

**FOREKOMST AV PARAMOEBA
PERURANS I FAUNA, MILJØ OG
VILLFISK ASSOSIERT MED
OPPDRETTSANLEGG FOR MARIN
ATLANTISK LAKS**

| | |
|--------------------------------|--|
| Tittel | Forekomst av <i>Paramoeba perurans</i> i fauna, miljø og villfisk assosiert med oppdrettsanlegg for marin atlantisk laks |
| Forfatter(e) | Audny Hellebø ¹ , Anne Stene ² , Vidar Aspehaug ³ |
| Rapport nr. | MA 16-07 |
| Antall sider | 28 |
| Prosjektnummer | 54764 |
| Prosjektets tittel | Undersøking av potensielle reservoarer for <i>Paramoeba perurans</i> på marine oppdrettslokaliteter for atlantisk laks |
| Oppdragsgiver | FHF, Tollbugata 32, Postboks 429 Sentrum, 0103 Oslo |
| Referanse oppdragsgiver | 901003, Merete Bjørgan Schrøder |
| ISSN | 0804-5380 |
| Distribusjon | Åpen |
| Nøkkelord | Amøbisk gjellesykdom/AGD/ <i>Paramoeba perurans</i> /laks |
| Godkjent av | Beate Julie Thu |
| Godkjent dato | 15.11.2016 |

Abstrakt (max250)

Amøbisk gjellesykdom (AGD), forårsaket av amøben *Paramoeba perurans*, er et økende problem i oppdrett av atlantisk laks. Real-time PCR ble brukt for å identifisere om amøben var tilsted i fauna, miljø og villfisk. Over 1200 prøver ble samlet inn fra anlegg med AGD på laks eller anlegg med AGD-historie. Det ble også tatt ut makrell i fjordarm uten oppdrettsaktivitet og ved en aktiv oppdrettslokalitet i ytre kystområde. I et laboratorieforsøk ble det undersøkt hvorvidt amøben har affinitet for fettfilm. Når det er høyt smittepress på en lokalitet med AGD-syk laks så kan arvestoff fra amøben finnes i vannet, biofilm, plankton, noen begroingsorganismer, rensefisk og villfisk. Hverken begroingsorganismer, lakselus, biofilm eller sediment ser ut til å være langtidsoppholdssteder for amøben og slik medvirke til introduksjon av amøben hos laks. Positiv vandrende villfisk, som sei og makrell, kan bidra til introduksjon og spredning av amøben. Positiv stasjonær villfisk, som paddetorsk og leppefisk, kan bidra til introduksjon av amøben hos laks. Berggyllt og rognkjeks, brukt som rensefisk i merd, var positive for amøbe om våren etter at laks var blitt negativ gjennom vinteren. Dette indikerer at amøben kan overleve lenger hos disse artene og at de kan bidra til reintroduksjon av amøbe. I laboratorieforsøket var det ingen funn av amøbe i fetthinnen på vannoverflaten. Utbrudd på et anlegg gir høyt smittepress i miljøet. Mulige tiltak for å redusere utvikling av sykdommen bør derfor vurderes. Det er også viktig å undersøke smittestatus på villfanget rensefisk før bruk, og å utvise aktsomhet ved gjenbruk av rensefisk.

© Forfatter/Møreforskning Ålesund AS

Forskriftene i åndsverksloven gjelder for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller fremstille eksemplarer til privat bruk. Uten spesielle avtaler med forfatter/Møreforskning Ålesund AS er all annen eksemplarfremstilling og tilgjengelighetsgjøring bare tillatt så lenge det har hjemmel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettshavere til åndsverk.

¹ Møreforskning Ålesund AS

² NTNU i Ålesund

³ PatoGen Analyse AS

FORORD

NTNU i Ålesund, PatoGen og Møreforskning Ålesund har et ønske om å bidra til å forstå smittespredning og slik redusere tap og øke velferd i norsk lakseoppdrett. Vi har hatt flere prosjekter som omhandler ulike patogener. Med denne rapporten så ønsker vi å formidle den kunnskapen som vi har ervervet om oppholdssteder for amøben, *Paramoeba perurans*, i tilknytning til marint lakseoppdrett i Norge. Se gjerne også artikkelen som vi fikk publisert i Journal of fish diseases med tittel: «PCR survey for *Paramoeba perurans* in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)» (Hellebø *et al.*, 2016).

Det er mange som har bidratt inn i prosjektet og vi vil benytte anledningen til å takke de positive driftslederne og røkterne som gjorde dette prosjektet mulig. Tusen takk for dyktig tilrettelegging! Takk også til selskapene som lot oss få opprette kontakt med anleggene og som stilte personell, utstyr og tid til rådighet. Takk også til fiskehelsetjenesten Fiske-Liv (nå Åkerblå), styringsgruppen og ansvarlig hos FHF. Til sist en takk til Turid Standal Fylling, Anne-Mari Simonnes, Kristine Kvangarsnes, Pierrick Stévant, Margrete Emblemsvåg, Janne Kristin Stangeland, Sunniva Wannebo Kui, Mari Viken Kjønstad og Stein Eric Solevåg for stå-på-viljen og det gode humøret på de lange prøveuttakene.

Finansiering:

Møre og Romsdal fylkeskommune finansierte forprosjektet «Tiltak mot spredning av virussykdommer i sjøbasert oppdrett i Møre og Romsdal» (108/2008) og FHF finansierte prosjektet «Undersøking av potensielle reservoarer for patogene virus – fokus på NSAV og PMCV i marine akvakulturanlegg for atlantisk laks» (900721). Disse to prosjektene ledet frem til dette prosjektet som har blitt finansiert av FHF (901003). Takk!

Styringsgruppen bestod av:

Bjarne Reinert (Lerøy), Olav Breck (Marine Harvest), Arne Guttvik (Salmar).
Takk til alle for gode bidrag i prosjektet!

Ansvarlig hos FHF:

Merete Bjørgan Schrøder
Takk for hurtig respons og klar tale!

Prosjektgruppen bestod av:

Anne Stene (NTNU i Ålesund, tidligere Høgskolen i Ålesund), Vidar Aspehaug (PatoGen Analyse AS) og Audny Hellebø (Møreforskning Ålesund AS, prosjektleder).



Audny Hellebø

Ålesund 15.11.2016
Forsker



INNHold

| | |
|--|----|
| FORORD..... | 5 |
| OPPSUMMERING | 9 |
| SUMMARY | 10 |
| 1 INNLEDNING..... | 12 |
| 1.1 Bakgrunn for prosjektet | 12 |
| 1.2 Prosjektets omfang | 13 |
| 1.3 Prosjektorganisering | 13 |
| 1.4 Prosjektets effektmål | 13 |
| 1.5 Prosjektets resultatmål | 13 |
| 2 MATERIALE OG METODE | 14 |
| 2.1 Valg av forskningsmetode..... | 14 |
| 2.2 Gjennomføring av prosjektet | 14 |
| 2.2.1 Prøveuttakssteder | 14 |
| 2.2.2 Prøvetakingen | 14 |
| 2.2.3 Amøbe og affinitet for fettfilm | 15 |
| 2.2.4 Makrell | 15 |
| 2.2.5 Real-Time RT-PCR..... | 17 |
| 2.2.6 Sekvensering | 17 |
| 3 RESULTAT | 18 |
| 3.1 Anlegg 1 – 1. prøveuttak – Mai 2014 | 18 |
| 3.2 Holme – 2. prøveuttak – September 2014..... | 18 |
| 3.3 Anlegg 2 – 3. prøveuttak – November 2014 | 18 |
| 3.4 Anlegg 2 – 4. prøveuttak – Mai 2015 | 18 |
| 3.5 Sekvensering | 21 |
| 3.6 Amøbe og affinitet for fettfilm | 21 |
| 3.7 Makrell | 21 |
| 4 DISKUSJON | 22 |
| 5 KONKLUSJON..... | 24 |
| 6 LEVERANSER..... | 25 |
| 7 REFERANSER..... | 26 |

OPPSUMMERING

Amøbegjellesykdom (AGD) er et økende problem i sjøbasert lakseoppdrett globalt. I Norge ble sykdommen påvist i 2006 og den har siden 2012 gitt store tap. Karakteristiske tegn på sykdommen er lyse slimete flekker på gjelleoverflaten. Etter hvert som forandringene blir mer uttalt, oppholder fisken seg nærmere vannoverflaten og svimer. Sykdommen er forårsaket av amøben *Paramoeba perurans*. Først trodde man *Neoparamoeba pemaquidensis* var agens for AGD, og studier viste at denne amøben var tilstede i påvekstorganismer på merder og biofilm i Tasmania. Kun et mindre miljøstudium for *P. perurans* har tidligere vært publisert.

Formålet med prosjektet har vært å identifisere reservoar eller oppholdssteder for *P. perurans*. Det ble tatt ut prøver fra fauna, miljø og villfisk assosiert med oppdrettsanlegg der laksen hadde AGD eller hadde hatt AGD. Det ble gjennomført fire prøveuttak i prosjektperioden. Totalt ble over 1200 prøver av begroingsorganismer, biofilm, sediment, vann, plankton, villfisk, rensefisk og laks undersøkt for tilstedeværelse av *P. perurans*-arvestoff med Real-Time (RT)-PCR.

Det ble funnet arvestoff fra amøben hos enkeltindivider av påvekstorganismer på anlegg med AGD-utbrudd. De PCR-positive organismene filtrerer eller spiser partikler fra vann. Under utbrudd var også prøver av plankton, sjøvann og biofilm positive, noe som tyder på at det var høy konsentrasjon av amøber på lokaliteten. Alle prøver av sediment og lakselus var negative.

Om våren var rensefisk i merd PCR-positiv for amøben på to anlegg. På disse anleggene hadde laksen hatt AGD den foregående høsten, men i løpet av vinteren ved lav sjøtemperatur, var ikke laksen lenger PCR-positiv. På det ene anlegget var berggylt brukt som rensefisk, og på det andre rognkjeks. Dette indikerer at berggylt og rognkjeks kan bære amøben lenger enn laks og slik potensielt bidra til reinfeksjon av laks. Villfisk (sei, paddetorsk, grønngylt, berggylt, bergnebb) fra lokaliteten med AGD-utbrudd var PCR positive for amøben. To av artene, paddetorsk og grønngylt, hadde svært lave Ct-verdier som indikerer store mengder amøber. Makrell fisket i en fjordarm uten oppdrettsaktivitet var også positiv for amøben.

Positive prøver for *P. perurans* ble sekvensert på 18S rRNA genet. Vi lyktes med å få sekvenser fra amøbe i prøver fra laks, paddetorsk, rognkjeks og grønngylt. Alle sekvensene var like, noe som betyr at innenfor dette sekvenserte området er genmaterialet til amøben identisk.

Fettfilm på vannoverflaten kan bli transportert raskt med vær og vind. På bakgrunn av tidligere forskning ble det derfor undersøkt i laboratoriet om *P. perurans* hadde affinitet for fettfilm. Vi fant ingen indikasjoner på dette.

Resultatene indikerer at påvekstorganismer på merd ikke er langtidsreservoar for *P. perurans* siden de bare var PCR-positive da det var mye amøbe i vannet. Sjøvann og plankton kan bidra til smitteoverføring i likhet med positiv villfisk (sei og makrell) som forflytter seg mellom anlegg. Villfisk (som paddetorsk og leppefisk) er forholdsvis stasjonære men vil kunne bidra til smittespredning i nærområdet, og kanskje også introdusere amøben til nyutsatt laks. Våre resultater viser også at ved lave temperaturer kan rognkjeks og leppefisk være smittet med amøben lenger enn laks. Utbrudd på et anlegg gir høyt smittepress i miljøet. Mulige tiltak for å redusere utvikling av sykdommen bør derfor vurderes. Undersøkelse av smittestatus på villfanget rensefisk bør vurderes samt at det bør utvises aktsomhet ved gjenbruk av rensefisk.

SUMMARY

Amoebic gill disease (AGD) in sea-based salmon farming is a growing problem globally. The disease was detected in Norway in 2006, and has since 2012 resulted in large losses. Characteristics of the disease are bright, slimy spots on the gill surface. As changes become more pronounced, the fish become lethargic and congregate near the water surface. The disease is caused by the amoeba *Paramoeba perurans*. Initially the amoeba *Neoparamoeba pemaquidensis* was believed to be the etiological agent, and studies showed this amoeba to be present in fouling organisms and biofilm on cages in Tasmania. Only a preliminary environmental study for *P. perurans* have previously been published.

The purpose of the project was to identify reservoir or residing places for *P. perurans*. Samples from fauna, environment and wild fish associated with salmon farms with AGD or with a history of AGD were collected. Four samplings were completed during the project period. A total of more than 1200 samples of fouling organisms, biofilms, sediment, water, plankton, wild fish, cleaning fish and salmon were examined for the presence of genetic material of *P. perurans* by Real-Time (RT) PCR.

At salmon farm with AGD outbreak, genetic material from the amoeba was found in some individual fouling organisms. The PCR positive organisms either filter water or feed on particles from the water. Also, samples of plankton, seawater and biofilm were positive, which indicates that there was a high concentration of amoeba in the surroundings during outbreak. All samples of sediment and sea lice were negative.

At two farms in the spring, cleaner fish in the cage was found PCR positive. At these farms, the salmon had AGD the preceding autumn, but during the winter with low sea temperature, the salmon was no longer PCR positive. At one farm, ballan wrasse were used as cleaner fish, and at the second farm they used lumpfish. This indicate that ballan wrasse and lumpfish may carry amoeba longer than salmon and be able to reinfect salmon. Wild fish (pollock, tadpole fish, corkwing, ballan and goldsinny wrasse) sampled during AGD outbreak were also PCR positive for amoeba. Two of the species, tadpole fish and corkwing wrasse, had very low Ct values, indicating large amounts of amoebae. Mackerel in fjord without farming activity was positive for amoeba.

The PCR positive *P. perurans* samples were sequenced in the 18S rRNA gene. Sequences were obtained from the fish samples of salmon, toad cod, lumpfish and corkwing. The sequences were identical, indicating that within the sequenced area, the genetic material of the amoeba was identical among the species.

Liquid fat on water surface can be transported quickly over distances due to weather conditions. Previous research has shown pathogenic viruses to reside in the fat. The fat affinity of *P. perurans* was therefore examined in the laboratory. There was found no indication of fat affinity for the amoeba.

The results indicate that fouling organisms associated to farms are not long term reservoir for *P. perurans* since they were PCR positive only when there was high amount of amoeba in the surroundings. Seawater and plankton may contribute to spread of amoeba as positive wild fish (pollock and mackerel) which move between farms. Wild fish (like tadpole fish and wrasse) is mainly stationary but may contribute to the spread of infection in the vicinity, and introduce amoeba to smolt recently transferred to sea. Our results also show that lumpfish and wrasses

can be infected with the amoeba longer than salmon at low temperatures. An AGD-outbreak impose high infection pressure in the environment. Actions to reduce development of the disease should be considered when infection of salmon is proved. It may be important to know the infection status of wild cleaner fish and to be cautious when reusing cleaner fish.

1 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn for prosjektet

Amøbisk gjellesykdom (AGD) i atlantisk laks (*Salmo salar*, senere i rapporten brukes laks) er et økende problem for akvakulturnæringen globalt (Palmer *et al.*, 1997; Bustos *et al.*, 2011; Nowak, 2012; Mouton *et al.*, 2014; Rodger, 2014). AGD hos laks gir lyse, slimete flekker på gjelleoverflaten. Når forandringene blir verre vil laksen få respirasjonsvansker, svime og oppholde seg nær vannoverflaten (Rodger & McArdle, 1996; Munday *et al.*, 2001). AGD ble først beskrevet hos sølvlaks (*Oncorhynchus kisutch*) i oppdrett i USA i 1988 og senere også i oppdrettet laks og regnbueørret (*O. mykiss*) i Tasmania (Kent *et al.*, 1988; Munday *et al.*, 1990). Siden da er AGD funnet på flere oppdrettede arter, inkludert kveite (*Scophthalmus maximus*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), havabbor (*Dicentrarchus labrax*), sharpshout seabream (*Diplodus puntazzo*), olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), berggyllt (*Labrus bergylta*) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) (Kim *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008; Crosbie *et al.*, 2010; Karlsbakk *et al.*, 2013).

Agenset for AGD var først antatt å være *Neoparamoeba pemaquidensis* basert på morfologisk og molekylær karakterisering (Dyková *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2004), men det var diskutert om det var blandet etiologi for AGD (Dykova *et al.*, 2005). I 2007 ble *Neoparamoeba perurans* identifisert som etiologisk agent for AGD (Young *et al.*, 2007) og i 2012 ble Koch's postulater oppfylt (Crosbie *et al.*, 2012). *Neoparamoeba perurans* og *Paramoeba perurans* er synonyme navn (Feehan *et al.*, 2013) og i denne rapporten vil *P. perurans* bli brukt. *P. perurans* er bekreftet som etiologisk agens for AGD i laks, Chinook salmon, regnbueørret, kveite og berggyllt (Young *et al.*, 2008; Karlsbakk *et al.*, 2013).

Det var først i 2006 at AGD ble dokumentert i norsk oppdrettslaks (Steinum *et al.*, 2008). Den gang ble fire geografisk adskilte anlegg diagnostisert samtidig og Steinum *et al.* (2008) foreslo at det måtte finnes reservoar for amøben i det marine miljøet. Høy sjøtemperatur og salinitet har tidligere blitt identifisert som viktige miljøpreferanser for AGD-utbrudd (Clark & Nowak, 1999). Få studier har fokusert på introduksjon og transmisjon av *P. perurans*. *Neoparamoeba pemaquidensis*, som man tidligere trodde forårsaket AGD, er funnet i begroingsorganismer, biofilm, sjøvann, sediment og marine invertebrater, enten ved immunfluorescens antistoff test eller ved dyrking (Tan *et al.*, 2002; Crosbie *et al.*, 2003; Douglas-Helders *et al.*, 2003; Crosbie *et al.*, 2005; Dykova *et al.*, 2005). I et PCR forstudium der potensielle reservoar ble undersøkt, ble 22 organismer, 27 sedimentprøver og 20 lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) testet ved PCR (Nowak *et al.*, 2010). I dette studiet ble bare ryggskjoldet til lakselusa funnet PCR-positiv for *P. perurans*.

Målet med dette studiet var å identifisere reservoarer eller oppholdssteder for *P. perurans* i det marine miljø og foreslå tiltak for å hindre spredning av *P. perurans* og utbrudd av AGD. Det ble samlet inn prøver på og nær anlegg med AGD eller AGD-historikk som alle ble analysert ved Real-time PCR.

1.2 Prosjektets omfang

Prosjektstart: august 2014. I tillegg ble det sikret prøver fra et anlegg i mai 2014 som også gikk inn i prøvematerialet (innspill 34-2014 til FHF).

Prosjektslutt: november 2016

De fire arbeidspakkene i prosjektet:

- **Arbeidspakke 1:**
Analysere prøvematerialet fra anleggene i FHF-prosjekt 900721 og fra FHF-innspill 34-2014.
- **Arbeidspakke 2:**
Prøveuttak på eller nær anlegg med AGD-sykdom på laks eller historikk.
- **Arbeidspakke 3:**
I laboratoriet - undersøke fettavsviv fra AGD-laks for tilstedeværelse og fettaffinitet for *P. perurans*.
- **Arbeidspakke 4:**
Rapportering og vitenskapelig publisering

1.3 Prosjektorganisering

Prosjektgruppen: Anne Stene, Vidar Aspehaug og Audny Hellebø (prosjektleder).

Styringsgruppen: Olav Breck (Marine Harvest), Arne Guttvik (Salmar) og Bjarne Reinert (Lerøy).

Ansvarlig hos FHF: Merete Bjørgan Schrøder

1.4 Prosjektets effektmål

Ønsket effektmål med prosjektet er å identifisere *P. perurans* i det marine miljø og slik bidra til kunnskap for å redusere spredning av amøbe og forekomst av AGD. Dersom man kjenner introduksjonsveier for amøben så kan man sette inn tiltak for å forhindre spredning. Sykdommen gir betydelige økonomiske tap for akvakulturnæringen og ny kunnskap kan bidra til redusert tap og bedre fiskevelferd. Eksempel på slike tiltak kan være behandling tidlig i sykdomsforløpet og vise varsomhet ved import og gjenbruk av rensefisk.

1.5 Prosjektets resultatmål

- Innhente prøvemateriale
- Analysere prøvematerialet ved Real-Time PCR
- Systematisering av prøvesvar, rapportering og publisering
- Undersøke fettlekkasje fra AGD-død laks og vurdere fettaffinitet for amøben
- Sekvensering av positive prøver
- Anbefaling av tiltak

2 MATERIALE OG METODE

2.1 Valg av forskningsmetode

For å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av arvestoff fra amøben *P. perurans* ble analysemetoden Real-Time (RT)-PCR benyttet. PatoGen Analyse AS (Larsgårdsveien 4, 6009 Ålesund) utførte alle analysene. PatoGen er akkreditert etter den internasjonale standarden ISO17025 for å utføre slike analyser for påvisning av fiskepatogene agens. Videre i rapporten blir Real-Time (RT)-PCR omtalt som PCR.

2.2 Gjennomføring av prosjektet

2.2.1 Prøveutakssteder

Det ble samlet prøver fra tre steder (Tabell 2.1). På anlegg 2 ble prøver samlet inn to ganger (under og etter utbrudd). Lokalitetene ble valgt ut på bakgrunn av regelmessig screening for tilstedeværelse av amøbearvestoff.

2.2.2 Prøvetakingen

For å minimere risikoen for kontaminering, ble prøver vurdert som høyrisiko (mest sannsynlig positiv) arbeidet med til sist (eks. laks). Pinsetter ble satt i glass med 10% klorin i minimum 1 min dersom det ble behov for å gjenbruke utstyret.

- *Begroingsorganismer* blir her definert som de fastsittende og bevegelige marine dyrene som ble samlet for hånd på merder, tauverk og konstruksjoner eller i strandsonen. På holmen (2. prøveuttak) ble prøvene samlet inn fra strandkanten til nedre strandsone, og dykkere samlet bunndyr på 15m dyp. Målet var å samle 20 individer av hver organisme på de tre første prøveuttakene. På det fjerde prøveuttaket forsøkte vi å finne 60 av hver av de organismene som var positive på det tredje prøveuttaket. På grunn av varierende mengde individ tilstede ble ikke alltid ønsket antall prøver oppnådd. Fra hver organisme ble en vevsbit på 2 mm³ fiksert i rør forhåndsfylt med RNAlater® (Qiagen, 76104). Vevet var enten (1) gjeller, (2) munn, (3) polypper eller (4) fordøyelsessystemet eller tarmer etter denne prioriteringsrekkefølgen og utfra hvilken organisme en tok prøve av. Fra noen arter ble flere vevsbiter tatt ut (feks. kråkebolle – her ble det tatt prøve fra tarm, gonade og radial nerve). Rørene med vevsbiter ble lagret i 24t ved 4°C før de ble fryst ned på -20°C og oppbevart der frem til analyse.
- *Biofilmprøver* ble tatt fra anleggsbåt, tau og konstruksjoner med ESwab kit med Liquid Amies medium (480C; Copan). Det ble tatt 3 parallelle prøver nær hverandre fra hvert sted. Biofilmprøver fra glatte overflater ble først tatt med ett skalpellblad og overført til svaberen, som så ble overført til mediet. På ujevne overflater (f.eks. tau) ble svaberen brukt direkte. Prøvene ble oppbevart ved 4°C før de innen 2 dager ble rensset for nukleinsyrer.
- *Sjøvann* ble hentet med en vannhenter (Niskin 5l; KC-Danmark AS) på 0m, 5m og 15m dybde. Sjøvannet ble oppbevart på is inntil ett døgn frem til videre analyse. På laboratoriet ble vannet filtrert gjennom 0,45 µm filter (GN-6, Pall). Filteret ble så lagt i en petriskål og tilsatt 2 ml QIAzol® før inkubering i 10-15 min ved romtemperatur.

Filteret ble skrappt med ett skalpellblad og 820 µl av væsken med avskrap ble overført til et nytt rør. En liten bit av filteret ble skåret ut og lagt i væsken og alt ble lagret ved -20°C frem til analyse. Vann ble ikke hentet fra første prøveuttak.

- *Plankton* ble tatt ved horisontalt trekk på 20 cm dyp både med 20 µm og 100 µm maskestørrelse (Fybikon A/S). To trekk ble utført for hver maskestørrelse. Planktonet ble overført til 50ml rør og oppbevart på is frem til laboratoriet hvor det ble filtrert gjennom 0,45 µm filter (GN-6, PALL) og behandlet videre som vannprøvene.
- *Sedimentprøve* ble tatt med en van Veen grab (250cm², KC-Denmark AS) nært inntil og dersom mulig nedstrøms for anlegget. Tre parallelle sedimentprøver ble tatt på hvert prøveuttak, overført til transportbeholder og holdt på is frem til laboratoriet. I avtrekk ble 2 mm³ av topplaget inkubert med 750 µl QIAzol[®] i 10-15 min for deretter å bli lagret ved -20°C frem til analyse.
- *Fisk* ble avlivet med en dødelig dose bedøvelsesmiddel (Benzoak Vet, ACD Pharmaceuticals AS). Fra hver fisk, ble gjelleprøver på 2 mm³ tatt fra andre gjellebue (venstreside, i benden mellom øvre og midtre del) og overført til rør forhåndsfylt med RNAlater[®]. Rørene ble lagret 24 t ved 4°C før de ble fryst og lagret ved -20°C frem til analyse. Gjellene ble scoret fra 0 til 5 etter Taylor *et al.* (2009).
 - *Vill fisk*. En dag før prøveuttak ble teiner eller ruser satt ut 200 m fra prøvetakingsstedet. Sei ble fanget med håv etter at fiskefôr ble kastet i sjøen utenfor merdene.
 - *Rensefisk fra merd*. Hvis mulig ble teiner satt i merd før prøveuttak. I tillegg ble rensefisk samlet fra dødfiskhåven.
 - *Laks*. Prevalensen av *P. perurans* i anleggene på prøveuttak ble regnet ut fra analyser av 20 tilfeldige laks. Laksen ble fanget som seien. Prøveuttakene og besøk av fiskehelsetjeneste var koordinert for å minimere tap av laks.
 - *Torsk i merd*. På første prøveuttak ble tre torsk fanget i merd med håv.
- *Lakselus* ble fjernet fra laksen med et skalpellblad og overført til 50ml rør med sjøvann. Etter 30 minutter ble lusa overført til rør med RNAlater[®] og lagret i 24 t ved 4°C, så fryst ved -20°C og oppbevart fryst frem til analyse.

2.2.3 Amøbe og affinitet for fettfilm

Fettvev (abdominal og pylorus) og gjeller ble skåret ut fra seks døde fisker («ferske») fra oppdrettsanlegg med AGD diagnose. Vev fra to fisker ble lagt i samme begerglass, tilsatt sterilt sjøvann og oppbevart ved +5 og +12 °C. Etter ett døgn og tre døgn ble det tatt ut 70 µl prøve fra fett på toppen av vannsøylen og vann under overflatefettet. Prøvene ble tilsatt 750 µl Qiazol[®] og inkubert i 10-15 min for deretter å lagres ved -20°C frem til analyse.

2.2.4 Makrell

I midten/slutten av september 2015 ble 35 makrell fisket i 1) Sykkylvsfjorden, en arm av Storfjorden uten oppdrett av laks, og 2) utenfor et anlegg på Sunnmørskysten (Tabell 2.2). Makrellen ble avlivet med slag mot hode/nakke. Hodene ble skåret av bak sidefinnen, lagt i plastikkposer, oppbevart i isoporboks med kjøleelement og transportert til laboratoriet. Ved mottak av makrellen neste dag ble gjelleprøver tatt ut som beskrevet tidligere for fisk.

Tabell 2.1 Informasjon om de tre prøveutaksstedene og de fire prøveuttakene i prosjektet.

| | Anlegg 1 1. prøveuttak | Holme^b 2. prøveuttak | Anlegg 2 3. prøveuttak 4. prøveuttak | |
|---|--|--|--|--|
| Fylke | Møre & Romsdal | Møre & Romsdal | Sogn & Fjordane | |
| Smolt satt ut i sjø | Høst 2012 | På naboanleggene: 1 ^c : Juli 2014 2 ^d : Juni 2014 | Vår 2014 | |
| Tidspunkt prøveuttak | Mai 2014 | September 2014 | November 2014 | Mai 2015 |
| Snittvekt laks | 7 kg | På naboanleggene: 0.25 - 0.35 kg | 1 kg | 4 kg |
| Tidligere <i>P. perurans</i> historikk hos laks | Ja, AGD diagnose på laks November 2013 både på histologi ^a og PCR (28/29 positive Ct 14.6-31.9) Feb 2014: 0/10 PCR-positive April 2014: 0/4 PCR-positive | Laks på naboanleggene: 1: Ja (se Anlegg 1) 2: Nei (nyetabert anlegg) | Nei | Ja, AGD-utbrudd november 2014 |
| Analyser på rensefisk før prøvetaking | Ja, på berggylte: Feb 2014: 8/10 positive Ct 17-28 April 2014: 7/20 positive Ct 22-36 | | | |
| Tilleggsinformasjon | Laksen ble utslaktet på tidspunktet for prøveuttak og anlegget ble brakklagt frem til juli | Det ble også gjennomført dykk for å samle bunnlevende dyr ved holmen | | |
| Bakgrunn for prøvetaking | Anlegget var lokalisert i et område der <i>P. perurans</i> ikke tidligere hadde vært påvist ved PCR (og AGD ved histologi). Laks på anlegget testet positivt for <i>P. perurans</i> ved PCR i november 2013 og var så negative på de to etterfølgende testingene. Rensefisken på anlegget var positive på disse testene (se over). | Laks på naboanleggene ble samtidig infisert med <i>P. perurans</i> sent i august 2014 (bekreftet både med PCR og histologi). Det hadde ikke vært laks i området siden mai 2014 da Anlegg 1 ble brakklagt. | Anlegget hadde AGD-utbrudd på laks (bekreftet både med PCR og histologi positiv) | Samlet prøver fra de artene/grupper av arter som testet positivt fra 3. prøveuttak |

^a Histologi utført av Veterinærinstituttet.

^b Holmen lå mellom to infiserte anlegg.

^c Dette naboanlegget er det samme som Anlegg 1 (1. prøveuttak) og var lokalisert 2,8 km unna holmen.

^d Dette naboanlegget lå 0,15 km unna holmen.

Tabell 2.2 Informasjon om de to prøveuttaksstedene for makrell i prosjektet

| Sted | Fylke | Dato | Fangst-metode | Nærmeste oppdrettsanlegg for laks i sjø | |
|-----------------|-----------------|------------|---------------|---|--|
| | | | | avstand | PCR status laks |
| Sykkylvsfjorden | Møre og Romsdal | 17.09.2015 | stang | 7 km | PCR negativ |
| Sunnmørskysten | Møre og Romsdal | 23.09.2015 | hekle | 1 km | 4/19 PCR positive (10/9-15), (Ct: 19,4 ,21,3, 24,4 og 36,4) |

2.2.5 Real-Time RT-PCR

70 µl celledsupernatant og fettavsiv ble tilsatt 750 µl QIAzol® (Qiagen, 79306) og inkubert i 10 min ved romtemperatur. Prøvene ble så oppbevart ved -20°C frem til rensing av RNA og utføring av Real-Time RT-PCR i henhold til PatoGen Analyses metoder.

RNA ble rensset fra prøver på RNAlater og Real-Time RT-PCR ble utført i henhold til PatoGen Analyses akkrediterte metode for SAV påvisning og den lisensierte metoden for påvisning av PMCV.

2.2.6 Sekvensering

Positive prøver ved Real-Time RT-PCR ble sekvensert. Forskjellige primere for *P. perurans* ble undersøkt ved PCR for å vurdere hvilke som skulle brukes i sekvensering. Primerne som gav best PCR-produkt for ulike typer prøver ble valgt til sekvensering. Det var primere for 18S rRNA genen med annealingstemperatur på 54°C som ble valgt ut:

Primersekvens 5': ACCTGGTTGATCCTGCCAG (Erib1F, (Barta *et al.*, 1997))

Primersekvens 3': CAAGAATTCACCTCTGACAATGA (NeoEKR2, (Karlsbakk *et al.*, 2013))

Sekvenseringsprodukt ble sendt til Sekvenslaboratoriet i Bergen for analysing. Sekvenser ble undersøkt med søkemotoren BLAST (National Center for Biotechnology Information). 18S sekvensene av *P. perurans* ble sammenlignet med Vector NTI Advance (Invitrogen).

3 RESULTAT

3.1 Anlegg 1 – 1. prøveuttak – Mai 2014

Prøveuttaket ble gjennomført på et anlegg der rensefisk (her: berggylt) var PCR-positiv for *P. perurans* etter at laks var blitt negativ (Tabell 2.1). Totalt ble 288 prøver samlet inn. Av disse ble 19 ulike begroingsorganismer, plankton, biofilm og sedimentprøver analysert. Alle disse var PCR negative for *P. perurans* (Tabell 3.1, 3.2 og 3.3). Torsk i merd og rognkjeksyngel utenfor merd testet også negativt for *P. perurans* (Tabell 3.2).

3.2 Holme – 2. prøveuttak – September 2014

Organismer ble samlet fra en holme lokalisert mellom to anlegg som samtidig fikk påvist AGD på laks. Av de 241 prøvene derav 25 ulike organismer (inkludert bunndyr) så var ingen PCR-positive for amøben (Tabell 3.1). Av de 42 fiskene fanget i teine nær holmen så var alle PCR-negative (Tabell 3.2). Vann, plankton og sedimentprøver var også negative for *P. perurans* ved PCR (Tabell 3.3).

3.3 Anlegg 2 – 3. prøveuttak – November 2014

Laks på anlegget hadde AGD-utbrudd under prøveuttaket. Alle gjelleprøver fra laks var PCR-positiv med Ct-verdier fra 11,7-23,2 (Tabell 3.2) og gjellescore fra 2,5-4. Begroingsorganismer som mosdyr, sjøpung, sjøanemoner og noen hydroider, blåskjell og nakensnegler var også PCR-positiv for amøben (Tabell 3.1). Ikke alle individ fra samme klasse eller art var positive og ingen av dem hadde Ct-verdier under 22.

Tre rensefisk i merd (her: rognkjeks) var PCR positive med en Ct-verdi på 13,4-19 (Tabell 3.2). De hadde noe lysere farge på gjellene men ikke slimflekker på gjellefilamentene. PCR-positiv sei hadde høye Ct-verdier (> 22). Fem arter (ulke, paddetorsk, berggylt, grønnngylt og bergnebb) ble tatt i teine. Berggylten hadde lysere farge på gjellene og slimflekker noe som ofte er assosiert med *P. perurans* infeksjon på laks og berggylten var også PCR-positiv med Ct-verdi på 20,7. Grønnngylten og paddetorsken hadde Ct-verdier på henholdsvis 15,1 og 16,1 men ingen av dem hadde visuelle endringer på gjellene. Ti lakselus ble tatt fra laks og alle var negative for *P. perurans* (data ikke vist).

Alle vann og planktonprøver og noen biofilmprøver var PCR positive for *P. perurans* (Tabell 3.3). Vannprøvene viste Ct-verdier på >22. Planktonprøvene samlet med 25 µm maskestørrelse viste lavere Ct-verdier (mer amøbe) enn planktonprøver fra maskestørrelse 100 µm. *P. perurans* ble også funnet i 4 av 26 biofilmprøver med Ct-verdier fra >26 og bare i en av tre parallelle prøver (data ikke vist). Amøben ble ikke påvist ved PCR i sediment (Tabell 3.3).

3.4 Anlegg 2 – 4. prøveuttak – Mai 2015

Det ble samlet prøver fra Anlegg 2 på nytt etter at laksen var PCR-negativ for amøben. Nå var fokus på å samle de organismene som var positive i forrige prøveuttak. Det ble samlet 238 prøver fra 12 arter. Alle prøvene var negative, med unntak av en rensefisk (her: rognkjeks) i merd (Tabell 3.1, 3.2 og 3.3). Lakselus (31 stk) tatt fra laks var også negative.

Tabell 3.1 Påvisning av *P. perurans* ved PCR i begroingsorganismer og bunndyr. Familienavn, latinsk navn (kursiv), artsnavn, familie, rekke, klasse eller fylum (uthevet) er oppgitt. Brøken viser hvor mange positive prøver det er av totalt antall prøver. For positive prøver er nedre og øvre Ct-verdi oppgitt. (Ct=threshold cycle, ND=not detected)

| | Anlegg 1 | | Holme | | Anlegg 2 | | | |
|---|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|---------------|---------------|-----------|
| | 1. prøveuttak | | 2. prøveuttak | | 3. prøveuttak | | 4. prøveuttak | |
| | +/no | Ct | +/no | Ct | +/no | Ct | +/no | Ct |
| Annelida (leddormer) | 0/16 | ND | 0/12 | ND | 0/1 | ND | | |
| Polychaeta (flerbørstemark) | 0/16 | ND | 0/12 | ND | 0/1 | ND | | |
| Arthropoda (leddyr) | 0/49 | ND | 0/38 | ND | 0/14 | ND | 0/1 | ND |
| Malacostraca (storkreps) | | | | | | | | |
| <i>Amphipoda</i> (tanglopper) | 0/20 | ND | | | 0/5 | ND | | |
| <i>Cancer pagurus</i> (taskekrabbe) | | | 0/5 | ND | | | | |
| <i>Caprella</i> spp. (spøkelseskreps) | | | | | 0/9 | ND | | |
| <i>Carcinus maenas</i> (strandkrabbe) | | | 0/24 | ND | | | | |
| <i>Idotea</i> spp. (isopod) | 0/6 | ND | | | | | 0/1 | ND |
| <i>Munida</i> sp. (langfingerkreps) | | | 0/1 | ND | | | | |
| <i>Paguriodea</i> (eremittkreps) | 0/1 | ND | 0/3 | ND | | | | |
| Maxillopoda | | | | | | | | |
| <i>Semibalanus balanoides</i> (rur) | 0/20 | ND | 0/2 | ND | | | | |
| Pycnogonida (sjøedderkopp) | 0/2 | ND | 0/2 | ND | | | | |
| Bryozoa (mosdyr) | 0/5 | ND | 0/10 | ND | 3/10 | 27.1 - | 0/20 | ND |
| Chordata (ryggstrengdyr) | 0/44 | ND | 0/25 | ND | 2/19 | 24.2 - | 0/56 | ND |
| Ascidiacea (sjøpung) | | | | | | | | |
| <i>Botryllus</i> spp. (kolonisekkedyr) | 0/20 | ND | | | | | | |
| <i>Ciona</i> sp. (sjøpung) | 0/24 | ND | 0/25 | ND | 2/19 | 24.2 - 29.4 | 0/56 | ND |
| Cnidaria (nesledyr) | 0/21 | ND | 0/8 | ND | 10/51 | 23.4 - | 0/74 | ND |
| Anthozoa (koralldyr) | | | | | | | | |
| <i>Alconyium</i> sp. (dødmannshånd) | | | 0/8 | ND | | | | |
| Actiniaria (sjøanemoner/sjøroser) | | | | | 2/26 | 23.4 - 28.7 | 0/37 | ND |
| Hydrozoa (hydroider) | | | | | | | | |
| <i>Hydroides</i> spp. | | | | | | | 0/34 | ND |
| <i>Obelia geniculata</i> (bjellehydroide) | | | | | 3/5 | 26 - 28.4 | 0/3 | ND |
| <i>Tubularia</i> spp. | 0/20 | ND | | | 5/18 | 25.2 - 29.8 | | |
| Scyphozoa (stormaneter) | 0/1 | ND | | | 0/2 | ND | | |
| Ctenophora (ribbemanet) | 0/21 | ND | | | | | | |
| Echinodermata (pigghuder) | 0/29 | ND | 0/48 | ND | 0/1 | ND | | |
| Asteroidea (sjøstjerner) | | | | | 0/1 | ND | | |
| <i>Asterias rubens</i> (korstroll) | | | 0/2 | ND | | | | |
| <i>Crossaster papposus</i> (piggsolstjerne) | | | 0/3 | ND | | | | |
| Crinoidea (sjøliljer) | | | | | | | | |
| <i>Antedon</i> sp. (fjærstjerner) | | | 0/2 | ND | | | | |
| Echinoidea (kråkebolle) | 0/29 | ND | 0/29 | ND | | | | |
| Ophiuroidea (slangestjerner) | | | 0/12 | ND | | | | |
| Mollusca (bløtdyr) | 0/71 | ND | 0/90 | ND | 5/49 | 22.1 - | 0/49 | ND |
| Bivalvia (muslinger) | | | | | | | | |
| <i>Anomia ephippium</i> (sadelskjell) | 0/20 | ND | | | | | | |
| <i>Hiatella arctica</i> (steinboreskjell) | 0/20 | ND | 0/6 | ND | 0/4 | ND | | |
| <i>Mytilus edulis</i> (blåskjell) | 0/21 | ND | | | 4/36 | 22.1 - | 0/49 | ND |
| <i>Pecten</i> spp. (kamskjell) | | | 0/31 | ND | | | | |
| Gastropoda (snegler) | | | | | | | | |
| <i>Gibbula</i> spp. (kjeglesnegl) | | | 0/10 | ND | | | | |
| <i>Littorina</i> spp. (strandsnegl) | 0/6 | ND | 0/10 | ND | | | | |
| <i>Nassarius</i> sp. (nettsnegl) | | | 0/3 | ND | | | | |
| <i>Nucella</i> spp. (purpurnegle) | 0/4 | ND | 0/10 | ND | | | | |
| Nudibranchia (nakensnegler) | | | | | 1/9 | 31.6 | | |
| <i>Patella</i> spp. (albuesnegle) | | | 0/15 | ND | | | | |
| <i>Trivia</i> spp. (kaffebønne) | | | | | | | | |
| <i>Valvata</i> spp. (fjærgjellesnegle) | | | 0/5 | ND | | | | |
| Nemertea (slimormer) | 0/15 | ND | 0/1 | ND | | | | |
| Porifera (svamp) | 0/17 | ND | 0/9 | ND | | | | |
| Totalt antall prøver | 288 | | 241 | | 145 | | 200 | |

Tabell 3.2 Påvisning av *P. perurans* ved PCR i fiskeprøver. Prøver fra fisk er delt i ulike grupper i forhold til hvor de ble fanget. Familienavn, latinsknavn (kursiv) og artsnavn er oppgitt. For hver gruppe og prøveuttakingssted er totalt antall fisk oppgitt. Brøken viser hvor mange positive prøver det er av totalt antall prøver. For positive prøver er nedre og øvre Ct-verdi oppgitt. (Ct=threshold cycle, ND=not detected)

| | Anlegg 1 | | Holme | | Anlegg 2 | | | |
|--|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|--------------------|---------------|-----------|
| | 1. prøveuttak | | 2. prøveuttak | | 3. prøveuttak | | 4. prøveuttak | |
| | +/no | Ct | +/no | Ct | +/no | Ct | +/no | Ct |
| Fisk i anlegg | 0/23 | ND | - | | 23/23 | 11.7 - 23.2 | 1/31 | 25 |
| Laksefamilien (prevalens referanse) <i>Salmo salar</i> (Atlantisk laks) | 0/20 | ND | | | 20/20 | 11.7 - 23.2 | 0/20 | ND |
| Rognkjeks og ringbukfamilien <i>Cyclopterus lumpus</i> (rognkjeks) | 0/0 | - | | | 3/3 | 13.4 - 19 | 1/11 | 25 |
| Torskefamilien <i>Gadus morhua</i> (Atlantic torsk) | 0/3 | ND | | | | | | |
| Fisk utenfor anlegg | 0/12 | ND | - | | 3/13 | 22 - 34.2 | 0/16 | ND |
| Rognkjeks og ringbukfamilien <i>Cyclopterus lumpus</i> (rognkjeks) | 0/12 | ND | | | | | | |
| Torskefamilien <i>Pollachius virens</i> (sei) | | | | | 3/13 | 22 - 34.2 | 0/16 | ND |
| Villfisk fra teine 200m fra anlegg | 0/0 | - | 0/42 | ND | 8/23 | 15.1 - 35.3 | 0/11 | ND |
| Ulkefamilien <i>Myoxocephalus Scorpius</i> (ulke) | | | | | 0/1 | ND | | |
| Torskefamilien <i>Gadus morhua</i> (torsk) | | | 0/5 | ND | | | | |
| <i>Raniceps raninus</i> (paddetorsk) | | | | | 1/1 | 16.1 | | |
| Leppefiskfamilien <i>Ctenolabrus rupestris</i> (bergnebb) | | | 0/20 | ND | 5/19 | 23.2 - 35.3 | 0/8 | ND |
| <i>Labrus bergylta</i> (berggyllt) | | | 0/1 | ND | 1/1 | 20.7 ^a | | |
| <i>Labrus bimaculatus</i> (rødnebb) | | | | | | | 0/2 | ND |
| <i>Symphodus melops</i> (grønngyllt) | | | 0/15 | ND | 1/1 | 15.1 | | |
| Tangsprellfamilien <i>Phois gunnellus</i> (tangsprell) | | | 0/1 | ND | | | 0/1 | ND |
| Totalt antall prøver | 38 | | 42 | | 59 | | 58 | |

^a patologiske endringer ofte assosiert med *P. perurans* infeksjon

Tabell 3.3 Påvisning av *P. perurans* ved PCR i prøver fra vann, plankton, biofilm og sediment. Brøken viser hvor mange positive prøver det er av totalt antall prøver. For positive prøver er nedre og øvre Ct-verdi oppgitt. (Ct=threshold cycle, ND=not detected)

| Sample | Dybde | Anlegg 1 | | Holme | | Anlegg 2 | | | |
|----------|-----------------------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|-------------|------------------------|-----------|
| | | 1. prøveuttak | | 2. prøveuttak | | 3. prøveuttak | | 4. prøveuttak | |
| | | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct |
| Vann | 0 m | - | | 1 l | ND | 7 l | 26 | 3,5 l | ND |
| | 5 m | - | | 1 l | ND | 4.5 l | 22 | 3,5 l | ND |
| | 15 m | - | | 1 l | ND | 3.5 l | 24.4 | 3,5 l | ND |
| | Pore-størrelse | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct | Mengde filtrert | Ct |
| Plankton | 20 µm | - | | - | | 44 000 l | 19 - 20.7 | 44 000 l | ND |
| | 100 µm | 62 800 l | ND | 62 800 l | ND | 62 800 l | 25.7 - 31.6 | 62 800 l | ND |
| | Dybde | +/no | Ct | | | +/no | Ct | +/no | Ct |
| Biofilm | 0 - 0.1 m | 0/24 | ND | - | | 4/26 | 26.2 - 34.8 | 0/18 | ND |
| | | Dybde | Ct | Dybde | Ct | Dybde | Ct | Dybde | Ct |
| Sediment | | 50 m | ND | 15 m | ND | 120 m | ND | 120 m | ND |

3.5 Sekvensering

Alle prøver som var PCR-positive for *P. perurans* ble 18S rRNA sekvensert. Sekvenseringsresultatet viste at det bare var de PCR-positive prøvene som hadde hatt Ct-verdi <19 som gav treff for amøben ved BLAST-søk. De PCR-positive prøvene med så lave Ct-verdier var laks, paddetorsk, rognkjeks og grønngylt. 18S sekvensene fra disse var like (data ikke vist), noe som betyr at genmaterialet fra amøben var identisk hos de ulike artene. De PCR-positive prøvene med høyere Ct-verdi fikk treff på eget 18S gen.

3.6 Amøbe og affinitet for fettfilm

Gjeller og fettvev fra seks døde fisker fra anlegg med AGD ble fordelt i tre grupper. Gjellevevet fra alle fiskene var positive for *P. perurans*. Etter ett døgn inkubasjon ble fettavsivet på toppen av vannsøylen og vann analysert. Hverken fettavsivet eller vannet var positive for *P. perurans* (Tabell 3.4). Siden *P. perurans* ikke ble detektert ble ikke prøvene som var tatt av etter tre døgn analysert.

Tabell 3.4 Påvisning av *P. perurans* ved PCR i laksegjeller, vann- og fettprøver fra fettaffinitetsforsøket i laboratorium. Ct-verdier for *P. perurans* fra hver av de seks fiskene i gjelleprøvene er oppgitt. Etter ett døgn inkubasjon ble fett fra toppen av vannsøylen og vann undersøkt ved Real-Time RT-PCR.

| | Ct-verdier <i>P. perurans</i> gjeller | Gruppe | °C | Prøve-material | Ct-verdier <i>P. perurans</i> |
|--------|---------------------------------------|--------|----|----------------|-------------------------------|
| Fisk 1 | 23,8 | 1 | 5 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |
| Fisk 2 | 22,2 | | 12 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |
| Fisk 3 | 26,3 | 2 | 5 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |
| Fisk 4 | 26,7 | | 12 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |
| Fisk 5 | 20,1 | 3 | 5 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |
| Fisk 6 | 24,3 | | 12 | Fett | ND |
| | | | | Vann | ND |

3.7 Makrell

Makrell fra Sykkylvsfjorden uten oppdrettsaktivitet og utenfor et anlegg på Sunnmørskysten ble fisket og gjelleprøver ble fiksert og analysert. Av de 35 prøvene fra hvert sted, var det en *P. perurans* PCR-positiv makrell. Denne makrellen var av de som ble fisket i Sykkylvsfjorden uten oppdrett og Ct-verdien var på 29,4.

4 DISKUSJON

Fokus i prosjektet har vært på å identifisere *P. perurans* uavhengig av infeksjonsstatus hos laks. Mer enn 1200 prøver har blitt samlet inn på eller ved anlegg med AGD eller AGD historikk og analysert for tilstedeværelse av *P. perurans* ved PCR. Flere begroingsarter og fisk ble funnet PCR-positive for *P. perurans* på anlegg med AGD utbrudd, men ikke etter at laksen var negativ. Det var bare hos renseskjell (her: berggyllt og rognkjeks) at amøben ble påvist når laksen var PCR-negativ. Sjøvann og mobile organismer som var PCR-positive kan spille en rolle i introduksjon og transmisjon mellom nærliggende anlegg under AGD utbrudd.

De *P. perurans*-positive begroingsorganismene filtrerte vann eller spiste partikler. De var positive når det var høy amøbekonsentrasjon i vannet. Ingen var positive når vannprøvene var negative og når det ikke var utbrudd av AGD på laksen i anlegget. Disse begroingsorganismene er dermed trolig ikke langtidsreservoarer der amøben kan oppholde seg over en lengre periode og på denne måten infisere nye individer etter brakklegging. Rolin *et al.* (2016) fant reduksjon i antall amøber i eksperimentelt forsøk med blåskjell og foreslo at skjellene beitet på amøben. I vår studie ble ikke alle vannfiltrerende individ av samme art funnet PCR-positive (Tabell 3.1). Det er mulig at de PCR-negative individene har fordøyd og destruert arvestoffet til amøben.

Gjelleprøver fra sei og bergnebb var også positive bare når det var høyt smittepress i vannet. Disse artene hadde ikke noen kliniske tegn på AGD og hadde Ct-verdier fra 22 til 35. Vannprøvene hadde Ct-verdi fra 22 til 26. Det er derfor sannsynlig at analysen kan bli positiv på grunn av at store mengder sjøvann med amøbe føres over gjellelamellene og at amøbene akkumuleres her. Utenfor oppdrettsanlegg finnes det sei i store mengder og de migrerer mellom oppdrettsanlegg (Uglem *et al.*, 2009). Sei kan derfor være passive bærere og bidra til smitteoverføring mellom anlegg når infeksjonspresset er høyt. Bergnebb blir, som flere andre renseskjell, fanget i perioden juni til oktober og satt ut i merd for å få bukt med lakselus. De kan dermed bidra med smittespredning hvis de er bærere av infektive amøber.

Gjelleprøvene fra paddetorsk og grønnngylt hadde Ct-verdier på henholdsvis 16 og 15. Dette var mye lavere enn de andre positive prøvene i denne studien (med unntak av laks (Ct-verdi fra 11 til 23)). Paddetorsk er vanlig bifangst under fangst av leppefisk (Havforskningsinstituttet, 2014). Begge artene er stasjonære, rent marine og unngår de laveste temperaturene om vinteren. De kan derfor være potensielle verter for amøben om vinteren. De lave Ct-verdiene kan indikere at disse artene kan spille en rolle i introduksjon av amøben.

En makrell av trettifem undersøkte ble funnet positiv for amøben med Ct-verdi på 29,4. Makrellen ble fanget i fjordarm uten oppdrettsaktivitet, og de nærmeste anleggene i nærliggende fjord var negative for amøben på tidspunktet. Det ble også undersøkt 35 makrell utenfor anlegg med AGD, ingen av disse ble funnet PCR-positive. Store mengder makrell går inn i fjordene på sensommer/høst, og dersom makrellen er bærer av amøben kan de spille en rolle i introduksjon av amøbe. Makrellen kan være en nyttig vektor siden den trives best i temperaturer over 6-7°C. De siste 7 årene har makrellens utbredelsesområde ekspandert og Norge har i dag en stor makrellbestand og utbredelse. Den aller sterkeste årsklassen for nordøstatlantisk makrell var i 2006, som også var det første året *P. perurans* ble oppdaget i Norge.

To ganger i dette studiet har renseskjell i merd vært PCR-positiv når laks på anlegg var negativ. Laksen hadde vært positiv før vinteren, men ble negativ ved lave sjøtemperaturer. I det ene tilfellet (i forkant av første prøveuttak) var det berggyllt og i det andre tilfellet (siste prøveuttak) rognkjeks. Det var også en villfanget berggyllt på tredje prøveuttak som var PCR-positiv og som også hadde kliniske tegn forenelig med AGD. Det har tidligere vært vist at både berggyllt og rognkjeks kan utvikle AGD (Karlsbakk *et al.*, 2013; Oldham *et al.*, 2016). Disse artene er mye brukt til kontroll av lakselus. Muligheten for at positiv renseskjell i merd kan reinfisere laks på anlegg, eller bidra til spredning av amøben dersom renseskjell blir gjenbrukt, bør undersøkes nærmere. Paddetorsk, grønngyllt, berggyllt, rognkjeks, bergnebb er alle aktuelle som reservoar for amøben. Det bør derfor gjøres et større studium på flere av artene for å konstatere om amøben kan overføres til laks. Først da er det mulig å identifisere hvilken rolle disse artene spiller i spredning av AGD.

Prøver av plankton og vann fra ulike dybder var PCR-positive når laksen i oppdrettsanlegget hadde AGD-utbrudd. Disse resultatene sier noe om risikoen for horisontal smittespredning av amøber mellom anlegg med vannstrømmen. Mikroorganismer som gir sykdom i norsk oppdrett er primært overført til naive populasjoner med vannkontakt, spesielt i perioder med høyt infeksjonspress (Stene *et al.*, 2014). I dag starter de fleste lakseoppdrettere behandling mot AGD basert på gjellescore etter Taylor *et al.* (2009). Derfor blir behandling først iverksatt når laksen allerede har hatt mulighet til å spre amøben i vannmassene.

I henhold til Wright *et al.* (2015) så oppholder amøben seg i de øvre vannmasser i anlegg. I vårt studium ble vann fra 0m, 5m og 15m dyp analysert, og amøben ble påvist på alle dybdene under AGD-utbrudd. Fettet som lekker fra dødfisk og som legger seg som en fettfilm på vannoverflaten kan inneholde patogene laksevirus (Stene *et al.*, 2016). Det var ikke hold for at amøben søkte mot eller fantes i fetthinnen, og det var mer amøbe på 5 og 15m dyp enn ved overflaten. Et studium for å se på fordeling av *P. perurans* i vannsøylen samt spredningspotensial fra anlegg under AGD-utbrudd vil kunne gi mer kunnskap om dette.

En utfordring i dette studiet har vært mangfoldet av organismer og at mange av prøvene har vært negative. Det er mulig at sensitiviteten på analysen for noen prøver har vært lavere enn forventet på grunn av f.eks. PCR inhibitorer. Hemming av PCR kan omgås på flere måter (Bessetti, 2007). Rensemestoden for nukleinsyrer, valg av polymerase og additiver skulle helst vært optimalisert for alle prøvene. I dette studiet var det ikke praktisk mulig å optimalisere metoden for hver art og vevstype, men vi hadde innledende testrunder der vi vurderte ulike rensesmetoder. Videre har vi brukt velkjente kommersielle kit med effektive all-round polymeraser. Vi spiket (inkluderte en endogen positiv kontroll for å kunne oppdage PCR hemming) men på grunn av varierende resultat (f.eks. negativ PCR på spiking men positiv PCR på amøbe) så vi bort fra resultatene av spikingen og verifiserte heller tilstedeværelse av nukleinsyrer. Prøvestørrelse og valg av vev kan også ha påvirket resultatet. Til tross for utfordringene fikk vi positive prøver, noe som indikerer at deteksjonsmetoden fungerte godt.

Patogene laksevirus er blitt funnet i fett på overflate som lekker fra dødfisk (Stene *et al.*, 2016). Det ble derfor undersøkt hvorvidt *P. perurans* hadde affinitet for fetthinne på overflaten i et laboratorieforsøk. Noen affinitet for fett for amøben ble ikke funnet siden amøben ikke ble påvist i fettavsvivet. Gjelleprøvene fra laks viste at amøbe var tilstede, men snitt av Ct-verdiene var på 23,9, noe som betyr at det ikke var veldig mye amøbe på gjellene. Det ble heller ikke påvist amøbe i vannet. Vannkvaliteten i begerglassene var trolig suboptimal for *P. perurans*, som trives på laksegjeller med god vanngjennomstrømming.

5 KONKLUSJON

Våre resultater indikerer at begroingsorganismer ikke er et langtidsreservoar for *P. perurans*. Sjøvann og plankton kan transportere amøben vekk fra et anlegg og bidra til smittespredning i nærområdet. Noen villfisk er svært mobile (sei og makrell) og kan dermed bidra til transport av amøber mellom anlegg og introduksjon av amøben. Resultatene indikerer at noen stasjonære fiskearter, inkludert arter som benyttes som rensefisk, kan ha betydning for introduksjon av amøben og reinfisering av oppdrettslaks. Noen marine fiskearter, både rensefisk og villfisk, trenger videre undersøkelser for å finne ut om, og i så fall hvordan, de bidrar i spredning av AGD. Da prosjektet startet opp var det ikke påvisning av amøbe på laks ved real-time RT-PCR om vinteren. De to siste årene har PatoGen hatt påvisning av amøben på laks gjennom hele året i enkelte deler av landet. Likevel har ikke de to siste årene vært preget av flere AGD-utbrudd. Dette kan ha sammenheng med salinitet- og temperaturforhold. Det er flere reservoar i dag for amøben, i og med at laksen selv også er blitt et reservoar. I videre arbeid bør man se nærmere på hvilke faktorer det er som trigger et AGD-utbrudd.

6 LEVERANSER

| Dato | Leveranse | Tittel |
|------------|--|---|
| 25.08.2014 | Referat fra oppstartsmøte med styringsgruppa | |
| 26.09.2014 | Statusoppdatering til styringsgruppa | |
| 22.10.2014 | Stautsrapport til FHF | |
| 24.10.2014 | Statusoppdatering til styringsgruppa | |
| 24.10.2014 | Pressemelding Intrafish | Hvor er amøben som gir AGD? |
| 25.10.2014 | Pressemelding Kyst | Hvor er AGD-amøben? |
| 25.10.2014 | Pressemelding Møreforskning | Hvor er AGD-amøben? |
| 27.10.2014 | Presentasjon FHF's fiskehelsesamling (Trondheim) | Hvor er amøben? Undersøkelse av reservoar for amøben <i>Paramoeba perurans</i> |
| 19.11.2014 | Statusoppdatering til styringsgruppa | |
| 31.12.2014 | Stautsrapport til FHF | |
| 23.06.2015 | Presentasjon FHF-dialogmøte AGD (Bergen) | Hvor er amøben? Undersøkelse av reservoar for amøben <i>Paramoeba perurans</i> |
| 25.06.2015 | Referat fra møte med styringsgruppa | |
| 03.09.2015 | Presentasjon FHF's fiskehelsesamling (Bergen) | Hvor er amøben? Undersøkelse av reservoar for amøben <i>Paramoeba perurans</i> |
| 03.09.2015 | Avisomtale Intrafish | Kort effekt av hydrogenperoksid |
| 04.09.2015 | Avisomtale Kyst | Hvor er amøben på våren? |
| 31.12.2015 | Statusrapport til FHF | |
| 14.06.2016 | Statusoppdatering til styringsgruppa | |
| 23.06.2016 | Presentasjon FHF-dialogmøte AGD (Trondheim) | Hvor er amøben? Undersøkelse av reservoar for amøben <i>Paramoeba perurans</i> |
| 12.07.2016 | Vitenskapeligartikkel i Journal of Fish Diseases | PCR survey for <i>Paramoeba perurans</i> in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.) |
| 25.10.2016 | Referat fra styringsgruppa | |
| 15.11.2016 | Sluttrapport til FHF | |

7 REFERANSER

- Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P.A., Dashkevicz, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M.C. & Danforth, H.D. (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of parasitology*, 262-271.
- Bessetti, J. (2007) An introduction to PCR inhibitors. *Journal of Microbiological Methods*, **28**, 159-167.
- Bustos, P.A., Young, N.D., Rozas, M.A., Bohle, H.M., Ildefonso, R.S., Morrison, R.N. & Nowak, B.F. (2011) Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile. *Aquaculture*, **310**, 281-288.
- Clark, A. & Nowak, B.F. (1999) Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *Journal of Fish Diseases*, **22**, 433-443.
- Crosbie, P., Macleod, C., Forbes, S. & Nowak, B. (2005) Distribution of *Neoparamoeba* sp. in sediments around marine finfish farming sites in Tasmania. *Diseases of aquatic organisms*, **67**, 61.
- Crosbie, P., Nowak, B. & Carson, J. (2003) Isolation of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 from marine and estuarine sediments in Tasmania. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **23**, 241-244.
- Crosbie, P.B.B., Bridle, A.R., Cadoret, K. & Nowak, B.F. (2012) In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in Atlantic salmon and fulfils Koch's postulates. *International Journal for Parasitology*, **42**, 511-515.
- Crosbie, P.B.B., Ogawa, K., Nakano, D. & Nowak, B.F. (2010) Amoebic gill disease in hatchery-reared ayu, *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel), in Japan is caused by *Neoparamoeba perurans*. *Journal of Fish Diseases*, **33**, 455-458.
- Douglas-Helders, G., Tan, C., Carson, J. & Nowak, B. (2003) Effects of copper-based antifouling treatment on the presence of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 on nets and gills of reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **221**, 13-22.
- Dyková, I., Figueras, A. & Peric, Z. (2000) *Neoparamoeba* Page, 1987: light and electron microscopic observations on six strains of different origin. *Diseases of aquatic organisms*, **43**, 217-223.
- Dykova, I., Nowak, B., Crosbie, P., Fiala, I., Peckova, H., Adams, M., Macháčková, B. & Dvořáková, H. (2005) *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains. *Journal of Fish Diseases*, **28**, 49-64.
- Feehan, C.J., Johnson-Mackinnon, J., Scheibling, R.E., Lauzon-Guay, J.-S. & Simpson, A. (2013) Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Diseases of aquatic organisms*, **103**, 209-227.
- Havforskningsinstituttet (2014) Bestander og fangstkvalitet av leppefisk *Rapport fra Havforskningen* **3**, 14-16.
- Hellebø, A., Stene, A. & Aspehaug, V. (2016) PCR survey for *Paramoeba perurans* in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, published online, doi:10.1111/jfd.12546.
- Karlsbakk, E., Olsen, A.B., Einen, A.-C.B., Mo, T.A., Fiksdal, I.U., Aase, H., Kalgraff, C., Skår, S.-Å. & Hansen, H. (2013) Amoebic gill disease due to *Paramoeba perurans* in ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture*, **412**, 41-44.

- Kent, M.L., Sawyer, T.K. & Hedrick, R.P. (1988) *Paramoeba pemaquidensis* (Sarcomastigophora: Paramoebidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Diseases of aquatic organisms*, **5**, 163-169.
- Kim, H.J., Cho, J.B., Lee, M.K., Do Huh, M. & Kim, K.H. (2005) *Neoparamoeba* sp. infection on gills of olive flounder (*Par-*alichthys olivaceus*) in Korea. *Journal of Fish Pathology*, **18**, 125-131.*
- Mouton, A., Crosbie, P., Cadoret, K. & Nowak, B. (2014) First record of amoebic gill disease caused by *Neoparamoeba perurans* in South Africa. *Journal of Fish Diseases*, **37**, 407-409.
- Munday, B., Foster, C., Roubal, F., Lester, R., Perkins, F. & Cheng, T. (1990) Paramoebic gill infection and associated pathology of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Salmo gairdneri* in Tasmania. In: *Pathology in marine science* (ed. by F.O. Perkins & T.C. Cheng), pp. 215-222. Academic Press Inc., San Diego, California.
- Munday, B., Zilberg, D. & Findlay, V. (2001) Gill disease of marine fish caused by infection with *Neoparamoeba pemaquidensis*. *Journal of Fish Diseases*, **24**, 497-507.
- Nowak, B., Bryan, J. & Jones, S. (2010) Do salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis*, have a role in the epidemiology of amoebic gill disease caused by *Neoparamoeba perurans*? *Journal of Fish Diseases*, **33**, 683-687.
- Nowak, B.F. (2012) *Neoparamoeba perurans*. In: *Fish parasites: pathobiology and protection* (ed. by P.T. Woo & K. Buchmann), pp. 1-18. CAB International, London.
- Oldham, T., Rodger, H. & Nowak, B.F. (2016) Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD)—An epidemiological review. *Aquaculture*, **457**, 35-42.
- Palmer, R., Carson, J., Ruttledge, M., Drinan, E. & Wagner, T. (1997) Gill disease associated with *Paramoeba*, in sea reared Atlantic salmon in Ireland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **17**, 112-114.
- Rodger, H. (2014) Amoebic gill disease (AGD) in farmed salmon (*Salmo salar*) in Europe. *Fish Veterinary Journal*, **14**, 16-26.
- Rodger, H. & Mcardle, J. (1996) An outbreak of amoebic gill disease in Ireland. *Veterinary record*, **139**, 348-349.
- Rolin, C., Graham, J., Mccarthy, U., Martin, S.a.M. & Matejusova, I. (2016) Interactions between *Paramoeba perurans*, the causative agent of amoebic gill disease, and the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, **456**, 1-8.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Ronneberg, L.B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., Nygard, S.M., Olsen, A.B. & Dale, O.B. (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of Fish Diseases*, **31**, 205-214.
- Stene, A., Hellebø, A., Viljugrein, H., Solevåg, S.E., Devold, M. & Aspehaug, V. (2016) Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *Journal of Fish Diseases*, **39**, 531-537.
- Stene, A., Viljugrein, H., Yndestad, H., Tavornpanich, S. & Skjerve, E. (2014) Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *Journal of Fish Diseases*, **37**, 123-134.
- Tan, C.K.F., Nowak, B.F. & Hodson, S.L. (2002) Biofouling as a reservoir of *Neoparamoeba pemaquidensis* (Page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, **210**, 49-58.
- Taylor, R.S., Muller, W.J., Cook, M.T., Kube, P.D. & Elliott, N.G. (2009) Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture*, **290**, 1-8.

- Uglem, I., Dempster, T., Bjorn, P. & Sanchez-Jerez, P. (2009) High connectivity of salmon farms revealed by aggregation, residence and repeated migrations of wild saithe (*Pollachius virens*) among farms. *Marine Ecology Progress Series*, **384**, 251-260.
- Wong, F.Y., Carson, J. & Elliott, N.G. (2004) 18S ribosomal DNA-based PCR identification of *Neoparamoeba pemaquidensis*, the agent of amoebic gill disease in sea-farmed salmonids. *Diseases of aquatic organisms*, **60**, 65-76.
- Wright, D.W., Nowak, B., Oppedal, F., Bridle, A. & Dempster, T. (2015) Depth distribution of the amoebic gill disease agent, *Neoparamoeba perurans*, in salmon sea-cages. *Aquaculture Environment Interactions*, **7**, 67-74.
- Young, N., Crosbie, P., Adams, M., Nowak, B. & Morrison, R. (2007) *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal for Parasitology*, **37**, 1469-1481.
- Young, N.D., Dyková, I., Snekvik, K., Nowak, B.F. & Morrison, R.N. (2008) *Neoparamoeba perurans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease. *Diseases of aquatic organisms*, **78**, 217-223.

the same time, the fact that the two countries have similar political systems and similar political culture may have contributed to the similar results.

It is interesting to note that the results of the present study are similar to those of the study by Wong and Chan (2001) on the political participation of Hong Kong citizens.

There are some limitations to the present study. First, the sample size is small and the response rate is low.

Second, the study is cross-sectional and does not allow for the examination of causal relationships.

Third, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Fourth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Fifth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Sixth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Seventh, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Eighth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Ninth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Tenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Eleventh, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twelfth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Thirteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Fourteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Fifteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Sixteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Seventeenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Eighteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Nineteenth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twentieth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twenty-first, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twenty-second, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twenty-third, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twenty-fourth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.

Twenty-fifth, the study is limited to the political participation of Hong Kong citizens and does not include other forms of political participation.



MØREFORSKING

MØREFORSKING AS
Postboks 5075
NO-6021 Ålesund
TEL +47 70 11 16 00
epost@mfaa.no
www.moreforsk.no
NO 991 436 502