ER SJØAURE MOTTAGELIG FOR *SPIRONUCLEUS SALMONICIDA* – PARASITTEN SOM KAN FORÅRSAKE SYSTEMISK SPIRONUCLEOSE I OPPDRETTSLAKS?

Smitteforsøk på sjøaure og Laks

RAPPORT FRA HAVFORSKNINGEN NR. 2025-82

Tittel (norsk og engelsk):

Er sjøaure mottagelig for *Spironucleus salmonicida* – parasitten som kan forårsake systemisk spironucleose i oppdrettslaks?

Is sea trout susceptible to *Spironucleus salmonicida* – the parasite that can cause systemic spironucleosis in farmed Atlantic salmon?

Undertittel (norsk og engelsk):

Smitteforsøk på sjøaure og Laks

Infection trials on sea trout and Atlantic salmon

Rapportserie:	År - Nr.:	Dato:
Rapport fra havforskningen	2025-82	15.12.2025
ISSN:1893-4536		

Forfatter(e):

Egil Karlsbakk, Maren Hoff Austgulen, Joachim Nordbø, Julie Marie Aga, Håkon Berg-Rolness, Stig Mæhle, Dawit Berhe Ghebretnsae, Amarjargal Sengee, Thomas Burtenshaw Røttingen og Bjørn Olav Kvamme (HI)

Forskningsgruppeleder(e): Monica F. Solberg (Smittespredning og sykdom)
Godkjent av: Forskningsdirektør(er): Geir Lasse Taranger
Programleder(e): Mari Skuggedal Myksvoll

Distribusjon:

Åpen

Prosjektnr:

15954

Oppdragsgiver(e):

FHF

Oppdragsgivers referanse:

901831

Program:

Miljøeffekter av akvakultur

Forskningsgruppe(r):

Smittespredning og sykdom

Antall sider:

24

Samarbeid med

Grieg Seafood ASA, Pure Salmon Kaldnes v/ Erik Sterud, Universitetet i Uppsala v/ Staffan Svärd

Sammendrag (norsk):

Den encellede parasittiske flagellaten S. salmonicida kan invadere blodet og forårsake alvorlig sykdom hos oppdrettslaks. Smitte synes knyttet til ett smoltanlegg, og de eneste kjente naturlige reservoarene er ville laksefisk, aure og røyr, i innsjøer i Finnmark.

Noen vann hvor parasitten er påvist kan ha anadrom fisk, og det er mulig at anadrom laksefisk kan bære og spre smitte. Det er også fare for at vill laksefisk kan smittes etter å ha oppsøkt oppdrettsanlegg med spironucleoseutbrudd. I SpiroFri-prosjektet undersøkes mottageligheten til laks og sjøaure i brakkvann (25‰; «fjordvann»).

Vi badeksponerte sjøaure og postsmolt laks for parasitter (108 flagellater per liter) i samme kar i overkant av 30 minutt. Disse fiskene ble så fordelt på seks kar, og kohabitanter tilsatt. Smitteeksponert laks gikk sammen med aure og laks, mens smitteeksponert aure gikk sammen med laks. Fisken ble fulgt i 4 måneder, med blodprøvetaking og tarmsvabring.

Størstedelen av laksen var smittet etter 1 måned (positivt blod). Kun få badsmittede aure hadde påviselig infeksjon i blod eller tarm. Likevel ble laks kohabitert med badsmittet aure smittet. Noen få aure som gikk sammen med badsmittet laks ble også smittet, mens en stor andel av laksekohabitantene ble det.

Infeksjonene i aure var lette. Ingen aure hadde makroskopisk synlige innvendige lesjoner ved forsøksslutt. Badsmittet laks og kohabiterende laks utviklet lesjoner i muskulatur og innvoller, karakteristiske forandringer ved systemisk spironucleose. Disse inneholdt store mengder av flagellatene.

Aure eksponert for smitte blir i liten grad smittet, og blir ikke syk. Sykdomsutbrudd i laksemerder i fjordene synes ikke å være en trussel for arten. Forsøket viser at sjøaure kan være smittebærer i sjø.

Sammendrag (engelsk):

The unicellular parasitic flagellate *Spironucleus salmonicida* can invade the bloodstream and cause severe disease in farmed Atlantic salmon. Known outbreaks have been associated with a single smolt production site, and the only confirmed natural reservoirs are wild salmonids—brown trout and Arctic charr—in lakes in Finnmark.

Some of the lakes contain where the parasite has been found may have anadromous fish, and it is possible that anadromous salmonids can carry and disseminate the parasite. There is also a risk that wild salmonids may become infected after visiting sea cages experiencing spironucleosis outbreaks. Within the SpiroFri project, we investigate the susceptibility of Atlantic salmon and sea trout in brackish water (25‰; “fjord water”).

Sea trout and post-smolt salmon were co-exposed by bath to the parasite (10^8 flagellates per litre) in a single tank for just over 30 minutes. The fish were then distributed into six tanks, and naïve cohabitants added. Bath-exposed salmon were cohabited with both trout and salmon, whereas bath-exposed trout were cohabited only with salmon. The fish were monitored for four months, with blood sampling and intestinal swabs.

Most salmon were infected one month after challenge (positive blood samples). Only a few bath-exposed trout had detectable infection in blood or intestine. Nevertheless, salmon cohabiting with bath-exposed trout became infected. A small number of trout cohabiting with bath-exposed salmon were also infected, whereas a large proportion of the salmon cohabitants became infected.

Infections in trout were mild. No trout showed macroscopic internal lesions at the end of the experiment. Bath-exposed salmon and their salmon cohabitants, however, developed lesions in muscle and visceral organs, characteristic of systemic spironucleosis, containing large numbers of flagellates.

Sea trout exposed to the parasite become infected only to a limited degree, and do not develop disease. Outbreaks in salmon sea cages in fjord environments therefore appear unlikely to pose a threat to the species. The experiment demonstrates that sea trout can act as a carrier of the parasite in marine waters.

Innhold

1 Introduksjon 5

2 Material og metoder 7

2.1 Bakgrunnen til *S. salmonicida* isolatet brukt 7

2.2 Dyrking av smittemateriale 7

2.3 In vitro kultur av *Spironucleus salmonicida* 8

2.4 Fisk 8

2.5 Smitteforsøk 9

2.6 Prøvetaking 10

2.7 Rensing av genomisk DNA 10

2.7.1 *Blodprøver* 10

2.7.2 *Tarmprøver* 10

2.8 qPCR-analyser 11

2.9 qPCR assay og standardkurver 11

3 Resultat 13

3.1 Prevalens 13

3.1.1 *4 uker* 14

3.1.2 *9 uker* 14

3.1.3 *17 uker* 14

3.2 Varighet av blodinfeksjoner 14

3.2.1 *Laks* 14

3.2.2 *Aure* 15

3.3 Intensiteter 15

3.4 Tarm og blodinfeksjoner 16

3.5 Histopatologi 17

3.6 Vevstrofisme 18

3.7 Makropatologi 18

3.7.1 *Aure* 18

3.7.2 *Laks* 19

4 Konklusjoner 22

5 Referanser 23

1 - Introduksjon

Etter utbrudd av spironucleose i Finnmark i 2022 (NVI 2023, 2024), ble det av FHF lyst ut midler for å bedre kunnskapen om den encellede parasitten *Spironucleus salmonicida,* det kausale agens.

Prosjektet «***Spironucleus salmonicida* infeksjoner og spironucleose i norsk akvakultur: smitteveier, vertsspekter og forebygging (SpiroFri)**» ble støttet .

SpiroFri-prosjektet (FHF prosjektnummer 901831) er ledet av Havforskningsinstituttet (HI), og er et samarbeidsprosjekt mellom HI Bergen, Nofima Tromsø, Veterinærinstituttet, Pure salmon Technology v/ Erik Sterud, Uppsala Universitet v/ Staffan Svärd, og Grieg Seafood ASA.

Spironucleoseutbruddene i merdoppdrettet laks startet i1989, på fisk satt i sjø 1988. Det første utbruddet varte til 1990. Etter dette ble ikke sykdommen registrert igjen før i 2001/2002, så i 2007/2008 og endelig i 2022-2023, den siste fisken ble slaktet i 2024 (NVI 2023, 2024). Dette siste utbruddet involverte 12 lokaliteter (Lie et al. 2022), NVI 2023, 2024).

Spironucleus salmonicida er en liten (9-14 µm lang) encellet organisme, nesten utelukkende kjent fra tilfeller med systemisk spironucleose i oppdrett av laks og sjørøyr i Nord Norge (Vesterålen til Finnmark) (Karlsbakk m.fl. 2025). Flagellatene i slekten *Spironucleus* er normalt relativt harmløse, de lever i tarmvæsken og spres direkte fra fisk til fisk, hos noen arter ved å danne cyster. *Spironucleus salmonicida* derimot forekommer i laks som systemiske infeksjoner, hvilket innebærer at parasitten har invadert blodkarsystemet, og dermed forekommer overalt (systemisk). Den forårsaker da sykdom, systemisk spironucleose. Laksen vil etter noen uker respondere med en humoral immunrespons mot parasitten, og mengde flagellater i blodet vil da som regel gå ned (Guo & Woo 2004, Guo 2006). Det kan da overleve parasitter i vevene, og en kan se lesjoner i lever, nyre og milt m.m. med vevsdød, betennelse og bindevevsnedslag. Det kan dannes væskefylte lesjoner (puss, blod, parasitter) også i muskulaturen hos laks, og slike kan forekomme i lang tid etter et utbrudd. Væsken i byllene kan ha en ubehagelig lukt. Et vanlig sted å finne slike byller er ved finnebasis, særlig i haleroten. Byller rett under huden kan åpnes mot overflaten og bli sår. Fisk fra grupper som kan ha byller i muskulaturen kan ikke selges hel, og må skjæres opp og undersøkes. Tap etter spironucleose forårsaket av *S. salmonicida* er følgelig et resultat av både fiskedød, kassering av fisk med sår eller byller og ekstraarbeid ved sjekking av laksesider for muskellesjoner (Karlsbakk m.fl. 2025).

De fleste av disse tilfellene hadde mottatt smolt fra ett enkelt smoltanlegg, og en har derfor ment at parasitten har måtte forekommet i smolten derfra. Det har vært forsøk på å finne parasitten i fisk fra smoltanlegget, og dette lyktes i 2022 da mange fisk i enkelte kar ble funnet smittebærende (Karlsbakk et al. 2025). Det er tidligere blitt undersøkt villfisk fra vannkilder til anlegget (tre vann), og det ble da påvist *S. salmonicida* infeksjoner i tarmen på klinisk frisk aure og røyr (Bjørland & Torp 2009, Jørgensen et al. 2011). Oppdrettet sjørøyr er tidligere funnet å kunne ha systemisk infeksjon med *S. salmonicida* (da kalt *S. barkhanus*), med store mengder flagellater i blodet (Sterud et al. 2003). Kun få individer var syke (taperfisk), og tapene ble sett på som ubetydelige. Parasitten ble også påvist i en gjellebiopsi fra en anadrom røyr i Arktisk Canada (Chapman 2020). I villfiskene undersøkt fra Finnmark ble det kun undersøkt tarmprøver. Det foreligger en senere analyse på to individ, en aure og en røyr, fra ett av vannene. Begge var positive for *S. salmonicida* med qPCR, både på tarm og på hjerte (Tjessem 2024). Dette funnet antyder at både røyr og aure kan ha systemiske infeksjoner også i naturen.

Aure og røyr i ferskvann utgjør altså naturlige reservoar for parasitten, som på ett eller annet vis kommer seg inn i et smoltanlegg og smitter lakseungene. Siden både røyr og aure i våre nordlige fylker kan være anadrome,

er det mulig at enkelte vassdrag har smittebærende fisk som går ut i sjøen. Det er også en mulighet at usmittede ville laksefisk oppsøker merdanlegg med spironucleose hos laksen, og blir eksponert der.

I 2022 ble det også påvist systemisk spironucleose hos rognkjeks brukt som rensefisk i laksemerder der en hadde sykdommen. Dette var alarmerende. Før det hadde *S. salmonicida* kun blitt påvist i laksefisk, og sykdom kun i noen av dem. Derfor var en av målene til SpiroFri prosjektet å oppnå mere kunnskap om mottageligheten til villfisk i sjø, samt den mulige rollen villfisk kan ha i smittespredning.

Her rapporteres resultater fra bad- og kohabitant smitteforsøk gjort på aure i sjø (sjøaure) og laks.

2 - Material og metoder

I smitteforsøket ble det brukt aure (Matre-elv stamme) og laks (Aquagen-stamme) produsert ved Havforskningsinstituttets Forskningsstasjon på Matre (HI Matre) eller Industrilaboratoriet i Bergen (ILab) (Stofnfiskur-stamme).

Både aure og laks ble badsmittet sammen, laksen er en kjent mottagelig art og infeksjon hos laksen bekrefter at også auren ble utsatt for smittepress. Det ble også gjort kohabitering med badsmittede laks og aure, med naïve individer av da henholdsvis aure og laks. Her måtte det i kar med laks som «sheddere» også tilsettes laks som resipienter, for å demonstrere at aurene der faktisk hadde blitt utsatt for smittepress. Karoppsettet ble derfor som vist i figur1, med tre paralleller (triplikate kar) i smittegruppene.

2.1 - Bakgrunnen til *S. salmonicida* isolatet brukt

Flere *Spironucleus salmonicida* isolat ble dyrket opp fra lesjoner i laks fra et merdanlegg i Altafjorden med spironucleoseutbrudd. Fisken ble mottatt på is 11 november 2022. Isolatet brukt (SS1) ble tatt med steril sprøyte fra en halebyll på en laks (totallengde 55,5 cm, vekt 2088 g). Flagellatene ble først holdt i L15 medium i lukkede fulle 15 ml sentrifugerør (4°C) og så senere dyrket frem i Keisters medium (se under). Dyrkingen foregikk etter hvert i cellekulturflasker (T25, T75, T175) der veksten og flagellattettheten lett kunne overvåkes med omvendt mikroskop (100x, 200x). Flaskene ble da boblet med nitrogen, for å oppnå en tilnærmet oksygenfri atmosfære. Veksten var svært god, og en måtte tilføre medium og splitte flaskene omtrent hver tredje dag. Temperatur var da vanligvis 6°C.

Isolatet ble kryopreservert som beskrevet i (ATCC) (se referanseliste). Ved langtidsdyrking kan flagellater tape virulens (Woo & Thomas 1991). Kryopreservering representerer også en «bottleneck», få flagellater overlever og seleksjonen kan ha en påvirkning på virulensen. Det er derfor foretrukket å bruke flagellater nylig isolert fra syk fisk for å unngå parasitter selektert for virulenstap.

Det ble derfor mottatt 5 nye spironucleose-syke laks 26 April 2023 og 14 nye isolater ble dyrket opp. Alle disse var kontaminert med bakterier, muligens hadde fiskene septikemier. Det ble gjort forsøk med en rekke antibiotika for å fjerne bakteriene. Det ble da sett at noen antibiotika påvirket flagellatenes vekst negativt (dårlig vekst, anormale celler) og bakteriene var vanskelige å bli kvitt.

Derfor ble det nødvendig å bruke kryopreserverte flagellater (SS1 isolatet) dyrket opp for bruk i smitteforsøket på aure.

2.2 - Dyrking av smittemateriale

De resusciterte flagellatene av SS1-isolatet ble dyrket opp i 12 T175 flasker ved 6°C. På smittedagen ble kulturen helt over i et større antall 50ml sentrifugerør og sentrifugert ved 500g (10 minutter, 4°C). Deretter ble ca. 40 ml supernatant i hvert rør tømt av, og pelleten med noe væske resuspendert i ca. 10 ml fosfatbuffret saltløsning (PBS). Det samlede volumet fra dette ble 1,6 liter flagellatsuspensjon (flaske på is).

Antallet flagellater ble estimert ved tellinger i hemocytometer (Kova Glasstic, 87144E) i mikroskop. Det ble telt 9 felt per grid fra flere grider. Da flagellatene er meget aktive og følgelig ikke tellbare, ble flagellatsuspensjoner for tellinger (mindre mengde i Eppendorfrør på is) først tilsatt glyserol (vanligvis 1 del glyserol : 3 deler flagellatsuspensjon). Flagellatene ble da immobilisert (økt viskositet i mediet) men viste flagellaktivitet. Selve tellingen ble gjort som beskrevet i hemocytometer instruksen.

2.3 - In vitro kultur av *Spironucleus salmonicida*

Spironucleus salmonicida ble rutinemessig dyrket i T25 eller T75 celledyrkningsflasker (Thermo Fischer), med modifisert Keisters vekstmedium (Keister 1983) se under) og med nitrogenatmosfære. En gassflaske med nitrogen var påkoblet en slange, som det kunne settes i sterile Pasteurpipetter. Væsken i flaskene ble boblet («gasset») med nitrogen i 10 sekunder, funnet å være nok tid til å skifte ut atmosfæren. Etter gassing ble korken umiddelbart skrudd helt igjen. Kulturflaskene ble alltid «gasset» etter åpning. De ble normalt inkubert ved 6 °C uten risting. De ble overvåket rutinemessig ved bruk av omvendt mikroskop (Motic) ved 100-200X for å bekrefte vitalitet, og mengde flagellater ble grovestimert ved å telle omtrent antall flagellater i flere mikroskopifelt, regne ut væskevolumet representert av et felt og så gange det opp med totalvolumet. På denne måten kunne en raskt få et overslag på flagellatantallet i mange flasker.

Ved oppdyrking av større mengder ble eksponentielt voksende kulturer splittet i flere og større (T175) celledyrkningsflasker. Standard splitting bestod av 25 % volum gammel kultur med flagellater og 75 % nytt medium.

Modifisert Keister’s medium uten glukose (ATCC 2695):

Basemedium, til 1000 ml ferdig Keisters:

- Trypton (casein digest) 20 g
- Gjærekstrakt 10 g
- NaCl 1 g
- K2HPO4 1 g
- KH2PO4 0,6 g
- NH3Fe(III)Citrat 22 mg
- dH2O 806,3 mL

Basemediets pH ble justert til 7,4 med NaOH, og så autoklavert.

Før bruk ble basemediet tilsatt følgende:

- Storfegalle, dehydrert 0,75 g
- L-Cystein-HCl 2 g
- Askorbinsyre 0,2 g
- Diamonds Vitaminmiks 25 ml (Merck, 58980C)
- Kalveserum 100 ml
- Antibiotika# 10 ml (Antimycotic)

kan utelates

2.4 - Fisk

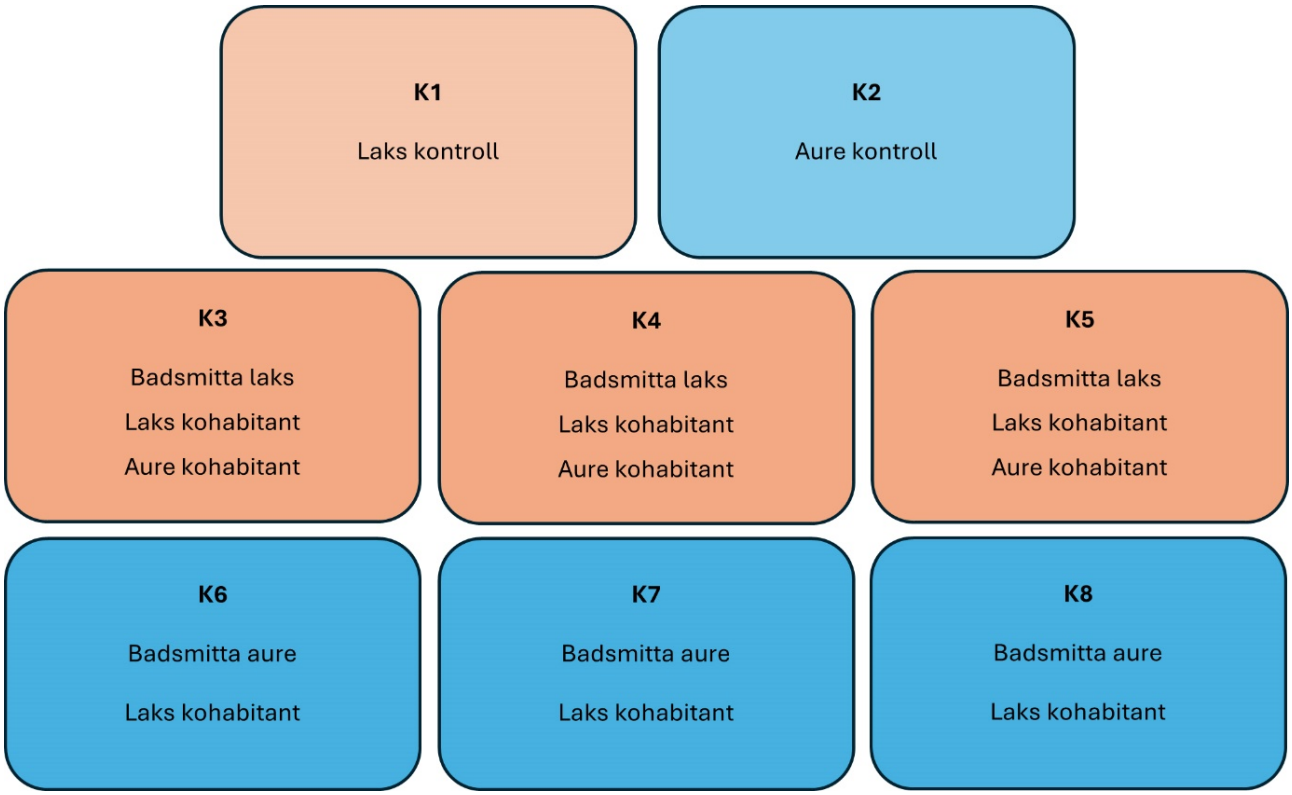
Både laks og aure brukt i forsøket produsert ved HI Matre ble PIT merket (12 mm merker) der 6 juni og transportert til HI Bergen for akklimatisering 10 dager senere. Laks fra ILab, ble transportert til HI tidlig i Juni. Alle fiskene ble gradvis akklimatisert til ca. 25 ‰, ved ca. 10 °C og 12:12 L:D lysregime fram til smittedagen, 22. Juni 2023.

2.5 - Smitteforsøk

Alle fiskene som skulle smittes (60 laks og 90 aure) ble samlet i et 500 L kar på smittedagen (22. juni 2023). Ved smitte ble vanntilførselen stengt, og vannvolumet redusert til ca. 100 liter. Intensjonen var 60 minutter smittetid. Flagellatsuspensjonen i PBS ble så spredt i karet, og lufting startet (brusestein). Smittematerialet bestod av 18 milliarder flagellater, dosen var da 1,8 x 10^8 flagellater per liter. Oksygennivået ble kontinuerlig overvåket. Etter 35 minutter var oksygennivået lavt, og da det ble oppdaget at to laks var sløve, ble vanntilførselen startet igjen. Etter smitte ble fiskene fordelt i 8 kar à 160 L som beskrevet i Tabell 1; Figur 1. Kohabitanter tilsatt i karene dagen etter. Kontrollfiskene ble håvet fra akklimatiseringskar til K1-2 alt før smitte.

Fisken ble røktet minst 2 ganger per dag, og fôret med Nutra RC (Skretting AS) fôr. Temperatur, saltholdighet og oksygen ble målt daglig. Temperaturen varierte lite (9-11 °C), og var i snitt 10,2±0,3 °C for hele forsøket.

Forsøket er godkjent av Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem (FOTS-ID: 30189).



***Figur 1**. Oppsett av kar (alle 160 liter) i smitteforsøket. Fargene antyder badsmittet fiskeart i kar K3-8), eller art i kar (K1-2).*

***Tabell 1.** Antall og vekt til fiskene som inngikk i forsøket (dag 0-1*). N=antall fisk, V=vekt, SD= standardavvik.*

Kar	Type fisk	N	Snitt V (g)	SD (g)	Min-maks (g)
K1	Kontroll laks	30	102,8	14,2	79-131
K2	Kontroll aure	30	71,8	19,8	40-109
K3-5	Badsmitta laks	3 x 20 = 60	93,4	13,8	57-127
	Kohab. laks	3 x 15 = 45	94,7	13,9	62-122

	Kohab. aure	3 x 20 = 60	68,1	19,8	30-123
K6-8	Badsmitta aure	3 x 30 = 90	64,8	17,3	30-112
	Kohab. laks	3 x 20 = 60	91,6	14,8	58-126

*kohabitanter overført til karene dag 1.

2.6 - Prøvetaking

Det ble gjort 2 prøvetakinger av fisken før sluttuttaket og terminering. Disse mellomuttakene var planlagt til uke 4, uke 8 og sluttuttaket til uke 12. Da kartilgangen tillot oss å forlenge forsøket, ble disse uttakene underveis forskjøvet og ble tatt 18-19 Juli (uke 4), 22-24 august (uke 9) og 18-20 oktober (uke 17). Noen fisk ble tatt ut i mellomuttakene for ytterligere prøvetaking, for å kunne undersøke parasittens vevsfordeling (qPCR) og for histologi. Disse uttakene var viktige også for å holde biomassen i karene akseptabel ettersom fiskene vokste.

Ved prøvetaking deltok som regel 4 personer, med ansvar for i) håving, bedøvelse og oppvåkning av fisk; ii) skriving, måling og veiing; iii) tarmprøver og iv) blodprøvetaking. For prøvetaking ble fisken bedøvd med 100 mg/L trikain (Finquel vet., MSD Animal Health). Fisken ble PIT-lest, og så målt og veid. Tarmprøver ble tatt med tynne myke svabere (PurFlock Ultra, MWE Ltd, #MW814). Disse ble ført inn gjennom gattet og ca. 2-3 cm opp i baktarmen, og så rotert mens den ble sakte dratt ut. Svaber-tuppene ble klippet av ned i Eppendorfrør på is. Disse rørene ble så frosset inn (-20 °C). Blod (0,1 ml) ble tatt med 1 ml sprøyter med 0,6 mm kanyler fra de kaudale blodårene, og overført til rør tilsatt 10 µl 20 mM EDTA. Også disse rørene stod på is til de ble frosset inn.

Ved sluttuttaket ble alle fisk, etter standard blod og tarmprøvetaking, også undersøkt for ytre og indre sykdomstegn (forandringer). Bukhulen ble åpnet og indre organer (hjerte, hjertehule, lever, milt, svømmeblære, tarm, og nyre) inspisert for avvik. Det var særlig fokus på å avsløre skjulte lesjoner i muskulatur. Dette ble først undersøkt ved beføling langs fiskens sider og finnebasis for usynlige subdermale forandringer. Dernest ble muskulaturen snittet opp med skalpell og undersøkt.

Det ble laget nativpreparat og mikroskopert på lesjoner og forandringer for påvising av *S. salmonicida*. Disse var umiddelbart synlige ved 100-400x forstørrelse på grunn av den store svømmeaktiviteten. Det ble tatt prøver for histologi fra fisk med infeksjon eller lesjoner. Etter prøveuttak og undersøking ble all fisk frosset inn (-20°C) enkeltvis i poser for å være tilgjengelige for eventuell ytterligere prøvetaking senere.

2.7 - Rensing av genomisk DNA

2.7.1 - Blodprøver

DNA ble renset fra blodprøver med Genefind V3 kit (Beckman Coulter; produktnummer C34881) på en Biomek i5 Automated Workstation (Beckman Coulter) i 96-brønnars brett. Blodprøvene ble tint og deretter homogenisert med stålkuler og risting. Av homogenatet ble 5 µl overført til 195 µl PBS, og DNA renset i henhold til produsentens anbefaling. DNA ble eluert i 50 µl elueringsbuffer (EBB) og frosset-20 °C inntil bruk.

2.7.2 - Tarmprøver

DNA ble renset fra tarmsvaberne med DNAdvance kit (Beckman Coulter; produktnummer A48706) på en Biomek i5 Automated Workstation (Beckman Coulter) i 96-brønners brett. Svabertippenene ble overført til brønner 96-brønners deepwell-plater (DW-plater), tilsatt 200 µl lysis buffer med Proteinase K (ca 1.4 mg/mL) og mikset. DW-platene ble så sentrifugert og inkubert over natt (55 °C). Neste dag ble platene vortekset og sentrifugert ved 1000 g i 1 min. Lysatene (à 200 µl) ble så overført til isoleringsplatene og plassert i

arbeidsstasjonen og renset. DNA ble eluert i 50 µl elueringsbuffer (EBA-buffer) og frosset (-20 ° C) inntil bruk.

2.8 - qPCR-analyser

Spironucleus salmonicida infeksjoner ble påvist i blod og tarm med real-time PCR (qPCR) med EagleTag 2x Universal Master Mix (ROX) (Merck, art.nr. 7260296190). Templat var DNA renset fra blod eller tarmsvabere. DNA fra blod ble fortynnet ved inhibisjonstesting, men ellers brukt ufortynnet. DNA fra tarmsvabere ble alltid fortynnet 1:10 før qPCR-analyse. Det ble brukt 384 brønners brett med totalvolum på 8 µl per reaksjon.

- 2X qPCR Master Mix 4 µl
- Spiro-F primer (10µM) 0,4 µl
- Spiro-R primer (10µM) 0,4 µl
- Spiro-Probe (4µM) 0,4 µl
- Vann 0,8 µl
- Templat 2 µl

qPCR ble gjennomført i Quantstudio TM 5 Real-Time PCR instrument (384-block) (Applied Biosystems, ved Thermo Fisher Scientific) med følgende profil: 10minutt 95 °C, 45 sykluser 15 sekund 95 °C-60 sekund 60 °C -1 sekund 72 °C, deretter 30 sekund 40 °C og ∞ på 4 °C.

Ct-verdier ble bestemt med QuantStudio TM Design & Analysis Software v1.4.2 (Applied Biosystems), med en grenseverdi på 0,2.

2.9 - qPCR assay og standardkurver

qPCR assayet brukt for påvisning av *S. salmonicida* ble utviklet (som «sp_sal») sammen med andre assay for mikrobe påvisning med Fluidigm BioMark^{TM} høykapasitets mikrofluidikk plattformen (Miller et al. 2016). Primerne amplifiserer et kort fragment (61 bp) av SSU rDNA (Small Subunit ribosom RNA genet) til parasitten. Vi har brukt det som et TaqMan assay, med navnet «Spiro»:

- Spiro-F: 5’-GCGAGATTTGTTGCATTTAAAAAG-3’
- Spiro-R: 5’-CGAACTTTTTAACTGCAGCAACA-3’
- Spiro-P (probe): 5’-6FAM-ACACGGAGAGTATTCT-MGB-3’

Effektiviteten for «Spiro» qPCR assayet ble beregnet til 87 % for lakseblod (R^2=0,989) og 100 % for PBS (R^2=0,978).

Ligningen for standardkurven for blod, basert på 10x fortynninger i triplikat av en kjent mengde flagellater, var:

Ct = -1,599ln(Nspiro) + 33,24

Tabell 2. Kurven antyder følgende forhold mellom Ct og antall (N) *S. salmonicida* celler:

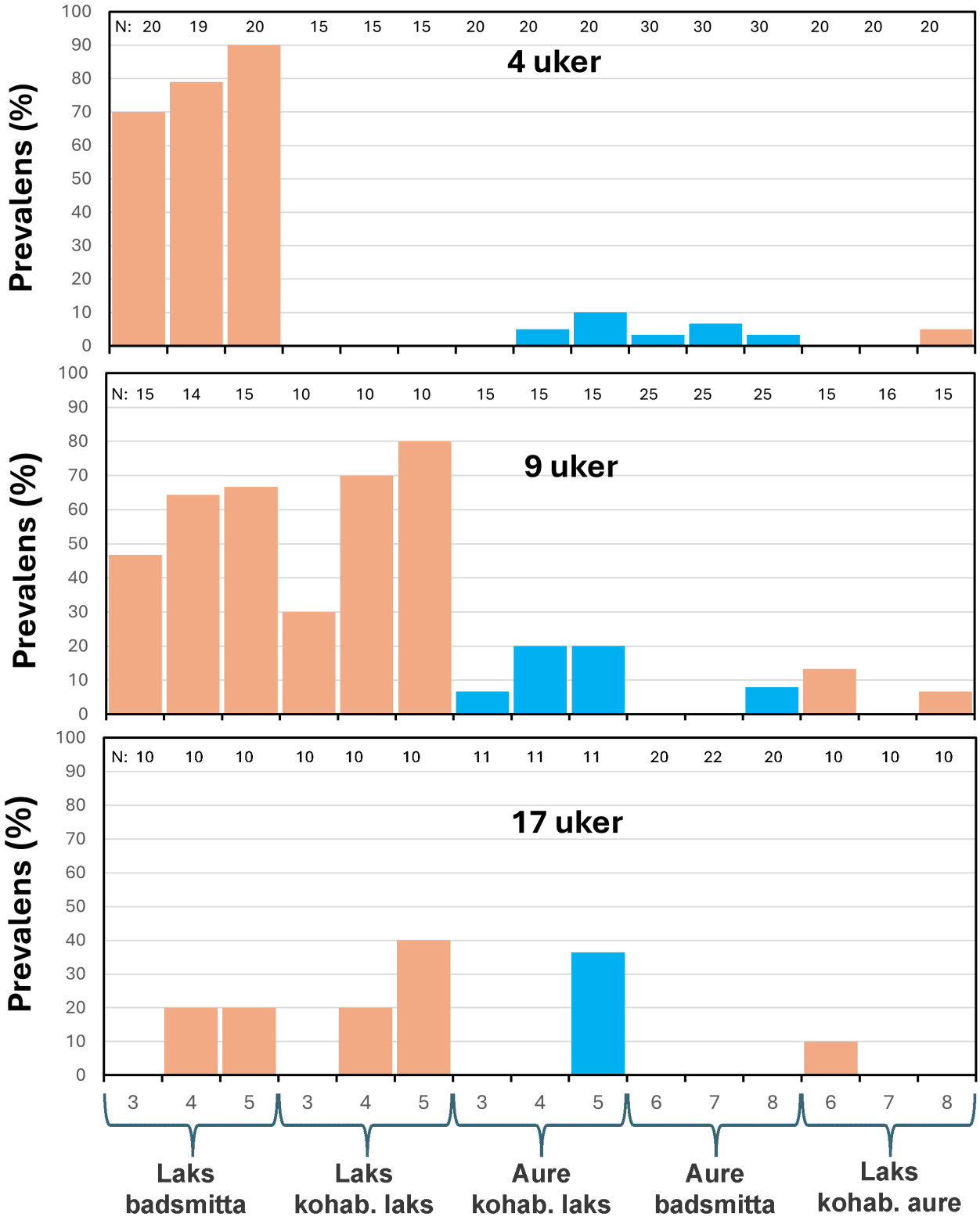
N *S. salmonicida* celler	**Ct**	Flagellater ml^{-1} blod
0.01*	**40.6**	5
0.1	**36.9**	50
1	**33.2**	500
10	**29.6**	5000
100	**25.9**	50000

1000	**22.2**	0.5 million
10000	**18.5**	5 millioner

*ekstrapolert

3 - Resultat

3.1 - Prevalens



***Figur 2**. Spironucleus salmonicida prevalens i smittegruppene etter 4, 9 og 17 uker. Fiskene i kontrollgruppene (kar 1 og 2) viste aldri infeksjon og er ikke tatt med. Rødlige søyler er laks, blå er aure. Nummer ved x-aksen refererer til kar. «kohab.» betyr «kohabiterende med». Tallene bak «N» er antallet fisk. I kar 1 og 2 var der initielt 30 fisk, så 25 ved 9 uker og 20 ved 17 uker.*

3.1.1 - 4 uker

Etter 4 uker ble det kun registrert fisk med positive blodprøver, ingen tarmsvabre hadde påviselig *S. salmonicida* DNA.

I dette uttaket var en større andel (80 %) av den badeksponerte laksen qPCR positiv for parasitten. Ingen av de kohabiterende laksene var da påviselig smittet, men 3 aure var positive. Av de 90 badsmittede aurene var kun 4 positive i blod, en prevalens (4 %) signifikant lavere (P<0,001) enn blant laksen. En kohabiterende laks var positiv i kar 8, der en eneste badsmittet aure var positiv, med Ct=37.2.

3.1.2 - 9 uker

Etter 9 uker forekom det noen få fisk med positive tarmsvabre, både laks (4) og aure (5). Alle de tarmpositive aurene var kohabitanter med smittet laks, mens laksene var badsmittede (3) og kohabitant med laks (1).

I uke 9 uttaket var prevalensen hos den badsmittede laksen sunket til 59 % (p<0,05). Nå var også en betydelig andel av den kohabiterende laksen smittet (60 %), og 16 % av aurene. Prevalensen blant de badsmittede aurene var fortsatt lav, 2 av 75 individ (2.7 %). Tre laks kohabiterende med smitteeksponert aure var nå også positive i blod.

3.1.3 - 17 uker

Etter 17 uker var kun 4 (13 %) av den badsmittede laksen og ingen av de badsmittede aurene positive. Nedgangen i prevalens hos laksene fra uke 9 var signifikant (P<0,004), mens det ikke var endring for aurene. En påfallende utvikling var at 4/11 aure i kar 5 nå var positive, i samme kar var det størst andel smittet laks i både uke 9 og 17.

Tre fisk viste positive tarmprøver, alle kohabitanter i kar der laksen var/hadde vært badsmittet, 1 laks og 2 aure.

3.2 - Varighet av blodinfeksjoner

3.2.1 - Laks

En andel av laksen som ble smittet tidlig kunne følges gjennom de 4 månedene forsøket varte. Gjennom smitteforsøket ble det tatt ut tilfeldige fisk til andre formål, som histologi og studier av parasittens vevstropisme, så antallet synker.

Etter badsmitte var 46 laks smittet uke 4. I 9-ukers uttaket var 34 av disse individene igjen, og 65 % (22/34) av disse var da fortsatt påviselig smitta. Ved 17 ukers uttaket var 25 % (4/16) av de gjenværende av disse fiskene fortsatt positive. To av disse hadde makroskopisk synlige indre lesjoner (se under), mens to var uten.

Uke 4 var ingen av laksene som kohabiterte med badsmittet laks positive for parasitten.

Derimot var 18 positive uke 9. Uke 17 var kun 5 (28 %) av disse fortsatt positive, og alle disse 5 hadde makroskopisk synlige indre lesjoner (se under).

Det synes som noen laks er resistente, de smittes ikke tross en høy baddose. Noen laks smittes, men synes å bekjempe infeksjonen, da de ikke er påviselig smitta 5 uker senere (uke 9), og ikke har lesjoner. Ved uke 17 er få fisk positive, og de fleste av de har lesjoner. To badsmitta fisk viste positivt blod uke 4 til 17, uten å ha påviselige indre lesjoner. Dette kan tyde på at ikke alle blodinfeksjoner blir bekjempet av fiskens immunforsvar innenfor dette tidsspennet (>3 måneder).

3.2.2 - Aure

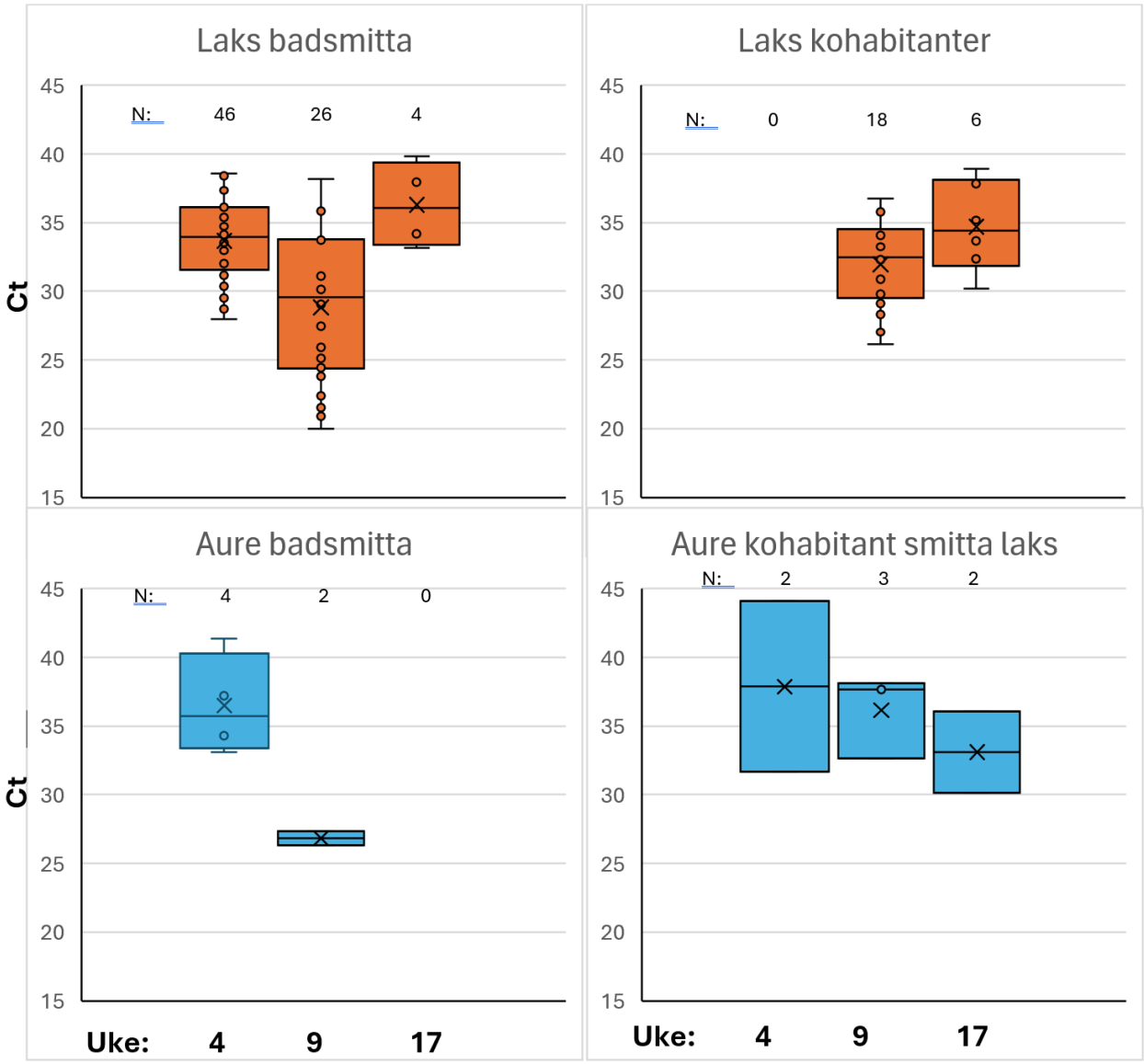
Etter badsmitte var 4 aure positive uke 4. To av disse ble tatt ut til histologi. De to som var igjen var negative uke 9. To ytterligere var positive uke 9, men ingen var positive uke 17.

Disse få observasjonene antyder kortvarige blodinfeksjoner hos aure.

3.3 - Intensiteter

De fleste infeksjonene påvist hos laks uke 4 etter smitte var lette (Fig. 3). Uke 9 hadde prevalensen gått ned, men laksene hadde signifikant høyere densiteter (lavere Ct) enn ved 4 uker. Etter 17 uker var de fleste blodinfeksjonene borte, og kun små mengder *S. salmonicida* DNA var påviselig i blodprøvene. Kohabiterende laks utviklet etter uke 4 lette infeksjoner påvist uke 9. Disse fiskene kan ha hatt høyere intensiteter senere, men ved sluttuttaket var få fisk smittet og da med lette infeksjoner.

De få aurene som hadde påviselig infeksjon i blodet hadde høye Ct-verdier (lette infeksjoner) (Fig. 3). Unntaket er to badsmittede fisk som uke 9 etter smitte viste moderate intensiteter (Ct 26,3-27,4) i blod. Ingen av disse individene var positive i blod eller tarm ved 4 ukers uttaket, og de var også negative ved sluttuttaket.

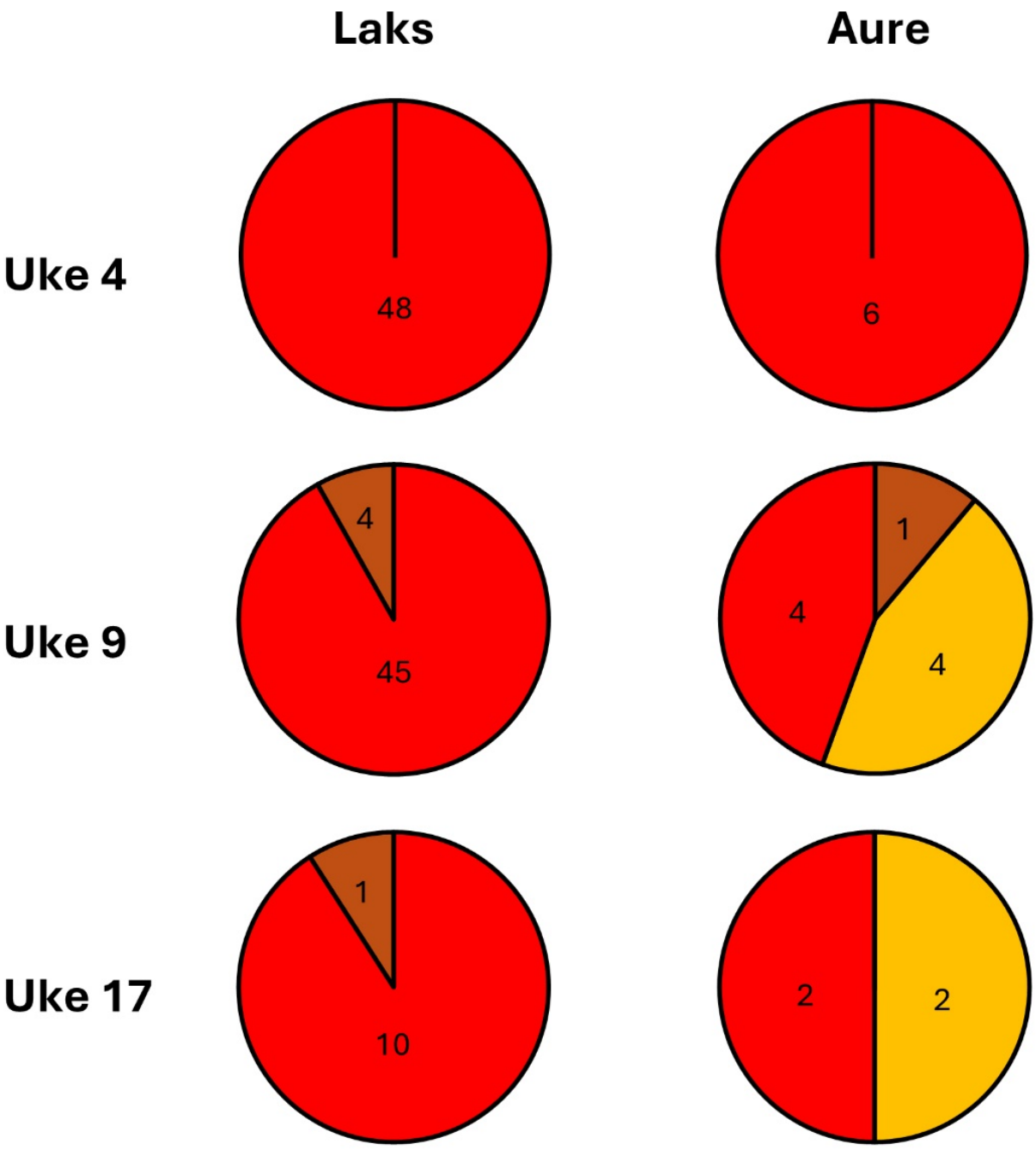


***Figur 3**. Spironucleus salmonicida SSU rDNA Ct-verdier i blod hos laks og aure i smitteforsøket, etter 4, 9 og 17 uker. Høye Ct-verdier antyder lave densiteter (og dermed lave intensiteter), og lavere høyere. Boksene angir interkvartile spennvidden i dataene, horisontal strek er medianen. En X angir snittet, og stavene spenn (minimum til maksimum). N= antall positive fisk.*

3.4 - Tarm og blodinfeksjoner

Andelen fisk som kun viste infeksjon i blod var 100% uke 4, både for aure og laks. En mindre andel av laksen som var positiv i blod viste også tarminfeksjon uke 9 og 17 (Fig. 4).

Kun få aure var smittet uke 9 og 17, men tarminfeksjon ble da påvist i halvparten av fisken. Andelen fisk med påviselig tarminfeksjon var høyere hos aurene (uke 9 og 17 samlet, P<0,001) enn hos laksen.



***Figur 4**. Kakediagrammene angir andelen av Spironucleus salmonicida positive fisk med kun positivt blod (rød farge), kun positiv tarmsvaber (gul farge) og med både blod og tarmprøve positiv (brun). Tallene angir antall fisk i kategori.*

3.5 - Histopatologi

Da det ikke ble sett indre forandringer på aure ved sluttuttaket (som ville medført uttak for histologi), var kun aure tatt ut tilfeldig for histologi tilgjengelige. Ingen av disse var positive for *S. salmonicida* på blodprøver eller tarmsvabre. En fisk hadde vært positiv på blod (Ct 25,3) i 9 ukers uttaket. Denne ble det gjort histologiske studier på, uten å påvise histopatologi (Lofnes 2025). Det ble også analysert et sett vevsprøver fra denne fisken tatt ved sluttuttaket, og da var prøver fra halemuskulatur, lever og fortarm positive (Lofnes 2025, se under).

3.6 - Vevstrofisme

For å undersøke vevsfordelingen til *S. salmonicida* i laks, røyr og aure tok Lofnes (2025) ut et sett ekstra vev fra utvalgte fisk (fra flere smitteforsøk).

Fra aure ble det tatt vev fra 14 fisk, 8 fra uke 9 og 6 fra uke 17. Deriblant var der tre fisk fra uke 9 uttaket som var positive på standardprøvene, en på blod (Ct 38,1) og to på tarm (Ct 37,3 og 40,3), og to positive på blod uke 17 (Ct 30,1 og 32,5). To andre fisk fra uke 17 uttaket som det ble tatt prøver av hadde hatt positive prøver etter uke 9 uttaket (en med Ct 25,9 på blod og 27,4 på tarm), en annen Ct 25,3 på blod. De øvrige 7 fiskene var fra karene med positive fisk, men var negative både på blod og tarm når tatt ut og ved tidligere prøvetaking (Lofnes 2025).

***Tabell 3**. Vevsprøvene analysert med qPCR (med vevskoder)*

Kode	Organ/Vev	Prøve
G	**Gjelle**	**Gjelle-I, midt**
M	**Muskulatur**	**Rett under hud, ved halerot**
H	**Hjerte**	**Ventrikkel**
L	**Lever**	**Fremre del**
S	**Milt**	**Tilfeldig bit**
AK	**Nyre**	**Fremre**
PK	**Nyre**	**Bakre**
I	**Tarm**	**Bit av fremtarmen bak siste blindsekk**
CNS	**Hjerne**	**Metencephalon**

En eneste fisk viste positive vevsprøver. Denne auren var positiv på blod uke 9 (Ct 25,3), men ikke uke 17. Ved sluttuttaket viste den positiv muskelprøve (Ct25), leverprøve (Ct 32,1) og fortarmprøve (Ct 32,4) (Lofnes 2025).

Denne fisken viser at ikke alle infiserte aure ble påvist ved blodprøvetaking og tarmsvabring uke 17. Dette individet (No. 169), opprinnelig badsmittet (kar 8), ble det også gjort histologi på uten at det kunne påvises forandringer (se over). På basis av disse resultatene kan det ikke sies noe sikkert om vevstropismen til parasitten i ørret, men det synes trolig at systemiske infeksjoner (blod) bekjempes (humorale immunresponser), og at parasitten da i noen fisk overlever en tid i vev.

3.7 - Makropatologi

På sluttuttaket (uke 17) ble all fisk åpnet og bukhulen undersøkt for synlige indre forandringer. Muskulaturen ble også kuttet opp, for å påvise eventuelle lesjoner ved finnebasis og dypt nede i muskulaturen. Det ble laget nativpreparat og mikroskopiert på lesjoner, for å påvise flagellater.

3.7.1 - Aure

Det ble ikke sett innvendige lesjoner i ørreten som kunne knyttes til *S. salmonicida* infeksjon. To lyse flekker ble sett i milten på en ørret, disse områdene inneholdt ikke flagellater, og fisken hadde ikke blodinfeksjon. Den hadde heller ikke tidligere vært infisert i blod, men uke 17 var den positiv på tarmsvaber (Ct 31,3).

Blant hannørretene, var 14 (27 %) kjønnsmodne (store testes, rennende melke).

3.7.2 - Laks

Det ble sett innvendige lesjoner i 15 laks. Disse ble ved mikroskopi verifisert å inneholde mengder med flagellater. Fiskene med lesjoner var både badsmittet fisk og kohabitanter med badsmittet laks (Tabell 4).

Muskulatur. De vanligste muskellesjonene sett var i halerota, i muskulaturen under huden (Fig. 5B). Noen fisker hadde synlige hevelser assosiert med byllene (Fig. 5B). Det ble også påvist bylldannelser ved basis av ryggfinnen på tre fisk, disse var ikke synlige fra utsiden (Fig. 5A). En byll var lokalisert ved basis av en bukfinne, og en ble funnet i et gjellelokk.

Svømmeblære. I flere fisk var det lyse flekker bak svømmeblæra (Fig. 5E,F), dels i svømmeblære-veggen og dels i serosa på nyren. Disse var væskefylte, med store mengder flagellater.

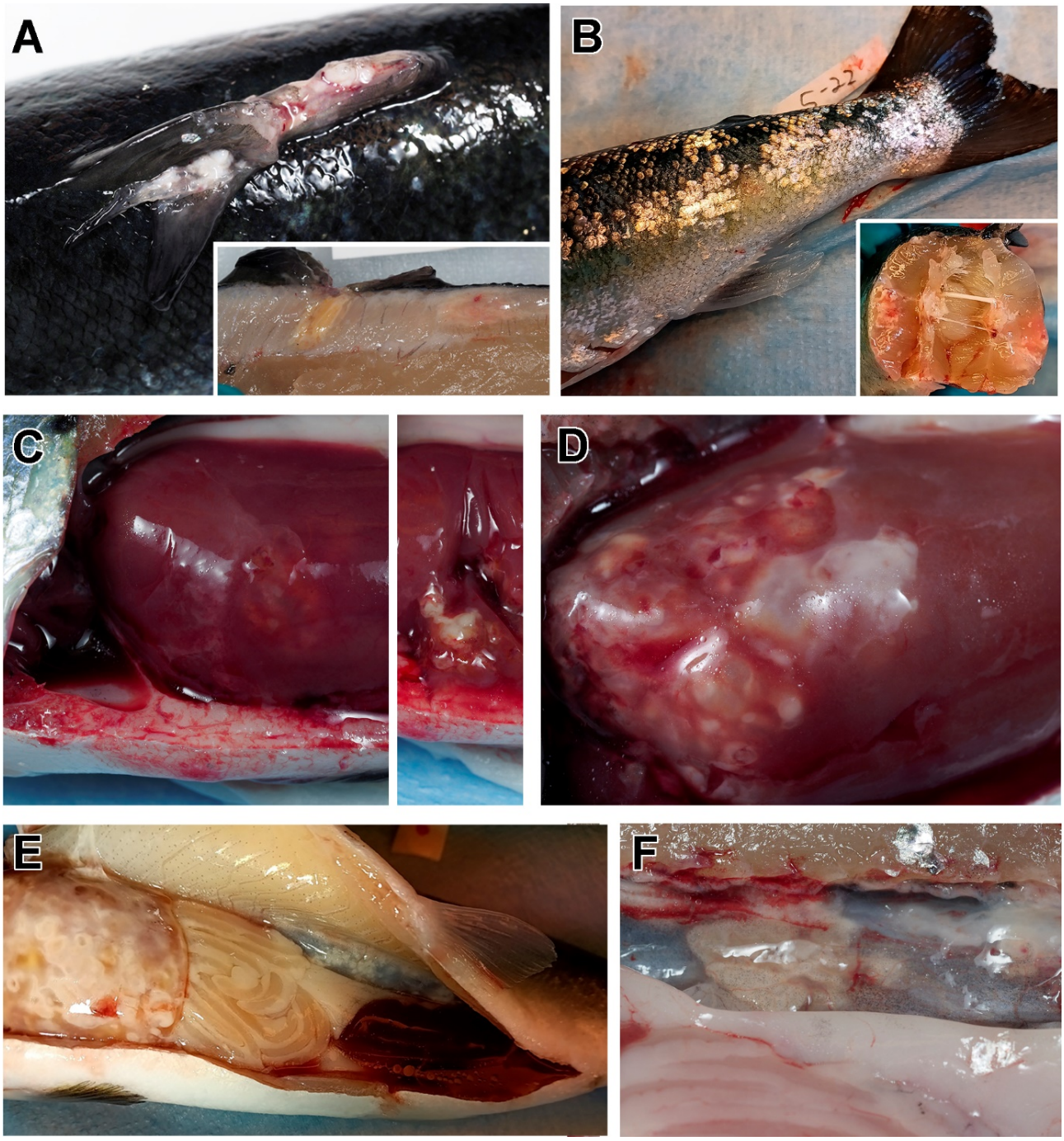
Levernekroser ble sett i tre fisk, de var da omfattende, med flere angrepne områder (Fig. 5C,D).

Milt. Det ble funnet en pussfylt lesjon inne i en milt.

Hudsår. Det ble observert hudlesjoner på 5 laks, de fleste av disse sårene var små. Ved mikroskopi ble det påvist flagellater i ett sår på siden nær analfinnen. I to tilfeller var såret nær stikksåret etter blodprøvetaking. I disse ble det ikke sett flagellater ved mikroskopi (Fig. 6).

***Tabell 4**. Lesjonsforekomst i laks (N=15), ved sluttuttaket (uke 17), sår i hud og finner er ikke tatt med. Det ble ikke påvist lesjoner i aure.*

	Antall laks med lesjonstypen		
Lesjoner:	**Badsmitta**	**Kohabitanter**	**Sum**
Halebyll	5	4	9
Byll, basis ryggfinne	2	1	3
Byll, basis bukfinne	0	1	1
Byll gjellelokk	0	1	1
Svømmeblære	4	0	4
Lever med lesjoner (nekroser)	3	0	3



***Figur 5**. Lesjoner sett i laksen på sluttuttaket uke 17. Enten badsmitta laks eller kohabitanter med dem. **A**, byll i ryggfinne, med to fortsettelser langs pterygioforene ned i muskulaturen (kohabitant kar4). **B**, bulk på halerot, assosiert med byll under huden (lite bilde, der halen er kuttet av og brettet) (kohabitant, kar 5)). **C**, lesjoner inne i leveren, så vidt synlige som lyse områder, som ved oppkutting viste seg å inneholde puss (lite bilde)(badsmitta fisk, kar 3), **D**, mer omfattende lesjoner i leveren, fremre del (badsmitta fisk, kar 4). **E**, kraftig affisert fisk, omfattende nekrotiske lesjoner i lever og bak svømmeblæren, svullen milt og blodig ascites (badsmitta fisk, kar 5). **F**, lesjoner på overflaten av nyren, bak svømmeblæren (badsmitta fisk, kar 3).*

***Figur 6**. Laks fra sluttuttaket. Sår nær halerot, ikke funnet å inneholde S. salmonicida. Tre andre sår inneholdt heller ikke flagellater, men et mindre sår på en analfinne inneholdt mengder S. salmonicida (foto mangler).*

4 - Konklusjoner

Vi brukte en høy bad-dose, men likevel ble ikke all laks smittet. En del av laksen som ble påviselig smittet innledningsvis synes å ha bekjempet infeksjonen 5 uker senere. Under en fjerdedel av laksen utviklet lesjoner i løpet av 17 uker. Det ble ikke sett klinisk sykdom, men en andel av fiskene som hadde lesjoner var trolig syke eller var i ferd med å utvikle sykdom.

Få aure ble smittet, og infeksjonene var forbigående. Ingen aure viste klinisk sykdom eller ble funnet å ha lesjoner. Arten synes resistent.

Laks hadde nesten utelukkende blodinfeksjoner i ukene etter smitte, mens hos aure var infeksjoner i tarmen vanligere.

Smittet aure som gikk sammen med laks (kohabitanter) smittet individer blant disse. Badsmittet laks smittet aure ved kohabitering.

Kohabitering med smittet laks var en mer effektiv smittemåte for aure enn badsmitting i 10^8 flagellater.

Forsøket viser at sjøaure kan være smittebærer, og derfor spre smitte i fjordene.

Hvorvidt sjøaure i Nord-norske fjorder faktisk er bærere av smitte må undersøkes ved analyser på villfisk, helst fra fjorder der det går fisk med opphav i vassdrag der parasitten er påvist.

5 - Referanser

ATCC Spironucleus sp Sterud et al. ATCC50377 [kryopreservering av *Spironucleus salmonicida* isolat NOR-1 (som *S. barkhanus* NOR-1) beskrevet].

Bjørland M, Torp K (2009) Spironucleosis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Master in Aquatic Medicine MSc, Norwegian School of Veterinary Science, Oslo

Chapman JM (2020) Factors influencing infectious agent communities and infection burden in free-ranging migratory adult salmonids across Canada. PhD Thesis, Carleton University, Ottawa, Ontario

Guo FC (2006) *Spironucleus* spp. and experimental spironucleosis in salmonids. University of Guelph,

Guo FC, Woo PTK (2004) Detection and quantification of *Spironucleus barkhanus* in experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar* . Diseases of Aquatic Organisms 61:175-178

Jørgensen A, Torp K, Bjørland MA, Poppe TT (2011) Wild Arctic char *Salvelinus alpinus* and trout *Salmo trutta* : hosts and reservoir of the salmonid pathogen *Spironucleus salmonicida* (Diplomonadida; Hexamitidae). Diseases of Aquatic Organisms 97:57-63

Karlsbakk E, Tjessem A, Hansen H, Sterud E (2025) Spironucleus-infeksjoner og Spironucleose hos laks – En kunnskapsoppsummering. Rapport fra Havforskningen 2025(59):1-49

Keister DB (1983) Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 77:487-488

Lie K-I, Wisløff H, Alarcon M, Nylund S (2022) Spironukleose hos atlantisk laks. Norsk Veterinærtidsskrift 134:400-401

Lofnes A (2025) *Spironucleus salmonicida* – histopatologi og vevstropisme i ulike vertsarter. THESIS, MSc, BiO, UiB

Miller KM, Gardner IA, Vanderstichel R, Burnley T, Schulze AD, Li S, Tabata A, Kaukinen KH, Ming TJ, Ginther NG (2016) Report on the performance evaluation of the Fluidigm BioMark platform for high-throughput microbe monitoring in salmon. Canadian Science Advisory Secretariat (CSAS), Research Document 2016/038, Pacific Region 2016

NVI (2023) Fiskehelserapporten 2022. Veterinærinstituttet rapportserie 2023

NVI (2024) Fiskehelserapporten 2023. Veterinærinstituttet rapportserie 2024

Sterud E, Poppe T, Bornø G (2003) Intracellular infection with *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida : Hexamitidae) in farmed Arctic char *Salvelinus alpinus* . Diseases of Aquatic Organisms 56:155-161

Tjessem AV (2024) Upubliserte observasjoner 2024.

HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

Postboks 1870 Nordnes
5817 Bergen
Tlf: 55 23 85 00
E-post: post@hi.no
www.hi.no