



Diagnostikk av parasittsykdommer

Parasitter er alle snyltere, men de tilhører svært ulike grupper og har et mangfoldig levesett!

Ole Bendik Dale, Haakon Hansen, Brit Tørud, Toni Erkinharju og Mona Gjessing

Miniserie om diagnostikk

Veterinærinstituttet har siden oppdrettsnæringen startet opp i Norge benyttet erfaringsbasert utredning av sykdomsproblemer. Nye sykdommer og agens dukker stadig opp og teknologitvillingen innen diagnostikk er rask så at metoder forbedres, skiftes ut eller suppleres med nye hele tiden. Likevel ligger noen grunnleggende prinsipper i framgangsmåte fast og det aller viktigste er å innlede så bredt at vi kan målrette videre undersøkelser presist og ikke komme skjevt ut og tape verdifull tid. Informasjonen diagnostikken gir, bør også bidra til å iverksette de beste tiltak mht forebygging og behandling og til å redusere lidelse. Første artikkel i denne miniserien omhandler bakteriologi og bakteriesykdommer (NF 2021 nr 11), andre omhandler virologi og virus sykdommer (NF 2021 NR12). Her følger vi opp med innlegg om diagnostikk av parasittsykdommer.

Parasitter er ofte omtalt som snyltere fordi de er avhengige av en annen organisme, verten, for å reproducere seg. Ordets opphav er gresk og ble brukt om den «som spiser hos noen andre», og parasitter kan kanskje sies å være en ikke helt velkommen middags-gjest? Parasitter vil per definisjon påføre verten en form for skade, men skadene vil normalt sett ikke føre til at verten dør, da det ville være å gjøre slutt på sitt eget matfat. Rent strukturelt, skiller parasittene seg fra snyltende bakterier og virus ved at de er dyr med ekte cellekjerne, de er såkalte eukaryote organismer. Parasitter varierer veldig i størrelse, fra små, encellede organismer, f.eks. amøben *Paramoeba perurans* som kan føre til amøbegjellesykdom, til store, flercellede organismer, som bendelmarken *Eubothrium crassum* (figur 1), som er vanlig i tarm hos norsk oppdrettslaks, der den kan bli flere desimeter lang.

Noen parasitter gjennomfører hele sin livssyklus på en vert (direkte livssyklus), mens andre trenger en eller flere mellomverter (indirekte livssyklus)

Levesettene eller livssyklusen til de ulike parasittene er mangfoldige. Lakseparasitten *Gyrodactylus salaris*, som har tatt livet av lakseyngel i mange norske elver, trenger kun én vert, en laksefisk, for å gjennomføre sin livssyklus og den smitter direkte fra fisk til fisk. Dette kalles direkte livssyklus. *Gyrodactylus salaris* har en spesiell form for formering som kan minne om russiske dukker – de er

tvekjønnede og føder levende unger som allerede ved fødselen har anlegg til nye avkom. Ett individ kan derfor bli til flere hundre individer i løpet av noen uker. Av parasitter som er kjent fra norsk oppdrettsnæring, har amøben *P. perurans* direkte livssyklus og gjennomfører hele sin livssyklus på gjellene hos en vert, f.eks. på en laks eller rognkjeks. *Anisakis simplex*, også kjent som kveis, trenger derimot flere verter og har altså det vi kaller indirekte livssyklus. Livssyklusen går veien via krepsdyr (kopepoder) og fisk før de ender opp og blir voksne i marine pattedyr som er sluttvert. Bendelmarken *Eubothrium crassum* trenger også en kopepode før de kan infisere en fisk og bli til voksne individer i tarmen. For mange parasitter er imidlertid hele eller deler av livssyklus ukjent. Dette gjelder blant annet for *Parvicapsula pseudobranchicola* (Figur 2), som forårsaker parvicapsulose, en sykdom som gir store tap i lakseoppdrett i de nordlige deler av Norge. Denne parasitten har en hittil ukjent børstemark som sin sluttvert og laksen fungerer her som mellomvert.

I motsetning til parasitter med direkte livssyklus (og bakterier og virus), vil parasitter med en komplisert livssyklus med mellomverter altså ikke kunne smitte direkte videre til andre fisker i et oppdrettsanlegg. Parasitter med direkte livssyklus vil langt lettere kunne bli så tallrike at de fører til svært alvorlige sykdomsproblemer i fiskeoppdrett.

Noen parasitter er vertsspesifikke og infiserer bare én eller et fåtall vertarter, og noen er mer generalister som kan infisere en rekke verter. Et eksempel på det siste er *P. perurans*. Denne amøben har blitt påvist og har forårsaket sykdom



Figur 1. Til venstre scanning elektronmikroskopi bilde av bendelmarken *Eubothrium crassum* som lever i tarmen på laksefisk, forstørret 80 ganger og fargelagt. Foto: Jannicke Wiik-Nielsen, Veterinærinstituttet. Til høyre histologisk snitt der bendelmark – øverste biten viser festeorganet (scolex) som den holder seg fast med inne i pylorusblindsekken. De bakerste leddene, som er fulle av egg, vil løsne og gå ut med avføring og smitte mellomverter (små krepsdyr). Foto: Mona Gjessing.

på mange forskjellige fiskearter. Blant annet er den funnet på laks, rognkjeks og piggvar og den kan sannsynligvis infisere mange flere arter enn den er påvist på til nå.

Parasitter grupperes etter om de er encellede (protozoer) eller flercellede dyr (metazoer), og iht levevis og utseende. Utvortes parasitter- eller ektoparasitter lever på utsiden av sin vert, og eksempler på slike parasitter er lakselus, gjelleamøber og *Ichthyobodo* («Costia»). Innvortes parasitter eller endoparasitter lever inne i fisken. Det vi kaller innvollsorm lever gjerne i indre hulrom som tarm og inneles etter oppbygging i rundorm (nematoder) og flatorm (blant annet cestoder). Til endoparasittene kan en også regne svært små parasitter som lever i selve kroppsvevet, mellom cellene (ekstracellulært) eller inne i cellene (intracellulært). Et par eksempler er

myxosporidiene *Myxobolus cerebralis*, som gir dreiesyke, og *Pseudobranchicola* (figur 2) som gir parvicapsulose. I tillegg har vi mikrosporidien *Desmozoön lepeophtherii*, som bl.a kan gi gjellesykdom (figur 3). *Desmozoön lepeophtherii* er for øvrig samme parasitt, samme art, som *Paranucleospora theridion*, men siden *Desmozoön lepeophtherii* ble brukt først så bør det navnet brukes for å unngå forvirring.

Kunsten å systematisere og navngi parasitter - og hvorfor det er viktig

Historisk har en og samme parasittart fått «tildelt» forskjellige navn av ulike forskere og de har blitt gruppert nokså vilkårlig med mye forvirring som resultat. I dagens biologiske systematikk er målet å plassere alle organismer, inkludert

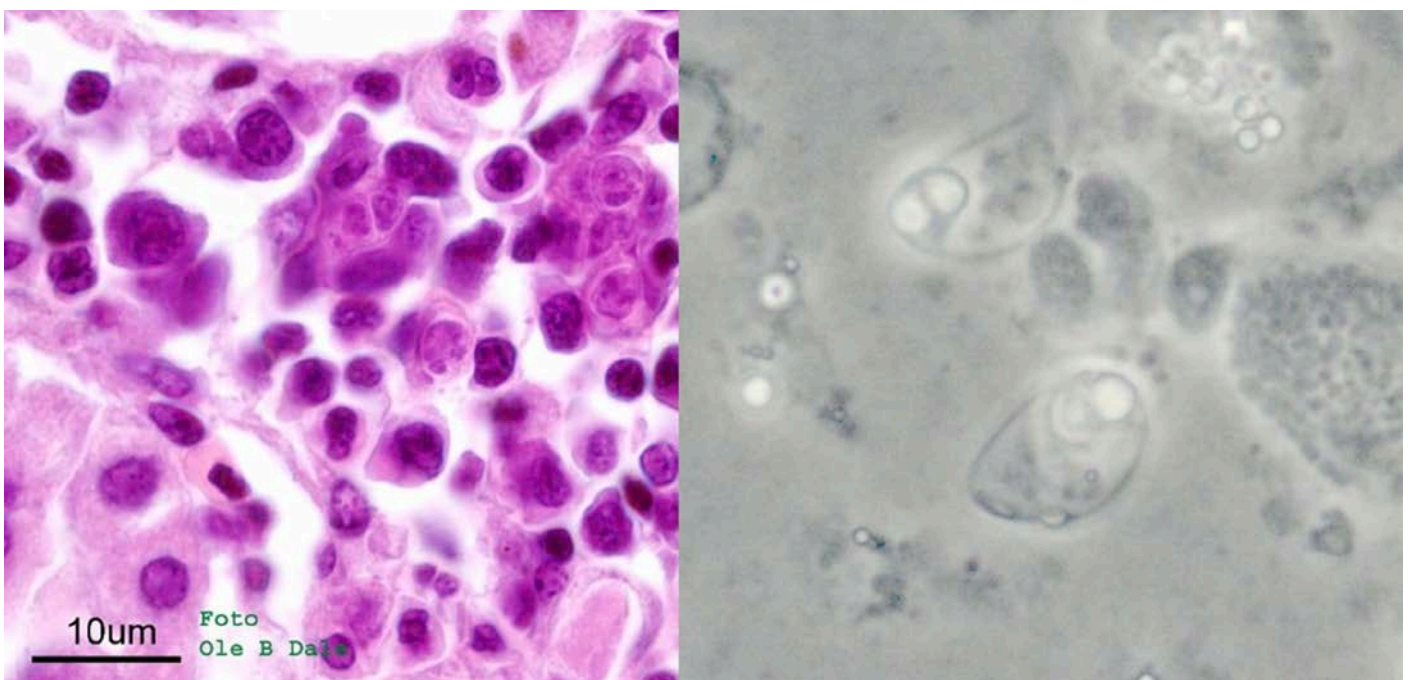
parasittene, i et naturlig system ut fra hvordan de har utviklet seg og er beslektet. Dette kombinerer Carl von Linné sin systematiske tilnærming og Charles Darwin sin lære om evolusjonært slektskap. Som kjent fant Linné opp artsbegrepet og Darwin skrev om «Artenes opprinnelse». Men lett er ikke dette. Det er «missing links» - utdødde dyr i evolusjonen og mildt sagt innviklede utviklingslinjer. Noen parasitter har så komplekse livssykluser at de veksler mellom en- og flercellethet og kan se totalt forskjellig ut i ulike vertsdyr. Dette gjorde at artsbeskrivelse og artsbestemmelse var mye vanskeligere i tidligere tider da man kun brukte morfologiske (utseendemessige) karakterer til dette. Heldigvis er det litt som i barnesangens strofe: «Meget er forskjellig, men det er utenpå». Mens utseende – fenotype - er ekstremt variabelt er deler av genetikken og molekylære mekanismer forbløffende konserverte og endringer dels sporbart gjennom evolusjonen.

Gjennom økt kjennskap til og tilgang til informasjon om genetikken til stadig flere organismer, kan vi i dag benytte oss også av og molekylærbiologiske karakterer og metoder for artsbestemmelse og slektskapsanalyse. I dag artsbestemmes altså parasitter (og andre arter) ved

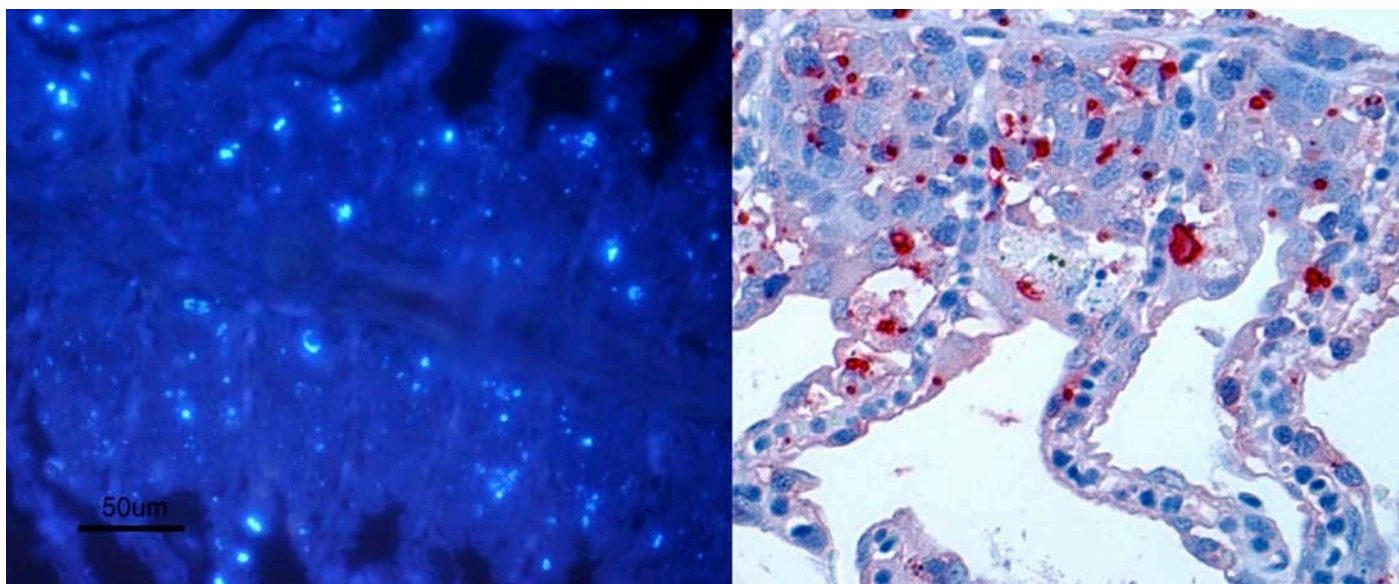
å benytte alle tilgjengelige kriterier. Formeringsmåte og morfologi (inklusive bruk av elektron-mikroskop), kombineres med genetisk og molekylærbiologisk karakterisering, som stadig blir bedre takket være en rivende teknologisk utvikling.

Faget parasittologi er altså mer komplekst og krevende enn noensinne, men utviklingen av nye PCR baserte laboratorietester gjør at viktige, kjente parasitter påvises kanskje enklere og raskere enn noensinne. Men, for å oppdage nye parasitter og om de er patogene eller ikke, vil PCR ha sine begrensninger. Til dette kreves innsats både fra diagnostikere og parasittologer som kan sin kunst.

Navnsetting og slektskapsanalyse er grunnleggende for å utvikle ikke bare diagnostikk, men også bekjempelse av parasitter. Er et medlem i slekten godt kjent, og bekjempelsestiltak mot den finnes, kan det gi kortere vei til å bekjempe slektinger. Medikamentelle parasittmidler skal ramme kun parasitten og her vil økende kunnskap om genetikken til parasitten og forskjeller mellom parasitt og vert kunne åpne for nye muligheter av blant annet nye medisiner. Vi trenger sårt nye tiltak mot parasitter og skadedyr samtidig som vi



Figur 2 –*Parvicapsula pseudobranchicola*. Til venstre histologisk preparat som viser parasitt-celler med «røde kjerner» blant fiskens celler med «blå kjerner» i nyrets bloddannende vev. Til høyre slik parasittene vises i direkte mikroskopi med «lysende kjerner». Venstre foto: Ole Bendik Dale, høyre foto: Haakon Hansen, Veterinærinstituttet.



Figur 3: Laks med alvorlige gjellelesjoner pga tallrike *Desmozoön lepeophtherii*. Til venstre lyser kitinveggen i sporer merket med Calcofluor opp under UV-lys. Sporene er på størrelse med bakterier og tar ikke farge ved vanlig histologi og oversees lett. Til høyre er parasittens ribosomer merket røde vha *in situ* hybridisering (ISH). Calcofluor sin styrke er at alle kitinholdige sporer uansett art vil lyse opp. Deretter kan PCR eller ISH brukes for å finne ut om det er en kjent art på ferde. Foto: Ole Bendik Dale, Veterinærinstituttet

må ta livet av andre arter på veien, arter vår økologi og framtid er helt avhengig av. Det er et hårete forskningsmål.

Godt feltarbeid av kliniker legger grunnlaget for å mistenke og oppklare parasitt-problemer!

Når man fornemmer at et «nytt» problem er på gang i et anlegg, er det, som alltid, viktig å gå bredt ut mht undersøkelser (Figur 4). Først å observere og beskrive hvordan fisken oppfører seg. Virker den urolig? Gnir den seg inntil merdkanten som om den klør? Da kan den kanskje være plaget av ektoparasitter. Ved obduksjon kan man noen ganger se parasitten direkte, som f.eks kveis eller bendelmark, men vanligst er det at parasittene ikke er mulige å oppdage med det blotte øyet. Et feltmikroskop vil, i slike tilfeller kunne være svært nyttig (fig 5). Og ikke minst, dette er en svært enkel undersøkelse.

A. Direkte mikroskopi av ferskt materiale kan være en snarvei til å oppdage nye tilstander, til raskere diagnose og behandling, og husk: døde parasitter beveger seg ikke!

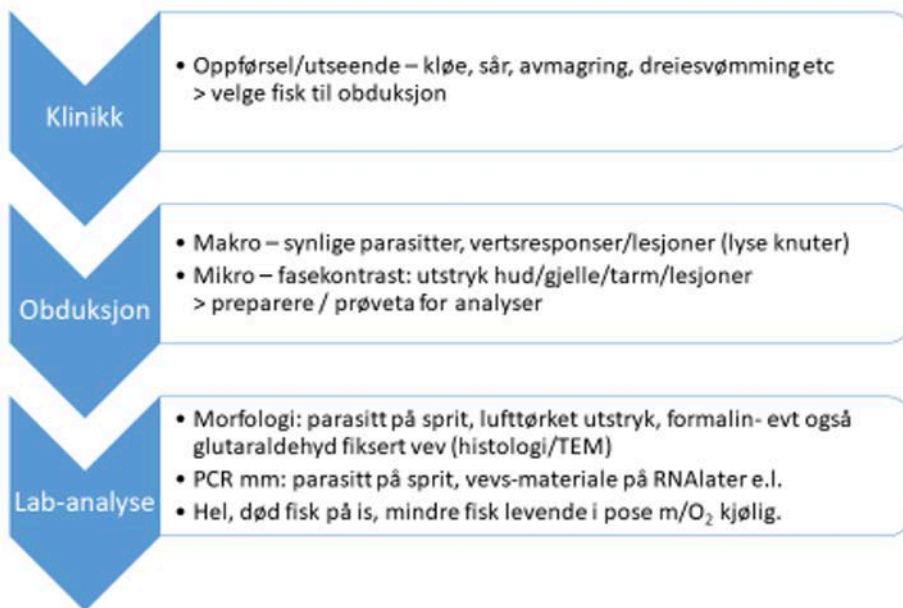
Særlig i settefiskanlegg er gode rutiner for å følge med på ektoparasitter ved direkte mikroskopi viktig for å kunne reagere i tide og unngå store problemer: trolig er

Ichthyobodo (Costia), som kan påvises ved direkte mikroskopi, av de parasittene som dreper flest små fisk.

Ved undersøkelse av hud- og gjelleslim for å se de små encellede parasittene er fasekontrastmikroskop det absolutt beste. Bevegelighet gjør at ektoparasitter tilhørende bl. a. *Ichthyobodo*, *Trichodina* og *Chilodonella* kan være lette å oppdage. Når det gjelder endoparasitter en ikke kan se med det blotte øyet, inne i vev/celler, kan i noen tilfeller bevegelige stadier sette en på sporet: det er viktig å ta en titt der det er lesjoner, selv om laboratorieundersøkelser ofte må til for å artsbestemme. Flagellater som *Spironucleus/Hexamita* kan sverme rundt og er lette å se vha direkte mikroskopi, mens de på histologi ligger dønn stille og ser mest ut som lite distinkte fargeflekker. Uten å ha undersøkt ved mikroskopi så vet en ikke om det er noe som hadde vært lett å se – og viktig å gjøre noe med raskt! Men uansett hva som har utløst et stort parasittproblem, så kreves raske tiltak. Å bruke mikroskopet i klinikken straks det er den minste mistanke om parasitter er meget klokt.

B. Histologi og TEM (Transmisjon elektron mikroskopi) er viktige metoder for å komplementere feltanalyser

De små parasittene, eller en snei av en større, eller en lesjon vi kan mistenke er



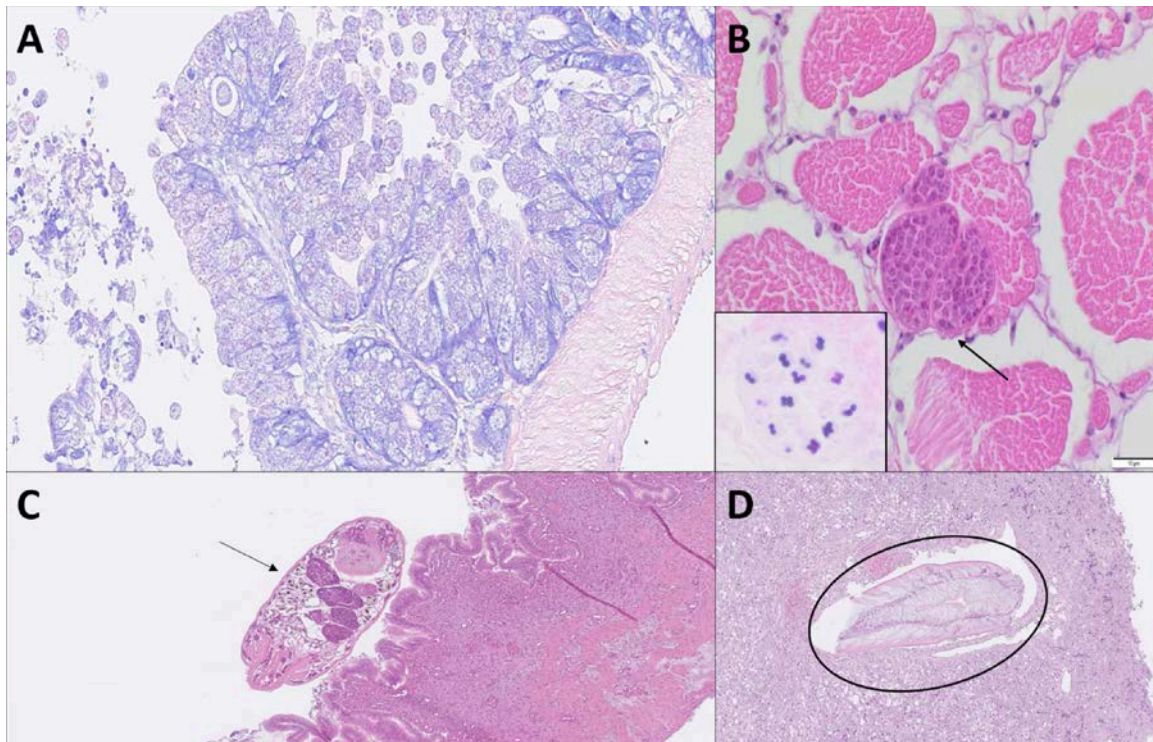
Figur 5. Øvelse gjør mester: direkte mikroskopering av ferske hudskrap og gjelleslim må gjøres rett etter avlaving mens parasittene enda er tilstede og beveger seg. Umiddelbare funn og raske tiltak kan berge store verdier! Foto: Brit Tørud

en vertsrespons rettet mot parasitten, dukker ikke sjelden opp på histologi (Figur 6). Det er laget flere oversikter mht hvilke karaktertrekk ved de ulike parasitter som er nyttige for å identifisere parasitter i vevssnitt. Men særlig de svært små parasittene kan være vanskelige å identifisere, og det kan være vanskelig å avgjøre om bare er fiskens eget vev som er sterkt endret. Kanskje er det også noe helt nytt vi observerer? TEM er da en måte å gå videre på, da det gir en langt sterkere forstørrelse og kan også vise strukturer nyttige for å klassifisere parasitter. TEM er imidlertid tidkrevende og kostbart så det brukes når rutinemessig diagnostikk ikke fører fram.

Histopatologi er videre nyttig for å karakterisere lesjoner og vertsresponser ved sykdom forårsaket av parasitter. Det kommer også stadig flere spesifikke genmarkører for parasitter som kan brukes i for eksempel vha *in situ* hybridisering, en metode hvor parasitten kan visualiseres direkte ifht patologien i histologiske snitt. Histologien er også nyttig om flere agens er til stede samtidig som f.eks ved kompleks gjellesykdom. I et utbrudd med kombinasjon av laksepox og *Ichthyobodo* så var de utallige parasittene det mest iøynefallende. Hadde en her bare gjort direkte mikroskopi kunne en lett stoppet opp og gitt *Ichthyobodo* all skylden. Likedan kunne en stoppet etter bare en PCR mot laksepox og gitt viruset all skylden. Histologi bidrar derfor godt til helhetlig sykdomsdiagnostikk som er viktig for å komme til bunns i problemenes årsak.

C. Bruk av PCR for å påvise parasitter

PCR er en veldig spesifikk og sensitiv metode som kan brukes til å påvise små mengder DNA/RNA fra et agens, og er nok den mest effektive måten å teste for om en bestemt parasitt er til stede eller ikke. Målet for mange PCR tester er DNA-sekvenser av ribosomer som produserer proteiner, eller sekvenser fra mitokondrier som er cellenes «kraftverk». Disse celle- organellene finnes det rikelig av i (nesten) alle dyr (mikrosporidier har ikke mitokondrier) og det er sekvenser tilgjengelig fra mange arter i offentlige DNA-sekvensdatabaser (GenBank m.fl) som kan brukes til å utvikle nye tester. Ribosomale markører som 18S og ITS er



Figur 6: Eksempler på parasitter i histologiske snitt fra rognkjeks. A: Koksidier i pylorusblindsekk. B: *Kudoa* sp. (Myxozoa) plasmodium i skjelettmuskulatur (pil). Innfelt bilde: Giemsa-fargede *Kudoa* sp. sporer i plasmodium med polare kapsler (blåfarget) i karakteristisk mønster. C: Flercellet parasitt, trolig en ictu, i magesekk (pil). D: Del av nematode (rundorm) i lever (sirkel). Foto: Toni Erkinharju, Veterinærinstituttet.

ofte tilstede i mange kopier og mange arts-spesifikke qPCR-assay er designet mot disse markørene. Om ribosomale sekvenser ikke gir resultat kan det hende mitokondrielle sekvenser (mtDNA COI) gir bedre artsbestemmelse. Her er god kjennskap til de forskjellige artsgruppene viktig bakgrunnskunnskap.

Nye teknologi slik som helgenom-sekvensering og metabarcoding, er allerede viktige og brukes for å finne nye agens og utvide kunnskapen om de en kjenner. I rutinetesting vil imidlertid ofte konvensjonell PCR være enklest og like bra i mange tilfeller.

D. Avsluttende kommentar til diagnostikk

Parasitter er ofte ikke det en har mest fokus på i den generelle sykdomsdiagnostikken. Et godt råd er å se etter parasitter en gang til hvis første runde med diagnostikk ikke har gitt noen forklaring på problemene. Husk at direkte mikroskopi i felt utfyller laboratorie-undersøkelser og kan gi svært raske resultater. Med tanke på innsending til laboratorier har vi laget en liten oversikt over forskjellige typer forbehandling av prøver ved innsendelse til laboratorium (tabell 1)

Nye problemer («emerging diseases») forårsaket av parasitter må forventes. Lakseindustrien har satt ut et stort matfat og det finnes mange «dyr» der ute som kan tenkes å tilpasse seg. I store RAS-anlegg har en sett virus som såkalte «husstammer», og vi skal ikke se bort fra at små parasitter med direkte livssyklus kan begynne å opptre som nye «husdyr» ●

Tabell 1 tips til forbehandling av prøver for innsendelse til laboratorium

Behandling / fiksativ:	Anvendelse:
Fersk vev/fisk – død/levende	Potensielt «Alt» (avtal med lab!)
Frysing	PCR mm
Sprit – 70% parasitt-fiksering	Morfologi større parasitter, PCR mm
RNAlater e.l. – vev m/små parasitter	PCR mm
Formalin – vev med parasitter	Histologi, In situ – hybridisering, morfologi større parasitter