

Epiteliocystis og Proliferativ gjellebetennelse - Felterfaringar

Av fiskehelsebiolog Cand.scient. Cecilie F. Myklebust og biolog Cand.real. Jan Arne Holm, Fjord-Lab AS

Epiteliocystis og Proliferativ gjellebetennelse medfører store tap for oppdrettsnæringa. Sjukdommen har likevel fått mindre merksemd enn omfanget skulle tilseie, og kunnskapen er fortsatt mangelfull. *Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV)* og *epiteliocystis*-bakterien er i det minste medverkande årsaker, samtidig som også andre organsimar kan finnast. Meir kunnskap om årsaksforhold er grunnlaget for gode diagnostiske metodar og mottiltak mot sjukdommen utover vanleg god drift.

Matfiskoppdrett av laks frå Agder i sør til Finnmark i nord har gjennom ei årrekke hatt problem med gjellelidningar som *epiteliocystis* (EC) og liknande. Den fyrste påvisinga av sjukdommen i Norge på laks i sjø er truleg frå Ytre Nordfjord i 1989 (Kvellestad 1990). Sjukdommen har vekslende vore omtala som *epiteliocystis* og gjellebetennelse. Namnet *epiteliocystis* har vore mykje brukt fordi ein ved mikroskopi ofte finn rickettsie- eller klamydieliknande bakteriar som danner "epiteliocyster" i overflateceller i gjellane (Nylund et al. 1998). Draghi et al. (2004) har karakterisert desse bakteriane (*epiteliocystis*-bakteriane) som er funne på atlantisk laks frå *epiteliocystis*-utbrot i Norge og Irland i 1999 og 2000 og føreslege namnet *Piscichlamydia salmonis*.

I mange tilfelle av gjellebetennelse kan få eller ingen *epiteliocyster* påvisast ved mikroskopi, og det er dermed grunn til å spørje om det i tillegg finst ei eller fleire andre årsaker. Av den grunn er samleomgrepet proliferativ gjellebetennelse (Proliferative

gill inflammation: PGI) innført. Namnet heng saman med at typisk for sjukdommen er betennelse og auka tal overflateceller i gjellene. I tillegg finn ein også blødingar og vevsdød, ofte også vevsdød i lever. Sjølv om dei fleste oppdrettarar i dag er best kjende med EC som sjukdomsnamn, er likevel samleomgrepet PGI i dag oftast det mest korrekte å nytte for å namnje sjukdomen.


Førekomst

Undersøkingar syner at den vanligaste forma for PGI opptre i august på vårutsett smolt, med størst utgong i perioden september – oktober (Kvellestad et al., 2005, i Havbruksrapporten). I 2002/2003 var det òg ei auke i påvisingar på haustsmolt (Nygaard, 2004). I tillegg til akutt dødeligheit blir sjukdomen ofte kronisk og ein får mykje magre "taparar" i etterkant. Dødelegheita vil vanlegvis variere frå nokre få prosent til 20 % (Nygaard, 2004), men inntil 85 % dødeligheit har og vore registrert (pers.obs.).

Ei kartlegging av problema frå 1998, 1999 og 2002/2003 synte at dei fleste utbrota førekjem

i området Agder, Rogaland og Sogn og Fjordane, men at det også har vore ei auke i Midt- og Nord-Noreg (Nygaard, 2000 og 2004). I Møre og Romsdal, eit fylke med ca 10% av norsk lakseproduksjon, var det i 2003 påvist PGI på 15 lokalitetar, noko som kan indikere at omkring 150 lokalitetar på landsbasis årleg kan ha sjukdommen (Kvellestad et al. 2004). Det er ikkje registrert at sjukdommen har skapt problem for andre artar i oppdrett i Norge. Om ein ser på utlandet, har *epiteliocystis*-liknande organismar skapt problem for atlantisk laks i Irland (Lannan et al. 1999), og store problem for havabbor i Middelhavet (cf. Crespo et al. 2001). For øvrig er EC med funn av *Chlamydia*-liknande organismar påvist hos mange ulike artar frå store deler av verda.

Det er vist at *Chlamydia* artar i periodar kan leve i amøber/eincella organismar (Draghi et al, 2004). Eincella parasittar som *Trichodina sp.* og "*Costia*" er ofte eit problem om hausten, i tillegg til PGI, på årsutsett av smolt. Det er då freistande å stille spørsmålet om protozoar kan vere vert for smittestoffet her i Norge òg .

<p>Korleis ser sjuk fisk ut ?</p>	<p>Sjuk fisk blir apatisk og står gjerne i ytterkant av mæra, motstraums. Ved store akutte utbrudd ser ein gjerne store mengder fisk stå slik "opplina" høgt i sjøen mot notveggen. Ein kan sjå at gjelleloka beveger seg raskt (fisken "tokner") grunna gjelleskader og problem med pustekapasitet. Fisk som overlever den akutte fasen får redusert appetitt og fisken magrar av etterkvart.</p> <p>Av sjukdomsændringar er det særleg gjelleforandringar ein ser. Gjellene er ofte skjolda og med ujamn farge (evt. slimete), og med punktblødingar. Av indre forandringar kan det være misfarga lever (brunlig, ev. med punktblødingar), men elles lite å sjå (pers.obs).</p>	
<p>Diagnostikk</p>	<p>Hittil har sjukdommen vore diagnostert basert på histologiske funn.</p> <p>Ferske gjelleprøver samt andre organ vert teke frå sjuk fisk på formalin for histopatologisk laboratorieundersøking. På farga vevsnitt kan ein finne nesten svulstaktig vekst av gjelleoverflateceller, slik at sekundærlamellane i store felt blir borte. Ellers ser ein gjerne blødingar og tromber, betennelse og dødt vev. Som nemnd finn ein ofte òg små <i>epiteliocyster</i> i gjelleepitelet (foto). Tidleg i ein sjukdomsfase kan ein gjerne finne meir cyster enn i ein seinare, meir kronisk fase.</p>	<p>Fig 1. Typisk farget histologisk snitt av gjeller, med <i>epiteliocyster</i> i gjelleepitelet. Foto: Agnar Kvellestad</p> 

Kunnskap som flytter grenser

Intervet Norbio AS • Thormøhlensgt. 55 • 5008 Bergen

Tlf.: 55 54 37 50 • Faks.: 55 96 01 35 • e-post: info.norbio@intervet.com • www.intervet.no

Smittefare	<p>Det har hittil ikkje vore mogleg å dyrke bakterien (epiteliocystis-agens), og det er dermed heller ikkje utført smitteforsøk med denne. Ein klarte å påvise paramyxovirus i gjeller, hjerte og nyre på laks smitta med homogenat av gjeller frå EC / PGI-anlegg i Ryfylke 6 og 14 dagar etter smitte (Rolf Hettlelid Olsen, hovudfag, UiB). Det er likevel ikkje påvist sjukdom med dødeligheit hos laks i smitteforsøk (Friedell et al, 2004).</p> <p>I felt kan sjukdommen gå frå merd til merd (horizontal smitte ?), men kan òg berre ramme ei merd. Det kan sjå ut til at smoltkvalitet og storleik på fisken kan vere av betydning for å unngå smitte, den største og beste fisken er ofte upåverka. Dette kan nok forvrrast dersom sjøanlegget i periodar har dårleg oksygentilførsel (straumtilhøve / vassutskifting). Smitte mellom anlegg med normal avstand ser ikkje ut til å være eit problem.</p>
Behandlig	<p>Det er pr i dag ikkje mogleg å behandle mot EC / PGI, noko som vart avklara allereie omkring 1990. Fleire gjorde då avgrensa forsøk både med badbehandling (antibiotika, formalin m.v.) så vel som medisinfør (antibiotika). Det einaste effektive vil truleg vere å førebyggje sjukdommen - der også vaksine kan bli aktuelt.</p>

Erfaringar med Epitheliocystis frå nokre fiskehelsetenester

Fjord-Lab, Ytre Nordfjord / Sunnmøre:

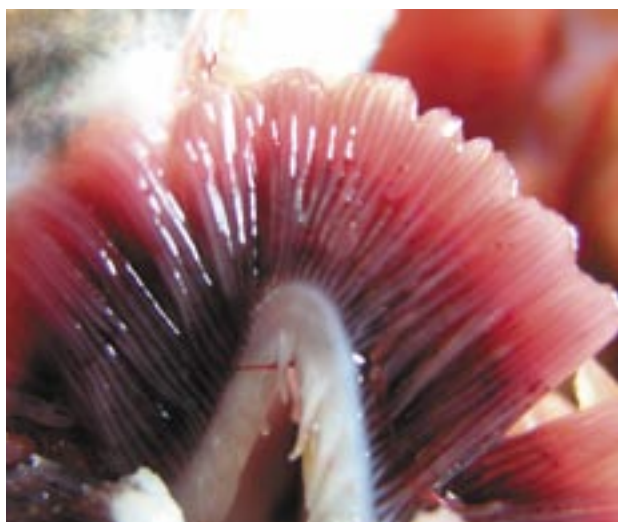
Det er særleg frå juli til oktober at vi har observert problem med EC / PGI. Juli 03 blei diagnosen stilt på eit anlegg med vår 03, men fisken hadde òg hatt IPN i forkant. Bortimot halvparten av fisken døydde eller blei avliva pga store skader og avmagring. Smolten kom frå eit settefiskanlegg med EC / microcystis påvist tidligere. Det er ikkje like store problem kvart år, og det har vore mange år samanhengande utan sjukdom påvist. Det kan sjå ut som om nokre anlegg er meir utsett enn andre - utan at dette er miljømessig dårligare lokalitetar. Vi er ikkje kjend med at det har vore problem med dødeligheit i ferskvatn i vårt område, men utsett av smolt med skadde gjeller kan truleg auke risiko for EC / PGI-problem.

Veterinær Brit Tørud, Fiskehelsa BA, Nordmøre / Sør-Trøndelag:

Det har vore eit aukande problem med EC / PGI på sjølokalitetar dei to siste åra, medan det før var meir sporadiske påvisningar. I 2004 blei EC / PGI påvist på 4 lokalitetar, derav 3 med vårmolt 04 og ein med haustsmolt 03. På vårfisken var det andre sjukdommer i tillegg som gjer det vanskeleg å angi storleiken på problemet, men dødeligheita varte frå august og utover hausten. På haustfisken var det særleg i ei gruppe, det begynte hausten 03 og varte til utpå vinteren, med 30-40 % døde totalt. Men problemet var òg at mesteparten av fisken vart mager og den blei utslakta grunna for dårleg tilvekst / avmagring. Utbrotet starta med *Trichodina* på hud og gjeller, men EC var truleg hovudproblemet. Lokalitetar med utbrot har ikkje vore dårlegare miljømessig enn resten. Ingen påvisningar på settefisk i dette området. Av tiltak har det vore fokus på reine nøter og oppdeling av fisk for å gi den best mogleg plass og gjennomstrømming. Når gjelleparasittar som "*Costia*" og *Trichodina* har vore involvert, har det vore utført formalinbehandling med dose 1 : 3000 i 30 minutt, med skjørt eller heil presenning. Litt betre appetitt i etterkant.

Figur 2. Gjeller frå sjuk fisk har gjerne ujamnfarge (skjolda) og ofte små punktblødningar. Ofte er forandringane lite synlige for det blotte auget, som her (foto: J.A.Holm)

**Fiskehelsebiolog Eirik Hoel,
Aqua-Lab AS,
Hordaland – Ytre Sogn:**



Det er problem med EC / PGI nokre år i perioden august til oktober.

Dei fleste utbrota har vore på vårutsett fisk den første hausten i sjø, men òg eit tilfelle på haust 03 med utbrot på seinsommaren 04 (problemfisk, men bra lokalitet). Har ikkje grunnlag for å seie om nokre lokalitetar går igjen.

I 2004 var sjukdomen påvist på 3 sjølokalitetar med laks i området, men på fleire av desse var "epiteliocyster" ikkje påvist på gjellane. Gjellebetennelse/irritasjon kan vere et stort problem, sjølv om ein ikkje finn nokon klar årsak. Talet på døde ligg vanlegvis på om lag 5 %.

Av anbefalte tiltak er særleg god vasstraum og reine nøter viktig, og gjerne redusere tettleik dersom aktuelt.

Det har òg vore litt positive erfaringar med restriktiv føring, dvs at ein ikkje fører "toppane".

Kunnskap som flytter grenser

**Tiltak for å betre overlevelse og fiskevelferda**

1. Før smoltutsett bør ein avklare gjellestatus ved histologi, særleg om fisken skal ut i "problem-områder".
2. Gunstig lokalisering av mæranlegg og reine nøter for optimal tilførsel av oksygen.
3. Dersom fisken står tett: splitte opp merder og gje fisken betre plass, noko som vil redusere smittepresset og gje meir oksygen tilgjengeleg for fleire fisk.
4. Måle oksygen nivået, gjerne gjennom fleire døgn. Evt. ha oksygenflasker tilgjengelige i særleg kritiske periodar.
5. Dersom det er "dårlege" smoltgrupper som har sjukdomen, kan det være aktuelt destruere for å unngå stor liding, smitte til andre grupper og langvarig økonomisk tap.
6. Dersom det i tillegg er mykje parasittar på gjellar, kan ein vurdere formalinbehandling (NB: oksygenering).

BRUKERSTYRT FORSKNINGSPROSJEKT:

Et brukerstyrt forskningsprosjekt er pågående for å avdekke årsaker til Proliferativ gjellebetennelse (PGI) ved spørreundersøkelse (epidemiologi).

De 3 oppdrettselskapene Marine Harvest (MH), Fjord Seafood (FS) og Pan Fish (PF) har siden 2004 samarbeidet med Veterinærinstituttet (VI), Norges Veterinærhøgskule (NVH) om et NFR-prosjekt, med tittelen: "Studies of risk factors associated with proliferative gill inflammation in seawater-reared Atlantic salmon".

Prosjektet er tredelt:

1. Identifisere risikofaktorer i ferskvann og sjø for PGI, gjennom innsamling av en rekke biologiske og driftsrelaterte data fra smoltutsett høst 02G og vår 03G, fra de 3 oppdrettselskapene.
2. En tilsvarende, noe mer raffinert oppfølging av høst 03G og vår 04G, basert på resultater fra 1 (spørreskjema nylig utsendt)
3. Innsamling av vevsprøver for utvikling av PCR-basert diagnostikk ved VI (Kvellestad m fl.).

Et nytt NFR-prosjekt, som bygger videre på del 3, er dessuten innvilget til VI.

Foreløpige resultat fra del 1 indikerer at kliniske PGI-utbrudd kan knyttes til belastende miljøforhold som primært går på vannkvalitet/utskifting og oksygensituasjonen i anlegget, f.eks. størrelse på utsett (totalt antall smolt), merdplassering i forhold til strømretning og miljøfaktorer som notspyling. Alle PGI-utbruddene i undersøkelsen er dessuten knyttet til stålanlegg.

Også faktorer i ferskvann kan ha betydning, jfr. vannkvalitet / kvantitet, vannutskifting. Undersøkelsen indikerer at sjøvannstilsetning kan være en beskyttende faktor. På den annen side er sjøvannstilsetning ofte en indikator på at settefiskanlegget har liten vannkapasitet i forhold til produksjon, jfr. bruk av sjø som "fysiologisk smoltifiseringsstøtte", og / eller forbedring av en dårlig vannkvalitet. Lav pH i driftsvann, periodevis uheldige O₂-nivå og deltakelse i NIVA-prosjekt (vannkvalitetsundersøkelse) synes alle å støtte opp omkring "dårlig" vannkvalitet som bidrag til at fisk utvikler klinisk PGI i sjøfasen.

Forholdsvis få observasjoner i undersøkelsen medfører imidlertid generelt liten styrke i analysen. Resultatene er under kvalitetssikring og rapportering.

(Pers.med. Olav Breck, MH, Edgar Brun, VI)

Referansar:

- Crespo, S., S. Zarza, and F. Padrós. 2001.** Epitheliocystis hyperinfection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): light and electron microscope observations. *J. Fish Dis.* 24:551-560.
- Draghi, A. 2nd., Popov, V. L., Kahl, M. M., Stanton, J. B., Brown, C. C., Tsongalis, G. J., West, A. B. & Frasca, S. Jr. (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.
- Fridell F, Devold M, Nylund A. 2004.** Phylogenetic position of a paramyxovirus from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ.* Apr 21;59(1):11-5.
- Kvellestad, A. (1990).** Chlamydia-like mikroorganismer hjå norsk laks. *Forskningsprogrammet "Frisk Fisk", årsmøteseminar.*
- Kvellestad A, Dannevig BH, Falk K.** Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of General Virology* 2003; 84: 2179-2189.
- Kvellestad, A., Bornø, G., Flesjå, K.I., Nilsen, H., Skjelstad, H.R. og Hjeltnes, B. (2005).** Helsestatusen hjå laksefisk. I *Boxaspen K., Agnalt A.-L., Gjøsæter J., Jørgensen L.L. og Skiftesvik A.B. (red.). Havforskningsinstituttet: Fisken og havet, særnummer 2 – 2005, Kyst og havbruk 2005, kap. 4.3, s. 97 – 101.*
- Kvellestad A, Aarflot L, Tørud B, Holm J.A. (2004).** Proliferativ gjellebetennelse hjå laks – eit undervurdert problem? *Norsk Veterinærtidsskrift* 116:552-553.
- Lannan, C.N., J.L. Bartholomew, and J.L. Fryer. 1999.** Rickettsial and chlamydial infections. In: *Fish Diseases and Disorders Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections* (ed. by P.T.K. Woo & D.W. Bruno), 245-267. CAB Intl., London.
- Nygaard SMR (2000)** Gjellesykdommen epitheliocystis i sjø. *Norsk Fiskeoppdrett* 4:34 – 36.
- Nygaard, SMR (2004)** Kartlegging av epitheliocystis i sjø. *Norsk Fiskeoppdrett* 11:46 – 48.
- Nylund A, Kvanseth AM, Isdal E.** A morphological study of the epitheliocystis agent in farmed Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 1998; 10: 43-55.

Kunnskap som flytter grenser

Intervet Norbio AS • Thormøhlensgt. 55 • 5008 Bergen

Tlf.: 55 54 37 50 • Faks.: 55 96 01 35 • e-post: info.norbio@intervet.com • www.intervet.no

Epiteliocystis og Proliferativ gjellebetennelse hjå laks – kva veit vi om årsaker ?

Jan Arne Holm¹⁾, Kjell Flesjå²⁾, Knut Falk³⁾, Agnar Kvellestad³⁾, 1).Fjord-Lab AS, 2).Veterinærinstituttet i Sandnes, FOMAS og 3).Veterinærinstituttet i Oslo

Forskning på epitheliocystis eller proliferativ gjellebetennelse, som er eit meir vidtfemnande sjukdomsnamn og også omfattar epitheliocystis, har hittil hatt eit avgrensa omfang, og kunnskapen er fortsatt mangelfull. Epiteliocystis-bakteriar og *Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV)* er medverkande årsaker, men det kan også finnast andre organismar.

I eit forskingsrådsprosjekt gjennomført ved Norges Veterinærhøgskole og Veterinærinstituttet i samarbeid med lokale fiskehelsetenester frå 1995 til 1998 vart eit til då ukjent paramyxovirus – Atlantic salmon paramyxovirus påvist vha. cellekulturdyrking i gjeller frå laks i eit matfiskanlegg med proliferativ gjellebetennelse (Kvellestad et al. 2003).

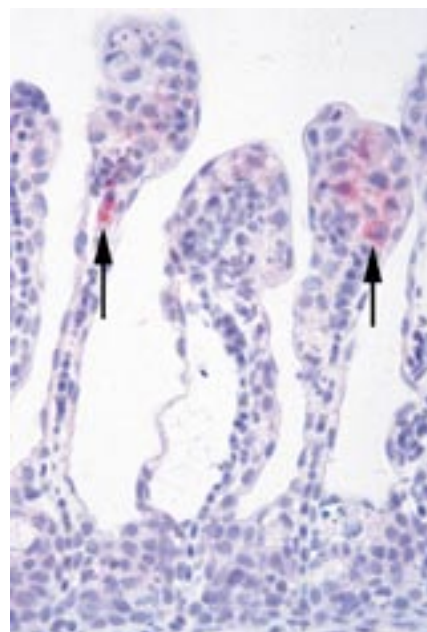
I prosjektet vart vidare sjuk fisk frå ovanfor nemnde og frå to andre anlegg på Vestlandet undersøkte vha. histologi og immunfargemetodar (immunfluorescens og immunhistokjemi) (Kvellestad et al. under trykking). I kring halvparten av den undersøkte fisken, som ikkje var plukka ut tilfeldig, vart det påvist korkje epitheliocystis-bakteriar eller paramyxovirus. Hjå dei andre fiskane vart eit eller begge av desse smittestoffa påvist. Både epitheliocystis-bakteriar og virus vart påvist hjå fisk i alle tre anlegga. Interessant er det at begge smittestoffa dels førekom hjå dei same fiskane. Vi veit i dag at epitheliocystis-bakteriar og paramyxovirus i det minste er medverkande årsaker til proliferativ gjellebetennelse.

I visse tilfelle av proliferativ gjellebetennelse påvisast også det vi oppfatar som sekundære infeksjonar med parasittar som trichodininar (*Trichodina* sp.) og *Ichthyobodo necator*-liknande parasittar ("*Costia*"). I nokre tilfelle også infeksjon med andre bakteriar som medfører uttala vevsdød. Vi veit lite om eventuell medverknad frå uheldige miljøfaktorar, som blandsoner med giftige typar av aluminium- og jern, uvanlig høge temperaturar og giftige alger og maneter.

Smitteforsøk med paramyxovirus oppdyrka i laboratoriet er utførde ved Universitetet i Bergen (Fridell 2003) og ved Norges veterinærhøgskole (Kvellestad, upubl. resultat). Ein fekk systemisk infeksjon, men ikkje sjukdom. Dette utelukkar ikkje paramyxovirus som årsak; først og fremst fordi gjellebetennelse hjå laks truleg skuldast eit samspel mellom mange årsaksfaktorar og at det dermed er vanskeleg/umogleg å framkalle sjukdom ved smitte med berre eit smittestoff, men også både fordi virus dyrka i laboratoriet kan miste si evne til å framkalle sjukdom.

Eit nytt forskingsrådfinansiert prosjekt er no igangsett ved Veterinærinstituttet i samarbeid med bl.a. Marine Harvest. Ein vil sjå nærare på årsakene til sjukdommen, bl.a. ved å nærare avklare kva epitheliocystis-bakteriar og paramyxovirus har å seie. I dette prosjektet vert det brukt meir følsomme metodar som polymerasekjedereaksjon (PCR) for lettare kunne påvise desse smittestoffa. Føremålet er dessutan å utvikle betre diagnostiske metodar. Meir kunnskap om årsaker og betre diagnostikk er føresetnader for å kunne redusere tap pga. denne sjukdommen.

Fig 3. Gjelle hjå laks med proliferativ gjellebetennelse, immunhistokjemisk farga for paramyxovirus (raudt). Her er rikelig med virus i to av gjellelamellane (piler), og alle lamellane syner uttala sjukdomsendingar. Foto: Agnar Kvellestad



Referansar

Draghi II A, Popov VL, Kahl MM, Stanton JB, Brown CC, Tsongalis GJ, West AB, Frasca Jr. S (2004) Characterization of "*Candidatus piscichlamydia salmonis*" (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Clin Microbio 42:5286-5297, 2004.

Fridell, F. (2003). Påvisning av paramyxovirus i utvalde vev frå *Salmo salar* etter eksperimentell smitte. Hovudfagsoppgåve i Fiskehelse for graden Candidatus scientiarum. Insittutt for fiskeri- marinbiologi, Universitet i Bergen.

Kvellestad A, Dannevig BH, Falk K. Isolation and partial characterization of a novel paramyxovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of General Virology 2003; 84: 2179-2189.

Kvellestad, A., K. Falk, S.M.R. Nygaard, K. Flesjå and J.A. Holm (in press). Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in seawater-reared Atlantic salmon *Salmo salar* – as demonstrated by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Nygaard, S. 2004. Kartlegging av epitheliocystis i sjø. Norsk Fiskeoppdrett nr.11. 46-48.

Nygaard S. Gjellesykdommen epitheliocystis i sjø. Norsk Fiskeoppdrett 2000; 4: 34-36.

Nylund A, Kvenseth AM, Isdal E. A morphological study of the epitheliocystis agent in farmed Atlantic salmon. Journal of Aquatic Animal Health 1998; 10: 43-55.

Kunnskap som flytter grenser

Intervet Norbio AS • Thormøhlensgt. 55 • 5008 Bergen

Tlf.: 55 54 37 50 • Faks.: 55 96 01 35 • e-post: info.norbio@intervet.com • www.intervet.no