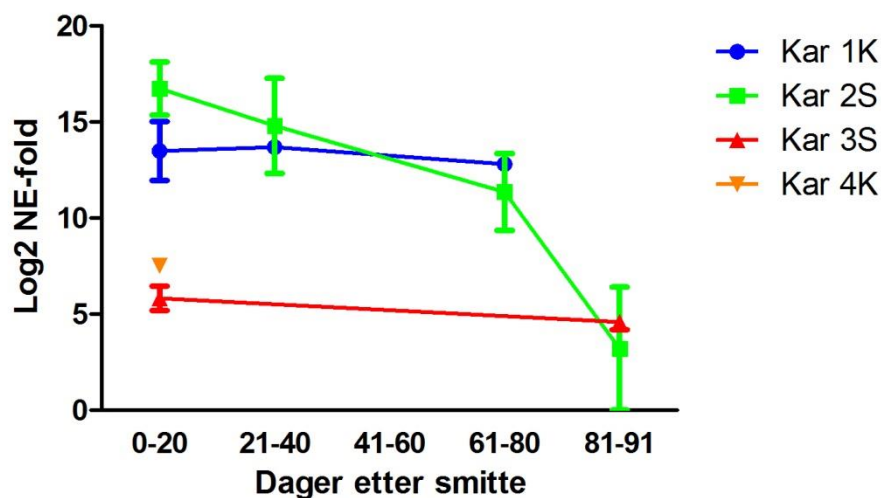
Mesteparten av fiskene som ble tatt ut i løpet av forsøket ble også sjekket for *Tenacibaculum* spp. på grunn av den uventede dødeligheten blant både feltfisk og sheddere. Også her ble C_t-verdiene normalisert, men med folds-økning mot minste normaliserte verdi for feltfisk og naïve fisk/sheddere i kar 1 til 4 etter oppstart (se figur 17 og 18). I feltfiskene var det jevne mengder *Tenacibaculum* spp. ved 8 og 16 °C i starten av forsøket. I løpet av dag 21 til 40 sank densiteten i alle karene, og etter dag 41 ble det kun funnet *Tenacibaculum* spp. i fisk fra kar 2 og 3, men kun i lave mengder. I sheddere og ubehandlede fisk ble det funnet høyere densitet i karene ved 8 °C enn ved 16 °C fra starten av forsøket. I kar 4 ble det kun funnet fisk som var positive for *Tenacibaculum* spp. de første 20 dagene etter oppstart, mens det i kar 3 ble funnet noen svakt positive ved avslutning av forsøket. I karene ved 8 °C var det høye mengder *Tenacibaculum* spp. gjennom stort sett hele forsøket, mens verdiene falt til samme nivå som ved 16 °C ved forsøksslutt.

Tenacibaculum spp. feltfisk



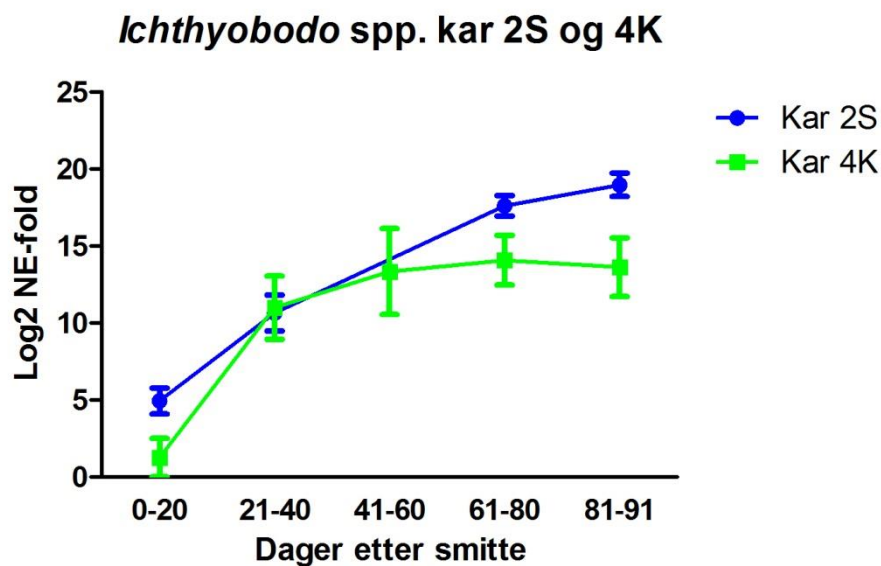
Figur 17: Mengde *Tenacibaculum* spp. på gjellene i feltfisk som normaliserte verdier mot laveste NE i alle karene og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor. Kar 1: $N_{0-20}=17$, $N_{21-40}=5$. Kar 2: $N_{0-20}=18$, $N_{21-40}=2$, $N_{81-91}=3$. Kar 3: $N_{0-20}=10$, $N_{21-40}=1$, $N_{81-91}=3$. Kar 4: $N_{0-20}=5$, $N_{21-40}=1$.

Tenacibaculum spp. shedder og naiv fisk



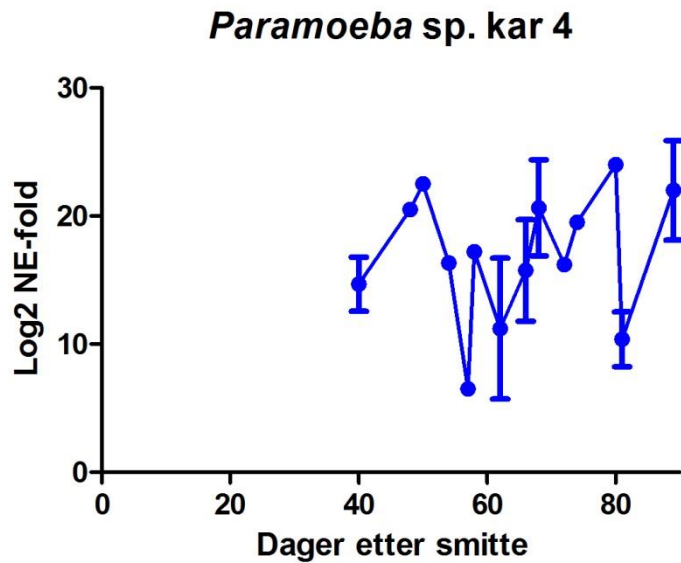
Figur 18: Mengde *Tenacibaculum* spp. på gjellene i sheddere og naive fisk som normaliserte verdier mot laveste NE i alle karene og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor. Kar 1: $N_{0-20}=9$, $N_{21-40}=1$, $N_{61-80}=1$. Kar 2: $N_{0-20}=8$, $N_{21-40}=6$, $N_{61-80}=5$, $N_{81-91}=2$. Kar 3: $N_{0-20}=4$, $N_{81-91}=2$. Kar 4: $N_{0-20}=3$, $N_{21-40}=5$.

De fleste fiskene i alle karene ble også sjekket for *Ichthyobodo* spp. hvor det til tider ble registrert noen få svakt positive individer i kar 1 og 3. I kar 2 og 4 derimot ble det observert en økning i løpet av forsøket, spesielt i kar 2 hvor densiteten økte frem til forsøket ble avsluttet. Prevalensen i den siste perioden før avslutning var 100 % og laveste Ct-verdi var 13,9 i kar 2. I kar 4 var det en betydelig økning i mengde *Ichthyobodo* spp. fra starten av forsøket og til dag 21 tilsvarende som i kar 2, men i den siste perioden av forsøket og frem til avslutning var densiteten betydelig lavere i kar 4 enn i kar 2 (Ct > 16), og prevalensen var 82 % (se figur 19).



Figur 19: Mengde *Ichthyobodo* spp. på gjellene i alle fiskegruppene i kar 2 og 4 som normaliserte verdier mot laveste NE i karene og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor. Kar 2: $N_{0-20}=13$, $N_{21-40}=11$, $N_{61-80}=5$, $N_{81-90}=7$. Kar 4: $N_{0-20}=2$, $N_{21-40}=5$, $N_{41-60}=5$, $N_{61-80}=6$, $N_{81-90}=6$.

Tilsvarende som med *Ichthyobodo* spp. ble mange fisk sjekket for *Paramoeba* spp. i alle karene og kun få individer var positive med unntak av kar 4. Ingen av fiskene som ble prøvetatt fra kar 4 som var positive før dag 40, men deretter var det en gradvis økning frem mot avslutning (se figur 20). Enkelte fisk hadde Ct-verdier under 10, og prevalensen var 96 % den siste perioden før avslutning.

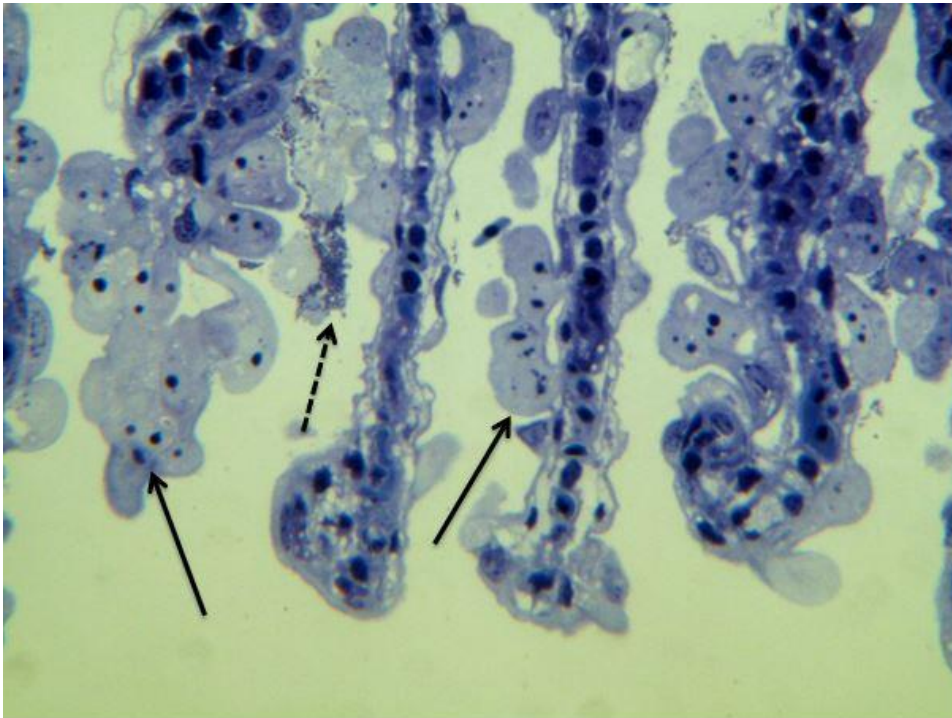


Figur 20: Mengde *Paramoeba* spp. på gjellene i alle fiskegruppene i kar 4 som normaliserte verdier mot gjennomsnittet ved 0-prøveuttaket og Log2 transformert. De vertikale linjene viser området verdiene ligger innenfor.

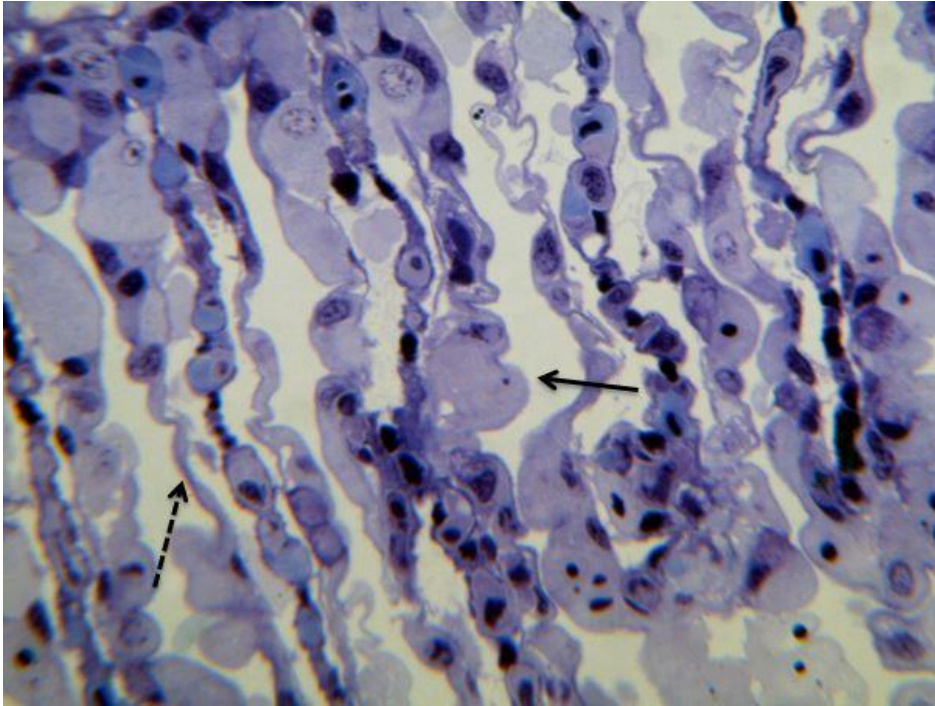
Gjellene fra 0-prøveuttaket og fra en del fisk fra kar 1 til 4 ble også sjekket for ‘*Ca. B. cysticola*’. Det ble funnet svakt positive fisk blant både felt- og naïve fisk ved 0-prøveuttakene. I karene ved 8 °C ble det ikke sett noen økning i mengde verken i feltfisken eller sheddere/naïve fisk. I karene ved 16 °C ble det mot slutten av forsøket sett en kraftig økning i mengde ‘*Ca. B. cysticola*’ med Ct-verdier på under 20.

Histopatologi

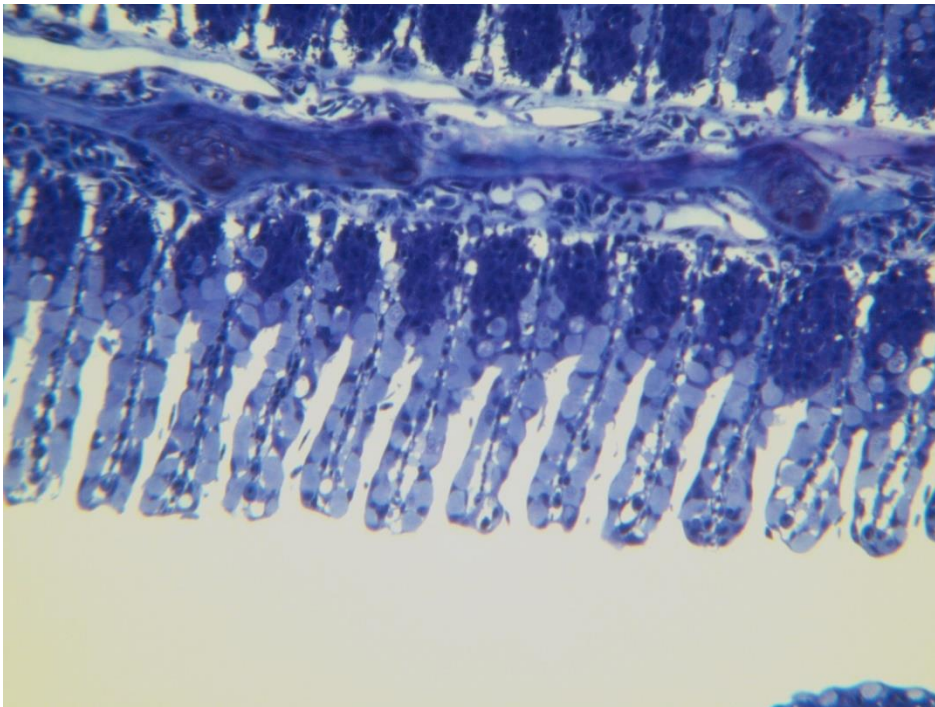
De histologiske funnene var felles for både feltfisk og ubehandlede fisk, og for begge temperaturgruppene. I tillegg var det ingen forskjell på om fiskene var svimere som var avlivet eller om de var tilsynelatende frisk fisk tatt ut i forbindelse med prøveuttak. Generelt var det mye gjelle-patologi i alle karene, og det ble observert mest hyperplasi, hypertrofi, degenerasjon og lifting av epitelceller. Det var også tilstedeværelse av *Tenacibaculum*-lignende bakterier og kokkoide bakterier på gjellene til enkelte fisk. I nyrene ble det funnet langt flere leukocytter enn erythrocytter i blodkarene i tillegg til en mulig økning av melanomakrofager i det haematopoetiske vevet. Det ble funnet epikarditt i én feltfisk ved 16 °C som ble tatt ut like etter oppstart av forsøket, ellers ble det ikke observert endringer i verken hjerte eller hud (se figur 21 til 26).



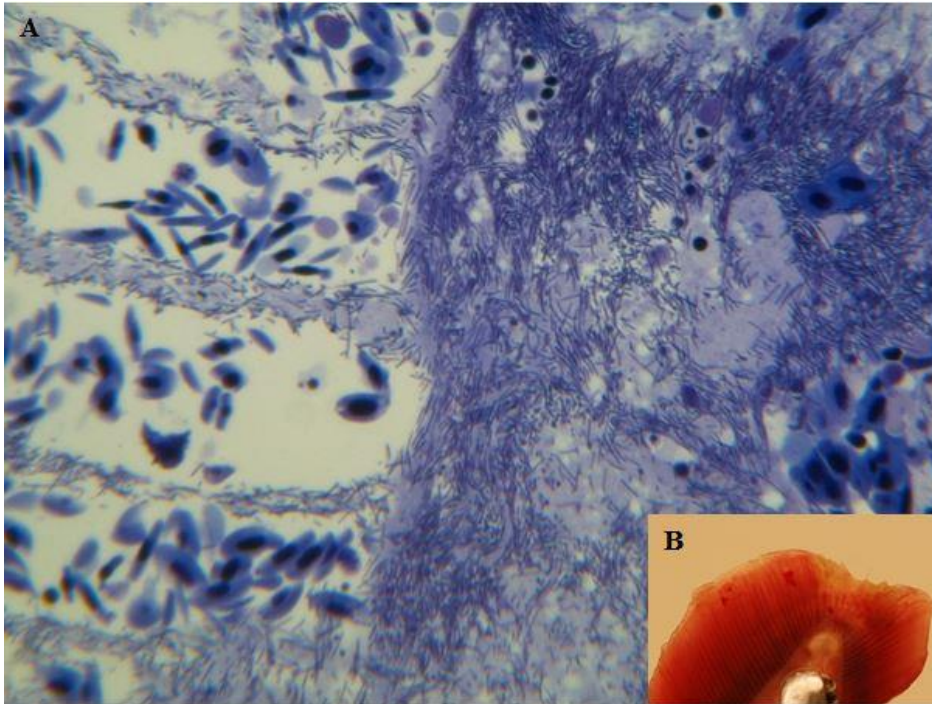
Figur 21: Nekrotiske gjeller med bakterieinfeksjon fra feltfisk i kar 1 avlivet ved avslutning 21. januar 2014. De hele pilene viser områder med hypertrofe, nekrotiske celler på sekundærlameller. Den stiplede pilen viser en klynge med kokkoide bakterier.



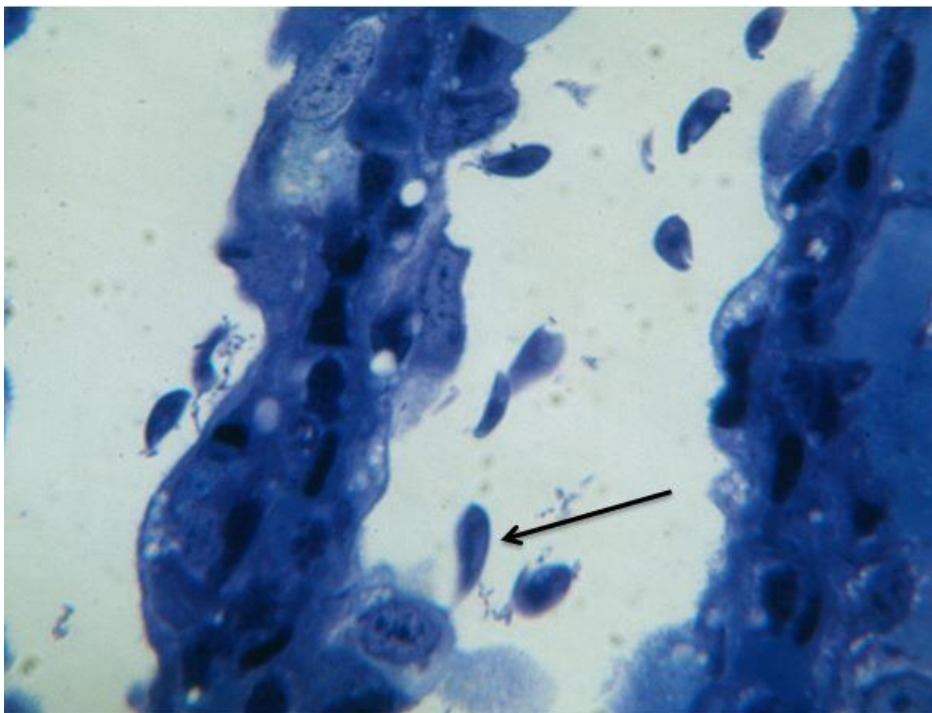
Figur 22: Sekundærlameller med nekrose og lifting fra en shedder i kar 3 avlivet ved uttak 14. januar 2014. Den hele pilen viser en av flere hypertrofe, nekrotiske celler. Den stiplede pilen viser et område med lifting av epitelceller fra pillarcecellene.



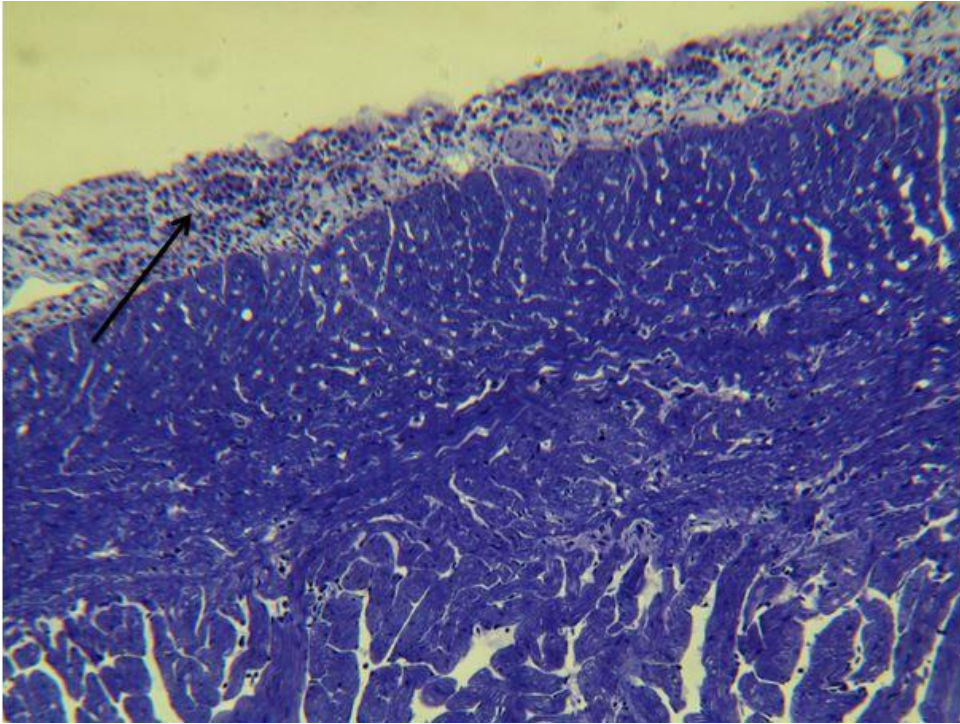
Figur 23: Hypertrofi på sekundærlameller fra feltfisk i kar 3 som ble avlivet på grunn av apatisk adferd 26. oktober 2013. De hypertrofe cellene antas å være kloridceller, i så fall er det både hyperplasi og hypertrofi av kloridceller.



Figur 24: Shedder fra kar 2 kraftig infisert med *Tenacibaculum*-lignende bakterier på gjellene. Fisken ble avlivet på grunn av apatisk adferd 11. november 2013. **A)** Både primær- og sekundærlamellene er borte, og strukturene kan kun kjønes igjen på grunn av de store mengdene med stavformede bakterier. **B)** Gjelle fra samme fisken som er kraftig nekrotisert på grunn av bakterieinfeksjon.



Figur 25 *Ichthyobodo*-lignende parasitt på gjellen til en shedder som ble avlivet ved uttak 14. januar 2014 fra kar 2. Pilen viser en av parasittene som er festet til en nekrotisk celle på sekundærlamellen.



Figur 26: Epikarditt hos feltfisk som ble avlivet 26. oktober 2013 på grunn av apatisk adferd.

Diskusjon

Utvikling av *Paranucleospora theridion*

I felt er det observert at infeksjon med *P. theridion* gir problemer ved temperaturer på over 10 °C (Matthews et al., 2013, Nylund et al., 2011, Staveland, 2010, Steinum et al., 2010, Sveen et al., 2012). Dette er også vist for andre fiske-mikrosporidier som *Glugea stephani* (McVicar, 1975, Olson, 1981) og *Loma salmonae* (Sanchez et al., 2000, Shaw et al., 2000) hvor infeksjon stopper opp ved lave temperaturer, og blusser opp igjen når temperaturen stiger. I forsøk A er det et klart skille i mengde *P. theridion* mellom karene ved 8 og 16 °C. Det er spesielt tydelig på feltfiskene hvor fisk fra kar ved 16 °C hadde langt høyere nivåer av *P. theridion* enn fisk som gikk ved 8 °C. Blant sheddere og ubehandlede fisk er trenden litt mer uklar, men mot slutten av forsøket ble det likevel et skille med en lignende tendens som hos feltfisken i forhold til gjennomsnittet ved 0-prøveuttaket. Resultatene i dette forsøket støtter opp under de dataene som er observert i felt hvor det er en positiv korrelasjon mellom temperaturer over 10 °C og mengde *P. theridion* (Matthews et al., 2013, Nylund et al., 2011, Staveland, 2010, Steinum et al., 2010, Sveen et al., 2012).

P. theridion infiserer både laks og lakselus, og det er derfor antatt at hyperparasitten stort sett forekommer langs kysten hvor begge vertene er tilgjengelig (Staveland, 2010). I de fleste tilfeller er *P. theridion* funnet på fisk langs kysten av Norge og Skottland (Freeman et al., 2003, Freeman & Sommerville, 2009, Matthews et al., 2013, Miller et al., 2013, Nylund et al., 2011, Nylund et al., 2010, Staveland, 2010, Steinum et al., 2010), men det er også funnet salmonider i ferskvann som var positive for *P. theridion* etter opphold i sjøvann (Staveland, 2010). *L. salmonae* er vist å opptre i ferskvann og brakkvann uten at det er betydelige forskjeller under infeksjon (Becker & Speare, 2007). I forsøk A ble saliniteten holdt ved 25 ‰ for å forhindre sårskader på fisken. Ettersom *P. theridion* blir registrert i områder som til tider er utsatt for brakkvann, for eksempel fjorder, og at det ble observert en økning i mengde *P. theridion* ved 16 °C, er det mulig at saliniteten ikke har påvirket oppformering av mikrosporidien i fisken. I fremtidige studier derimot, kunne det vært interessant å finne ut om salinitet kan ha en effekt på infeksjon med *P. theridion*.

Spredning av *Paranucleospora theridion*

P. theridion har en livssyklus som inkluderer sporedannelse i både laks og lakselus, men det er fortsatt uvisst hvordan sporer fra lus frigis til vannmassene (Freeman & Sommerville, 2009, Nylund et al., 2010). Det er ikke kjent om *P. theridion* kan smitte fra laks til laks, men Sveen et al. (2012) har vist at laks kan bli infisert med *P. theridion* før påslag med lus. I dette tilfellet ble det antatt at sporer var frigitt fra lus og transportert med vannstrømmer, og slik infiserte laksen. I forsøk B ble sporer av *P. theridion* samlet inn fra naturlig infisert lakselus, og naïv atlantisk laks ble eksponert for disse i 10 timer. Mikrosporidier smitter vertsceller ved at poltuben i sporene vrenses ut med en så stor kraft at den penetrerer vertscellens membran, slik at sporoplasma blir overført direkte til cellens cytoplasma eller nukleoplasma (Cali & Takvorian, 1999, Rodriguez-Tovar et al., 2003). Denne germineringsprosessen blir først igangsatt av en aktivering av sporen før poltuben blir trigget til utskyting. Både aktivering og utskyting av poltuben er vist å være avhengig av en rekke ulike faktorer som fysiske og kjemiske stimuli, og varierer mellom ulike mikrosporidier (Keohane & Weiss, 1999). Germinering hos *L. salmonae* og *G. stephani* kan for eksempel aktiveres ved inkubering i henholdsvis 1,5 og 3 % hydrogenperoksid (Amigó et al., 1996, Shaw et al., 2000). Til tross for gjentatte forsøk med både kjemiske, fysiske og biologiske stimuli, har man enda ikke fått germinering av *P. theridion* sporer *in vitro* (pers. kom. Steffen Blindheim). Det er gjennomført vellykkede eksperimentelle smitter med flere mikrosporidier på fisk, blant annet *Nucleospora salmonis* og *L. salmonae* på salmonider, og *G. stephani* på flatfisk (Baxa-Antonio et al., 1992, Becker & Speare, 2004, Hedrick et al., 1991, McVicar, 1975, Olson, 1981, Shaw et al., 1998, Wongtavatchai et al., 1995), men disse brukte i.p.-smitte, føring med infisert vev og kohabitantsmitte, og badsmitte av fisk med mikrosporidier har ikke vært vellykket (Figueras et al., 1992, McVicar, 1975). Smitteforsøket med *P. theridion* i forsøk B var ikke vellykket, og det ble kun registrert en kortvarig økning i densitet med *P. theridion* på gjellene like etter smitte. Sporene som ble brukt til badsmitten var samlet inn fra både tungt infiserte lus og noen lus med lettere infeksjoner av *P. theridion*. Dette burde gi en stor andel modne sporer (Økland, 2012), men det kan være mulig at *P. theridion* sporer trenger lengre modning i lus eller bli utsatt for ukjente faktorer for å bli aktivert og infektive for laksen. Tidligere smitteforsøk med *P. theridion* sporer fra lus og autoinfektive sporer fra nyren til infisert laks, har vist at de er infektive og kan gi paranucleosporose hos laks når de injiseres intravenøst (pers. kom. A. Nylund).

Det er vist at sporer fra blant annet *L. salmonae* og *G. stephani* er svært stabile ved ulike temperaturer og saliniteter (Amigó et al., 1996, Shaw et al., 2000), men dette er fortsatt ukjent for *P. theridion*. Ved et tilsvarende eksperiment som forsøk B, ble sporer oppbevart ved 4 °C i 1-3 uker før badsmitte av laks ble gjennomført. I dette tilfellet ble ikke fisken infisert med *P. theridion* (pers. kom. Steffen Blindheim). Derfor ble sporene i forsøk B oppbevart ved samme temperatur som vanntemperaturen de ble hentet fra (11 °C) frem til smitten ble gjennomført, mens selve smitten foregikk i bad ved 8 og 16 °C. Variasjonene i temperatur kan ha inaktivert sporene eller aktivert germinering for tidlig. Smitten ble gjennomført ved 30 ‰, og to dager etter smitte ble saliniteten satt ned til 25 ‰ på grunn av sårddannelser på fisken. Som nevnt er flere mikrosporidier avhengig av ytre stimuli for utskytning av poltuben (Keohane & Weiss, 1999) og det kan hende at det manglet slike forhold under badsmitten slik at utskytning av poltuben ikke ble trigget. I tillegg må det også tas til betraktning at laks i felt sannsynligvis blir utsatt for sporer over lengre perioder enn det vi hadde mulighet til å gjennomføre i dette smitteforsøket, og at *P. theridion* kan være avhengig av en lengre eksponeringsperiode for å infisere laksen.

Flere av de vellykkede smitteforsøkene med blant annet *L. salmonae* og *N. salmonis* ble gjennomført ved kohabitering hvor mikrosporidieinfeksjonen sannsynligvis ble spredt fra fisk til fisk, både ved direkte kontakt og ved vannbåren smitte. Shedderene ble i disse tilfellene infisert ved intraperitonalt, intramuskulært eller oralt (Baxa-Antonio et al., 1992, Becker & Speare, 2004, Shaw et al., 1998). Det er også foreslått at enkelte mikrosporidier kan akkumuleres i transportverter, som for eksempel små copepoder, før de infiserer fisken oralt eller ved direkte kontakt (Figueras et al., 1992, Stunkard & Lux, 1965). Ettersom det utføres grundig filtrering og vannbehandling ved ILAB er dette derimot lite sannsynlig i forsøk A, hvor det mot slutten av forsøket ble observert en økning i mengde *P. theridion* i sheddere og ubehandlede fisk i karene ved 16 °C. I felt er det sett at laks kan infiseres ved «badsmitte» uten direkte kontakt med lakselus (Sveen et al., 2012). I forsøk A minket antall lus raskere i karene ved 16 °C enn i karene ved 8 °C og det kan ikke utelukkes at lusen døde som følge av infeksjon med *P. theridion*. Økningen i mengde *P. theridion* hos sheddere og naïv fisk kan være forårsaket av sporer frigitt fra de få gjenværende lusene, eller ved smitte med sporer frigitt fra feltfiskene. Denne observasjonen bør følges opp i nye studier.

Kohabitantsmitte med SAV

Et av målene med studiet var å se om mengde *P. theridion* kan påvirke utvikling av PD etter SAV-smitte. Miller et al. (2013) observerte immunsuppresjon hos salmonider som var infisert med *P. theridion*. Tilsvarende er også observert ved eksperimentell smitte med mikrosporidier hvor infeksjonen har ført til cellulær immunrespons og lave hematokritnivåer (Figueras et al., 1992, Hedrick et al., 1991). For å se om *P. theridion* kan være en medvirkende faktor for utvikling av PD hos SAV-smittet laks, ble det valgt å bruke vaksinert laks. Dette ble blant annet gjort for å simulere forholdene til oppdrettslaks på Vestlandet hvor det meste av laksen er vaksinert mot SAV. Tidligere har det vært gjennomført flere smitteforsøk hvor fisken ble smittet med SAV selv om den var PD-vaksinert (Karlsen et al., 2012, pers. obs. Are Nylund), og dette er også hovedregelen for all fisk som får PD på Vestlandet. Fisken som ble brukt i forsøk A var vaksinert 9. til 19. juli 2013, 2 måneder før utsett og mer enn 3 måneder før kohabitantsmitten med SAV. Ifølge produsenten får laksen begynnende immunitet fra 500 døgngrader til 12 måneder etter vaksinerings, så laksen skulle være godt immunisert når SAV-sheddere ble tilsatt i karene. Alle shedderene som ble injisert med SAV, var positiv for SAV kort tid etter smitte, og det er vist at SAV frigis fra sheddere ved 4 til 13 dager etter smitte ved 12 °C (Andersen et al., 2010). Selv om det var en del dødelighet blant sheddere de to første gangene etter at de ble injisert med SAV og tilsatt i karene med feltfisken, er det mulig at fiskene hadde begynt å frigi virus i karet før de døde. Etter tredje tilsetning av sheddere overlevde de fleste av disse. Mesteparten av de ubehandlede fiskene som ble tilsatt i karene 11. desember 2013 ble infisert med SAV, og det er derfor klart at feltfiskene ble eksponert for SAV uten å bli smittet. I likhet med virus er mikrosporidier intracellulære parasitter (Cali & Takvorian, 1999), og det er mulig at en mikrosporidieinfeksjon vil stimulere produksjonen av interferon og Mx-proteiner, og dermed gjøre verten mer motstandsdyktig mot andre infeksjoner (Robertsen, 2006, Robertsen et al., 2003). I dette forsøket ble det ikke observert forskjeller i infeksjonssuksessen til SAV hos feltfisk, med unntak av 3 positive fisk ved 8 °C 4. desember 2013, og det er dermed sannsynlig at vaksinen har fungert og hindret utvikling av viruset i fisken og dermed utvikling av sykdom i dette tilfellet.

Årsak til dødelighet

Som nevnt innledningsvis var et av målene med studiet å se etter en eventuell sammenheng mellom *P. theridion* og SAV, og eventuell dødelighet i forbindelse med disse patogenene.

Imidlertid opplevde vi stor dødelighet hos feltfisk allerede i akklimatiseringsfasen før selve forsøket ble igangsatt. Videre var det uventet dødelighet blant shedderene som ble injisert med SAV og EMEM. Mot slutten av forsøket opplevde vi ny dødelighet blant feltfisk og sheddere som ikke kan relateres til SAV-smitten.

Fellesnevner ved dødelighet hos både feltfisk og sheddere er at de ved histologisk undersøkelse hadde betydelig gjellepatologi. Patologien var ikke forenelig med patologien man finner ved infeksjon av *P. theridion* (Matthews et al., 2013, Nylund et al., 2011, Nylund et al., 2010). Det ble heller ikke observert patologiske endringer i noen andre vev som kan relateres til SAV (Andersen et al., 2010, Christie et al., 2007, McLoughlin et al., 2002, Taksdal et al., 2007).

Feltfisken som ble brukt i forsøk A var sjøsatt omtrent en måned før inntak til forsøksfasilitetene. Smolten hadde dermed nylig gjennomgått betydelige osmoregulatoriske endringer i forbindelse med smoltifisering, og kunne derfor fortsatt være sårbar for stress og håndtering. Når fisken ble hentet fra felt ble den utsatt for både håndtering og stress i tillegg til at de ble overført til kar med lavere temperatur enn temperaturen i felt. Det er vist at stress kan ha betydelige konsekvenser for salmonider ved at blant annet immunforsvaret kan påvirkes og svekkes, spesielt hvis stress foregår over lengre tid (Barton et al., 1986, Fast et al., 2008, Maule et al., 1989, Wiik et al., 1989). Dødfiskene ble sjekket for flere patogener, men det ble kun funnet *P. theridion*, *Tenacibaculum* spp og *Vibrio* spp. (resultater ikke vist). Årsaken til dødeligheten ble ikke identifisert, men dersom immunforsvaret ble svekket i forbindelse med håndteringen, kan fisken ha fått problemer med den eksisterende infeksjonen av *P. theridion*, *Tenacibaculum* spp. eller eventuelle andre patogener som ikke ble identifisert, men som kan ha forårsaket gjellepatologien som ble observert ved histologi. Disse patogenene kan i så tilfelle ha fulgt med fisken fra felt, eller infeksjon kan ha skjedd etter inntak til forsøksfasilitetene mens fisken var svekket på grunn av stress.

Laksen som ble brukt som sheddere i forsøk A var også nylig smoltifisert og ble utsatt for stress ved håndtering og injeksjon av SAV eller EMEM. Shedderene som ble tilsatt 25. oktober 2013 ble i tillegg injisert i løpet av en periode hvor temperaturen ble hevet og senket til de ønskede temperaturene for forsøket. Det er derfor tenkelig at shedderene var, på lik linje med feltfiskene, ekstra sårbare og mottakelig for infeksjoner. Dersom shedderene var av dårlig kvalitet, kan det være mulig at de hadde lavere toleranse for stress og håndtering. I

motsetning til feltfiskene, var shedderene uvaksinert. Vaksinerer aktiverer immunforsvaret og kan derfor gjøre fisken mer motstandsdyktig for andre patogener enn det som de blir vaksinert mot. Det er for eksempel vist kryssbeskyttelse for noen bakterier ved vaksinerer (Gudmundsdóttir & Gudmundsdóttir, 1997, Hoel et al., 1998). Det kan være mulig at feltfiskene var mer motstandsdyktige mot patogener enn shedderene ettersom de var vaksinert, og dette kan muligens forklare hvorfor dødeligheten stanset opp blant feltfisk, mens den fortsatte blant shedderene. *Tenacibaculum* spp. er bakterier som gjerne assosieres med hudsår, men er også funnet i bakterielle infeksjoner på gjellene til fisk og assosieres med dødelighet (Handlinger et al., 1997, Olsen et al., 2011, Powell et al., 2004). Det ble funnet en del *Tenacibaculum* spp. på gjellene til shedderene, i større grad enn på feltfiskene, og ved histologi ble det sett at *Tenacibaculum*-lignende bakterier ga betydelige skader på gjellene til en shedder. Med slike skader på gjellene, vil fisken får respirasjonsproblemer som kan føre til dødelighet.

Mot slutten av forsøket ble det observert en ny økning i dødelighet blant hovedsakelig feltfiskene ved 16 °C og sheddere og naïve fisk ved 8 °C i kar 2. I forbindelse med dette ble det påvist gjellepatogenene *Paramoeba perurans* (resultater fra sekvensering ikke vist) i kar 4 og *Ichthyobodo* spp. i kar 2 og 4. Begge parasittene fører til skader på gjellene og er assosiert med dødelighet (Crosbie et al., 2012, Steinum et al., 2008, Todal et al., 2004).

Konklusjon og fremtidsperspektiver

I dette forsøket er det vist at det er en positiv korrelasjon mellom temperaturer over 10 °C og mengde *P. theridion* hos laks, og at dette stemmer overens med de data som er observert i felt. Videre er det vist at det kan være mulig at *P. theridion* overføres fra fisk til fisk uten at lus er tilstede, og dette bør undersøkes i senere studier. Det vil også være viktig å finne ut hvordan sporene aktiveres og hvordan sporene frigis fra lusen med henblikk på fremtidige smitteforsøk.

Ettersom SAV-smitten av feltfisk ikke var vellykket kan det være interessant å se om det var infeksjonen med *P. theridion* eller vaksinen som var den viktigste årsaken til dette. Et smitteforsøk med både vaksinerte og uvaksinerte laks infisert med *P. theridion* vil kanskje gi et klarere bilde av et eventuelt samspill mellom *P. theridion* og SAV.

Forsøk A var preget av uventet dødelighet av grunner det var vanskelig å fastslå, men kan ha vært forårsaket av kraftig infeksjon med *P. theridion* i kombinasjon med betydelig stress. Ved et eventuelt nytt forsøk bør fiskegrupper velges med større omhu og det kan gjerne gjennomføres tiltak for en mer skånsom transport og mindre stress for fisken.

Referanser

- AMIGÓ, J. M., GRACIA, M. P., RIUS, M., SALVADÓ, H., MAILLO, P. A. & VIVARÉS, C. P. 1996. Longevity and effects of temperature on the viability and polar-tube extrusion of spores of *Glugea stephani*, a microsporidian parasite of commercial flatfish. *Parasitology Research*, 82, 211-214.
- ANDERSEN, L., BRATLAND, A., HODNELAND, K. & NYLUND, A. 2007. Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of Virology*, 152, 1871-1883.
- ANDERSEN, L., HODNELAND, K. & NYLUND, A. 2010. No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Virology journal*, 7, 198.
- AUNSMO, A., VALLE, P. S., SANDBERG, M., MIDTLYNG, P. J. & BRUHEIM, T. 2010. Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 233-241.
- BARTON, B. A., SCHRECK, C. B. & SIGISMONDI, L. A. 1986. Multiple Acute Disturbances Evoke Cumulative Physiological Stress Responses in Juvenile Chinook Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115, 245-251.
- BAXA-ANTONIO, D., GROFF, J. M. & HEDRICK, R. P. 1992. Experimental Horizontal Transmission of *Enterocytozoon salmonis* to Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *The Journal of Protozoology*, 39, 699-702.
- BAXTER, E. J., RODGER, H. D., MCALLEN, R. & DOYLE, T. K. 2011a. Gill disorders in marine-farmed salmon: investigating the role of hydrozoan jellyfish. *Aquacult Environ Interact*, 1, 245-257.
- BAXTER, E. J., STURT, M. M., RUANE, N. M., DOYLE, T. K., MCALLEN, R., HARMAN, L. & RODGER, H. D. 2011b. Gill Damage to Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Caused by the Common Jellyfish (*Aurelia aurita*) under Experimental Challenge. *PLoS ONE*, 6, e18529.
- BECKER, J. A. & SPEARE, D. J. 2004. Ultraviolet light control of horizontal transmission of *Loma salmonae*. *Journal of Fish Diseases*, 27, 177-180.
- BECKER, J. A. & SPEARE, D. J. 2007. Transmission of the microsporidian gill parasite, *Loma salmonae*. *Animal Health Research Reviews*, 8, 59-68.
- BJØRN, P. A. & FINSTAD, B. 1998. The development of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) on artificially infected post smolts of sea trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Zoology*, 76, 970-977.
- BRON, J. E., SOMMERVILLE, C., JONES, M. & RAE, G. H. 1991. The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology*, 224, 201-212.

- BRUNO, D. W. 1992. Ichthyobodo sp. on farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the marine environment. *Journal of Fish Diseases*, 15, 349-351.
- CALI, A. & TAKVORIAN, P. M. 1999. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: WITTNER, M. & WEISS, L. M. (eds.) *Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington D.C.: ASM Press.
- CHRISTIE, K., GRAHAM, D., MCLOUGHLIN, M., VILLOING, S., TODD, D. & KNAPPSKOG, D. 2007. Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by ip injection with new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Diseases of aquatic organisms*, 75, 13.
- CROSBIE, P. B. B., BRIDLE, A. R., CADORET, K. & NOWAK, B. F. 2012. In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in Atlantic salmon and fulfils Koch's postulates. *International Journal for Parasitology*, 42, 511-515.
- DESVIGNES, L., QUENTEL, C., LAMOUR, F. & LE VEN, A. 2002. Pathogenesis and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr experimentally infected with salmon pancreas disease virus (SPDV). *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 77-95.
- DEVOLD, M., KROSSØY, B., ASPEHAUG, V. & NYLUND, A. 2000. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40, 9-18.
- DRAGHI, A., POPOV, V. L., KAHL, M. M., STANTON, J. B., BROWN, C. C., TSONGALIS, G. J., WEST, A. B. & FRASCA, S. 2004. Characterization of "Candidatus piscichlamydia salmonis" (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of clinical microbiology*, 42, 5286-5297.
- DUESUND, H., NYLUND, S., WATANABE, K., OTTEM, K. F. & NYLUND, A. 2010. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway. *Virology*, 7, 19.
- FAST, M. D., HOSOYA, S., JOHNSON, S. C. & AFONSO, L. O. B. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 194-204.
- FEEHAN, C., JOHNSON-MACKINNON, J., SCHEIBLING, R., LAUZON-GUAY, J. & SIMPSON, A. 2013. Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103, 209-227.
- FIGUERAS, A., MARTÍNEZ, E., NOVOA, B., SANTARÉM, M. M., TORANZO, A. E., ÁLVAREZ, J. M. & DYKOVÁ, I. 1992. *Tetramicra brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 135, 127-135.
- FREEMAN, M. A., BELL, A. S. & SOMMERVILLE, C. 2003. A hyperparasitic microsporidian infecting the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*: an rDNA-based molecular phylogenetic study. *Journal of Fish Diseases*, 26, 667-676.

- FREEMAN, M. A. & SOMMERVILLE, C. 2009. Desmozoon lepeophtherii n. gen., n. sp.,(Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae). *Parasit Vectors*, 2, 58.
- FROST, P. & NILSEN, F. 2003. Validation of reference genes for transcription profiling in the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis, by quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, 118, 169-174.
- GUDMUNDSDÓTTIR, B. K. & GUDMUNDSDÓTTIR, S. 1997. Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon, Salmo salar L. *Journal of Fish Diseases*, 20, 343-350.
- HAMRE, L. A., EICHNER, C., CAIPANG, C. M. A., DALVIN, S. T., BRON, J. E., NILSEN, F., BOXSHALL, G. & SKERN-MAURITZEN, R. 2013. The Salmon Louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLoS ONE*, 8, e73539.
- HANDLINGER, J., SOLTANI, M. & PERCIVAL, S. 1997. The pathology of Flexibacter maritimus in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*, 20, 159-168.
- HEDRICK, R., GROFF, J. & BAXA, D. 1991. Experimental infections with Enterocytozoon salmonis Chilmonczyk, Cox, Hedrick (Microsporea): an intranuclear microsporidium from chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha. *Diseases of aquatic organisms*, 10, 103-108.
- HEDRICK, R., GROFF, J., MCDOWELL, T., WILLIS, M. & COX, W. 1990. HEMATOPOIETIC INTRANUCLEAR MICROSPORIDIAN INFECTIONS WITH FEATURES OF LEUKEMIA IN CHINOOK SALMON ONCORHYNCHUS-TSHAWYTSCHA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8, 189-197.
- HJELTNES (RED), B. 2014. Fiskehelse rapporten 2013. Oslo: Veterinærinstituttet.
- HJORTAAS, M. J., SKJELSTAD, H. R., TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., JOHANSEN, R., BANG-JENSEN, B., ØRPETVEIT, I. & SINDRE, H. 2013. The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon, Salmo salar L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 36, 71-74.
- HODNELAND, K. & ENDRESEN, C. 2006. Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 131, 184-192.
- HOEL, K., REITAN, L. J. & LILLEHAUG, A. 1998. Immunological cross reactions between Aeromonas salmonicida and Vibrio salmonicida in Atlantic salmon (Salmo salar L.) and rabbit. *Fish & Shellfish Immunology*, 8, 171-182.
- ISAKSEN, T. E., E, K., GA, S. & A, N. 2010. Patterns of Ichthyobodo necator sensu stricto infections on hatchery-reared Atlantic salmon Salmo salar in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88, 207-214.

- ISAKSEN, T. E., KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. 2007. *Ichthyobodo hippoglossin*. sp.(Kinetoplastea: Prokinetoplastida: Ichthyobodonidae fam. nov.), an ectoparasitic flagellate infecting farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Ichthyobodo infections on farmed and wild fish. Methods for detection and identification of Ichthyobodo spp.*
- ISAKSEN, T. E., KARLSBAKK, E., REPSTAD, O. & NYLUND, A. 2012. Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites. *Parasitology International*, 61, 675-683.
- ISAKSEN, T. E., KARLSBAKK, E., WATANABE, K. & NYLUND, A. 2011. *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitology*, 138, 1164-1175.
- JANSEN, M. D., JENSEN, B. B. & BRUN, E. 2014. Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus subtype. *Journal of Fish Diseases*, n/a-n/a.
- JOHNSON, S. & ALBRIGHT, L. 1991a. Development, growth, and survival of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) under laboratory conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71, 425-436.
- JOHNSON, S. C. & ALBRIGHT, L. J. 1991b. The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). *Canadian Journal of Zoology*, 69, 929-950.
- JONES, M. W., SOMMERVILLE, C. & BRON, J. 1990. The histopathology associated with the juvenile stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 13, 303-310.
- KARLSBAKK, E., OLSEN, A. B., EINEN, A.-C. B., MO, T. A., FIKSDAL, I. U., AASE, H., KALGRAFF, C., SKÅR, S.-Å. & HANSEN, H. 2013. Amoebic gill disease due to *Paramoeba perurans* in ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture*, 412-413, 41-44.
- KARLSBAKK, E., SÆTHER, P., HØSTLUND, C., FJELLSØY, K. & NYLUND, A. 2002. *Parvicapsula pseudobranchicola* n. sp.(Myxozoa), a myxosporidian infecting the pseudobranch of cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 381-387.
- KARLSEN, M., TINGBØ, T., SOLBAKK, I.-T., EVENSEN, Ø., FUREVIK, A. & AASENG, A. 2012. Efficacy and safety of an inactivated vaccine against Salmonid alphavirus (family Togaviridae). *Vaccine*, 30, 5688-5694.
- KEOHANE, E. M. & WEISS, L. M. 1999. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: WITTNER, M. & WEISS, L. M. (eds.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington D. C.: ASM Press.
- KVELLESTAD, A., DANNEVIG, B. H. & FALK, K. 2003. Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of General Virology*, 84, 2179-2189.

- KVELLESTAD, A., FALK, K., NYGAARD, S. M., FLESJA, K. & HOLM, J. A. 2005. Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in sea-water-reared *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 67, 47.
- MATTHEWS, C. G. G., RICHARDS, R. H., SHINN, A. P. & COX, D. I. 2013. Gill pathology in Scottish farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., associated with the microsporidian *Desmozoon lepeophtherii* Freeman et Sommerville, 2009. *Journal of Fish Diseases*, 36, 861-869.
- MAULE, A., TRIPP, R., KAATTARI, S. & SCHRECK, C. 1989. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, 120, 135-142.
- MCCLOUGHLIN, M., NELSON, R., ROWLEY, H., COX, D. & GRANT, A. 1996. Experimental pancreas disease in Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts induced by salmon pancreas disease virus (SPDV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 117-124.
- MCCLOUGHLIN, M. F., NELSON, R. N., MCCORMICK, J. I., ROWLEY, H. M. & BRYSON, D. B. 2002. Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25, 33-43.
- MCCVICAR, A. H. 1975. Infection of plaice *Pleuronectes platessa* L. with *Glugea* (*Nosema*) *stephani* (Hagenmüller 1899) (Protozoa: Microsporidia) in a fish farm and under experimental conditions. *Journal of Fish Biology*, 7, 611-619.
- MCCVICAR, A. H. 1987. Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and early pathology. *Aquaculture*, 67, 71-78.
- MILLER, K. M., TRUDEL, M., PATTERSON, D. A., SCHULZE, A., KAUKINEN, K., LI, S., GINTHER, N., MING, T. & TABATA, A. 2013. Are Smolts Healthier in Years of Good Ocean Productivity? In: COMMISSION, N. P. A. F. (ed.) *Technical Report*. Honolulu.
- MITCHELL, S. O., STEINUM, T., RODGER, H., HOLLAND, C., FALK, K. & COLQUHOUN, D. J. 2010. Epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in fresh water in Ireland is associated with 'Candidatus *Clavochlamydia salmonicola*' infection. *Journal of Fish Diseases*, 33, 665-673.
- MITCHELL, S. O., STEINUM, T. M., TOENSHOFF, E. R., KVELLESTAD, A., FALK, K., HORN, M. & 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 Org*, 103, 35-43.
- MORRISON, J., MACCONNELL, E., CHAPMAN, P. & WESTGARD, R. 1990. A microsporidium-induced lymphoblastosis in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in freshwater. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8, 99-104.

- NELSON, R., MCLOUGHLIN, M., ROWLEY, H., PLATTEN, M. & MCCORMICK, J. 1995. Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22, 25-32.
- NYLUND, A., HOVLAND, T., WATANABE, K. & ENDRESEN, C. 1995. Presence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., collected during three separate outbreaks of the disease. *Journal of Fish Diseases*, 18, 135-145.
- NYLUND, A., KARLSBAKK, E., SÆTHER, P. A., KOREN, C., LARSEN, T., NIELSEN, B. D., BRØDERUD, A. E., HØSTLUND, C., K. R. FJELLSØY, LERVIK, K. & ROSNES, L. 2005. *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporea) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 197-204.
- NYLUND, A., KVENSETH, A. M. & ISDAL, E. 1998. A Morphological Study of the Epitheliocystis Agent in Farmed Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10, 43-55.
- NYLUND, A., WATANABE, K., NYLUND, S., KARLSEN, M., SÆTHER, P. A., ARNESEN, C. E. & KARLSBAKK, E. 2008. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of Virology*, 153, 1299-1309.
- NYLUND, S., ANDERSEN, L., SÆVAREID, I., PLARRE, H., WATANABE, K., ARNESEN, C. E., KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. 2011. Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94, 41-57.
- NYLUND, S., NYLUND, A., WATANABE, K., ARNESEN, C. E. & 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*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57, 95-114.
- NYLUND, S., STEIGEN, A., PLARRE, H., ANDERSEN, L., KARLSEN, M., WATANABE, K., KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. Submitted. 'Candidatus *Syngnamydia salmonis*' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium causing epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of Microbiology*.
- OLSEN, A. B., NILSEN, H., SANDLUND, N., MIKKELSEN, H., SØRUM, H. & COLQUHOUN, D. J. 2011. *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 94, 189-199.
- OLSON, R. E. 1981. Effects of low temperature on the development of the microsporidian *Glugea stephani* in english sole (*Parophrys vetulus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 17, 559-562.
- OLSVIK, P., LIE, K., JORDAL, A.-E., NILSEN, T. & HORDVIK, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6, 21.

- POWELL, M., CARSON, J. & VAN GELDEREN, R. 2004. Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. *Diseases of aquatic organisms*, 61, 179-185.
- REPSTAD, O. 2011. *Kartlegging av patogendynamikken hos oppdrettslaks (Salmo salar L.) med diagnosen pankreassykdom (PD)*. Universitetet i Bergen.
- ROBERTSEN, B. 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 172-191.
- ROBERTSEN, B., BERGAN, V., RØKENES, T., LARSEN, R. & ALBUQUERQUE, A. 2003. Atlantic Salmon Interferon Genes: Cloning, Sequence Analysis, Expression, and Biological Activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 23, 601-12.
- RODGER, H. & MITCHELL, S. 2007. Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *Journal of Fish Diseases*, 30, 157-167.
- RODRIGUEZ-TOVAR, L. E., WADOWSKA, D. W., WRIGHT, G. M., GROMAN, D. B., SPEARE, D. J. & WHELAN, D. S. 2003. Ultrastructural evidence of autoinfection in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* infected with *Loma* sp.(phylum Microsporidia). *Diseases of aquatic organisms*, 57, 227.
- ROUBAL, F. R., BULLOCK, A. M., ROBERTSON, D. A. & ROBERTS, R. J. 1987. Ultrastructural aspects of infestation by *Ichthyobodo necator* (Henneguy, 1883) on the skin and gills of the salmonids *Salmo salar* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 10, 181-192.
- SANCHEZ, J. G., SPEARE, D. J. & MARKHAM, R. J. F. 2000. Normal and aberrant tissue distribution of *Loma salmonae* (Microspora) within rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following experimental infection at water temperatures within and outside of the xenoma-expression temperature boundaries. *Journal of Fish Diseases*, 23, 235-242.
- SCHRAM, T. A. 1993. Supplementary descriptions of the developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837)(Copepoda: Caligidae). *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*, 30-47.
- SHAW, R. W. & KENT, M. L. 1999. Fish Microsporidia. In: WITTNER, M. & WEISS, L. M. (eds.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington D.C: ASM Press.
- SHAW, R. W., KENT, M. L. & ADAMSON, M. L. 1998. Modes of transmission of *Loma salmonae* (Microsporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 33, 151-156.
- SHAW, R. W., KENT, M. L. & ADAMSON, M. L. 2000. Viability of *Loma salmonae* (Microsporidia) under laboratory conditions. *Parasitology Research*, 86, 978-981.
- STAVELAND, Ø. 2010. *Prevalence and densities of Paranucleospora theridion in wild Atlantic salmon (Salmo salar L.) and sea trout (Salmo trutta L.) in selected areas in Western Norway*. Universitetet i Bergen.

- STEINUM, T., KVELLESTAD, A., COLQUHOUN, D., HEUM, M., MOHAMMAD, S., GRØNTVEDT, R. N. & FALK, K. 2010. Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of aquatic organisms*, 91, 201.
- STEINUM, T., KVELLESTAD, A., RØNNEBERG, L. B., NILSEN, H., ASHEIM, A., FJELL, K., NYGÅRD, S. M. R., OLSEN, A. B. & 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, 205-214.
- STERUD, E., SIMOLIN, P. & KVELLESTAD, A. 2003. Infection by *Parvicapsula* sp. (Myxozoa) is associated with mortality in sea-caged Atlantic salmon *Salmo salar* in northern Norway. *Diseases of aquatic organisms*, 54, 259-263.
- STRAUSS, J. H. & STRAUSS, E. G. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 58, 491.
- STUNKARD, H. W. & LUX, F. E. 1965. A microsporidian infection of the digestive tract of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *The Biological Bulletin*, 129, 371-387.
- SVEEN, S., ØVERLAND, H., KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. 2012. Paranucleospora theridion (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101, 43-49.
- TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., BJERKÅS, I., HJORTAAS, M. J., DANNEVIG, B. H., GRAHAM, D. A. & MCLOUGHLIN, M. F. 2007. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 30, 545-558.
- TODAL, J. A., KARLSBAKK, E., ISAKSEN, T. E., PLARRE, H., URAWA, S., MOUTON, A., HOEL, E., KOREN, C. W. R. & NYLUND, A. 2004. *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida) — a complex of sibling species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 9-16.
- TOENSHOFF, E. R., KVELLESTAD, A., MITCHELL, S. O., STEINUM, T., FALK, K., COLQUHOUN, D. J. & HORN, M. 2012. A Novel Betaproteobacterial Agent of Gill Epitheliocystis in Seawater Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE*, 7, e32696.
- TOLÅS, I. V. 2012. *Lukket merdssystem - AquaDomen: Effekt på smittedynamikk*. Universitetet i Bergen.
- VÁVRA, J. & LARSSON, J. I. R. 1999. Structure of the microsporidia. In: WITTNER, M. & WEISS, L. M. (eds.) *Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington D.C.: ASM Press.
- VOLD, V. 2014. *Challenge experiment with field isolates of Tenacibaculum spp. isolated from moribund Atlantic salmon (Salmo salar)*. Universitetet i Bergen.

- WAKABAYASHI, H., HUH, G. & KIMURA, N. 1989. *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 213-216.
- WATANABE, K., KARLSEN, M., DEVOLD, M., ISDAL, E., LITLABÅ, A. & NYLUND, A. 2006. Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Diseases of Aquatic Organisms*, 70, 183-192.
- WESTON, J., VILLOING, S., BRÉMONT, M., CASTRIC, J., PFEFFER, M., JEWHRST, V., MCLOUGHLIN, M., RØDSETH, O., CHRISTIE, K. E. & KOUMANS, J. 2002. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. *Journal of Virology*, 76, 6155-6163.
- WIIK, R., ANDERSEN, K., UGLENES, I. & EGIDIUS, E. 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Aquaculture*, 83, 201-215.
- WONGTAVATCHAI, J., CONRAD, P. A. & HEDRICK, R. P. 1995. Effect of the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* on the immune response of chinook salmon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48, 367-374.
- YOUNG, N., CROSBIE, P., ADAMS, M., NOWAK, B. & MORRISON, R. 2007. *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal for Parasitology*, 37, 1469-1481.
- YOUNG, N., DYKOVÁ, I., SNEKVIK, K., NOWAK, B. & MORRISON, R. 2008. *Neoparamoeba perurans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78, 217-223.
- ØKLAND, A. L. 2012. *The occurrence, pathology and morphological development of Paranucleospora theridion in salmon louse (Lepeophtheirus salmonis)*. Universitetet i Bergen.