

Smitteforsøk med *Saprolegnia parasitica*, *Aeromonas sobria* og *A. piscicola* ga kliniske forandringer forenlige med Red Skin Disease hos kjønnsmoden Atlantisk laks *Salmo salar* L.

Linda Andersen¹, Erwan Lagadec², Sanna Wiik Brekke², Christiane Trösse², Lindsey Moore², Heidrun Nylund², Lars-Kristian Selbekk³, Bjørnar Strøm Hågensen⁴, Are Nylund²

Firma:

- 1; Stiftelsen Industrilaboratoriet (ILAB),
- 2; Institutt for Biovitenskap, Universitetet i Bergen
- 3; Haldenvassdraget vannområde
- 4; Halden kommune

Sammendrag

Red Skin Disease (RSD) er en ny sykdom som har rammet villaks i elver i Nord-Europa siden 2014. Siden 2019 er sykdommen også påvist i Norge, hovedsakelig i Enningdalselven i Halden kommune i Østfold. Sykdommen kjennetegnes av alvorlige blødninger og ulcerøse, ofte ringformede hudlesjoner i laksens bukrområde. Til tross for den raske spredningen med påvisning av sykdommen i nye land, har en sykdomsårsak for RSD så langt ikke vært mulig å identifisere, og det haster derfor med tiltak for å beskytte villaksbestander. I et tidligere smitteforsøk med *Aeromonas sobria* og *A. piscicola* så man ingen utvikling av RSD hos smolt. I mange tilfeller kan man finne den parasittiske soppen *Saprolegnia parasitica* hos villfanget fisk med RSD. I forsøket beskrevet i denne rapporten undersøker man om en ko-infeksjon av *Aeromonas*-bakterier og *S. parasitica* kan gi RSD. Fjorten laks (1.5-3 kg), hovedsakelig kjønnsmodne hannfisk, ble overført til 16 grader ferskvann og smittet med *S. parasitica* etter håndtering. En uke senere ble fiskene utsatt for en miks av *Aeromonas sobria* og *A. piscicola* via badeksponering. Fiskene

ble så holdt videre i 2 uker til, dvs. 3 uker etter soppsmitte. Dette ble gjort for å undersøke om fiskene utviklet RSD og underveis ble det foretatt undersøkelser av fiskegruppen, tatt ut ulike organprøver, sopp- og bakterieprøver og vannprøver. Fiskene utviklet alvorlig saprolegniose hvorav flere hadde et sykdomsbilde forenlig med RSD med sår og blødninger/lesjoner på buk, også noen ringformede. Det var dermed mulig å framkalle et RSD-liknende sykdomsbilde under disse eksperimentelle betingelsene, og bakterier og sopp kunne reisoleres fra de aller fleste individene, også systemisk. I dette forsøket fikk man lesjoner som er svært likt det man kan se ved et RSD-sykdomsbilde og det er derfor trolig at *S. parasitica* spiller en viktigere rolle i utvikling av RSD enn tidligere antatt. Videre forskning på RSD bør inkludere *S. parasitica* og virulens (evne til å framkalle sykdom), samt kartlegging av betydningen av temperatur, vannføring, og andre miljøforhold i vassdragene.

Formål med forsøket

Undersøke om en ko-infeksjon av *Aeromonas*-bakterier (*Aeromonas sobria* og *A. piscicola*) og den parasittiske soppen *Saprolegnia parasitica* kan gi Red Skin



Foto: Villfanget laks med RSD. Kilde: Bjarne Granli

Disease når man bruker kjønnsmoden stor laks som forsøksgruppe.

Bakgrunn

Red Skin Disease (RSD) er en ny sykdom som har rammet villaks i elver i Nord-Europa siden 2014, og som i senere år (siden 2019) også er påvist i Norge. Sykdommen kjennetegnes av alvorlige blødninger og ulcerøse, ofte ringformede hudlesjoner i bukområdet, ofte assosiert med soppinfeksjoner. Fiskene med RSD er vist å være både førstegangs- og flergangsgytere og individer med RSD er observert å framstå som apatiske/letargiske og tydelig svekkede. Rapporter om laks med hudlesjoner i bukområdet som ligner de som er assosiert med RSD er også dokumentert fra elver i flere nordeuropeiske land, hovedsakelig rundt Østersjøen (ICES, 2018; Weichert et al., 2020). I Norge har sykdommen gjentatte ganger blitt registrert i Enningdalselven i Halden kommune. Den raske økningen i meldinger om syk laks førte i 2019 til forslaget om et nytt sykdomsbegrep, «Red Skin Disease»,

under en workshop arrangert av Norsk institutt for naturforskning (NINA) (ICES, 2020). Til tross for den raske spredningen av sykdomstilstanden til nye land, inkludert Danmark, Irland og Storbritannia, har en sykdomsårsak for RSD så langt ikke vært mulig å identifisere. Den raske spredningen av denne sykdomstilstanden og det uavklarte årsaksforholdet gjør at det haster med tiltak for å beskytte atlantiske villaksbestander.

En studie utført ved Fiskesykdomsgruppen ved Universitetet i Bergen undersøkte om tilstedeværelse av ulike fiskepatogener, assosiert med sykdommen hos villaks, kunne være årsak til RSD i 2019-2021 (Lagadec et al. 2023). Bakterier fra sår og indre organer ble dyrket på ulike medier og de dominerende bakteriellstammene ble karakterisert morfologisk og genetisk. Resultatene viste at flere bakteriellstammer som tilhører slekten *Aeromonas* var assosiert med RSD. Fylogenetiske analyser viste videre at den syke laksen var infisert med minst to

ulike arter av *Aeromonas* (*A. piscicola* og *A. sobria*) (Lagadec et al. 2023).

For å avgjøre om disse *Aeromonas*-bakterieisolatene kunne være årsak til RSD ble det høsten 2024 gjennomført et smitteforsøk med disse bakteriene og smolt av atlantisk laks. Smitteforsøket ble gjennomført ved Stiftelsen Industrilaboratoriet (ILAB) i Bergen i samarbeid med Universitetet i Bergen v/ Are Nylund og Erwan Lagadec. En masterstudent i Fiskehelse ble også tilknyttet smitteforsøket (Wiik Brekke 2025). RSD kunne ikke ses som følge av smitteforsøket med smolt og *Aeromonas*-bakteriene, og man kunne konkludere med at disse bakteriene alene ikke kunne framkalle sykdommen hos smolt, selv med brudd i hudbarrieren fra lakselusssmitte. Det ble da foreslått at man burde gjennomføre forsøk med større laks, gjerne kjønnsmoden laks og en ko-infeksjonssmitte. Dette fordi det er funnet flere andre agens assosiert med RSD. I dette forsøket undersøker man dette, om den parasittiske soppen *Saprolegnia parasitica* kan gi RSD om

Red skin disease

Vitenskapet

den kombineres med *Aeromonas*-bakteriene.

Material og metode

Dyrevelferd

Smitteforsøket ble gjennomført ved ILABs fasiliteter i Bergen. Dyreforsøket er godkjent av Mattilsynet under FOTS ID 31413 med høy belastningsgrad, som stiller strenge krav til hyppig oppfølging underveis og oppfølging av dyrene iht. dyrevelferd og humane endepunkt. Det er også krav om at forsøket skal etterevalueres slik at informasjon kan gis tilbake til Mattilsynet.

Bakgrunn for valgt forsøksoppsett

Atlantisk laks benyttet i forsøket er laks produsert for forsøksformål ved ILAB i Bergen. Alle fiskebatcher er testet for fravær av utvalgte sykdomsorganismer. Det er vanskelig å framskaffe forsøksdyr i rettstørrelsedadettarlangtidåprodusere slike individer. Det var videre ønskelig å inkludere kjønnsmodne individer da disse antas å være immunologisk svekkede og dermed kunne medføre økt sjanse for sykdom. Da det vil ta for lang tid å produsere kjønnsmodne hunner, ble forsøket gjennomført hovedsakelig med hanner og et begrenset antall dyr og uten flere grupper. Atlantisk laks (1.5-3 kg), hovedsakelig kjønnsmodne hanner, ble benyttet i forsøket (Figur 1). Fiskene gikk på naturlig sjøvann og 9 grader. Fjorten individer ble bedøvet med AQUI-S og Finquel Vet og sortert inn på 11 grader ferskvann i november 2025 i et 2500L kar i ILABs sykdomsfasilitet. Fiskene ble akklimatisert til 16 grader den første uken. Før ble tilbakeholdt fra fiskene 24 t før overføring til dette nye karet for å redusere håndteringsstress for fisken. Vanntemperatur gjennom forsøket var 16 grader. Forsøket ble gjennomført i ferskvann og lysregimet var 24 t lys.

For å forsøke å gjenskape RSD i forsøket skulle kjønnsmoden laks gis den parasittiske soppen *S. parasitica* samt en kombinasjon av *A. sobria* og *A. piscicola* som i forsøket i 2024. Fiskene ble badsmittet med *S. parasitica* (1 time



Figur 1. Eksempel på kjønnsmoden laks som ble benyttet i forsøket. Alle fisker ble undersøkt før innsett i forsøket.

badsmitte i 1200 L samt 6 dager med soppeksposering). Fiskene ble håvnet fra et kar til et annet før soppsmitten (max 1 minutt i håv) for å forstyrre / skape brudd i mukuslaget til fisken. Syv dager senere ble fiskene badeksponert i en time med en kombinasjon av flere isolater av *A. sobria* og *A. piscicola* etter at vannstanden var senket til 1200 L. Fiskene ble undersøkt visuelt for RSD før bakterieeksponeringen ettersom uttak av en fisk med sår dagen før bakterieeksponeringen viste at den allerede hadde kliniske tegn som samsvarte med RSD. Sykdomsutvikling ble overvåket ytterligere 2 uker og det ble tatt en rekke undersøkelser underveis med uttak av bakterie- og sopp-prøver og vevsprøver fra ulike organer for videre analyser.

Oppdyrking av *Saprolegnia parasitica* for smitte

En villørret fra Gaula elven (Sokna) med saprolegniose ble sendt til Fiskesykdomsgruppen ved Universitetet i Bergen 11. oktober (Figur 2A). Sopp fra fisken ble dyrket på glukose gjær agar (GYA) med 50 µg/ml Gentamicin (et antibiotikum) (Figur 2B). Soppen ble karakterisert og identifisert vha 18S og ITS regionen i ribosomalt RNA. Soppen ble passert to ganger på ny GYA. For smitte ble sopp podet på GYA sammen med dobbelautoklaverte hampfrø og inkubert ved 24 grader i 5 dager iht. beskrivelse av Apostolakis et al.

2021 (Figur 2C). Dagen før smitte ble soppmateriale (mycel med hampfrø) samlet i en gjennomhullet/fenestret pose. Posen ble plassert i 1200 L for smitte av fisk i 1 time og deretter plassert i karet med vanngjennomstrømning i 6 dager. Smittemetoden for sopp er basert på Misk et al. 2022 og Apostolakis et al. 2021. Soppmaterialet ble fjernet etter 6 dager.

Test av smittemateriale (inokulum) i forkant av oppdyrking av bakterier

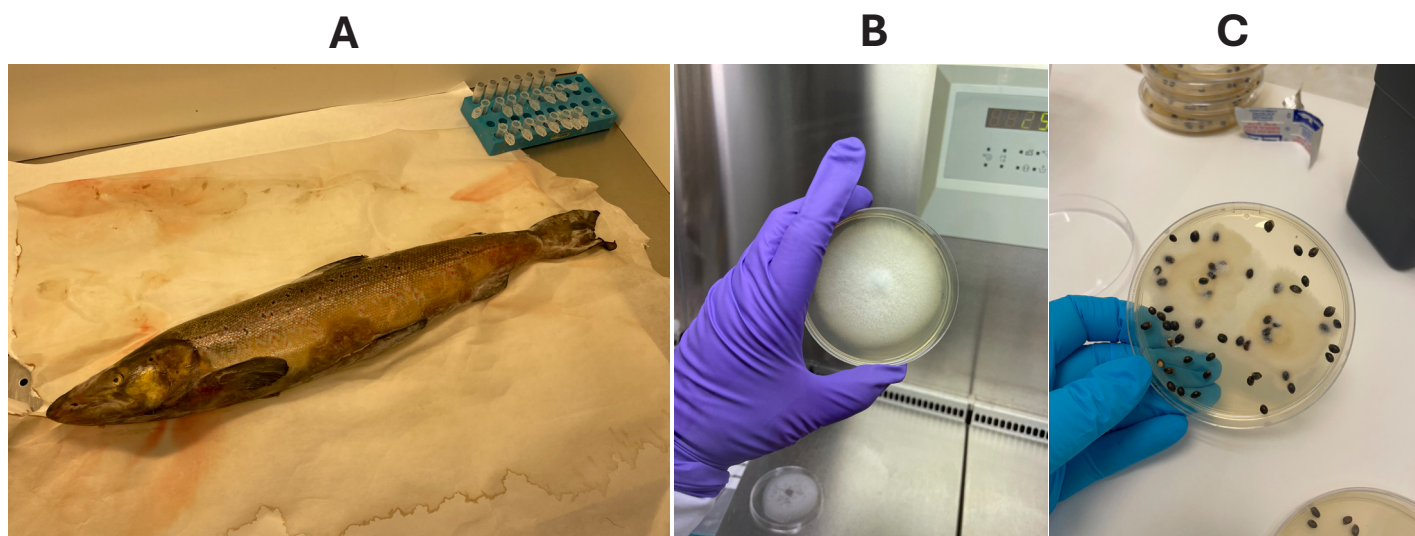
For å lage en homogen bakteriekultur, ble seks bakterielle inokula fremstilt og fordelt/utporsjonert på rør. Tre *A. sobria*-isolater og tre *A. piscicola*-isolater (isolert under studiet til Lagadec et al. 2023 og på senere tidspunkt) ble først dyrket på Tryptic Soy Agar (TSA) fra en cryopreservert stamkultur, inkubert ved 16 °C i to dager og deretter subkultivert for å få enkeltkolonier. Én koloni fra hvert isolat ble deretter dyrket over natten ved 16 °C i en risteinkubator i 15 mL Tryptic Soy Broth (TSB). Til slutt ble 12 ampuller, hver inneholdende 1,6 mL av hver bakteriekultur, lagret i flytende nitrogen i et konserveringsmedium (TSB + 15 % glyserol). Denne bakteriesuspensjonen ble senere brukt til å vurdere bakterienes vekstdynamikk (for pre-eksperimentell justering), samt for å oppdyrke isolatene til smitteforsøket.

Forberedelse av bakteriekulturer for badsmitte

Tre isolater av *A. piscicola* og tre isolater av *A. sobria* ble brukt i smitteforsøket. Noen av isolatene var fra fisk med RSD innhentet tidligere fra Enningdalselven i 2019 (19N_1_strain1 (*A. sobria*), 19N_1_strain2 (*A. piscicola*) og 19N_1_strain3 (*A. piscicola*), mens noen av *Aeromonas*-isolatene var fra Gaula i 2025 (25N_1_strain1 (*A. sobria*), 25N_1_strain2 (*A. piscicola*), 25N_1_strain4 (*A. sobria*). For hvert bakterieisolat ble fem inokulum-ampuller tint og overført til fem separate 2 liters Erlenmeyer-kolber med henholdsvis 1 liter TSB. Etter ca. 21 timer ble 5 mL fjernet fra hver kolbe og slått sammen (25 mL) for å kvantifisere mengden av hvert isolat brukt i smitten. Antall bakterieceller ble estimert ved hjelp av utplating på agarskåler (kolonier telles etter utstryk av seriefortynnede kulturer på agarskåler).

Smitte med *Aeromonas*-bakterier

Vannstanden ble senket til 1200 L i fiskekaret og bakterier tilsatt. Fiskene ble holdt i stagnat vann med trykkluft i 30 minutter før man åpnet for ny vanntilførsel inn i karet. Fiskene hadde lufttesteinere med trykkluft i karene under eksponeringen som skapte god vannsirkulasjon i karet. Etter 30 ytterligere



Figur 2. A) Vill sjørret fra Gaula (etter 3 dager på kjøll). B) *S. parasitica* dyrket på GYA-medium C) *S. parasitica* dyrket på hampfrø og GYA for smitteforsøk.

minutter var det normal vannutskiftning i karet (flow var 4000 L per time). Bakteriene som ble tilsatt var en blanding av tre isolater av *A. piscicola* og tre isolater av *A. sobria* (totalkonsentrasjon for disse under badsmitten var 4.41×10^7 levende bakterier per mL). Vannprøver tatt under smitten viste et tilsvarende tall (2.7×10^7 levende bakterier per mL). Fisk ble overvåket kontinuerlig av fiskehelsepersonell under smitte og fisken hadde tilsyn to ganger daglig etter smitte i tillegg til daglig røktig.

Prøvetaking

Bakgrunnsprøver (gjelle, hud, nyre og milt) for qPCR og histologi ble tatt fra tre fisk samme dag som ved overføring til ferskvann for å kunne sikre oversikt over utgangspunktet for fiskegruppen. Det ble også tatt ut blod til serum og histologi fra hjerte, lever og baktarm i tillegg til dyrkning for bakterier og sopp fra gjeller, hud og nyre. Grunnet det lave antallet fisk tilgjengelig for forsøket ble kun ett kjønnsmodent individ (hann) tatt prøver fra samt to andre umodne hunner på ca. 2 kg (kontrollgruppe). Materialet ble lagret ved -20 grader for senere analyser.

Det var planlagt flere uttak og undersøkelser i forsøket, men sykdommen utviklet seg svært raskt og uforutsigbart og man måtte derfor en uke etter smitte begynne å ta ut fisk grunnet dyrevelferdshensyn og ta prøver av disse. Det ble tatt prøver for videre qPCR og histologianalyser, samt dyrkning på agar for sopp og bakterier. Fra dødfisk ble det kun tatt prøver til qPCR og dyrkning.

Ved 0(2), 6(1), 7(1), 9(4), 10(1), 12(2) og 21(1) dager etter soppsmitte ble det tatt ut prøver fra fiskegruppen (antall fisk i parentes). Det døde tre fisk i forsøket (trolig av saprolegniose da de hadde mye sopp), ved dag 9 (S6), 10 (S9) og 12 (S11). Fra alle fisk ble følgende prøver og undersøkelser tatt: vekt, lengde, utseende/ lesjoner/sår (foto) og hud og mucus, blod til serum, gjeller (visuelle skader, swabs, qPCR histologi og dyrkning), hjerte og lever (histologi), nyre (qPCR, histologi og dyrkning for sopp og bakterier), milt (qPCR og histologi). Kjønn hos individet samt evt. organendringer

ble notert. Prøver til qPCR ble plassert på is og histologiprøver på 10% nøytralbufret formalin. Bakterieundersøkelser ble tatt vha. podenål fra hodenyre, hud, sår-rand og gjeller på TSA. Undersøkelser av sopp ble tatt ved at en organbit fra de samme organene som til bakteriedyrkning ble inkubert på GYA med gentamicin. Bakterieskålene ble inkubert ved 16 °C i 48 timer mens GYA med sopp holdt på 24 grader ble holdt minimum 5 døgn for evaluering. Ved bakteriell vekst ble enkeltkolonier viderekultivert på nye agarskåler. Positive prøver vil senere bli sekvensert for å bekrefte hvilket bakterieisolat som var til stede i hvilke fisk. Reisolert sopp ble passert en gang på nye GYA skåler og deretter ekstrahert DNA fra disse ved hjelp av et Blood & Tissue kit fra QIAGEN. Sopp ble cryopreservert etter endt forsøk iht. metode beskrevet av Eszterbauer et al. 2020.

Analyse av vevs- og vannprøver

RNA fra sår, gjeller og nyre ble ekstrahert ved bruk av TRI Reagent® (www.sigmaaldrich.com) iht. produsentens bruksanvisning. Alle RNA-prøver ble undersøkt med qPCR. Assayet som ble benyttet for påvisning av *Aeromonas* er rettet mot 16S-genet til *Aeromonas*-arter, og er et gen som er høyt uttrykt i bakterien og som foreligger i mange kopier, og assayet har derfor høy sensitivitet (Lagadec et al. 2023). Basert på sammenligning av ribosomalt RNA fra *Saprolegnia*-arter (inkludert *S. parasitica*) ble det laget et real-time RT PCR assay rettet mot 18S region til *S. parasitica* (assay: Sp-F: GTC CGG TCG AGT TTA TCT CTG TAC T, Sp-probe: ATGGCC CAA RCA TCC A, Sp-R: AGC GCC CCC TCA CAA AA). RNA fra fisk, sopp, og bakterier ble analysert ved hjelp av et ett-trinns qPCR kit, AgPath-ID™ (www.appliedbiosystems.com) hvor RNA oversettes til cDNA som så amplifiseres i samme rør.

Vev til histologi ble fiksert på bufret formalin (Sarstedt) og sendt til Veterinærinstituttet i Oslo for innstøpning i parafin og videre snitting og hematoksylin- og eosin (HE) farging. Histologisnittene ble så returnert til Bergen og evaluert

ved Universitetet i Bergen for organ- og vevsendringer.

Serum fra fiskene ble undersøkt for en rekke biomarkører (albumin, sink, kolesterol, jern, kalsium, glukose, laktat, urea, ALT, CK, AST og LDH) hos WellFish Tech i Bergen iht. deres prosedyrer.

Resultater:

Kliniske tegn og dødelighet

Seks dager etter *S. parasitica* - smitte var det tydelig at det var saprolegniose i fiskepopulasjonen da flere individer (4 stk.) da hadde synlig sopp-påslag. Et av individene, gitt koden S3, ble tatt ut 6 dager etter soppsmitte av dyrevelferdshensyn grunnet at den hadde et hodesår. Fisken ble derfor avlivet og tatt prøver av. Ved obduksjon av denne kunne det ses at fisken hadde kliniske forandringer forenlige med RSD, med bukblødninger/lesjoner foruten såret på hodet (Figur 3).

Da vi inspiserte alle individene før bakterieeksponering, identifiserte vi et individ (kode S4) med uttalt saprolegniose og svimeradferd. Fisken ble avlivet og ved nærmere undersøkelse ble det synlig for oss at denne hadde kliniske forandringer som samsvarte med RSD på buk med ringformede lesjoner. Soppen kunne ses i fortykkede, brunaktige lag, særlig ved finner, og da særlig også assosiert med brystfinnene (Figur 4).

Lesjoner observert under prøvetaking

Etter smittetidspunktet med bakterier ble det tatt ut følgende individer (dager etter soppsmitte i parentes): 4 stk. S5-S8; 1 død, 3 svimere (9 dpi, 20. november), 1 stk. S9; død (10 dpi, 21. november), 2 stk. S10 og S11; 1 død og en svimer (12 dpi, 22. november). Alle individene unnatt 3 stk. mot slutten av forsøket hadde lesjoner forenlig med saprolegniose, med hvite eller gulbrune fortykkede soppområder/belegg, eller sår/blødninger lokalisert hovedsakelig ved finnebasis/finner. I tillegg til fiskene S3 og S4, som ble tatt prøver av før bakteriesmitte, var det flere av fiskene

som hadde lesjoner forenlige med RSD også etter bakterier var tilsatt, dvs. fisker som hadde et mer atypisk mønster for saprolegniose med blødninger/lesjoner på buk, noen ganger også ringformede eller antydninger til mer dypereliggende lesjoner.

Av andre funn fra obduksjon av fisk så kunne man finne væske i svømmeblære, samt svullen milt hos noen individer. Det ble også funnet gule, nekrotiske områder i gjeller hos ett individ (S5, 9 dpi). En fisk (S10) hadde avvikende svømmeadferd i karet. Ved uttak kunne en se at fisken hadde betent brystfinnebasis med invasiv soppvekst og fortykkede lag av sopp i den ene finnen.

Oppdyrking av bakterier og sopp på agar og molekyllære analyse

Etter to dagers inkubasjon av TSA-skåler på 16 grader ble bakteriekolonier viderekultivert fra bakteriekolonier med morfologiske egenskaper som samsvarte med *Aeromonas*-utseende av bakteriekoloniene. Molekyllære analyser er fortsatt pågående.

Sopp kunne reisoleres fra alle individene fra gjeller, hud og sår, men ikke nyre. Unntaket var fisk S4 og S6 hvor sopp også ble funnet i nyre, samt i svømmeblære hos individ S4. Reisolert sopp på GYA

ble frosset for videre DNA undersøkelser samt at reisolert sopp fra sår hos S3 og S4-fiskene ble cryopreservert.

qPCR analyser

RNA fra gjeller, nyre, hud og sår ble analysert ved hjelp av qPCR for eventuell påvisning av *Saprolegnia* spp. og *Aeromonas* spp. Det ble ikke påvist sopp eller bakterier på kontrollfiskene (C1-C3, tatt ut før smitte) eller i nyre fra S12. Vevsprøver fra fiskene S3 og S4 som ble tatt ut før *Aeromonas*-smitten var kun positive for *S. parasitica*, ikke *Aeromonas*. Størst mengde med *Saprolegnia* RNA ble påvist i sår (Gj.sn. Ct = 14,1, range: 11,6 – 19,9). Verdiene for de andre vevene var: gjeller (Gj.sn. Ct = 16,8, range 15,1 – 20,3), hud (Gj.sn. Ct = 17,7, range 10,4 – 28,4), og nyre (Gj.sn. Ct = 25,5, range 19,9 – 34,5). Dette viser at *S. parasitica* var systemisk i fisken selv om mengden var betydelig lavere i nyre enn i gjeller, hud og sår. *S. parasitica* i nyre ble funnet hos 9 fisk; S3-S11).

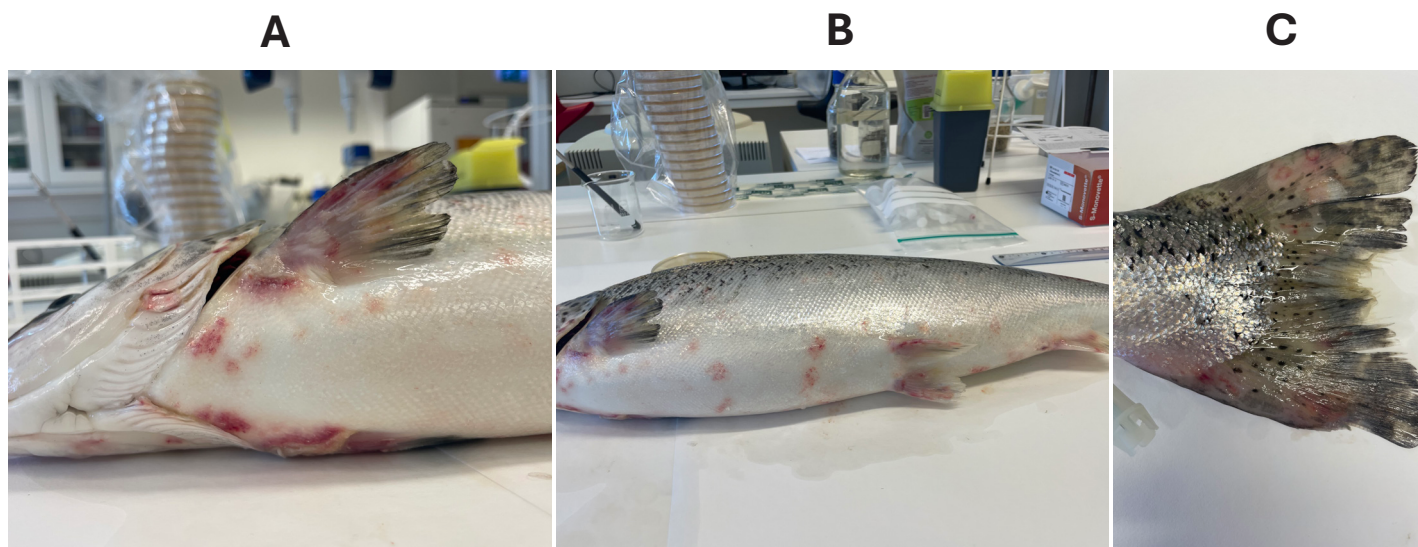
RNA fra *Aeromonas*-bakterier ble også påvist i alle vevene: gjeller (Gj.sn. Ct = 19,2, range 17,1 – 21,4. NB: To fisk, S3 og S4, var negative), hud (Gj.sn. Ct = 22,5, range 18,3 – 28,7. NB: To fisk, S3 og S4, var negative), nyre (Gj.sn. Ct = 19,9, range 16,8 – 21,1. NB: Tre fisk, S3, S4 og S12 var negative), og sår (Gj.sn. Ct = 18,1, range 12,9 – 22,8). *Aeromonas*

spp. var også systemisk i fiskene og ble funnet i nyre hos 6 fisk (S5-S9, S11).

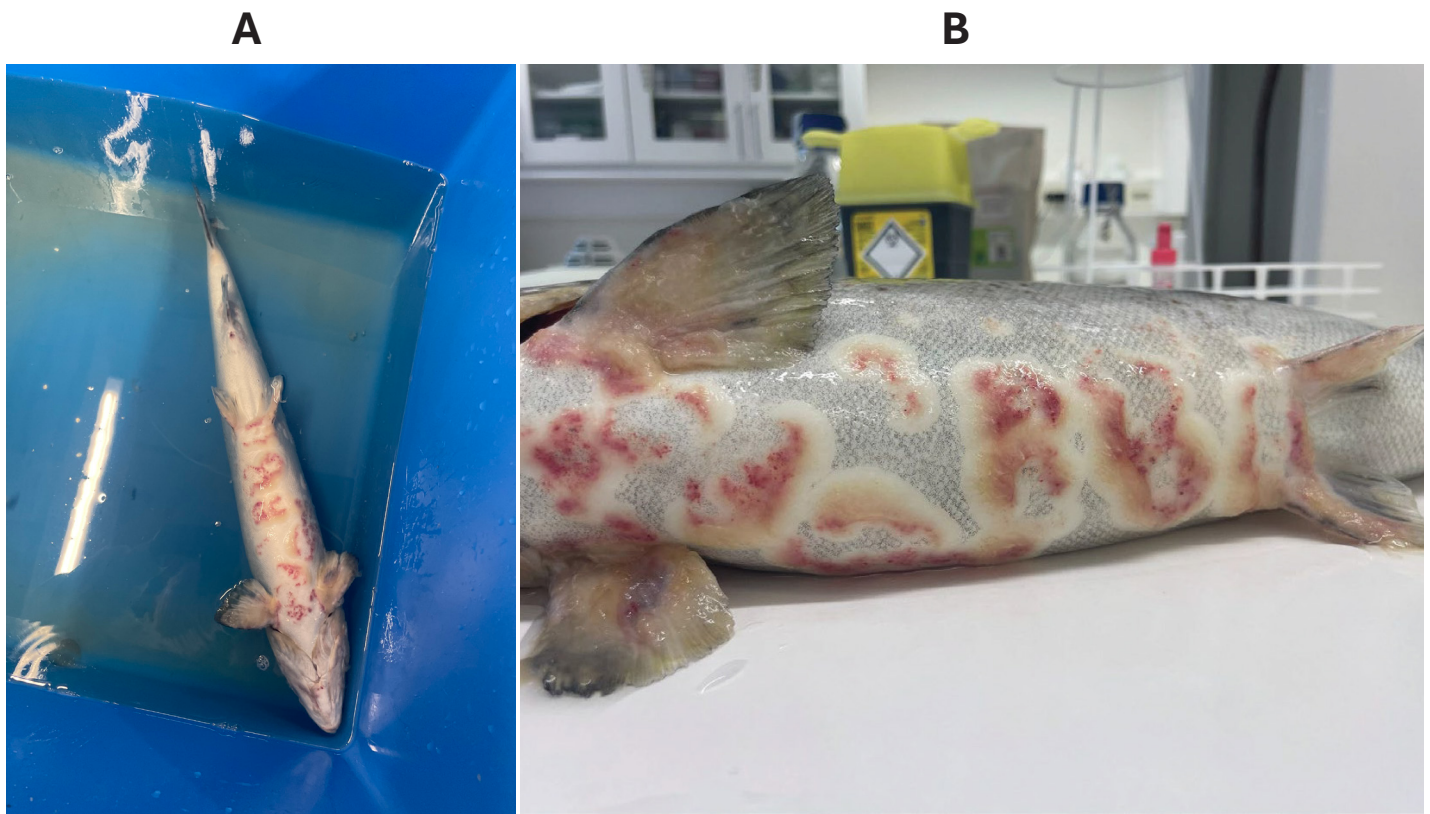
Noen av fiskene hadde lave RNA nivåpåvisninger av *Saprolegnia* og *Aeromonas* spp. (Ct >35) Dette var C1 og C3 (Ct 35,4 – 35,5) for *Saprolegnia* som kan være et resultat av at assayet kanskje kan påvise andre naturlig forekommende sopp (*Saprolegnia* spp.) i ferskvann. Tilsvarende ble det påvist høye Ct-verdier for *Aeromonas* spp. i C1- C3 (Ct 35,0 – 37,4), samt S3, S4 og S10 (Ct 35,2 – 36,6). *Aeromonas*-arter er også vanlig forekommende i ferskvann. Det var imidlertid ikke mulig å dyrke *Saprolegnia* eller *Aeromonas* spp. fra kontrollfiskene.

Undersøkelse av biomarkører fra serum

Serum fra 3 kontrollfisk C1-C3 og 6 stk. fisk med *Saprolegnia* og bakterier (S3, S4, S5, S7, S8 og S10) ble undersøkt for ulike biomarkører hos WellFish Tech, avd. Bergen. Dette er til vår kjennskap den første biokjemiske profilen fra fisk med symptomer forenlig med Red skin disease og kvantifiserte målinger for saprolegniose. Kontrollfiskene hadde noe lave nivåer av sink og jern. Disse mineralene er viktige for immunfunksjonen. Syk fisk hadde tydelige tegn på inflammasjon og multiorgansvikt. Det var lave nivåer av albumin, sink, kolesterol, jern og kalsium-



Figur 3. Fisk med kliniske forandringer forenlige med RSD (kode S3). Fisken var ikke gitt bakterier på dette tidspunktet. **A)** og **B)** Røde hudblødninger og lesjoner på buk **C)** Sopplesjoner med ringformede blødninger på halefinne.



Figur 4. Individ med alvorlig saprolegniose og bukforandringer forenlige med RSD (kode S4). Fisken var ikke gitt bakterier på dette tidspunktet (7 dpi soppsmitte), den ble tatt ut samme dag som bakteriesmitten. Legg merke til ringformede blodige lesjoner på buk. **A)** Bukforandringer som er forenlige med RSD **B)** Nærbilde viser de ringformede lesjonene med blødninger samt assosierte lysebrune fortykkede soppområder.

dette er vanlig å se hos alvorlig syk fisk. Disse endringene indikerer både redusert leverfunksjon og svekket immunstatus. Det foreligger også klare tegn på svikt i osmoregulering og gjellefunksjon, som påvirker ionebalanse og elektrolytter negativt. Forhøyede nivåer av glukose og laktat indikerer betydelig stress - økt laktat tyder på anaerob metabolisme, trolig grunnet hypoksi.

Urea er kraftig forhøyet og tyder på at fiskene ikke kan kvitte seg med avfallstoffer i like stor grad. Dette bildet støtter alvorlig systemisk påvirkning. I tillegg er flere vevsspesifikke enzymer forhøyet hos enkelte individer, ALT og CK, som tyder på skade på lever og muskulatur. AST og LDH er forhøyet hos størsteparten av gruppen som indikerer omfattende skader på vev og organer. Samlet sett er funnene forenlige med alvorlig systemisk sykdom.

Arbeid med vurdering av histologisnittene

fra forsøket er ikke ferdigstilt, men undersøkte snitt fra hud viser en kraftig soppinfeksjon (**Figur 5**).

Diskusjon

Red Skin Disease (RSD) er en ny sykdom som rammer villaks i elver i Nord-Europa, og sykdommen ble i 2019 også påvist i Norge, hovedsakelig i Enningdalselven i Halden kommune i Østfold. Sykdommen kjennetegnes av alvorlige blødninger og ulcerøse, ofte ringformede hudlesjoner i laksens bukrområde, ofte med påvisning av soppinfeksjoner. Til tross for den raske spredningen med påvisning av sykdommen i nye land, har en sykdomsårsak for RSD så langt ikke vært mulig å identifisere. I 2025 var RSD igjen å se hos laks i Enningsdalselven. Det har også vært flere saprolegniose-utbrudd i ulike elver i Norge den senere tiden hvor laksefisk har blitt rammet, blant annet i Halle-elven og Foldvikbekken november 2024 og Gaula med høy dødelighet

september - oktober 2025 (flere hundre døde sjørret og noe færre laks).

Forsøket gjennomført i 2024 lyktes ikke i å gjenskape RSD hos smolt når disse ble eksponert for *Aeromonas sobria* eller *A. piscicola*, selv om disse hadde brudd i hudbarrieren og var utsatt for stress fra lusepåslag (Wiik Brekke 2025). Etter forsøket i 2024 ønsket man å undersøke om en ko-infeksjon av sopp og bakterier kunne være årsaken. Man ønsket også å benytte kjønnsmodne, større fisk da de er mer riktig fiskestørrelse for undersøkelse av sykdommen, og slike individer vil også trolig være immunologisk svekkede fra kjønnsmodningsprosessen som kan øke sjansen for sykdom.

I undersøkelsene av villaks med RSD gjennomført i 2019-2021 (Lagadec et al. 2023) ble flere andre agens funnet sammen med de framtrepende *Aeromonas*-bakteriene. Dette var blant annet *Saprolegnia* spp., en kjent infeksjons

soppart i ferskvann, flagellaten *Ichthybodo* spp. samt bakteriene *Yersinia ruckeri* og *Candidatus Branchiomonas cysticola* (Lagadec et al. 2023). Soppinfeksjoner gir ofte karakteristiske ringformede lesjoner, som sett ved RSD, og sopp er en viktig sekundærårsak til morbiditet og dødelighet. I dette forsøket viser vi at det også kan være en primærårsak. I fiskehelserapporten 2019 beskrives det også funn av sopp hos fisk med RSD (Garseth et al. 2020). *Aeromonas*-bakteriene som ble undersøkt i forsøket her er naturlig forekommende i elvene. Bakterier som ikke er patogene for laks kan likevel gi sykdom hos laks med svekket kondisjon eller -immunsystem, som fiskene har når de er kjønnsmodne og returnerer til elvene (Dolan et al. 2016). Fiskene kan også bli syke om det er brudd i fiskens beskyttende barrierer. Både *A. piscicola* og *A. sobria* som ble benyttet i forsøket her er vist å være assosiert med sykdom hos andre fiskearter. I dette forsøket ble infeksjon med *Aeromonas* spp. etablert i fisken som resultat av en ko-infeksjon med *Saprolegnia parasitica*, hvilket ikke var tilfellet når disse bakteriene ble benyttet i smitteforsøk alene (Wiik Brekke 2025). RSD-sykdomsbildet kan være forårsaket av en koinfeksjon (eks *Aeromonas* spp. og *Saprolegnia* spp. eller *Ichthyobodo* spp.), muligens som følge av initiell påvirkning av risp/ sår i buk fra mekanisk påvirkning i elveinnløp eller at huden blir påvirket av avrenningsprodukter. Det kan ikke utelukkes at en initiell negativ miljøpåvirkning kan svekke fiskene og dermed gjøre dem mer mottakelige for infeksjon. Det kan også være knyttet til smittepress i omgivelsene. En nylig artikkel fra Cano et al. 2025 har undersøkt laks med RSD fra England og Wales, og viste til at genuttrykksmønstrene samsvarte med mønstre man assosierer med en infeksjonsårsak.

I forsøket nå høsten 2025 ble det benyttet et ferskt *S. parasitica*-isolat fra en sjørørret i Gaula elven med saprolegniose. Soppen ble dyrket opp og brukt til badsmitte og eksponering over 6 dager i karet. Fiskene fikk saprolegniose, og to fisk hentet ut før bakteriesmitten ved dag 6 og 7 grunnet sår og siden de var letargiske fra soppinfeksjonen, utviste

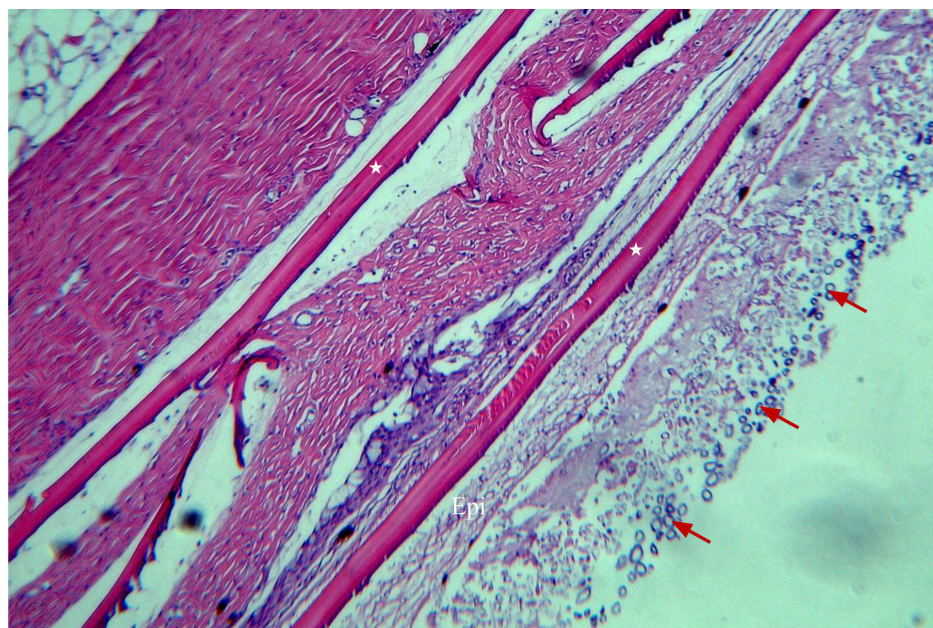
kliniske forandringer forenlig med RSD. Flere fisk utviklet alvorlig saprolegniose kort tid etter. Dødelighet og rask og uforutsigbar sykdomsutvikling i gruppen gjorde at man måtte ta ut fisk fortløpende i stedet for ved ulike forhåndsbestemte uttakstidspunkt. Det ble tatt en rekke prøver fra fiskene for å sikre best mulig informasjon, inklusiv dyrkning for sopp og bakterier, i tillegg til et rikt fotomateriale. Noen fisk utviste klassisk saprolegniose, mens andre hadde kliniske forandringer som samsvarer med RSD. Som ved klassisk saprolegniose kunne sopp for det meste isoleres fra ytre organer, men her også fra svømmeblære og nyre hos noen individer, og noen hadde svullen milt som tydet på pågående infeksjon eller systemisk påvirkning.

Basert på dette, når *S. parasitica* kan gi kliniske forandringer forenlige med RSD, både med og uten bakterier til stede, er det grunn til å tro at *S. parasitica* er en større del av sykdomsbildet ved RSD enn tidligere antatt. Trolig kan *S. parasitica* også være en primærårsak til sykdommen. Det er stor varians i hvordan saprolegniose og forandringer forenlig med RSD kommer til uttrykk blant fiskene i forsøket, dette kan være avhengig av en rekke ulike årsaker som for eksempel lokalisering av mekaniske skader/ forstyrrelser i hud. Soppen fra Gaula

er svært virulent, invasiv og angriper fiskene raskt, særlig via brystfinnebasis, synes det. Brystfinnebasis, et område uten skjell, er en kjent innfallsport for flere andre fiskeagens, som for eksempel viruset IHN (Harmache et al. 2006). At fiskene blir raskt syke og ikke-responsive passer også med RSD-sykdomsbildet man ser fra elver, hvor fisk i god kondisjon rammes (altså må de ha gått kort tid uten å ha spist) og ikke reagerer på fiskere. *S. parasitica* er vanligvis å anse som en sekundærpatogen, dvs. at den ikke kan invadere fisken om immunsystemet er bra eller om den ikke har noen brudd i hudbarrierene fra sår eller mekaniske skader. Når de rette forholdene er til stede, derimot, kan fiskene bli svært syke, som forsøket viser. Det har vært foreslått at *S. parasitica* kan ha endret virulens de siste årene (Veterinærinstituttet, 2025, 16. desember. Saprolegniose. <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/saprolegniose>) eller det kan være knyttet til miljøendringer som for eksempel økt temperatur i elvene eller andre forhold.

Konklusjon

Smitte med *Saprolegnia parasitica* gjorde at man framkalte alvorlig saprolegniose hos fiskene etter ca en uke. Man så også fisker med kliniske forandringer forenlig med RSD, som sår, bukblødninger og



Figur 5. Hud fra laks smittet med *Saprolegnia parasitica*. Hyfer fra *S. parasitica* (pil-er), Fiskeskjell (Stjerner), rester av epitel (Epi).

Vitenskapet

noen ganger ringformede lesjoner/tegninger på buk. Slike RSD-forandringer ble sett 6 og 7 dager etter smitte med kun *S. parasitica* og etter bakteriesmitte med *Aeromonas sobria* / *A. piscicola* ved dag 9 og 21. Infeksjon med *S. parasitica* medførte også at *Aeromonas* spp. klarte å etablere seg i fisk (systemisk infeksjon) til forskjell fra tidligere forsøk med de samme bakteriene. Forsøket kan ikke konkludere med om *S. parasitica* alene er årsak til de kliniske forandringene forenlig med RSD hos alle fiskene i forsøket eller om bakteriene forsterket symptomene. Dette grunnet det lave antallet fisk og stor individvariasjon i forsøket mtp. uttrykk av saprolegniose og RSD-forandringer. Forsøket lyktes imidlertid i å gjenskape RSD-klinikk hos enkelte av fiskene (5 stk.). At to individer med kliniske forandringer forenlig med RSD kunne ses før bakteriesmitte indikerer at det ikke er avgjørende at bakteriene er til stede. *Saprolegnia parasitica* foreslås å kunne ha en viktigere rolle i RSD enn tidligere antatt, kanskje også hovedårsaken til RSD og hudblødningene/lesjonene man ser, og soppen har ofte også vært funnet hos villfanget RSD-fisk.

Forslag til videre arbeid:

Virulens for *S. parasitica* fra Enningdalselven og andre elver bør undersøkes. Isolater av *S. parasitica* fra ulike elver, både hvor man har funnet RSD og ikke, bør sammenlignes genetisk. *S. parasitica* fra Enningdalselven er ikke undersøkt i smitteforsøk og det kan være viktig å undersøke et isolat fra elven hvor man ser RSD. Det bør gjennomføres forsøk med parr og smolt med *S. parasitica* (og evt *Aeromonas*) for å vurdere virulens.

Finansiering og takk

Takk til Randi Fivelstad ved WellFish Tech, Bergen, for tolkning og beskrivelser av biomarkørresultater og til Halden kommune og Haldenvassdragets vannområde for å ha støttet prosjektet.

Definisjoner

Red Skin Disease: sykdom hos laks med ukjent årsak som gir hudblødninger, ofte i form av røde ringer på buken og sidene og som kan utvikle seg til store åpne sår (foto fra villaks med RSD kan ses under). Sykdommen fører til svekket fisk som kan dø. Sykdommen ble først observert i norske lakseelver i 2019 og er også rapportert fra flere andre land i Nord-Europa foruten Norge (Danmark, Sverige, Irland, Storbritannia). Det har også vært tilfeller i Russland.

Saprolegniose: hos laks er dette en soppinfeksjon forårsaket av *Saprolegnia*-slekten i ferskvann, spesielt *Saprolegnia parasitica*, en eggsporesopp som gir bomullsaktige hvite eller gråaktige belegg på fisken. Sykdommen er ofte assosiert med stress og skader, og svekker fisken ved å ødelegge hudbarrieren. Bakteriefeksjoner (som *Aeromonas*) ses ofte sammen med sykdommen. Saprolegniose kan gi alvorlig sykdom og høy dødelighet, spesielt hos gytefisk og yngel i oppdrett.

Aeromonas: *Aeromonas* er en slekt av gramnegative, stavformede bakterier som hovedsaklig ses i

ferskvann eller brakkvann. Flere arter innen denne slekten er opportunistiske patogener hos fisk og kan gi sykdom som furunkulose eller hudlesjoner. Bakteriene kan trenge gjennom skadet hud eller infisere stressede eller svekkede individer.

Lesjon: en avgrenset unormal forandring i vev eller et organ, som kan være forårsaket av sykdom eller skade. En lesjon er ikke nødvendigvis et åpent sår.

Sår: en skade hvor huden eller en slimhinne er brutt, ofte med tap av vev og en åpen overflate.

Agens/ sykdomsagens: det sykdomsframkallende smittestoffet eller påvirkningen som utløser sykdommen, som oftest en bakterie, virus, parasitt eller sopp.

Virulens: et sykdomsagens sin evne til å framkalle sykdom (ofte brukt om en sykdomsorganisme sin aggressivitet).

Ko-infeksjon: når mer enn én sykdomsorganisme er involvert i et sykdomsbilde eller kan finnes samtidig i et dyr.

Referanser

Apostolakis K, Secombes C, van West P (2021). *Saprolegnia parasitica*. Kap 26 i "Fish Parasites; A handbook of protocols for their Isolation, Culture and Transmission", CABI International, s390-401

Cano I, Harvey C, Paley R, Hill R, Buckley M, Cobb A, van Aerle R, Soares S, Williams C. *Transcriptomic profiling of wild Atlantic salmon affected with red skin disease (RSD)*. Fish Shellfish Immunol. 2025 Dec;167:110880. doi: 10.1016/j.fsi.2025.110880. Epub 2025 Sep 16. PMID: 40967290.

Dolan, B. P., Fisher, K. M., Colvin, M. E., Benda, S. E., Peterson, J. T., Kent, M. L., & Schreck, C. B. (2016). Innate and adaptive immune responses in migrating spring-run adult chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fish & Shellfish Immunology*, 48, 136-144.

Eszterbauer E, Hardy T, Rónai Z, Sipos D, Zsigmond G. Cryopreservation of three *Saprolegnia* species (Oomycota): Preliminary evidence for the long-term archiving of water mould species, *Fungal Biology*, Volume 124, Issue 7, 2020, Pages 682-687, ISSN 1878-6146, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.005>.

ICES. (2018). *Report of the Working Group on North Atlantic Salmon (WGNAS)*. ICES Expert Group Reports.

ICES. (2020). Working Group on North Atlantic Salmon (WGNAS). <https://doi.org/10.17895/ICES.PUB.5973>

Garseth ÅH, Gåsnes SK, Hytterød S, Sandodden R, Tørud B og Hansen H. Kap 9. Helsesituasjonen hos vill laksefisk. Fiskehelse rapporten 2019, utgitt av Veterinærinstituttet 2020

Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Brémont M. Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J Virol*. 2006 Apr;80(7):3655-9. doi: 10.1128/JVI.80.7.3655-3659.2006. PMID: 16537634; PMCID: PMC1440417.

Lagadec E, Mjølnerød EB, Jensen ØM, Plarre H, Nylund A. Multiple *Aeromonas* strains isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) displaying red skin disease signs in Scandinavian rivers. *J Fish Dis*. 2024 Jan;47(1):e13870. doi: 10.1111/jfd.13870. Epub 2023 Oct 6. PMID: 37800856.

Misk E, Gonen S, Garber AF. Resistance to *Saprolegnia* parasitica infection: A heritable trait in Atlantic salmon. *J Fish Dis*. 2022 Sep;45(9):1333-1342. doi: 10.1111/jfd.13664. Epub 2022 Jun 4. PMID: 35661373; PMCID: PMC9544413.

Veterinærinstituttet (2025, 16.desember). Saprolegniose. <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/saprolegniose>

Weichert, F. G., Axén, C., Förlin, L., Inostroza, P. A., Kammann, U., Welling, A., Sturve, J., & Asker, N. (2020). A multi-biomarker study on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by the emerging red skin disease in the Baltic Sea. *Journal of Fish Diseases*, 44(4), 429-440.

Wiik Brekke, S (2025). Smitteforsøk med *Aeromonas sobria* og *A. piscicola*: bakterienes rolle i utvikling av Red Skin Disease. Msc thesis, Universitetet i Bergen. <https://hdl.handle.net/11250/3215383>, 56 s

PescaPex Antistatisk Ingen driftsstans

DNV-verifisert antistatisk rør
- testet i felt

DNV har testet PescaPex-røret og bekrefter de antistatiske egenskapene.

Dette sikrer trygg håndtering av foringsutstyr ute på anlegget.

PescaPex-røret er robust, vedlikeholdsfritt og eliminerer behovet for reparasjoner - noe som forhindrer driftsstans og tap av foringstid.

Den glatte innvendige overflaten sørger for at foret holder seg helt og intakt hele veien gjennom røret og frem til fisken.

Leveres i lengder fra 50 til 550 meter.

Lengre strekk gir raskere installasjon, færre skjøter og redusert behov for ekstra utstyr.

Opptil 50 % mindre mikroplast i havet med PescaPex.

Bruk din lokale distributør for PescaPex, eller kontakt Golan Pipes Scandinavia for å finne anbefalt

 **GOLAN PIPES
SCANDINAVIA**




Mer informasjon:
info@golan.dk
+45 64 41 77 32

