

Risikoanalyse- Utbrudd av Epiteliocystis (Branchiomonas Cysticola) på grunn av innførsel via ferskvannsinntak

Oppdrag

I forbindelse med etableringen av et nytt akvakulturanlegg i Smedvågen er det ønskelig med en risikovurdering knyttet til innførsel av bakterien Branchiomonas Cysticola som forårsaker sykdommen epiteliocystis. Anlegget skal baseres på resirkulering og produsere fisk helt frem til slaktestørrelse. Dette stiller større krav til at all rogn og driftsvann som kommer inn i anlegget er fri for agens som kan utløse sykdom på fisken gjennom hele produksjonen hos Averøy Industripark AS.

Risikomatrise MarinHelse AS

5	10	15	20	25	>12	Kritisk
4	8	12	16	20	6-12	Betydelig
3	6	9	12	15	<6	Ubetydelig
2	4	6	8	10		
1	2	3	4	5		

Sannsynlighetsmodell

Nivå	Sannsynlighet
1	>10 år
2	5-10 år
3	2-5 år
4	0,5-2 år
5	< 0,5 år

Konsekvensmodell

	Nivå	Beskrivelse
1	Ubetydelig	Ubetydelige skader eller belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
2	Mindre alvorlig	Små skader eller belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
3	Alvorlig	Alvorlige skader og belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier

4	Kritisk	Kritiske skader på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
5	Katastrofal	Katastrofal skade eller belastning på mennesker, fisk og/eller materielle verdier

Aktuell vurdering:

Forutsetninger:

Forekomst av de aktuelle agens i ferskvann som tas inn til Averøy Industripark AS. Forekomst av agens i produksjonssystem og opptak av smitte gjennom produksjonsvann.

Risikofaktorer	Ønsket beskyttelsesnivå	Sannsynlighet	Konsekvens	Risiko	Risikohåndtering
Utbrudd av Epteliocystis (Branchiomonas Cysticola) hos Averøy Industripark AS		> 10 år (1)	Kritisk (4)	4	1) Solide smittebarrierer ved ferskvannsinntak og sjøvannsinntak gjennom membranfiltrering og dobbelt UV 2) Screening for Branchiomonas cysticola under drift helt frem til slaktetidspunkt 3) «Alt inn alt ut» prinsippet er lagt inn i driftsplanen

Vurderinger ved inntak av ferskvann til Averøy Industripark AS knyttet til Epteliocystis

Averøy Industripark AS er et resirkuleringsanlegg som tar inn ferskvann til sin produksjon og man må derfor påregne en risiko for at det kan oppstå utbrudd av sykdommen epteliocystis, både i ferskvannsfasen og i den fasen hvor fisken er smoltifisert og skal stå under høy salinitet frem til slaktevekt. Grunnlaget for risikovurderingen baserer seg på oppdatert forskning på epteliocystis, og da *Branchiomonas cysticola*, samt erfaringer fra felt. Vi vil se på bakgrunnsstoff, sykdomstegn, smitteveier og virulens, samt risikofaktorer og håndtering av sykdommen.

Bakgrunnsdata Epteliocystis, *Branchiomonas Cysticola*

Epteliocystis er et begrep som beskriver en tilstand der små membrandedekte cyster med gram negative bakterier forårsaker irritasjon og patologiske forandringer i gjellene på ulike fiskearter, deriblant Atlantisk Laks (Mitchel et al. 2013). Cystene er lokalisert i det beskyttende cellelaget (epitelcellene) rundt gjellene på fisken, og er en av årsakene til proliferativ gjellebetennelse (PGI). En rekke studier koblet i starten epteliocystis til flere ulike klamydia-lignende bakterier, både hos beinfisk og bruskfisk (Draghi et al. 2004, Karlsen et al. 2008, Polkinghorne et al. 2010). Hos Atlantisk laks ble *Clavochlamydia salmonicola* assosiert med lignende infeksjon i gjellene på laks i ferskvann,

mens *Piscichlamydia salmonis* ble funnet i sjøvann både i Irland og Norge. I nyere tid har det riktig nok blitt vist at epiteliocystis ikke utelukkende er koblet til *Chlamydiae*, og i 2012 ble *Branciomonas cysticola* funnet i avgrensede cyster i gjellene på Atlantisk laks med PGI, og agenset er nå ansett for å være ansvarlig for cystedannelsen man ser i gjellene (og i enkelte tilfeller i huden) på fisken (Toenshoff et al. 2012). Studier viser at det er en kobling mellom økende antall bakterier tilstede i gjellene og økt alvorlighetsgrad av PGI, noe som indikerer at epiteliocystis spiller en stor rolle i slike gjellelidelser (Steinum et al. 2010). Dette støttes av feltforsøk der man ser godt samsvar mellom histologiske funn av cyster i epitelet og PCR-verdier for *B. Cysticola* i vevet (Steinum et al. 2015). Omfattende PCR-analyser av et stort utvalg individer har vist at bakterien ikke bare finnes i syk fisk, men også i tilsynelatende friske gjeller hos Atlantisk laks, i Norge og i Irland (Mitchel et al. 2013). Slike funn har ofte blitt kalt microcystis og under disse tilstandene er ikke gjellevevet særlig negativt påvirket av cystene. Epiteliocystis begrenser seg ikke bare til fisk oppdrett og man ser at villaks i stor grad er bærer av bakterien. Selv om man har trodd at bakterien i størst grad smitter i sjøvann, har studier vist at bakterien også kan smitte horisontalt i ferskvann (Wiik-Nilsen et al. 2017). Frem til 2012 ble også sykdommen ansett for å være en lidelse som ble forårsaket av en bakterie som kun forefantes i sjøvann. Med dagens kunnskap er altså fokuset rettet mer mot ferskvannsfasen og da særlig ferskvannskildene. Bakterien er funnet på vill laksefisk i slike vannkilder (Kvamme et al. 2012).

Kliniske tegn til epiteliocystis omfatter apatisk adferd hos fisken da, rammede individer sliter voldsomt med gassutskillelse og opptak av oksygen. Dette kommer som en følge av hyperplastisk gjellebetennelse der man ser en økning av antall celler i epitelet, noe som igjen forlenger avstanden mellom blodbanen til fisken og det omkringliggende vannet og reduserer evnen til bytte av CO₂ mot oksygen. Denne hyperplastiske gjellebetennelsen reduserer også gjelleoverflaten betydelig. Dette fører videre til hyperventilasjon hos fisken, utvidete gjellelokk og makroskopisk synlig økt slimproduksjon i gjellene. Dødeligheten varierer veldig, og er ofte påvirket av andre faktorer, men avgang så høy som 80 % er registrert i både ferskvannsfasen og sjøfasen. Cystene kan sees i mikroskop som runde, bakterieholdige, strukturer i de affiserte epitelcellene. Diagnosen settes ved å undersøke histologiske preparater, samt ved RT-PCR (Bruno et al. 2013). I ferskvannsfasen er de kliniske tegnene på epiteliocystis like de i sjøfasen. Rammet fisk svimer i store tall og oppholder seg ofte nært vannspeilet. Bleke og slimete gjeller, åpen munn og utspilte gjellelokk er vanlige funn. Det er få indikasjoner på at bakterien gir systemisk infeksjon (Steinum et al. 2015).

B. cysticola er svært utbredt i gjeller hos oppdrettslaks i matfiskanlegg langs hele Norge (Steinum et al. 2015). I felt er det ofte dødelighet i forbindelse med sykdommen på sommer og høst, med økte vanntemperaturer, noe som i stor grad gjelder for de fleste gjellelidelser man ser hos Atlantisk laks i oppdrett. Det er indikasjoner på at fisk i Nord-Norge er mindre utsatt for sykdommen, noe som trolig henger sammen med lavere temperaturer i havet (Steinum et al. 2015). PGI omtales ofte synonymt med epiteliocystis, men gjellebetennelse kan forekomme av flere ulike årsaker. Dette, kombinert med at gjellesykdommer ikke er ansett som meldepliktige, gjør det vanskelig å stadfeste konkret hvor stort problem epiteliocystis faktisk er i norsk lakseoppdrett. I 2019 ble gjellebetennelse påvist på 109 sjølokaliteter og 21 settefisklokaliteter, noe som er en økning i totalt 49 påvisninger fra året før. Hvor mye av dette som skyldes epiteliocystis er vanskelig å stadfeste. Som nevnt er gjellelidelser ofte forbundet med økte temperaturer. I og med at produksjon av settefisk ikke følger samme naturlige svingninger i temperatur etter årstidene (grunnet omfattende bruk av RAS-teknologi og oppvarming av vann), ser man ikke samme trend med økning av påvisninger i sommer/høstmånedene der (Fiskehelse rapporten 2019).

Epiteliocystis med påfølgende påvisning av bakterien *B. cysticola* er ikke uvanlig i RAS-anlegg i Norge. Her er bakterien påvist både i RAS med ferskvann og RAS med sjøvannsinnblanding. Undersøkelser av inntaksvann har vist at bakterien er å spore der, og det er også påvist av villfisk kan være bærer av bakterien (Kvamme et al. 2012). Utbrudd kan føre til svært høy dødelighet hos liten yngel og helt frem til utsettsfasen, og avgang etter sjøsetting er ikke uvanlig (Per Anton Sæther pers. med.).

Vurdering av den aktuelle risikofaktor

Smitterisiko og mulighet for å overleve i miljøet

Med økt bruk av RAS-teknologi ser man en økende trussel forbundet med oppformering av «husstammer» av bakterier og virus, og det gjelder også for *B. cysticola*. Riktig nok er bakterien i større grad forbundet med sykdom på sjøsiden enn på ferskvannssiden men i forbindelse med økt etablering av resirkuleringsanlegg og bruk av generelt høyere driftstemperaturer i disse har sykdommen fått et oppsving. Ved undersøkelse av 6 ferskvannsanlegg (2 i Irland og 4 i Norge) ble det ikke funnet *B. Cysticola* i noen individer (Mitchell et al. 2013), mens bakterien ble funnet på 80 % av undersøkt fisk fra 21 matfiskanlegg langs hele Norge (Steinum et al. 2015). Dette utelukker ikke risiko for sykdom, og man vet at bakterien kan gi dødelighet i ferskvann. Her er RAS-anlegg med økte temperaturer og saliniteter naturlige risikoområder.

I en studie fra 2014 (publisert i 2017) så man på smitte med *B. Cysticola* i et RAS-anlegg på Vestlandet, hvor det historisk var høy dødelighet forbundet med bakterien. For å undersøke smitte mellom fisk i ferskvann ble 80 syke fisk satt på en tank med ferskvann på 12 °C. I en annen tank var 35 klinisk friske fisk, som over en periode på 65 dager fikk innsig av vann fra karet med den smittede fisken. Som en kontrollgruppe hadde man 30 fisk i en tank med en separat vannkilde. Etter 65 dager så man ingen dødelighet, men om lag 97 % av den opprinnelig friske fisken var smittet av *B. Cysticola*. Histologiske forandringer innebar moderat hyperplasi av epitelet i gjellene, samt subepitelial inflammasjon, riktig nok ikke i like stor grad som i den opprinnelig syke fisken. Kontrollfisken hadde ingen tegn til infeksjon (Nilsen et al. 2017).

Et annet studie utført med *B. Cysticola* på Veso Vikan i 2013 viste at det var vanskelig å oppnå smitte. I det forsøket ble fisk smittet med injeksjon i buken (intraperitoneal smitte), samt eksponert for bakterien via badsmitte i ferskvann. Etter 33 dager var det ikke registrert dødelighet, og man klarte ikke i noen av forsøkene å finne igjen bakterien ved hjelp av qPCR (Steinum et al. 2015). Årsakene til at man i dette studiet ikke klarte å påvise smitte kan skyldes flere ting (bakterien overlevde ikke transporten eller at smittematerialet ikke inneholdt infektive stadier), men en åpenbar forskjell fra det studiet og det førstnevnte, er fravær av en vektor – en organisme som kan overføre agenset til en annen organisme. Dette kan indikere at bakterien kun smitter fra fisk til fisk, og at man ved å injisere bakterien eller utsette fisk for homogenisert gjellvev med bakterier ikke oppnår smitte. Dette gir indikasjoner på at det kan være svært viktig å ha et opphold der karene er tomme for fisk i en periode med nedvasking for å unngå sykdom.

Disse to studiene viser at det er vanskelig å oppnå smitte med *B. Cysticola*, men at smittepotensialet for *B. Cysticola* kan være stort innad i et settefiskanlegg når først smitten er oppnådd. I det førstnevnte forsøket ble studiet stoppet opp etter to måneder og man hadde på det tidspunktet ikke registrert dødelighet. Tross det er det utvilsomt et potensiale for avgang. Samtidig vet man at

bakterien er å finne i forholdsvis store mengder i frisk laks, så virulensen til bakterien regnes som liten (Kvamme et al. 2012). Dette innebærer at det trolig trengs relativt store konsentrasjoner av bakterien for å gi sykdom. I og med at RAS-teknologi innebærer gjenbruk av vann vil risikoen for oppformering av bakterien til store konsentrasjoner være til stede, noe som igjen øker risikoen for sykdom. Bruk av ozon i driftsvann har vist seg å kunne holde bakterien nede i antall slik at et sykdomsutbrudd ikke oppnås.

Alternativer behandlingsmetoder og risikoreducerende tiltak

Utbrudd av *B. cysticola* er ikke enkel å håndtere da det er få behandlingsmidler som har god effekt på bakterien. Dette er fordi agenset gjemmer seg inni cyster i epitelcellene (de er intracellulære) slik at de i stor grad unngår behandlingsmidlet. Gjellelidelser behandles ofte ved bruk av saltvann, kloramin T, formalin og til dels også antibiotika, men effekten på epiteliocyster er usikker. En studie på bruk av tetrasykliner (antibiotika) på Lakseabbor (large mouth bass) med epiteliocystis viste god effekt når stoffet ble distribuert i vannet over tre dager. Her ble dødeligheten redusert, og etter to uker kunne ikke epiteliocystis påvises i fisken. Det er riktig nok usikkerhet forbundet med disse resultatene, da man ikke identifiserte hvilke agens som infiserte fisken, og følgelig hva behandlingen faktisk hadde effekt på (Goodwin et al. 2005). I tillegg vet man ikke hvordan en slik behandling vil fungere på en annen art som Atlantisk laks.

Ved utbrudd og kroniske problemer knyttet til *B. Cysticola* er det en bedre løsning å forhindre sykdommen, snarere enn å behandle sykdommen – noe som i stor grad gjelder fiske sykdommer generelt. Det vil altså være svært viktig å opprette smittebarrierer på inntaksvannet til anlegget for å unngå at bakterien blir tatt inn. Man bør i tillegg til dette legge opp en driftsplan som gjør det mulig å nullstille floraen av bakterier, virus og parasitter i driftsvannet, slik at man unngår at patogener hopper seg opp i systemet. Dette gjelder spesielt i RAS-anlegg. Dette innebærer i praksis at man legger opp en drift etter det såkalte «Alt inn alt ut» prinsippet. Dette innebærer å fjerne all fisk, rengjøre RAS-avdelingen og fjerne all mikrobiologisk materiale i rørsystem og filter regelmessig. Frekvensen for disse tiltakene er vanskelig å angi, men screening av fisk for de aktuelle agensene med jevne mellomrom vil kunne si noe om frekvensbehovet for slike tiltak (i litteraturen omtaler veterinærinstituttet ct-verdier mellom 25,9 – 29 som moderat mengde bakterier, noe som kan brukes som et referansepunkt). I enkelte tilfeller har man klart å kvitte seg med husstammer av *B. Cysticola*. Konsekvensene av å ha en driftsplan som ikke tar høyde for problemer med opphopning av biologisk materiale kan være store, både på ferskvannssiden og etter sjøsetting. Erfaringer viser at biofilter i seg selv ikke klarer å holde uønskede agens i sjakk, slik at ytterligere tiltak synes nødvendig.

Bruk av probiotika i oppdrettssammenheng er et relativt nytt og interessant felt, og på sikt kan det tenkes at metoden kan påvirke vannmiljøet på en måte som minsker risikoen for epiteliocystis. Per i dag foreligger det ingen klare resultater eller anbefalinger.

Følsomhet overfor desinfeksjon

I og med at *B. Cysticola* foreløpig ikke har latt seg dyrke på laboratoriet (Steinum et al. 2015), har det ikke blitt gjort forsøk på følsomhet overfor desinfeksjonsmidler (Duncan Colquhoun pers. com.).

I forbindelse med bruken av membranfiltreringsteknologi, så omgår man konsekvensene knyttet til følsomhet overfor metoden. Membraner representerer fysiske barrierer hvor partikler eller

mikroorganismer som overgår en viss størrelse blir utestengt. Denne typen for finfiltrering kan i utgangspunktet sammenlignes med en desinfeksjon, da den kan fjerne både parasitter, bakterier, virus og andre mikroorganismer som kan føre til sykdom hos laks.

En membran er et materiale som slipper noe gjennom og holder noe annet tilbake – en selektiv barriere. En gitt membran er en barriere for komponenter av en viss størrelse eller med visse kjemiske egenskaper. I membranfiltrering av vann brukes trykk for å få rensset vann gjennom membranen, mens uønskede komponenter holdes tilbake. Membraner for filtrering av vann kan karakteriseres ved porestørrelse. Porestørrelsen avgjør altså hvilke komponenter som holdes tilbake.

Konklusjon

Med bakgrunn i de overnevnte faktorene er det en risiko for utbrudd av epiteliocystis, forårsaket av *B. Cysticola*, hos Averøy Industripark AS. Lokaliteten bruker RAS-teknologi, noe som betyr at det resirkulerer mye vann, holder forholdsvis høye temperaturer gjennom hele året, og i tillegg vil ha økt promille i enkelte kar. Dette er faktorer som øker risikoen for å få dødelighet som følge av sykdommen, og gir økt sannsynlighet for å få en «husstamme» med *B. cysticola*. Riktig nok er bakterien i størst grad forbundet med dødelighet på matfisklokaliteter på sjøsiden, og det er knyttet mindre risiko til ferskvannsproduksjon. Med de skisserte barrierene som allerede er på plass i ferskvannsinntaket og de som er planlagt knyttet til sjøvannsinntaket, er det vår oppfatning at risikoen for at bakterien skulle komme inn i anlegget er tilnærmet fraværende. Forutsatt at bakterien allikevel skulle kunne komme inn i inntaksvannet, er det lagt inn omfattende tiltak under produksjon med blant annet et «Alt inn og alt ut» prinsipp hvor det er lagt inn nedvasking av alle avdelinger og fjerning av all fisk etter gitte intervaller. Frekvensen her må vurderes ut fra smittesituasjonen i anlegget. For å få tilstrekkelig informasjon på dette punktet er det lagt opp til et overvåkningsprogram hvor fisk screenes jevnlig for blant annet dette agenset, slik at man kan finne frekvensen for når ekstra nedvask og desinfeksjon utover det som skjer under «Alt inn og alt ut» er å anbefale. Erfaringene om agenset man da opparbeider seg bør på sikt nedfelles i en tilpasset produksjonsplan.

Når det gjelder Averøy Industripark AS så skal de hente vann fra Nordre Averøy Vannverk. Dette vannverket benytter membranteknologi til å rense vannet. Tettheten på membranene er 1000 Dalton (metrisk tilsvarer dette ca. 4nm eller 0,004 mikrometer(μm)). De minste bakterier/virus/parasitter som forekommer i oppdrettssammenheng er mange ganger større, dette betyr at det er umulig å få disse gjennom membranene. Ser vi på akkurat dette agenset; *Branchiomonas Cysticola*, så er denne bakterien μm stor. Dette gjør at bakterien under normale driftsforhold ikke vil kunne komme inn gjennom ferskvannet. Etter at vannet er rensset gjennom membranene så ledes det gjennom en ny barriere som består av et dobbelt UV-anlegg. Alle systemer er doble med henblikk på redundans. Det er et dieselaggregat som starter automatisk og drifter hele anlegget ved bortfall av strøm. Det er ferskvannet som blir ansett som den mest sannsynlige innfallsporten for denne bakterien. Sjøvannsinntaket er plassert på 130m dyp. Ved denne plasseringen vil det være svært usannsynlig at bakterien vil kunne forefinnes. Dette sjøvannet vil også bli behandlet i en sammensatt prosess for å fjerne evt. patogene mikroorganismer.

Det vil bli benyttet ulike desinfeksjonsmetoder i kombinasjon inkludert membranfiltreringsteknologi for å sikre kvaliteten på det sjøvannet som skal tas inn i produksjonen. Det vil bli etablert 4 identiske enkeltenheter for membranfiltrering som totalt har en kapasitet på 760 000 liter. Det er lagt inn en overkapasitet på vannproduksjon for å ha døgnkontinuerlig vannleveranse og med tanke på redundans. Tre av disse enkeltenhetene vil kjøre hele tiden mens det fjerde fungerer som en back-up og vil i tillegg bli benyttet under regelmessig vedlikehold av enkeltenheter. De membranfiltrene som skal benyttes vil ha en porestørrelse på 0,02 mikrometer. Denne porestørrelsen innebærer at selv de minste av de kjente virusene som kan representere en risiko for sykdomsutbrudd i akvakulturanlegg, IPN -og PRV-viruset, blir fanget opp i filtrene. Bakterien *Branchiomonas cysticola* vil på denne måten ikke kunne bli tatt inn i anlegget via sjøvannsinntaket.

Det er MarinHelse AS sin oppfatning at utfordringene knyttet til epitheliocystis kan kontrolleres og elimineres via et godt fokus på inntaksbehandling av ferskvann og sjøvann. En sammen virkende desinfeksjon gjennom bruk av membranfiltrering og UV i kombinasjon har vist seg å være effektiv mot denne bakterien i andre resirkuleringsanlegg og vil kunne bidra til at risikoen for å få utfordringer knyttet til denne sykdommen er ubetydelige.

Mathias C. Overrein
Fiskehelsebiolog
MarinHelse AS



Referanser

Bruno, David W., Patricia A. Noguera, and Trygve T. Poppe. *A colour atlas of salmonid diseases*. Vol. 91. Springer Science & Business Media, 2013.

Draghi, Andrew, et al. "Characterization of "Candidatus piscichlamydia salmonis"(order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Journal of clinical microbiology* 42.11 (2004): 5286-5297.

Goodwin, A. E., E. Park, and B. F. Nowak. "Successful treatment of largemouth bass, *Micropterus salmoides* (L.), with epitheliocystis hyperinfection." *Journal of fish diseases* 28.10 (2005): 623-625

Karlsen, Marius, et al. "Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish." *Environmental microbiology* 10.1 (2008): 208-218.

Kvamme, Bjørn Olav, et al. "5. Annen smitte." *norsk fiskeoppdrett* 2012: 50.

- Mitchell, Susan O., et al. "Candidatus Branchiomonas cysticola' is a common agent of epitheliocysts in seawater-farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway and Ireland." *Diseases of aquatic organisms* 103.1 (2013): 35-43.
- Polkinghorne, Adam, et al. "Novel Chlamydiales associated with epitheliocystis in a leopard shark *Triakis semifasciata*." *Diseases of aquatic organisms* 91.1 (2010): 75-81.
- Sommerset I, Walde C S, Bang Jensen B, Bornø B, Haukaas A og Brun E (red). Fiskehelse rapporten 2019, utgitt av Veterinærinstituttet 2020
- Steinum, T., et al. «Proliferativ gjellebetennelse hos oppdrettslaks i sjøvann – patologi, utvalgte agens og risikofaktorer». Veterinærinstituttets rapportserie, utgitt 2015
- Steinum, T., et al. "Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation." *Diseases of aquatic organisms* 91.3 (2010): 201-211.
- Steinum, T., et al. "An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation." *Aquaculture* 293.3-4 (2009): 172-179.
- Wiik-Nielsen, J., et al. "Ca. *Branchiomonas cysticola*, Ca. *Piscichlamydia salmonis* and Salmon Gill Pox Virus transmit horizontally in Atlantic salmon held in fresh water." *Journal of fish diseases* 40.10 (2017): 1387-1394.