

***Salmoxcellia vastator* n. gen., n. sp. i regnbueørret og laks: -  
vevstropisme, patologi, diagnostikk og spredning**

Lars Sandvik



Masteroppgave fiskehelse

Institutt for biovitenskap, Universitet i Bergen, Norge

Oktober 2022

## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved Fish Diseases Research Group (FDRG) ved Universitetet i Bergen.

Vil gi en stor takk veileder Are Nylund for god hjelp under masterperioden, Christiane Trosse og Heidrun Nylund for hjelpen på laboratoriet.

Takk til familie og venner for støtte gjennom en lang og tøff periode.

## Abstrakt

*Salmoxcellia Vastator* har vært registret i sporadiske episoder i laksefisk siden 2002, men lite er kjent om parasittens sykdomsforløp og opprinnelse. I en lang periode har x-celle parasitter vært en felles betegnelse over hele verden på granulom lignende lesjoner hos fisk, men i de siste årene har studier og genetiske analyser bidratt til bedre kunnskap og klassifisering av ulike x-celler. *S. Vastator* skiller seg fra de nært beslektede *Gadixcellia*, *Xcellia* og *Notoxcellia* ved at den forårsaker en systemisk infeksjon i motsetning til svulst dannelser på pseudobranch.

Målet med dette studiet er å fremskaffe kunnskap om vevstropisme, gross patologi, og sykdomsforløp til *S. vastator* hos regnbueørret og laks. Samt undersøke utvalgte verter i området rundt regnbueørret anlegg for parasitten.

Resultatene fra dette studiet er basert på totalt 5 uttak av vevsprøver fra regnbueørret ved lokalitet A og B, vevsprøver fra villfisk i området rundt lokalitet A og tidligere prøver fra stamlaks ved lokalitet C. Analysene viste tilstedeværelsen av parasitten og ved alle lokaliteter. Hovedfunnene var systemisk infeksjon med høy tilstedeværelse i blodrike vev og med en avtagende prevalens over uttaksperioden i en periode med stigende temperatur. Resultatene indikerer at immunforsvaret klarer å bekjempe parasitten. Videre, var det ikke mulig å påvise horisontal smitte mellom regnbueørret eller fra det omliggende miljø. Villfisk ble undersøkt for å finne mulige smittekilder eller verter for parasitten, men resultatene viste ingen tilstedeværelse av parasitten *S. Vastator*.

## Forkortninger

---

Forkortinger	Forklaring
Ct-verdi	Terskel syklusverdi
Gj	Gjeller
Gj.	Gjennomsnitt
ml	Milliliter
NTC	Negativ templatkontroll
SSU rRNA	Small subunit ribosomal ribonucleic acid

# Innhold

<b>1. Introduksjon .....</b>	<b>6</b>
1.1 X-celler .....	6
1.2 X-celler i Nord-Atlanteren .....	6
1.3 X-celler hos fisk i Norge .....	7
1.4 X-celler i Laksefisk ( <i>Salmoxcellia Vastator</i> ) .....	7
1.5 Mål for studie .....	8
<b>2. Material og metode.....</b>	<b>9</b>
2.1 Innsamling av materiale fra syk/døende laks og regnbueørret.....	9
2.2 Prøvetaking av vev fra fisk.....	11
2.3 Rensing av RNA.....	11
2.4 Real-time RT-PCR .....	12
2.5 Oversikt av real-time assay .....	13
2.6 Statistiske analyser .....	14
<b>3. Resultat.....</b>	<b>15</b>
3.1 Anleggsdata - Salinitet og temperatur .....	15
3.2 Anleggsdata - Lakselus .....	17
3.3 Anleggsdata - Avlusninger.....	19
3.4 Stamfisk.....	21
3.5 Lokalitet A.....	24
3.6 Lokalitet B.....	26
3.7 Villfisk.....	27
<b>4 Diskusjon.....</b>	<b>29</b>
4.1 Evaluering av material og metode.....	29
4.2 Regnbueørret lokalitet A .....	30
4.3 Regnbueørret lokalitet B .....	31
4.3 Regnbueørret lokalitet A og B .....	31
4.4 Laks lokalitet C .....	32
4.5 Villfisk.....	32
<b>5. Konklusjon.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Videre forskning .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Referanser/litteratur .....</b>	<b>35</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 X-celler

Terminologien X-celler ble først brukt i 1969 for å beskrive store polygonale celler funnet i flatfisk på nordkysten av USA (Brooks, McArn, & Wellings, 1969). Disse cellene hadde en patologi som ble beskrevet som svulst lignende. Siden den gang har en stor mengde uidentifiserte celler blitt oppdaget og sammenlignet med beskrivelsene til Brooks' X-celler. Totalt har det blitt rapportert fra over 20 arter fisk fra 10 forskjellige familier, som dekker 5 teleost ordner. Pleuronectiformes (flatfisk), Perciformes (piggfinnefisker), Gadiformes (Torskfisk), Siluriformes (mallefisk) og Salmoniformes (laksefisk) (M. A. Freeman, 2009).

## 1.2 X-celler i Nord- Atlanteren

I Nord-atlanteren har disse cellene i hovedsakelig blitt observert i Torsk (*Gadus morhua*) og i sandflyndre (*Limanda limanda*). Den første observasjonen ble gjort i 1929 av Peyron og Thomas i torsk, men det tok lang tid før dette ble undersøkt nøyere. Den første beskrivelsen av x-celle parasitter på torsk funnet ved vestkysten av Norge ble gjort i 1973 av (Lange, 1973), som beskrev den som karsinoide svulster i pseudobranch. Histologiske undersøkelser utført i 1982 indikerte at svulstene kom som en følge av en infeksjon med protozoer (Watermann & Dethlefsen, 1982). Det ble også utført et videre studie som skulle ta for seg etiologien til parasitten, men det endte opp med å mislykkes. I 1996 ble det publisert en studie som tok for seg prevalensen til x-cellene hos torsk i Nord-atlanteren, som var basert på innsamling av data i perioden 1982 til 1993. Prevalensen i området nord sjøen lå på mellom 0%-4,6%, og mellom 0%-2,4% i Østersjøen (Dethlefsen, Lang, & Damm, 1996).

Lignende undersøkelser ble også utført på sandflyndre i denne perioden og x-celle lesjoner i flatfisk ble for første gang påvist i denne arten (Diamant & McVicar, 1987). I en lengre periode var betegnelsen «x-celle» beskrivelsen man brukte for å beskrive svulstlignende utvekster, men i 2017 ble det opprettet to nye slekter innenfor Perkinsea som ble kalt *Gadixcellia* og *Xcellia* (Mark A. Freeman et al., 2017). Lignende sykdomstegn til disse x-celle lignende parasittene ble først oppdaget i laksefisk i 1993 (Dykova et al 1993). Disse beskrev x-celler fra coho laks (*Oncorhynchus kisutch*) samlet inn i Spania i 1991.

### **1.3 X-celler hos fisk i Norge**

*Salmoxcellia vastator* tidligere, beskrevet som X-celler, ble først beskrevet i Norge høsten 2002 da det ble registret økt dødelighet hos voksen regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*) på Vestlandet i Norge. Den akkumulerte dødeligheten var på 2% og store deler av fisken måtte kastet på grunn av dårlig kvalitet ved slakt. Undersøkelsene som ble gjort av fisken viste hvite granulomer og blødninger på innvollene. Et lignende utbrudd ble observert i 2003 hvor regnbueørret ble smittet. (Nylund, et al. 2002)

Det var ikke før 2018-2019 parasitten ble igjen påvist hos regnbueørret i Norge, og da flere steder langs vestkysten av Norge. I 2020 ble parasitten også påvist hos stamfisk av laks (*Salmo Salar*) for første gang (Karlsbakk, et al. 2021)

### **1.4 X-celler i laksefisk (*Salmoxcellia vastator*)**

Ved påvisning av x-celler hos coho laks (*Oncorhynchus tshawycha*) i 1991, ble det funnet multinukleære samlinger av x-celler i lever (Dyková et al.1993a). Den største forskjellen mellom X-celler i norsk laksefisk sammenlignet med *Gadixcellia* spp. og *Xcellia* spp. er at cellene i laks forårsaker systemiske infeksjoner. Ved histologiske undersøkelser kan de sees som multinukleære vakuoler i form av plasmodium x-celler, med en pellikel dannet av flere elektron tette membraner. (Karlsbakk et al., 2021). I tidligere undersøkelser har det blitt funnet høyere konsentrasjoner av parasitten i leveren hos regnbueørret, hvor det kan ses både fokale og multifokale nekrotiske lesjoner. I hjertet kan parasitten ses i ventrikkelen i det kompakte laget og i epikardiet. (Dalum et al. 2021).

Fylogenetiske undersøkelser ble utført i 2021, basert på SSU rRNA hos laks beskrev parasitten som en ny art i Perkinsea og som en fjern slektning av *Gadixcellia*. Den nye slekten ble gitt navnet *Salmoxcellia* (*S. vastator*) (Karlsbakk et al., 2021).

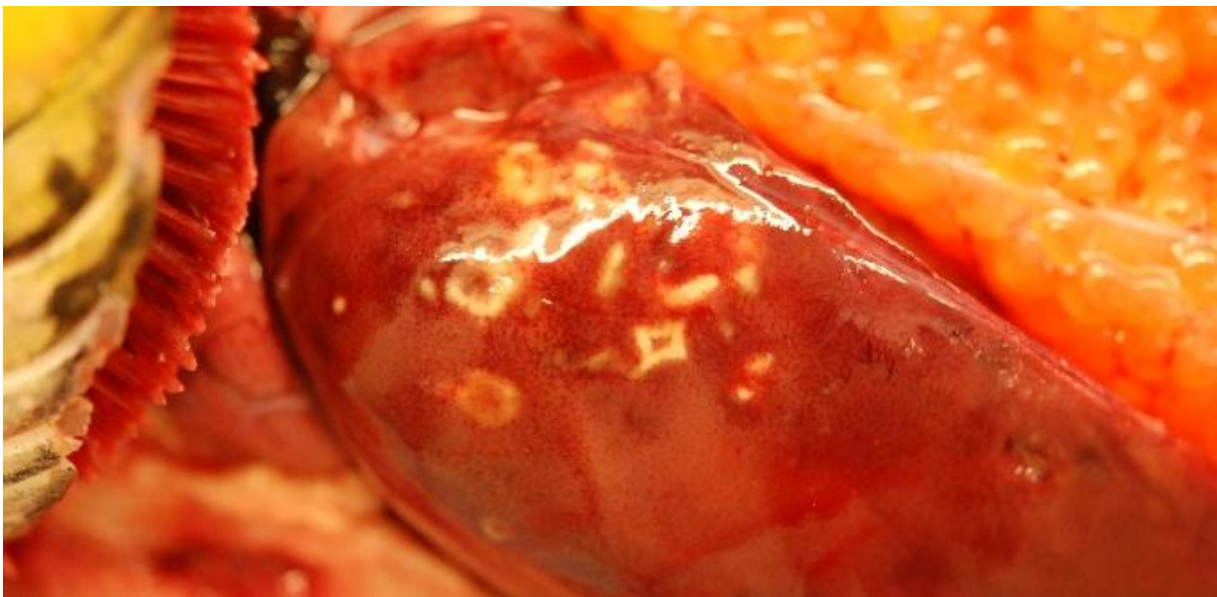
## 1.5 Mål for studie

Målet for studie er å fremskaffe kunnskap om vevstropisme, gross patologi, og sykdomsforløp til *S. vastator* hos regnbueørret og laks. Samt undersøke utvalgte verter i området rundt regnbueørret anlegg for parasitten.



## 2 Material og metode

Materialet i dette prosjektet ble samlet inn over en periode på 1,5 år fra tre forskjellige lokaliteter for produksjon av laksefisk på Vestlandet. I november 2020 ble det prøvetatt en rekke vev (rød muskulatur, gjeller, pseudobranch, lever, hjerte, nyren, milt og tarm) fra 32 stamfisk av laks (*Salmo salar*) i Samnangerfjorden, Hordaland. Det ble registrert en svak økning i dødelighet in anlegget og hos enkelte fisk ble det observert «granulom-liknende» inklusjoner i lever (Figur 1, Tabell 1). Det forelå mistanke om infeksjon med x-celler som tidligere har vært påvist hos regnbueørret i 2002 (Nylund et al. 2006), men Piscine myocarditis virus ble også påvist hos fisken og kan ha vært årsak til dødeligheten. Fylogenetiske analyser viste at parasitten var beslektet med medlemmer av Perkinzoa og nyere karakterisering har vist at den er en x-celle-parasitt som nå er gitt navnet *Salmoxcellia vastator* (Karlsbakk et al. 2021). Histopatologiske endringer hos regnbueørret og laks smittet med *S. vastator* er beskrevet av Dalum et al. (2021).

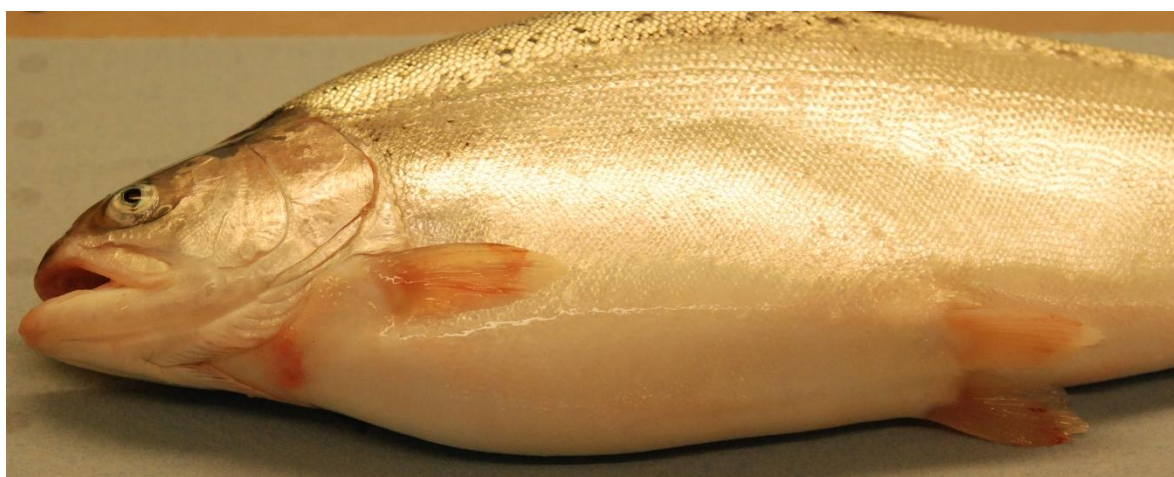


**Figur 1.** Stamfisks lever med granulom-liknende inklusjoner.

I tillegg til prøvene fra laks ble det samlet inn vev fra regnbueørret i to anlegg i Sørfjorden, Hordaland (Figur 2, Tabell 1). Begge anleggene hadde i tidligere produksjoner hatt mistanke om x-celle infeksjoner og i forbindelse med mekanisk behandling mot lakselus ble det i 2021 tatt ut svimere/død fisk for å kartlegge om parasitten var til stede på lokalitetene. Prøvene (rød muskulatur, gjeller, lever, hjerte, milt, nyre og tarm) ble tatt ut i perioden mars – august 2021. Det ble ikke observert makroskopiske tegn på infeksjoner med *S. vastator* hos regnbueørreten i dette studiet.

**Tabell 1.1** Oversikt over innsamling av laksefisk fra tre sjøanlegg (A, B, C) i Hordaland. I alle tre anleggene ble det tatt ut svimere og død fisk.

Lokalitet	Dato	Antall fisk	Art
C	24.11.20	31	Laks ( <i>S. salar</i> )
A	26.03.21	32	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )
B	27.03.21	32	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )
A	16.05.21	30	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )
A + B	19.05.21	13	Lyr ( <i>Pollachius pollachius</i> )
A + B	19.05.21	35	Makrell ( <i>Scomber scombrus</i> )
A	19.05.21	1	Sei ( <i>Pollachius virens</i> )
B	27.05.21	31	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )
A	24.08.21	31	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )
B	24.08.21	31	Regnbueørret ( <i>O. mykiss</i> )



**Figur 2.** Regnbueørret (svimer) tatt ut etter mekanisk behandling mot lakselus.

**Tabell 1.2** Oversikt over lakselus og sjøtemperatur på uttaksdatoene.

Lokalitet	Dato	Voksne ♀	Bevegelige stadier	Chalimi	Sjøtemp.
A	26.03.21	0,21	0,69	0,54	8,0 °C
A	16.05.21	0,09	0,24	0,12	11,6 °C
A	24.08.21	0,31	0,22	0,00	15,9 °C
B	27.03.21	0,2	0,58	0,27	7,9 °C
B	27.05.21	0,14	0,2	0,28	11,4 °C
B	24.08.21	0,33	0,24	0,08	15,8 °C
C	24.11.20	0,7	5,35	0,25	11,5 °C

I tillegg til uttaket av regnbueørret ble det også samlet in 49 villfisk rundt anleggene i Sørfjord. Dette for å teste om x-celler kunne være til stede hos de to dominerende fiskeartene rundt anleggene. Fisken ble samlet inn av ansatte på anlegget og bestod i hovedsak av kun to arter; lyr (*Pollachius pollachius*) og makrell (*Scomber scombrus*) (Figur 3). Gjeller, hjerte og nyret ble samlet inn fra villfisken (Tabell 1).



Figur 3. Lyr (*Pollachius pollachius*) og makrell (*Scomber scombrus*) samlet inn rundt anleggene i Sørfjorden.

Data om sjøtemperaturer og lakselus på de tre lokalitetene er hentet fra Barentswatch (Tabell 2).

## 2.2 Prøvetaking av vev fra fisk

All prøvetaking av innsamlet fisk ble utført ved laboratoriet til Fish Diseases Research Group (FDRG) ved Universitetet i Bergen. Vekt, lengde og makroskopiske tegn på sykdom ble registrert hos alle fiskene. Fra hvert vev ble det tatt ut en prøve til real time RT PCR analyse og en større vevsbit som «back-up» for eventuelle nye analyser eller for rensing av DNA til sekvensering. Prøvene ble tatt ved hjelp av pinsett og skalpell, hvor utstyret ble renset mellom hvert vevsuttak, og desinfisert ved mellom hvert individ. Totalt ble det tatt 3500 vevsprøver.

## 2.3 Rensing av RNA

Rensing av RNA ble gjennomført ved å bruke TRIzol reagent (Sigma) i henhold til manualen med enkelte unntak. Det ble tilsatt 1000 µl Trizol eller QIAzol til tubene (Eppendorf Safe Lock 2,0 mL) med vev. Videre ble vevet homogenisert i Tissulyser II (Qiagen) i 3 minutter. Enkelte

vev er mer krevende å homogenisere, og da ble tilsatt en stålkule til rørene for å sikre knusing av cellene. Etter prøvene var homogenisert ble de inkubert i romtemperatur i 5 minutter og sentrifugert. 200 µl chloroform (sigma-Aldrich) ble tilsatt tubene, etterfulgt av håndristing i 15 sekunder og inkubering i 5 minutter ved romtemperatur. Videre ble prøvene sentrifugert (Thermo Scientific™ Heraeus Fresco™ 21) i 15 minutter med 12 000 x g og 4°C. Prøvene ble separert i 3 forskjellige faser, vandig fase på toppen, interfase og organisk fase ved bunnen. 450 µl av den øverste vandige fasen ble så pipettert til Axygen mikrotuber og tilsatt 1,5 mL isopropanol. Prøvene ble så inkubert i 10 minutter ved romtemperatur, før de ble sentrifugert i 15 minutter ved 12 000 x g og 4°C. Isopropanolen ble fjernet fra prøverøret for å så vaske RNA pelleten to ganger med 100 % etanol. Videre ble pelleten lufttørket i 10-15 minutter ved romtemperatur og oppløst i 100 µl RNase-fritt vann. Under rensingen av RNAet ble det inkludert en negativ kontroll som fulgte de samme stegene som resten av prøvene. Kvaliteten på RNA rensingen og mengde RNA ble undersøkt ved hjelp av spektrometer (NanoDrop™, Thermo Scientific). Prøvene ble lagret ved -25 °C.

## 2.4 Real time RT PCR

Real time RT-PCR analysene ble gjennomført ved laboratoriet til FDRG, Universitet i Bergen. RNAet, som ble ekstrahert fra vevsprøvene, ble analysert for en rekke patogener inkludert parasitten *Salmoxcellia vastator* (Tabell 3). Real-time RT-PCR ble utført ved bruk av AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagent kit fra Applied Biosystems.

Det ekstraherte RNAet ble videre fordelt i et brønnbrett (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Reaksjonsmiksen som tilsvarer 10,5 µl inneholdt 6,25 µl 2X-RT-PCR buffer, 1 µl forward og revers primer, 0,25 µl enzym og 1,78 µl vann. Reaksjonsmiksen ble fordelt på hver enkel brønn hvor 2 µl RNA ble tilsatt. Rensekontroll og negativ templat kontroll (NTC) ble brukt for, om mulig, å oppdage eventuelle kontamineringer. MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) ble brukt til å forsegle brønnene og deretter satt i en sentrifuge i 15 sekunder.

RT-PCR ble gjennomført i QuantStudio™ 3 Real-Time PCR system, på et standard AgPath program med 45 sykluser. Oppsettet var 10 minutt på 45 °C, 10 minutt på 95 °C, 15 sekund på 95°C og 45 sekund på 45°C. I den første delen av prosessen blir RNA transkribert til cDNA, i den andre delen blir det videre denaturert og revers transkriptase blir inaktivert. Samtidig blir

DNA-polymerase i løsningen aktivert. I løpet av 45 sykluser vil det gjøres en amplifikasjon av måltemplatet.

**Tabell 1.3** Oversikt over primere og prober som ble brukt i Assay for studiet. Effektiviteten er oppgitt i kildene.

Assay	Primer	Sekvens	Referanse
<b>Piscine myokarditt virus (PMCV)</b>	Probe Forward Revers	TGG TGG AGC GTT CAA AGG GAA CAG GAG GAA GCA GAA CGT AAT CCG ACA TCA TTT TGT GA	Nylund et al., 2018a
<b>Infeksiøs pankreasnekrose virus (IPNV)</b>	Probe Forward Revers	TCT TGG CCC CGT TCA TT ACC CCA GGG TCT CCA GTC GGA TGG GAG GTC GAT CTC GTA	Watanabe et al., 2006
<b>Piscine orthoreovirus 1 (PRV1-M2)</b>	Probe Forward Revers	CTG GCT CAA CTC TC CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG	Nylund et al., 2018a
<b>Candidatus Branchiomonas cysticola (Epit)</b>	Probe Forward Revers	ACT TAG CGA AAG TTA AGC GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA GTG CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C	Nylund et al., 2018a
<b>Candidatus Piscichlamydia salmonis (Pch)</b>	Probe Forward Revers	CAA AAC TGC TAG ACT AGA GT TCA CCC CCA GGC TGC TT GAA TTC CAT TTC CCC CTC TTG	Nylund et al., 2008
<b>Paranucleospora theridion (Nuc)</b>	Probe Forward Revers	TTG GCG AAG AAT GAA A CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG GGT CCA GGT TGG GTC TTG AG	Nylund et al., 2010
<b>Paramoeba perurans (Pperu)</b>	Probe Forward Revers	CTG GTT CTT TCG RGA GC GAT AAC CGT GGT AAA TCT AGA GCT AAT A TGG CAT TGG CTT TTG AAT CT	Nylund et al., 2018b
<b>Ichthyobodo spp. (Costia)</b>	Probe Forward Revers	TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G ACG AAC TTA TGC GAA GGC A TGA GTA TTC ACT YCC GAT CCA T	Isaksen et al., 2012
<b>X-celler (PER) Salmoxcellia vastator</b>	Probe Forward Revers	AGCGTTGAGCGGAT CCCTGCTAAATAGTATGCGGTATACA ACCTTCAAATAAGAACAATCAGCAA	Karlsbakk et al. 2022
<b>X-celler generelt X-cell</b>	Probe Forward Revers	TCGACTCAACACGGGAA GTGGAGCCTGCGGCTTAA CATGTCTGGCCCTGGTGAGT	Nylund Ikke publisert
<b>Regnbogaure elongeringsfaktor (OmELF 1 alfa)</b>	Probe Forward Revers	ATC GGC GGT ATT GGA AC CCC CTC CAG GAT GTC TAC AAA CAC ACG GCC CAC GGG TAC T	A. Nylund pers. com
<b>Atlantisk laks elongeringsfaktor (EF1A)</b>	Probe Forward Revers	ATC GGT GGT ATT GGA AC CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA CAC ACG GCC CAC AGG TAC A	Olsvik et al., 2005

## Selskapsanalyse av X-celler fra laks

Basert på en tilnærmet komplett sekvens av rRNA genene av *S. vastator* (Accession no: ON819178) fra laks ble det gjennomført et søk i GenBank database etter nære lektninger (Blast 2,0). Vector NTI software ble benyttet til å lage alignement av disse utvalgte sekvensene. Analyse av slektskap ble gjennomført ved hjelp av TreePuzzle 5,2 (<http://www.tree-puzzle.de>). Slektskapstre ble laget ved hjelp av FigTree (v.1,4,3., A. Rambaut).

## Prevalens

Prevalens er oppgitt som prosent-andelen av populasjonen som er infisert med et spesifikt patogen basert på real time RT PCR analysene.

$$(1) \text{ Prevalens}(\%) = \frac{\text{Antall positive prøver}}{\text{Totalt antall prøver}} \times 100$$

## Tetthet av patogener i vev

Tettheten av patogener (basert på antall RNA kopier) er presentert ved formelen:

$$(2) 40 - Ct \text{ verdi til target}$$

## 2.8 Statistiske analyser

De statistiske analysene ble utført i programmet Prism. Det ble gjort en one-way anova analyse av Ct-verdiene.

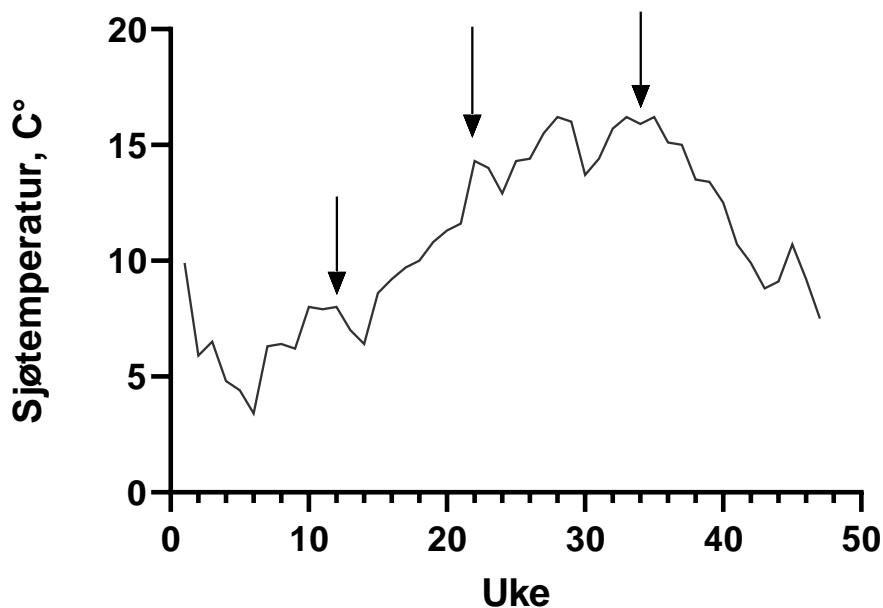
### 3. Resultat

#### 3.1 Anleggsdata – salinitet og temperatur

Gjennom forsøket var alle prøver tatt fra fisk som ble holdt i merder i sjø, dvs alle tre anleggene ligger i områder med påvirkning av ferskvann. Anlegg C ligger i nærheten av et elveutløp, mens anleggene A og B ligger i Sørfjorden som er en brakkvannsfjord. Den nøyaktige saliniteten gjennom produksjonsperioden er imidlertid ikke kjent.

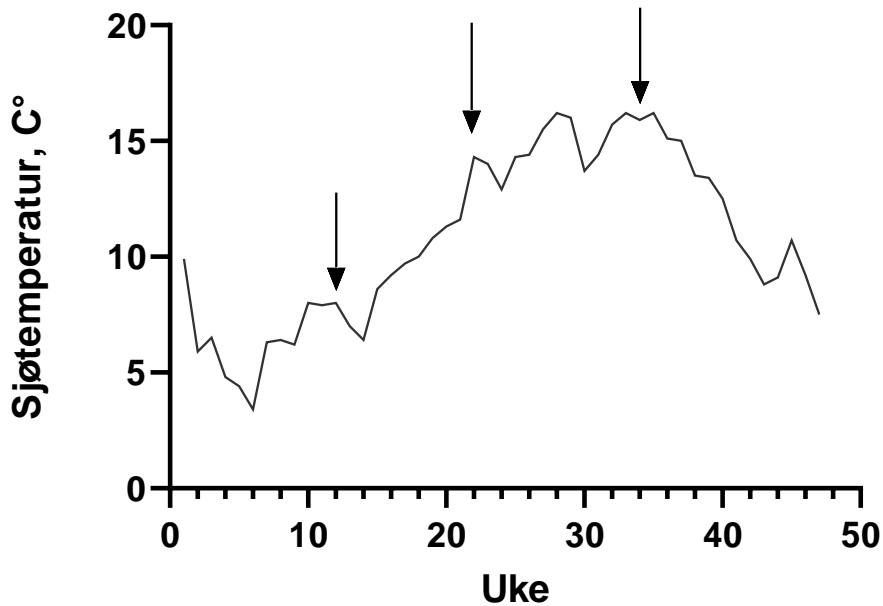
Temperatur og lakselus data er hentet fra BarentsWatch i perioden før og under uttakene.

For lokalitet A var temperaturen ved de 3 uttakene: 1) 8,0 C°, 2) 11,6 C° og 3) 15,9C° (Figur 3.1.1)



**Figur 3.1.1** Sjøtemperatur gjennom uttaksperioden ved lokalitet A, temperatur oppgitt i Celsius. Svarte piler markerer når uttakene ble gjennomført.

For lokalitet B var temperaturen ved de tre uttakene som følger, uttak 1: 7,9 C°, uttak 2: 11,4C° og uttak 3: 15,8C°.

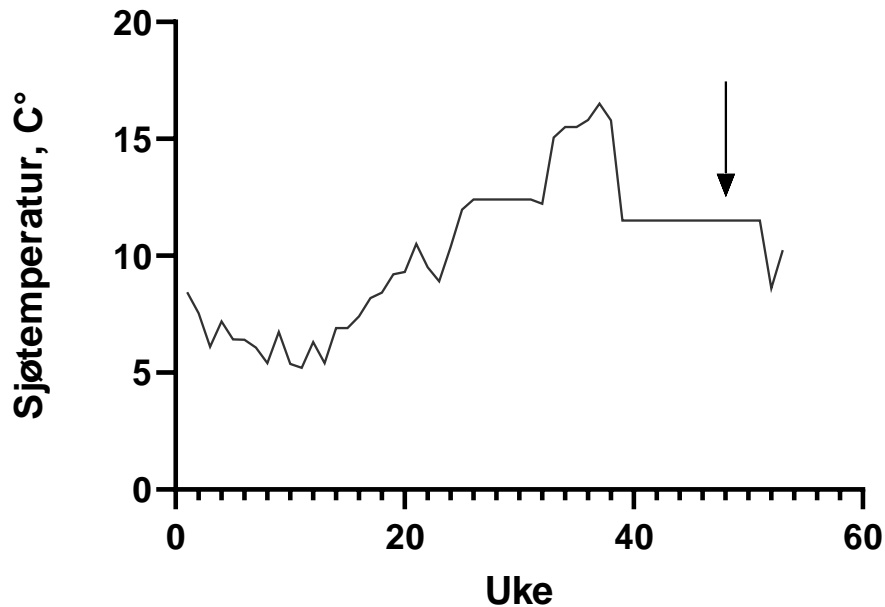


**Figur 3.1.2** Sjøtemperatur gjennom uttaksperioden ved lokalitet B, temperatur oppgitt i Celsius. Svarte piler markerer når uttaket tok sted

Vi ser at dataen som er samlet fra lokalitet A og lokalitet B har nesten identiske parameter ved uttakene. Dette kommer som en følge av de er lokalisert i samme fjord. Differansen i sjøtemperatur ved de 3 uttakene er: 1) 0,1 C°, 2) 0,2 C° og 3) 0,1 C° (Figur 3.1.1, Figur 3.1.2).



For lokalitet C var temperaturen ved uttaket 24. november 2020 11,5 C° (Figur 3.1.3).

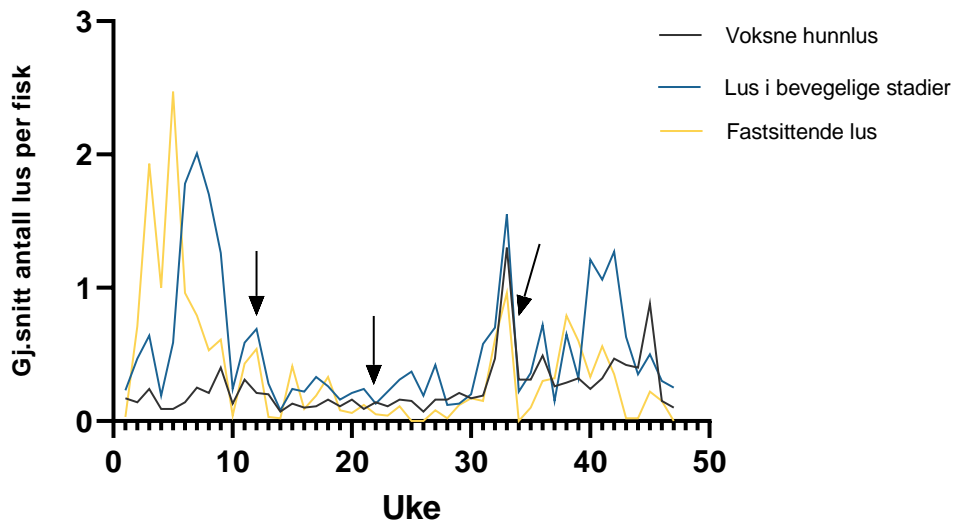


**Figur 3.1.3** Sjøtemperatur gjennom uttaksperioden ved lokalitet C, temperatur oppgitt i Celsius. Svarte piler markerer når uttaket tok sted

## 3.2 Anleggsdata - lakselus

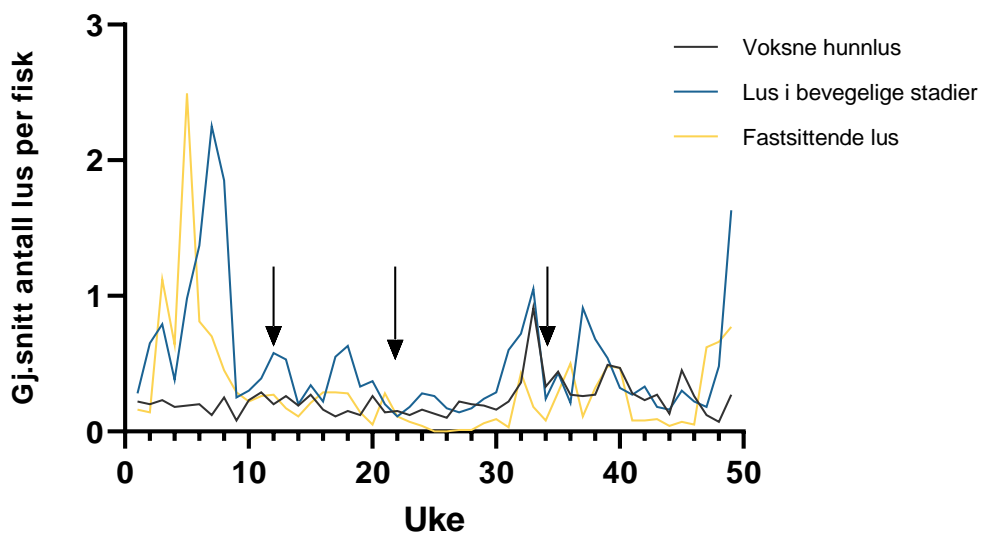
Mengde lakselus og gjennomføring av avlusinger ved de tre lokalitetene er hentet fra BarentsWatch.

For lokalitet A, ved første uttak i uke 12 var det registrert 0.21 voksne hunnlus per fisk, 0.69 lus i bevegelige stadier og 0.54 fastsittende lus. Uttak 2 i uke 21, 0.09 voksne hunnlus per fisk, 0.24 lus i bevegelige stadier og 0.12 fastsittende lus. Uttak 3 i uke 34, 0.31 voksne hunnlus, 0.22 lus i bevegelige stadier og 0.00 fastsittende lus (Figur 3.2.1).



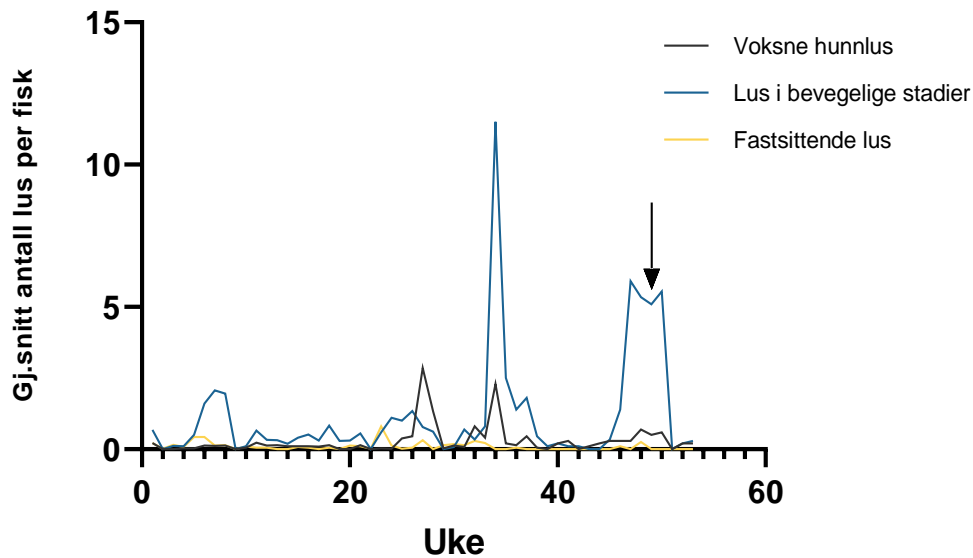
**Figur 3.2.1** Lokaltet A, lusedata, viser gjennomsnitt antall lus per fisk gjennom uttaksperioden. Svarte piler marker når uttaket ble gjennomført.

For Lokaltet B, ved uttak 1 i uke 12 var det registrert 0.2 voksne hunn lus per fisk, 0.58 lus i bevegelige stadier og 0.27 fastsittende lus. Uttak 2 i uke 21, 0.14 voksne hunn lus per fisk, 0.2 lus i bevegelige stadier og 0.28 fastsittende lus. Uttak 3 i uke 34, 0.33 voksne hunn lus, 0.24 lus i bevegelige stadier og 0.08 fastsittende lus (Figur 3.2.2).



**Figur 3.2.2** Lokaltet B, lusedata, viser gjennomsnitt antall lus per fisk gjennom uttaksperioden. Svarte piler marker når uttaket ble gjennomført.

For lokalitet C ved uttak i uke 48 var det registrert 0.7 voksne hunn lus per fisk, 5,35 lus i bevegelige stadier og 0.25 fastsittende lus.



**Figur 3.2.3** Lokalitet C, lusedata, viser gjennomsnitt antall lus per fisk gjennom uttaksperioden. Svarte piler marker når uttaket ble gjennomført.

### 3.3 Anleggsdata avlusninger

Data for avlusninger ved de ulike anleggene var hentet fra BarentsWatch, det året prøvene var hentet fra.

Uttakene for lokalitet A ble gjennomført i ukene 12, 21 og 34.

**Tabell 3.3.1** Avlusnings data for lokalitet A, året 2021.

Uke	Tiltak	Type behandling	Virkestoff	Omfang
3	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
4	Medikamentell	Badebehandling	Azamethiphos	Deler av lokaliteten
8	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
12	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
14	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
18	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
34	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
36	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
37	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
39	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten

Uttakene fra lokalitet B ble gjennomført i ukene 12, 21 og 34.

**Tabell 3.3.2** Avlusnings data for lokalitet B, året 2021

Uke	Tiltak	Type behandling	Virkestoff	Omfang
3	Medikamentell	Badebehandling	Azamethiphos	Deler av lokaliteten
3	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
4	Medikamentell	Badebehandling	Azamethiphos	Deler av lokaliteten
4	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
6	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
8	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
12	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
14	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
15	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
17	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
19	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
20	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
34	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
35	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
36	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
38	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
39	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
41	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
47	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten

Uttaket fra lokalitet C tok sted i uke 48.

**Tabell 3.3.3** Avlusnings data for lokalitet C, året 2020.

Uke	Tiltak	Type behandling	Virkestoff	Omfang
2	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
9	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
10	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
17	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
18	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
22	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
26	Mekanisk fjerning			Deler av lokaliteten
29	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
35	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
38	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
49	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten
51	Mekanisk fjerning			Hele lokaliteten

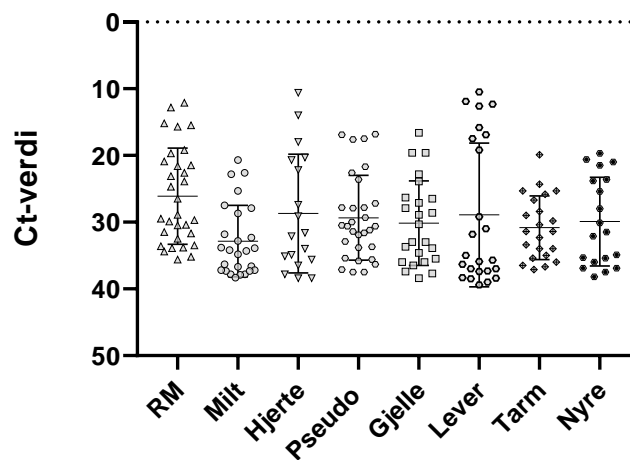
Metodene brukt for avlusning er kun spesifisert som mekanisk avlusning som kan innebære både bruk av flere metoder. Medikamentell behandling er spesifisert med både type behandling og virkestoff.

### 3.4 Stamfisk

Det ble gjennomført en screening av 31 vevsprøver per vevstype. Totalt ble 248 prøver screenet med PER assay, hvor alle vevstyper gav positive resultater. Alle prøvene hadde relativt høy prevalens, rød muskulatur hadde en prevalens på 100% med lave Ct-verdier og Pseudo like bak med en 96,8% prevalens. Gjennomsnitts Ct-verdi og prevalens for de følgende prøvene er vist i tabell 3.1.

**Tabell 3.2** Gjennomsnitt Ct-verdi, range, og prevalens for PER assay for vevstypene RM, Milt, Hjerte, Pseudo, Gjelle, Lever, Tarm og nyre.

Vevstype	Gjennomsnitt Ct-verdi	Range Ct	Prevalens
RM	26.1	12,1 – 35,6	100%
Milt	32.8	20,7 – 38,3	83.9%
Hjerte	28.7	14,0 – 38,4	58.0%
Pseudo	29.3	16,8 – 37,5	96.8%
Gjelle	30.1	16,6 – 37,7	77.4%
Lever	28.9	10,5 – 39,4	77.4%
Tarm	30.8	19,9 – 37,1	71.0%
Nyre	29.9	19,7 – 38,2	61.3%

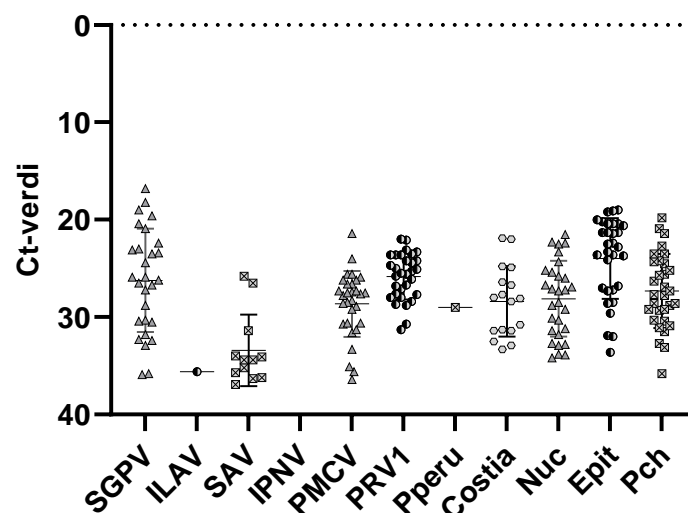


**Figur 3.3.1** Fordeling av Ct-verdi for PER assay. Rød muskulatur (RM), Milt, Hjerte, Pseudobranch (Pseudo), Gjelle, Lever, Tarm og Nyre. Framstilt med reverse Ct-verdier.

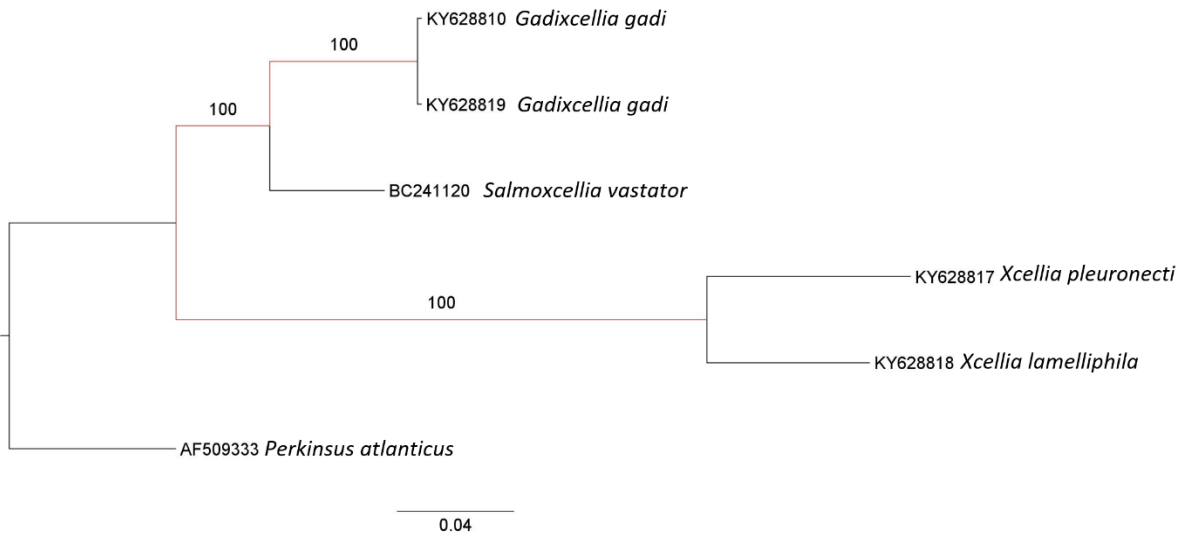
Det ble også utført en screening for utvalgte kjente patogener ved å kjøre 31 vevsprøver fra gjelle opp mot ulike patogener. Totalt ble 341 prøver analysert. Gjennomsnitt Ct-verdi og prevalens kan ses i tabell 3.3. De analyserte prøvene var positive for følgende patogener: SGPV, SAV, PMCV, PRV1, Costia, Nuc, Epit og Pch. Prøvene var negativ for ILAV, IPNV og Pperu.

**Tabell 3.3** Gjellelev, gjennomsnitt Ct-verdi, range, og prevalens for Salmon gill poxvirus(SGPV), Infeksiøs lakseanemi virus(ILAV), Salmonid alfphavirus (SAV), Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV), Piscine myocarditis virus (PMCV), Piscine orthoreovirus 1 (PRV1), *Paramoeba perurans* (Pperu), *Costia*, *Paranucleospora theridion* (*P. theridion*), *Candidatus Branchiomonas cysticola* (*Ca. B. cystic*), og *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (*Ca. P. salm*).

Patogen	Gjennomsnitt Ct-verdi	Range	Prevalens
SGPV	26.2	16,8 – 35,9	90.3%
ILAV	35.6	35,6	3.2%
SAV	33.4	25,8 – 36,9	38.7%
IPNV	0.0	-	0.0%
PMCV	28.6	21,4 – 36,4	96.8%
PRV1	25.8	22,0 – 31,3	100%
<i>P. perurans</i>	29.0	-	3.2%
<i>Costia</i>	28.4	21,9 – 32,9	54.8%
<i>P. theridion</i>	28.1	21,5 – 34,2	93.5%
<i>Ca. B.cystic</i>	24.0	19,0 – 32,0	100%
<i>Ca. P. salm</i>	27.3	19,8 – 35,8	100%



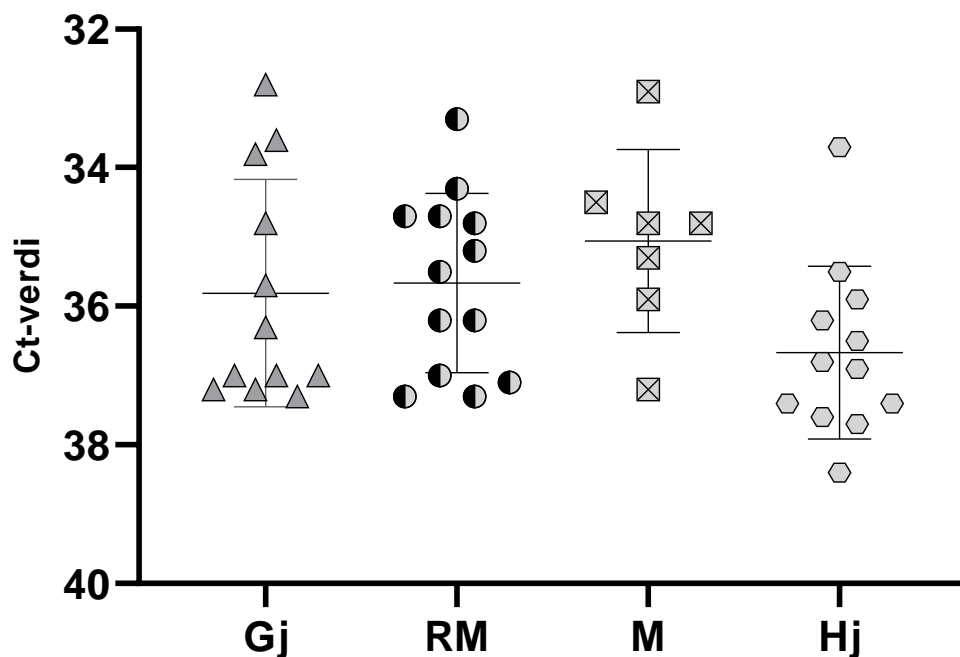
**Figur 3.3.2** Ct-verdi for ulike patogener. Salmon gill Poxvirus (SGPV), Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV), Salmonid alfphavirus (SAV), Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV), Piscine myocarditis virus (PMCV), Piscine orthoreovirus 1(PRV1), *P. perurans* (Pperu), *Costia*, *P. theridion* (Nuc), *Ca. B. cysticola* (Epit) og *Ca. P.salmonis* (Pch). Framstilt med reverse Ct-verdier.



**Figur 3.3.3** Slektskaps tre for *Salmoxcellia vastator* basert på rRNA (4266 nukleotider) fra kjente x-celle organismer. *Perkinsus atlanticus* er benyttet som utgruppe.

### 3.5 Lokaltet A

Fra lokalitet A ble det gjennomført 3 uttak, i uke 12 (26.03.2021), 19 (16.05.2021) og 34 (24.08.2021) i løpet av 2021. Prøvene ble som ble tatt fra regnbueørreten ved lokalitet A hadde en snittvekt på 1383g ved uttak 1, 2268g ved uttak 2 og 5320 ved uttak 3. Resultatene av real time RT PCR analysene viste en høy tilstedeværelse av parasitten *Salmoxcellia vastator* (Figur 3.4.1. og Tabell 3.4.1.) Uttak 1 og 2 viste positive resultater, mens uttak 3 viste ingen tegn til parasitten.



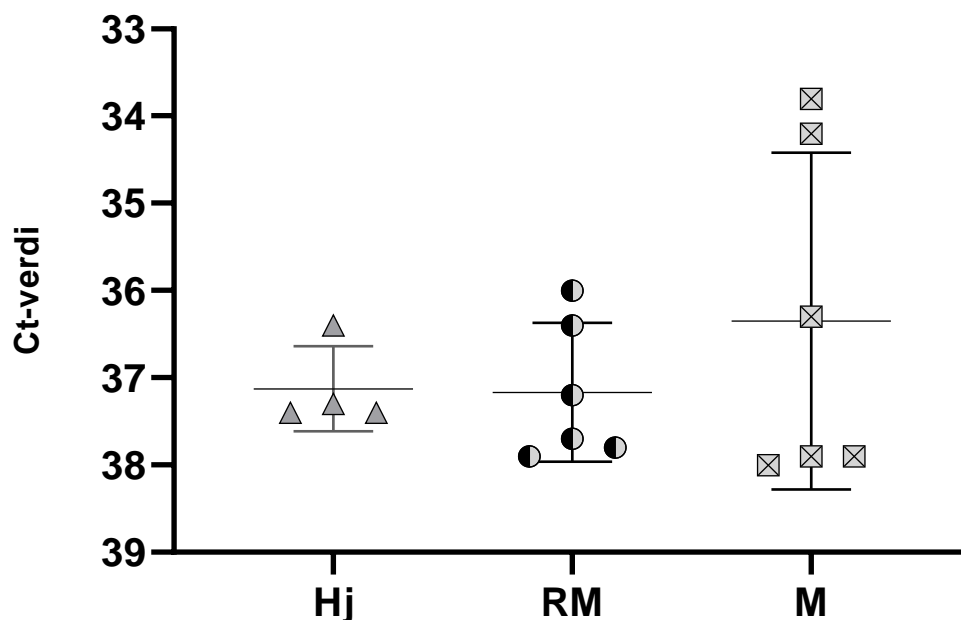
**Figur 3.4.1** Ct-verdier for PER-assay ved uttak 1(26.03.2021). Gjelle (Gj), rd muskulatur (RM), milt (M) og Hjerte (Hj). Framstilt med reverse Ct-verdier (40 – ct verdi).

**Tabell 3.4.1** Lokaltet A, gjennomsnitt Ct-verdi og prevalens for PER-assay ved uttak 1. Gjelle (Gj), rd muskulatur (RM), milt (M) og Hjerte (Hj). (Uttak 26.03.2021)

Vevstype	Gjennomsnitt Ct-verdi	Range	Prevalens
Gj	35,5	31,3 – 37,3	40,6%
RM	35,7	33,3 – 37,3	40,6%
M	35,1	32,9 – 37,2	21,9%
Hj	36,7	33,7 – 37,7	37,5%



Uttak 2 (16.05.2021) ble også testet for Salmonid alfavirus (SAV) patogener i tillegg til *S. vastator* (Figur 3.4.2. og tabell 3.5). Av 30 prøver fra hjertet testet 28 positivt for Salmonid alfavirus (SAV) med relativt lave Ct-verdier (gjennomsnitt = 25,1, range = 21,8 – 32,6).



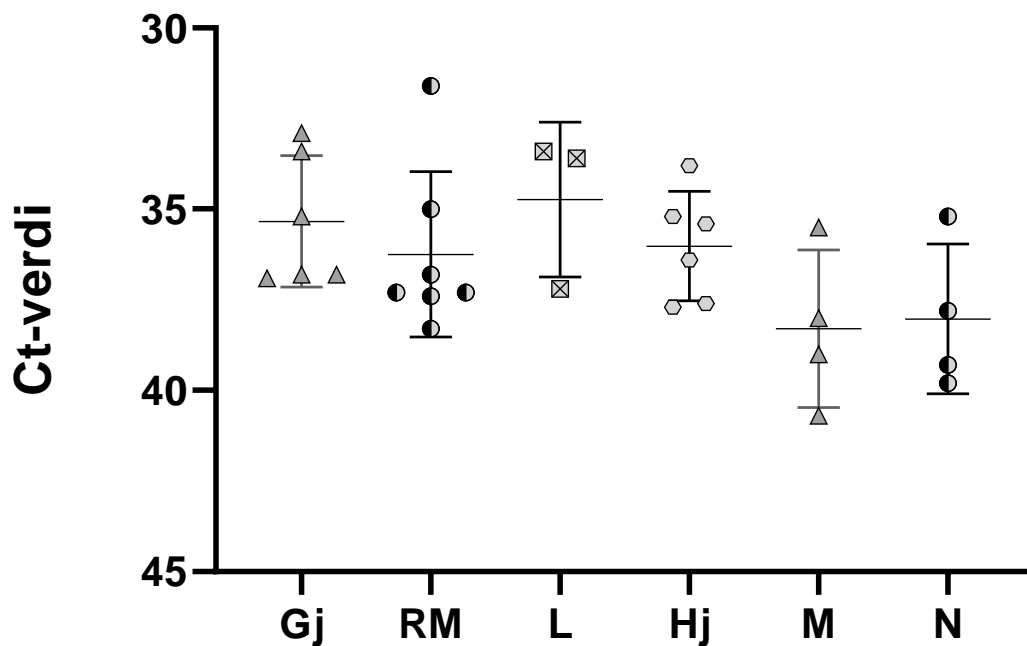
**Figur 3.4.2** Ct-verdier for PER-assay ved andre uttak. Hjerte (Hj), rød muskulatur (RM) og Milt (M). Framstilt med reverse Ct-verdier (40 – ct verdi).

**Tabell 3.5** Lokaltet A, gjennomsnitt Ct-verdi og prevalens for PER-assay ved uttak 2. Gjelle (Gj), rød muskulatur (RM), milt (M) og Hjerte (Hj).

Vevstype	Gjennomsnitt Ct-verdi	Range	Prevalens
Hj	37,1	36,4 – 37,4	13,3%
RM	37,2	35,3 – 37,7	20%
M	36,4	33,8 – 37,9	20%

### 3.6 Lokalitet B

Fra lokalitet B ble det gjennomført to uttak, i uke 12 (27.03.2021) og 34 (24.08.2021) i løpet av 2021. Ved lokalitet B lå snittvekten på 2060g ved uttak 1 og en snittvekt på 4120 g ved uttak 3. Real time RT PCR analysene av uttak 1 hadde lignende resultat som fra lokalitet A, hvor flere vev var positive (Figur 3.5.1, tabell 3.6). Uttak to hadde ingen tilstedeværelse av parasitten. Totalt ble 31 prøver testet for SAV, hvor de fleste individer hadde positive resultater med lave Ct-verdier (gjennomsnitt = 49,5, range = 15,3 – 28,9).



**Figur 3.5.1** Ct-verdier for PER-assay ved uttak 1. Gjelle (Gj), rød muskulatur (RM), Lever (L), Hjerte (Hj), Milt (M) og Nyre (N). Framstilt som reverse Ct-verdier (40 – ct verdi).

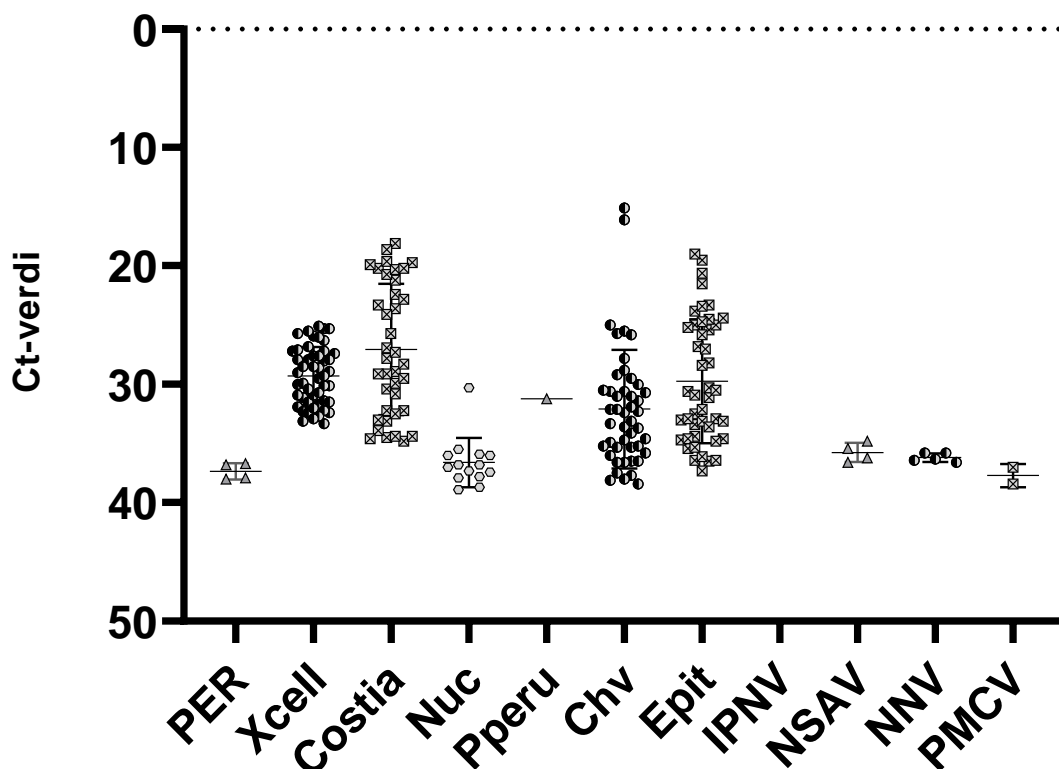
**Tabell 3.6** Lokalitet B, gjennomsnitt Ct-verdi og prevalens for PER-assay ved uttak 1. Gjelle (Gj), rød muskulatur (RM), milt (M), Hjerte (Hj), Lever (L) og Nyre (N).

Vevstype	Gjennomsnitt Ct-verdi	Range	Prevalens
Gj	35,3	32,9 – 36,9	19,4%
RM	36,2	31,6 – 38,3	22,6%
L	34,7	33,4 – 37,2	9,7%
Hj	36,0	35,2 – 37,7	19,4%
M	38,3	35,5 – 39,0	12,9%
N	38,0	35,2 – 39,3	12,9%

Prevalens av SAV RNA i hjertet gav en gjennomsnittlig Ct-verdi = 19,5 for alle individene som døde under lusebehandling 27.01.2021. Range for Ct-verdiene var 15,3 – 28,9.

### 3.7 Villfisk

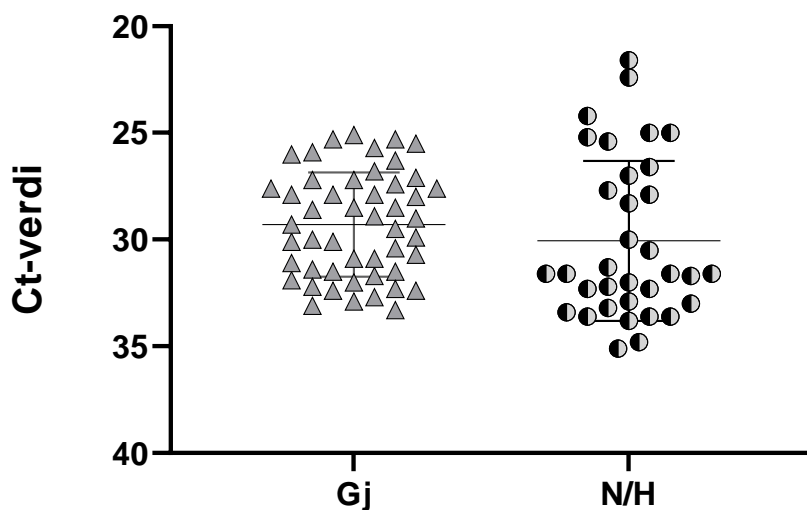
Det ble fanget villfisk (makrell og Lyr) i området rundt lokalitet A, 3 dager etter uttak 2. Fisken ble screenet for flere kjente patogener som er påvist i Norsk lakseoppdrett i tillegg til *S. vastator* (Figur 3.6.1, Tabell 3.7). Gjellelev fra tre lyr og en makrell var svakt positive for *S. vastator* (ct verdier 36,7 – 38,0, Figur 3.6.2). I tillegg var gjellelev fra alle fiskene positive (range: 25,3 – 33,3) ved bruk av assayet Xcell (Generelt assay for X-celler). Samme assay benyttet på hjerte/nyren villfiskene gav en prevalens lik 71,4 % (Range ct-verdier: 21,6 – 35,1). Sekvensering av PCR produkter fra disse positive fiskene gav imidlertid match mot Coccidier (se vedlegg A). Dette viser at assayet Xcell sannsynligvis fanger opp andre organismer enn X-celler og er dermed ikke egnet til screening for påvisning av disse parasittene.



**Figur 3.6.1** Ct-verdier ved screening av ulike patogener i gjellelev fra makrell og lyr. Salmonid alphavirus (SAV), Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV), Kardiomyopatisyndrom (PMCV), (Pperu), Costia, Nuc, Epit, Pch, Chv, PER og Xcell. Framstilt med reverse Ct-verdier (40 – ct verdi).

**Tabell 3.7** Prevalens, gjennomsnittlig ct-verdi, og ct-range til kjente lakse-patogener påvist på gjellene hos tre arter villfisk.

Agens	Makrell, N = 35	Lyr, N = 13	Sei, N = 1
PER	1/35, 36,7	3/13, 37,6, 36,8-38,0	0/1
Xcell	35/35, 29,2, 25,1-33,3	13/13, 29,6, 25,3-32,7	1/1, 27,9
Costia	24/35, 30,4, 21,2-34,8	13/13, 21,3,18,1-29,5	1/1, 22,4
<i>P. theridion</i> (nuc)	8/35, 37,2, 36,0-38,9	5/13, 35,6, 30,3-38,7	1/1, 37,0
<i>P. perurans</i> (Pperu)	1/35, 31,2	0/13	0/1
<i>Ca. B. cysticola</i> (Epit)	31/35, 32,6, 25,0-37,3	13/13, 23,4, 19,0-28,2	1/1, 23,8
Chlamydia (Chv)	34/35, 30,4, 15,1-35,3	11/13, 36,9, 35,2 – 38,4	1/1, 35,8
NNV	5/35, 36,2, 35,8 – 36,8	0/13	0/1
IPNV	0/35	0/13	0/1
SAV (NSAV)	1/35, 36,2	3/13, 35,6, 34,8-36,6	0/1
PMCV	0/35	2/13, 37,7, 37,0-38,4	0/1



**Figur 3.6.2** Ct-verdier for Xcell assay, gjelle (Gj) og nyre/hjerte (N/H). Framstilt med reverse Ct-verdier.

## 4. Diskusjon

*Salmoxcellia Vastator* har siden 2002 vært påvist langs kysten av Vestlandet i sporadiske perioder (Nylund et al, 2002, Karlsbakk et al. 2021, Dalum et al 2021). Det vanlige sykdomsbilde har vært granulomdannelse i indre organer tilsvarende den mer kjente Xcelle parasitten som vi finner hos villfisk over hele verden (Freeman et al. 2017, Desvignes et al. 2022). De mest påvirkede organer synes å være lever, hjerte, og rød muskulatur, granulom-liknende strukturer har også vært påvist i nyren, milt, tarm og gjeller (Dalum et al 2021). Resultatene fra dette studiet vil gi et innblikk i hvordan parasitten er lokalisert i ulike vev hos laks og ørret. Ved å sammenligne informasjon mellom anleggene vil jeg også se nærmere på om faktorer som temperatur, lusedata, behandlinger og andre patogener påvirker tilstedeværelsen av parasitten.

### 4.1 Evaluering av material og metode

I dette studiet ble det undersøkt fisk fra tre forskjellige anlegg, samt villfisk fra området ved lokalitet A og B, for tilstedeværelse av *S. vastator* ved hjelp av real time RT PCR. Som en følge av de store prøve mengdene ble ikke alle prøvene fulgt opp.

Prøveuttaket foregikk på laboratoriet hvor utstyret ble rensert mellom hvert vevsuttak og desinfisert mellom hvert individ. I denne fasen av studiet kunne det oppstått kontaminering, men ved analyse av prøvene var det ofte negative prøver mellom lave Ct-verdier. Som tyder på at kontamineringen var minimal.

Prøvene fra både lokalitet A og B testet positivt for NSAV, med lave Ct-verdier. Dette kan ha påvirket dødeligheten i anleggene og hvordan *S. Vastator* parasitten utviklet seg i fisken. Tilsvarende var stamfisken på lokalitet C smittet med PMCV som helt klart kan ha bidratt til dødelighet i dette anlegget. Alle undersøkte fisk fra dette anlegget var svimere og død fisk, og syv av dødfisken var negative for *S. vastator*. Dette viser at ande patogener en *S. vastator* har bidratt til dødelighet i anlegget. I tidligere undersøkelser av denne parasitten hos regnbueørret ble det kun påvist 2 % dødelighet assosiert med parasitten (Nylund et al. 2006). Det foreligger med andre lite data som tilsier at denne parasitten kan gi høy dødelighet in smittede anlegg. Imidlertid førte infeksjon av regnbueørret med *S. vastator* til en nedklassifisering av fisken på slaktelinjen (A Nylund, 2006).

## 4.2 Regnbueørret lokalitet A

Prøvene fra regnbueørret på lokalitet A testet positiv for *Salmoxcellia Vastator* ved uttak 1 og 2 (figur 3.4.1, 3.4.2). Gjelleprøvene og rød muskulatur hadde samme prevalens på 40,6%, fulgt av hjerte som lå på 37,5% (tabell 3.4.). Milt hadde lavest utslag på prøvene med en prevalens på 21,9%. Det som gikk igjen var at dersom et vev fra et individ var positivt, testet også andre vevstyper fra individet positivt. Spesielt blodrike vev som nyre, rød muskulatur, hjerte og lever. Dette støtter tidligere forskning som har blitt gjort på *S. Vastator* parasitten som sier at tilstedeværelsen av parasitten i laksefisk vil danne en systemisk infeksjon (Nylund et al. 2006, Karlsbakk et al., 2021, Dalum et al 2021). Dette har blitt sett også i coho laks i Spania, hvor de fant x-celler lokalisert i blodkanalen noe som bidro til atrofi av omkringliggende hepatocytter (Dyková et al. 1993b).

Ved uttak 2 så vi en nedgang i antall positive prøver, men tilstedeværelsen av parasitten var fortsatt der. Hjerte hadde en prevalens på 13.3%, hos rød muskulatur og milt lå prevalensen på 20% (tabell 3.5). Gjennomsnitt Ct-verdien viste også en økning mellom uttakene, som tilsier at parasitten har hatt en nedgang siden uttak 1. Ved uttak 3 testet vevsprøvene negativt for parasitten.

I løpet av screening-perioden har jeg sett på følgende faktorer som kan ha hatt en påvirkning på parasitten; temperatur, lakselus, behandlinger, andre patogener og eventuelt redusert smitte fra omliggende miljø.

Ved å sammenligne resultatene fra de tre uttakene ved lokalitet A ser vi en nedgang av tilstedeværelsen til parasitten *S. Vastator*. I løpet av perioden det ble tatt prøver har temperaturen økt fra 8,0 C° til 15,9 C°, som kan ha hatt en medvirkning på nedgangen. Det høye antallet luse-behandlinger kan ha hatt en negativ innvirkning på fisken uten at stress som følge av dette har ført til økt forekomst eller tetthet av parasitten. Dødelighet i anlegget kan sannsynligvis knyttes til forekomst av SAV. Nedgang i forekomst av *S. vastator* tyder på manglende horisontal spredning mellom regnbueørret in anlegget, i tillegg til manglende smittepress fra det omliggende miljø.

### 4.3 Regnbueørret lokalitet B

Resultatene fra lokalitet B viste også tilstedeværelsen av parasitten *Salmoxcellia Vastator* men her var prevalensen en del lavere. Rød muskulatur hadde den høyeste prevalensen med 22,6 %, etterfulgt av gjelle og hjerte på 19,4%, Milt og nyre lå på 12,9% mens lever hadde lavest med 9,7%. I likhet med lokalitet A, var det en sammenheng mellom vevsprøver fra individer som var positive. I likhet med situasjonen på lokalitet A ble det observert økende temperatur på lokalitet B, og påvisning av betydelige mengder med SAV RNA i prøvene. Dette viruset kan uten tvil ha vært medvirkende årsak til dødelighet i forbindelse med mekanisks avlusing i anlegget, mens *S. vastator* synes å ha vært uten betydning. Heller ikke her ble det registrert horisontal smitte av parasitten (dvs økning prevalens) hverken fra positiv regnbueørret eller fra det omliggende miljø.

### 4.4 Regnbueørret lokalitet A og B

Det ble ikke observert noen ytre eller indre tegn av parasitten ved både lokalitet A og B, i motsetning til tidligere studier som har vist hvite noder i det fleste vev og organer (Nylund, et al. 2002). Analyser av vevsprøver viste allikevel en tydelig tilstedeværelse av parasitten, en systemisk infeksjon både ved uttak 1 for lokalitet A og B, samt uttak 2 for lokalitet A. Parasittetallet avtok i korrelasjon med temperatur økningen, i rapporten fra 2002 ble det nevnt at regnbue ørreten vokste godt fram til oktober da temperaturen lå på 15 C° før temperaturen falt til 9,5 C° og ble slaktet i desember (Nylund, et al. 2002). En korrelasjon mellom temperatur og parasittens evne til å overleve kan derfor ikke utelukkes. Fisken i lokalitet A og B var utsatt for en rekke behandlinger av lakselus, som vil føre til at fisken blir svekket i ulike perioder. Tiltros for dette viste ikke analysene at parasitten økte i de over periodene med behandling, som igjen kan tyde på at det ikke var horisontal smitte til stede i merdene.

Ved uttak 3 var prevalensen til parasitten 0% i de undersøkte vevsprøvene. Som kan antyde at fiskens immunforsvar klarer å bekjempe parasitten, eller at laksefisk ikke er en optimal vert. Analyser av villfisk fra områdene rundt lokalitet A og B viste heller ingen tegn til parasitten, så smitekilden eller den opprinnelige verten er fortsatt ukjent. Ingen korrelasjon mellom de nært beslektede artene *Gadixcellia*, *Xcellia* og *Notoxcellia* kan observeres basert på resultatene fra dette studiet (Desvignes et al., 2022; Mark A. Freeman et al., 2017).

#### 4.4. Laks lokalitet C

Laks fra stamfiskanlegget, lokalitet C, besto kun av et uttak i forbindelse med dødelighet i anlegget. All fisken som ble prøvetatt var svimere og død fisk. Som vi har sett fra lokalitet A og B, er det en klar sammenheng der flere vev fra samme fisk er positiv dersom individet har parasitten påvist. Det synes også å være en korrelasjon mellom ct-verdiene i de ulike vevene. Dette kan forklares ut ifra at *S. Vastator* foretrekker til blodrike organer og påfører en systemisk infeksjon. Dette har også blitt observert ved hjelp av histopatologi (Dalum, et al. 2021).

Heller ikke i dette anlegget ble det påvist 100 % prevalens hos død fisk eller svimere, med det agens som klarest kan knyttes til dødelighet i anlegget er PMCV.

#### 4.5 Villfisk

Totalt ble det samlet inn 49 villfisk fra områdene rundt anleggene på lokalitet A, 3 dager etter uttak 2. Villfisken bestod av 13 lyr, 35 makrell og 1 sei (tabell 1.1), hvor det ble tatt prøver fra gjeller, hjerte og nyre. Vevsprøvene ble screenet for x-celler i tillegg til andre patogener, for å se om det spredningen kunne kommet fra de dominante fiskeartene i området rundt oppdrettsmerden (figur 3.6.1). Det ene assyet (Xcell) gav sterke positive signaler for mulig tilstedeværelse av X-celler. Imidlertid viste sekvensering av produkter fra disse fiskene at det dreide seg om en coccidie, dvs dette assayet var ikke spesifikk for X-celler (Vedlegg A). 4 vevsprøver ga utslag på PER-assay, men i kombinasjon med høye ct-verdier og gjelleprøver vil nok forklaringen på dette være kontaminering fra omgivelsene (figur 3.6.1).

Villfisken testet også positivt for *Costia*, *P. theridion* (Nuc) og *Ca. B. cysticola* (Epit), som er patogener som også går på laksefisk.

De undersøkte vevsprøvene fra villfisk i dette studiet viste ikke indikasjoner på mulig smittekilde eller vert for *S. Vastator*.



## 5. Konklusjon

Basert på Analysene viste tilstedeværelsen av parasitten og ved alle lokaliteter. Hovedfunnene var systemisk infeksjon med høy tilstedeværelse i blodrike vev og med en avtagende prevalens over uttaksperioden i en periode med stigende temperatur. Resultatene indikerer at immunforsvaret klarer å bekjempe parasitten. Videre, var det ikke mulig å påvise horisontal smitte mellom regnbueørret eller fra det omliggende miljø. Villfisk ble undersøkt for å finne mulige smittekilder eller verter for parasitten, men resultatene viste ingen tilstedeværelse av parasitten *S. Vastator*.

## **6 Forslag til videre forskning**

Livssyklusen til *S. Vastator* er fortsatt ukjent det gjenstår å identifisere smitekilden eller den/de original for parasitten. Hvis en skal oppnå bedre kontroll med *S. vastator* vil det være nødvendig å kartlegge forekomsten av parasitten i det omliggende miljø til anleggene og identifisere eventuelle verter. Undersøkelser av groe på not, sediment prøver og videre testing av villfisk vil bidra til en bedre forståelse av parasitten.

## 6. Referanser

- A Nylund, E. K. C. M. K. W. (2006). Ny parasitt påvist hos regnbueørret og laks i oppdrett på Vestlandet [New parasite detected in rainbow trout and salmon in western Norway]. *Nor Fiskeoppdr*, 31, 46–49.
- Are Nylund, Egil Karlsbakk, Cecilie Myklebust, K. W. (2002). *Ny parasitt påvist hos regnbueørret i oppdrett på vestlandet*. 67–70.
- Brooks, R. E., McArn, G. E., & Wellings, S. R. (1969). Ultrastructural Observations on an Unidentified Cell Type Found in Epidermal Tumors of Flounders. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 43(1), 97–109. <https://doi.org/10.1093/JNCI/43.1.97>
- Dalum, A. S., Wisløff, H., Kvinnsland, H. H., Nylund, A., & Karlsbakk, E. (2022). Histopathological description of an emerging disease in Norwegian salmonid aquaculture caused by an x-cell parasite. *Journal of Fish Diseases*, 45(1), 213–217. <https://doi.org/10.1111/jfd.13532>
- Desvignes, T., Lauridsen, H., Valdivieso, A., Fontenele, R. S., Kraberger, S., Murray, K. N., ... Postlethwait, J. H. (2022). A parasite outbreak in notothenioid fish in an Antarctic fjord. *IScience*, 25(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104588>
- Dethlefsen, V., Lang, T., & Damm, U. (1996). X-cell disease of cod *Gadus morhua* from the North Sea and Icelandic waters. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25(1–2), 95–106. <https://doi.org/10.3354/DAO025095>
- Diamant, A., & McVicar, A. H. (1987). The effect of internal and external X-cell lesions on common dab, *Limanda limanda* L. *Aquaculture*, 67(1–2), 127–133. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90017-2)
- Dyková, I., Figueras, A., & Novoa, B. (1993a). X-cell lesions in the liver of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15, 171–174. <https://doi.org/10.3354/DAO015171>
- Dyková, I., Figueras, A., & Novoa, B. (1993b). X-cell lesions in the liver of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis Aquat Org*, 15, 171–174. <https://doi.org/10.3354/dao015171>

- Freeman, M. A. (2009). X-cell parasites in the European dab *Limanda limanda* are related to other X-cell organisms: a discussion on the potential identity of this new group of parasites. *Parasitology*, *136*(9), 967–980. <https://doi.org/10.1017/s0031182009006507>
- Freeman, Mark A., Fuss, J., Kristmundsson, Á., Bjorbækmo, M. F. M., Mangot, J. F., del Campo, J., ... Bass, D. (2017). X-Cells Are Globally Distributed, Genetically Divergent Fish Parasites Related to Perkinsids and Dinoflagellates. *Current Biology*, *27*(11), 1645-1651.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.04.045>
- Karlsbakk, E., Nystøyl, C. F., Plarre, H., & Nylund, A. (2021). A novel protist parasite, *Salmoxcellia vastator* n. gen., n. sp. (Xcelliiidae, Perkinsozoa), infecting farmed salmonids in Norway. *Parasites and Vectors*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04886-0/FIGURES/7>
- Lange, E. (1973). Carcinoid-like tumours in the pseudobranch of *Gadus morhua*. *Comp Biochem Physiol*, *45*(2), 477–481. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90455-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90455-6)
- Watermann, B., & Dethlefsen, V. (1982). Histology of pseudobranchial tumours in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, *35*(2), 231–242. <https://doi.org/10.1007/BF01997554/METRICS>

## Vedlegg A

Alignement av rRNA sekvens fra coccidie i makrell mot den nærmeste slektninger *Goussia* sp. Prosent likhet med *Goussia bayae* (Accession no: MH758784) som er til stede hos hvit abbor *Morone americana* (Mark et al. 2018) var 98,0 %. Xcell-assayet er markert med farger (grønn for primere og rødt for probe). Forklaringen på positiv makrell og lyr kan være at assayet påviser coccidier hos disse artene.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120     *      140     *      160     *      180     *
HM117907 : -----CTGGTGTATCCCGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAAAGATTAAAGCCATGCATGCTCTAAGTAAAGCCTTTATACGGTGAACCTGGCAATGGGTCATTAACACAGTTATAGTTTATGATGGTCATTACTACATGGATAACCGTGGTAACTCTATGGCTAATACATGGCG : 173
HM117908 : -----AAGATTAAAGCCATGCATGCTCTAAGTAAAGCCTTTATACGGTGAACCTGGCAATGGGTCATTAACACAGTTATAGTTTATGATGGTCATTACTACATGGATAACCGTGGTAACTCTATGGCTAATACATGGCG : 137
MH758784 : GCTTTTGTGAATGCATAGCAACCTGGTGTATCCCGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAAAGATTAAAGCCATGCATGCTCTAAGTAAAGCCTTTATACGGTGAACCTGGCAATGGGTCATTAACACAGTTATAGTTTATGATGGTCATTACTACATGGATAACCGTGGTAACTCTATGGCTAATACATGGCG : 197
Makrell_co : -----
aagattaaagctatgctctaaagcttttatacggtgaaactgccaatggctcattaaacaggtatagtttatttgatggtcatttactacatggataacccgtggttaattctatggctaatcacatgcca

200      *      220     *      240     *      260     *      280     *      300     *      320     *      340     *      360     *      380     *
HM117907 : AAGCCACCTTCACTTGAAGGGCTGCTTTATTAGATACAAAACCTCCCTCTTCTGGGAAACTGGTGTATCATACTAAGCAACGAATCCGGCTAAGCGTTGGCCAGCGGATAGATCAATCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCCGACGGTAGGGFATGGCCATCCCGGCCCTGACGGGTAAAGGGGAA : 365
HM117908 : AAGCCACCTTCACTTGAAGGGCTGCTTTATTAGATACAAAACCTCCCTCTTCTGGGAAACTGGTGTATCATACTAAGCAACGAATCCGGCTAAGCGTTGGCCAGCGGATAGATCAATCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCCGACGGTAGGGFATGGCCATCCCGGCCCTGACGGGTAAAGGGGAA : 329
MH758784 : AAGCCACCTTCACTTGAAGGGCTGCTTTATTAGATACAAAACCTCCCTCTTCTGGGAAACTGGTGTATCATACTAAGCAACGAATCCGGCTAAGCGTTGGCCAGCGGATAGATCAATCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCCGACGGTAGGGFATGGCCATCCCGGCCCTGACGGGTAAAGGGGAA : 394
Makrell_co : -----
aagggcaacttctctgaagggctgtgtttattagatacaaaaaccc c c cttgtgggaaactggtgattcatagtaaccgaacgaatcgcgctacggctcggccagcagatagatcattcaagtttctgacctatcagctttcagcggtagggattggcctaccgtggca tgcagggtaacggggaa

400      *      420     *      440     *      460     *      480     *      500     *      520     *      540     *      560     *      580     *
HM117907 : TTAGGCTTCGATCCCGAGAGGGAGCCCTGAGAAACGGCTACCAATCTAAGGAGCGAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 562
HM117908 : TTAGGCTTCGATCCCGAGAGGGAGCCCTGAGAAACGGCTACCAATCTAAGGAGCGAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 526
MH758784 : TTAGGCTTCGATCCCGAGAGGGAGCCCTGAGAAACGGCTACCAATCTAAGGAGCGAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 591
Makrell_co : -----
ctgagcagcggccaaatTACCATACTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 142
tttaggttcgatcccgagagggagcctgagaaacggctaccacatctaaggaagcAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC

600      *      620     *      640     *      660     *      680     *      700     *      720     *      740     *      760     *      780     *
HM117907 : CAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 759
HM117908 : CAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 723
MH758784 : CAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 788
Makrell_co : -----
CAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC : 339
CAGCAGCGCCGCAAAATACCAATCCCTGACACAGGAGGTAAGTACAAATAACAATACAGCCATTTATCCTTTGTAATTTGAATCTGGGAATATAAACCCCTTTCAGAGTAACGATGGAGGGCAAGTCTCGTCC

800      *      820     *      840     *      860     *      880     *      900     *      920     *      940     *      960     *      980     *
HM117907 : AGAGTGTTCACAGCGCTTCTGGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTCCGTTCTATTTTCTGGTTCCTAGGACTGAAGTAATGATTAATAGGACAGTTGGGGGCAATTCGATTTAAACAGCACTACTCGGAAAGCAATTTGCCAAGGAT : 956
HM117908 : AGAGTGTTCACAGCGCTTCTGGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTCCGTTCTATTTTCTGGTTCCTAGGACTGAAGTAATGATTAATAGGACAGTTGGGGGCAATTCGATTTAAACAGCACTACTCGGAAAGCAATTTGCCAAGGAT : 920
MH758784 : AGAGTGTTCACAGCGCTTCTGGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTCCGTTCTATTTTCTGGTTCCTAGGACTGAAGTAATGATTAATAGGACAGTTGGGGGCAATTCGATTTAAACAGCACTACTCGGAAAGCAATTTGCCAAGGAT : 985
Makrell_co : -----
AGAGTGTTCACAGCGCTTCTGGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTCCGTTCTATTTTCTGGTTCCTAGGACTGAAGTAATGATTAATAGGACAGTTGGGGGCAATTCGATTTAAACAGCACTACTCGGAAAGCAATTTGCCAAGGAT : 536
AGAGTGTTCACAGCGCTTCTGGCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAGATAGGATTTCCGTTCTATTTTCTGGTTCCTAGGACTGAAGTAATGATTAATAGGACAGTTGGGGGCAATTCGATTTAAACAGCACTACTCGGAAAGCAATTTGCCAAGGAT

1000     *      1020    *      1040    *      1060    *      1080    *      1100    *      1120    *      1140    *      1160    *      1180
HM117907 : GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATCTTAAACATAAACTATGCCACTAGAGATAGGAAATAGTCTATTTTTCGACTTCTCCTGCACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTAAGCGGAA : 1153
HM117908 : GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATCTTAAACATAAACTATGCCACTAGAGATAGGAAATAGTCTATTTTTCGACTTCTCCTGCACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTAAGCGGAA : 1117
MH758784 : GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATCTTAAACATAAACTATGCCACTAGAGATAGGAAATAGTCTATTTTTCGACTTCTCCTGCACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTAAGCGGAA : 1182
Makrell_co : -----
GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATCTTAAACATAAACTATGCCACTAGAGATAGGAAATAGTCTATTTTTCGACTTCTCCTGCACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTAAGCGGAA : 563
GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCTGATCTTAAACATAAACTATGCCACTAGAGATAGGAAATAGTCTATTTTTCGACTTCTCCTGCACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTAAGCGGAA

1200     *      1220    *      1240    *      1260    *      1280    *      1300    *      1320    *      1340    *      1360    *      138
HM117907 : GGCACCACAGGCTGAGAGCTTCCGCTTAAAGTACTCAACACGCGGAACTCAACAGCTCCAGACATGGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGTATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCGGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTGCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTTAACTGCTAAATAGG : 1350
HM117908 : GGCACCACAGGCTGAGAGCTTCCGCTTAAAGTACTCAACACGCGGAACTCAACAGCTCCAGACATGGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGTATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCGGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTGCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTTAACTGCTAAATAGG : 1314
MH758784 : GGCACCACAGGCTGAGAGCTTCCGCTTAAAGTACTCAACACGCGGAACTCAACAGCTCCAGACATGGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTGTATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCGGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTGCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTTAACTGCTAAATAGG : 1379
Makrell_co : -----
ggcaccacagcgctggagcctgcggcttaattgactcaacacggggaactcaccaggtccagacatgggaaggatgacagatgtagctcttcttattgattctatgggtgggtggtgatggtcgccttcttagttggtgagtgatttctggttaattccggttaacgaacgagaccttaacctgctaaatagg

1400     *      1420    *      1440    *      1460    *      1480    *      1500    *      1520    *      1540    *      1560
HM117907 : GTCAGGAACCTCGGTTCTGAATCACTTCTAGAGGACTTTGCGTGTCTAAGCAAGGAAGTTGAGGCAATAACAGGCTCTGTATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAGAGTTTATAACCTCGGCCATAGCCCTGGTAATCTTGTAGATGATGATCGTGATGGGGATA : 1547
HM117908 : GTCAGGAACCTCGGTTCTGAATCACTTCTAGAGGACTTTGCGTGTCTAAGCAAGGAAGTTGAGGCAATAACAGGCTCTGTATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAGAGTTTATAACCTCGGCCATAGCCCTGGTAATCTTGTAGATGATGATCGTGATGGGGATA : 1511
MH758784 : GTCAGGAACCTCGGTTCTGAATCACTTCTAGAGGACTTTGCGTGTCTAAGCAAGGAAGTTGAGGCAATAACAGGCTCTGTATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAGAGTTTATAACCTCGGCCATAGCCCTGGTAATCTTGTAGATGATGATCGTGATGGGGATA : 1576
Makrell_co : -----
gtcaggaac tgggtt ctgaatcaactcttagaggaactttgctgtctaacgcaaggaagttaggcaataaacaggtctgtgatgcccttagatggtctgggctgacgcccgtctacactgatgcattcaacagagttataacct ggccg tagg ct ggtaactctgtgagatgcatgctgatggggata

1580     *      1600    *      1620    *      1640    *      1660    *      1680    *      1700    *      1720    *      1740    *      1760
HM117907 : GATTATTGCAATTTAATCTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGGCAAGTCAGCAGCTTCTGCGGATTACCTCCCTGGCTTTGTACACACCGCCCGTGGCTCCTACCGATTGAGTGATCCGGTGAATATTCCGAGCTATCCCTTACCCGTAAGGGTCTGGGTTGGGAAGTTTGTGAACCTTATCACTTACAG : 1743
HM117908 : GATTATTGCAATTTAATCTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGGCAAGTCAGCAGCTTCTGCGGATTACCTCCCTGGCTTTGTACACACCGCCCGTGGCTCCTACCGATTGAGTGATCCGGTGAATATTCCGAGCTATCCCTTACCCGTAAGGGTCTGGGTTGGGAAGTTTGTGAACCTTATCACTTACAG : 1701
MH758784 : GATTATTGCAATTTAATCTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGGCAAGTCAGCAGCTTCTGCGGATTACCTCCCTGGCTTTGTACACACCGCCCGTGGCTCCTACCGATTGAGTGATCCGGTGAATATTCCGAGCTATCCCTTACCCGTAAGGGTCTGGGTTGGGAAGTTTGTGAACCTTATCACTTACAG : 1773
Makrell_co : -----
gattattgcaattattaatctcaacgaggaatgcctagtagggcgaagtgcagcagcttggcggattacgctccctgctcaacacggcggctgctcctaccgattgagtgatccggtgaattatccggac g tccct tac cgtaggggtg ygg tgggaagtttggtaacctatcac

```