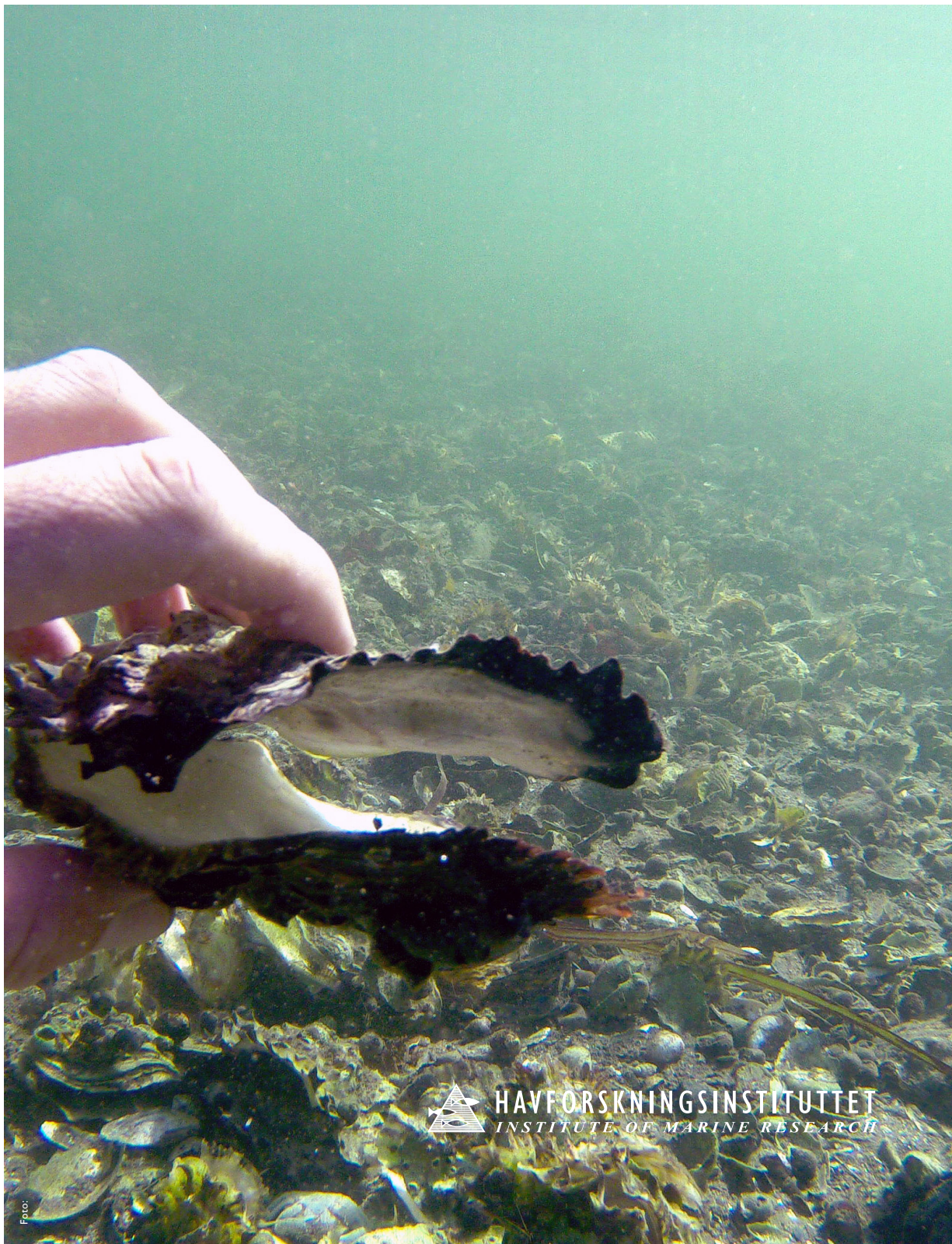


# Massedød av stillehavsosters, *Crassostrea gigas*, i Sverige og Norge, september 2014

UNDERSØKELSER AV ØSTERS FRA VESTFOLD OG  
FUNN AV ØSTERS HERPESVIRUS (OshV-1  $\mu$ var)

Stein Mortensen, Torjan Bodvin, Cecilie K. Skår, Lisbeth Sælemyr, Anders Jelmert,  
Jon Albretsen og Lars-Johan Naustvoll



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET  
INSTITUTE OF MARINE RESEARCH



# **Massedød av stillehavsøsters, *Crassostrea gigas*, i Sverige og Norge, september 2014**

**Undersøkelser av østers fra Vestfold og funn av østers herpesvirus (OsHV-1  $\mu$ var)**

Stein Mortensen, Torjan Bodvin, Cecilie K. Skår, Lisbeth Sælemyr,  
Anders Jelmert, Jon Albretsen og Lars-Johan Naustvoll

Havforskningsinstituttet, 24. oktober 2014

## **Bakgrunn**

Stillehavsøstersen, *Crassostrea gigas*, er en asiatisk art som er innført til Europa, og produseres i stor skala i Mellom-Europa. Arten regnes som svært tilpasningsdyktig og ekspansiv, og har etablert seg i vill tilstand i det meste av Syd- og Mellom-Europa. Stillehavsøstersen kan danne tette bestander som kan ha betydelig påvirkning på økosystemene. Den regnes således som ”invaderende” og er svartelistet i Norge. Arten har de siste årene også etablert seg i Skandinavia. Det er sannsynlig at etableringen hovedsakelig er et resultat av at østersen gradvis har forflyttet seg fra Vadehavet (Nederland–Tyskland–Danmark) ved drift av larver med kyststrømmene ([Wrange m.fl. 2010](#)). Det er også mulig at utsetninger av stillehavsøsters i dyrkingsanlegg noen steder kan ha bidratt til spredning. Spredningen er beskrevet og blir fulgt opp av et skandinavisk nettverk av forskere, både ved bestandsovervåking og genetiske analyser. Det er også utarbeidet en rapport som vurderer effekten av videre spredning på økosystemene i nordiske kystfarvann ([Dolmer m.fl. 2014](#)).

Utbredelsen på den svenske vestkysten, nordover til Oslofjorden og langs kysten av Vestfold har skjedd raskt (siden 2006–2007). Vi registrerer arten stadig lenger nord. Det til nå nordligste funnet er ved Lindås, nord for Bergen. Funn de siste årene tyder på at det er i ferd med å etablere seg lokale bestander i flere områder.

Mange områder i Mellom-Europa opplever høy sommerdødelighet av stillehavsøsters. Det er vist at dødeligheten kan forårsakes av flere samvirkende faktorer. Det er imidlertid dokumentert at østers herpesvirus (OsHV-1) og bakterien *Vibrio aestuarianus* kan forårsake sykdom og medvirker i sykdomsbildet. OsHV-1 finnes i flere varianter, og det er tidligere vist at viruset kan forårsake dødelighet hos larver og yngel hos både stillehavsøsters, flatøsters (*Ostrea edulis*), stort kamskjell (*Pecten maximus*) og teppeskjell (*Ruditapes decussatus* og *Ruditapes philippinarum*). Viruset kan også finnes hos voksne skjell, men vanligvis uten å forårsake dødelighet ([Batista m.fl. 2007](#); [Burge m.fl. 2011](#)). Varianten OsHV-1  $\mu$ var regnes som særlig patogen for stillehavsøsters ([Segarra m.fl. 2010](#)) og forbundet med høy dødelighet i Frankrike, Irland og Storbritannia. Det gjøres stadig flere funn av denne varianten, og det fryktes at den skal spre seg i områder hvor det produseres stillehavsøsters.

## Registrering av dødelighet av stillehavsøsters i september 2014

Den varme sommeren 2014 ga mange steder gunstige vilkår for stillehavsøstersen, og det er registrert sterke gytinger og yngelnedslag, blant annet i Tønsbergfjorden og i Mefjorden ved Sandefjord (figur 1). Det er flere steder registrert mellom 20 og 30 yngel på enkelte eldre skjell, men samtidig har det vært observert en svært høy dødelighet på både 2013- og 2014-årsklassene. Også i Tønsbergfjorden ble det registrert høyt yngelnedslag ved Hui (opptil 27 yngel per voksent skjell). Tilsvarende er også rapportert fra Sandspollen og Sætrepollen i Indre Oslofjord (E. Rinde, NIVA, pers.medd.).



**Figur 1:** Gyting av stillehavsøsters i slutten av juli 2014. Yngelavsetning (hvitt belte), Sandefjord, i slutten av september.

Østersklekkeriet Ostrea AB på Koster i Sverige har fått tillatelse til å produsere yngel av stillehavsøsters for videresalg. Den 19. september mottok Havforskningsinstituttet en e-post fra Åsa Strand (Universitetet i Göteborg) der hun informerte om at det i uke 37 ble observert en massiv dødelighet på yngel i østersanlegget på Koster. Det ble også opplyst at dette skjedde samtidig som det ble registrert en endring i strømforholdene fra en oppstrømssituasjon til et system med sydgående strømmer. Saltholdigheten falt fra 34 til 24 ppm. Senere ble et mindre antall ville bestander undersøkt. Bestandene på Koster så ut til å være lite påvirket, mens det ble påvist en dødelighet på nærmere 100 % for både yngel og voksne østers i bestander i nærheten av Strömstad.

Den 23. september fikk Havforskningsinstituttet en henvendelse fra Mattilsynet i Vestfold med rapport om massiv dødelighet på stillehavsøsters i Tønsbergfjorden. Det ble senere bekreftet at de første tegn ble observert en uke tidligere (15. september). Samme dag mottok vi tilsvarende melding om død stillehavsøsters i Kurefjorden (Østfold) og ned mot Hankø. Gunnar Larsen (Fiskeridirektoratet) bekreftet også dødelighet mellom Engelsvik og Hankø. Senere kom det meldinger om dødelighet i Sandefjord, Hallangspollen og Sandspollen. Den tidligste registreringen var fra Hallangspollen 9. september.

Det ble ikke registrert dødelighet i undersøkte bestander i Risør, Tvedestrand eller Arendal. Det er ingen innrapportering fra Larvik, Porsgrunn, Bamble eller Kragerø.

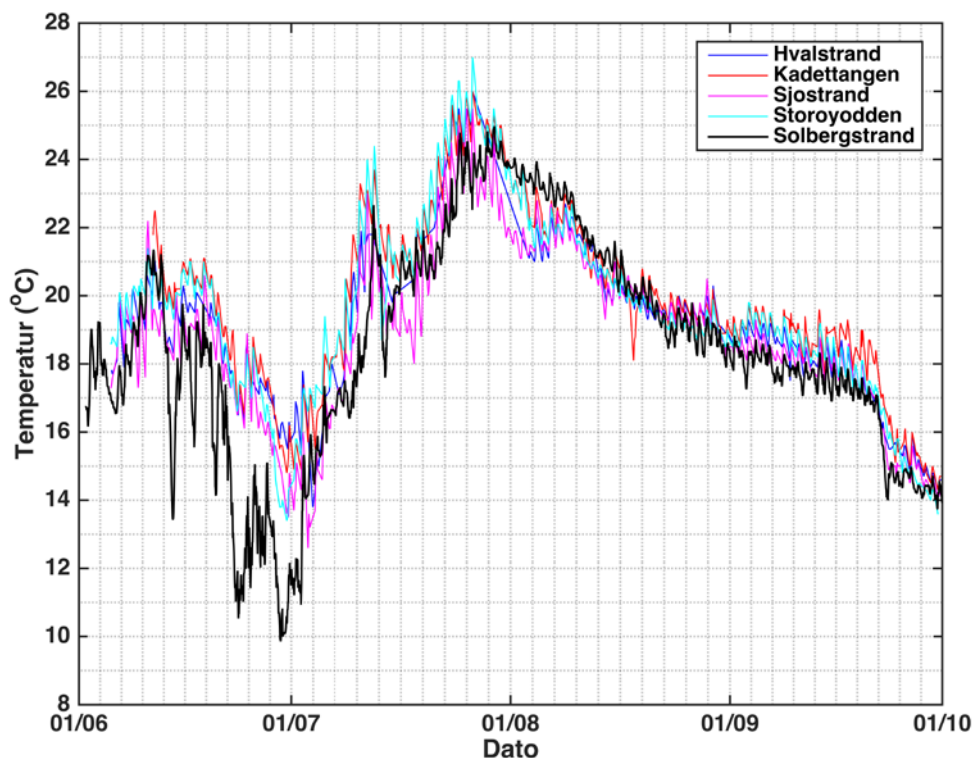
### **Oppfølging av dødeligheten: Registreringer i Vestfold**

Basert på forespørselen fra Mattilsynet i Vestfold reiste Anders Jelmert og Torjan Bodvin fra Havforskningsinstituttets forskningsstasjon i Flødevigen til Vestfold den 24. september. Det ble først holdt et møte med Mattilsynet for å bli oppdatert om situasjonen. Deretter ble to lokaliteter i Røssesundet inspisert. Her ble det ikke observert dødelighet. Dagen etter ble det gjort en synfaring ved Hui i Tønsbergfjorden. Dette er en av de lokalitetene som har inngått i det nasjonale overvåkingsprosjektet i regi av Miljødirektoratet ([Bodvin m.fl. 2013](#)). Statens [Naturopsyn](#) og Skjærgårdstjenesten sto for transporten. I tillegg til teamet fra Havforskningsinstituttet, deltok en representant fra Mattilsynet, den lokale rapportøren samt et team fra NRK og en journalist fra Tønsberg Blad.

Det ble så gjennomført en ruteanalyse for å få eksakte data for dødelighet. Analysen viste at 50–75 % av årets yngel var døde. Tilsvarende var nærmere 95 % av fjorårsyngelen død og ca. 50 % av østersene som var eldre enn dette. Det ble imidlertid ikke observert ”ny-døde” stillehavsøsters, da alle døde skjell var tomme for skjellmat. Det ble videre gjennomført en kartlegging av ytterligere fem lokaliteter i Tønsbergfjorden. På fire av disse ble det funnet høg dødelighet, men på sørenden av Veierland ble det funnet en bestand uten dødelighet. Det er senere rapportert at stillehavsøsters høstet 26. august på Hui, fortsatt var i live i begynnelsen av oktober.

### **Temperaturforholdene i Indre Oslofjord 2014**

Sommerdødelighet hos stillehavsøsters er registrert i en rekke europeiske land ([EFSA 2010](#)). I tillegg til forekomst av sykdomsfremkallende virus og bakterier, knyttes hendelsene i stor grad til svekkede skjell i etterkant av gyting, kombinert med høye vanntemperaturer.



**Figur 2:** Vanntemperaturer Indre Oslofjord sommeren 2014. Solbergstrand 1 m, resten 0,4 m.

Som det fremgår av figur 2, ble det i Oslofjorden målt opp mot 27 °C i slutten på juli på ca. 0,4 meters dyp. Det er ikke registrert så høye maksimumstemperaturer i perioden etter 2008, da den første stillehavsøstersbestanden ble påvist på Hui i Tønsbergfjorden. Gyting ble registrert i omtrent samme tidsrom (figur 1). Den første dødeligheten ble registrert i Hallangspollen 9. september. Selv om det ikke ble målt vanntemperaturer inne i Hallangspollen i den aktuelle periode, er det ingen grunn til å tro at vanntemperaturen her var lavere enn de registrerte målinger som er gjort i mer åpent vann.

### **Overvåking av mikroalger i indre Skagerrak og Oslofjorden**

Det er blitt spekulert i om massedøden av stillehavsøsters kan være forårsaket av giftige alger. Havforskningsinstituttet gjennomfører overvåking av mikroalger i Oslofjorden og langs Skagerrakkysten på oppdrag for Mattilsynet i forbindelse med OK-programmet ”Skadelige alger”, med ukentlige prøvetakninger. I tillegg gjennomfører vi annen overvåking i Oslofjorden, med stasjoner i sidefjorder og sentralt i fjorden. I forbindelse med den registrerte massedøden av stillehavsøsters fra Drøbak til Hvaler i øst og Sandefjord i vest, har vi gjennomgått dataene for Oslofjorden.

I slutten av august (uke 34 og 35) pågikk det en oppblomstring av kalkalgen *Emiliana huxleyi* i indre del av Oslofjorden. I de ytre delene (Fredrikstad, Ytre Hvaler, Tønsberg og Larvik) var det moderate til lave tettheter av alger med dominans av kiselalger. Utenfor Arendal var det

høye tettheter av mikroalger med en blanding av kiselalger og dinoflagellater (*Ceartium*). De to første ukene av september (36 og 37) var ulike arter av kiselalger dominerende i de ytre områdene av Oslofjorden. Brakkvannsarter var mest fremtredende. I indre del av Oslofjorden pågikk *E. huxleyi* fortsatt. Ved Arendal ble det registrert forholdsvis høye tettheter av uidentifiserbar flagellat (15–20 µm) i uke 36, mens kiselalger dominerte i uke 37. I uke 38 var forholdene mer eller mindre uforandret ved stasjonen i Oslofjorden. Kiselalger var mest fremtredende ved alle stasjonene også i indre fjord der *E. huxleyi*-oppblomstringen var avsluttet. Ved Arendal ble *Dictyocha (fibula og speculum)* ble observert. For de tre første ukene i oktober (40, 41 og 42) dominerte kiselalger i de indre deler av Oslofjorden (Asker) og de beskyttede delene i Hvaler. For mer eksponerte stasjoner (Tønsberg, Ytre Hvaler og Larviksfjorden) var kiselalger også tallrike, men ved Ytre Hvaler og Larvik var *Dictyocha* spp (*fibula og speculum*) tallrike både ”nakne” former og former med ”skjelett”. Tettheten av *Dictyocha* har økt ved de eksponerte stasjonene i oktober.

Det ble ikke registrert ekstreme konsentrasjoner av mikroalger i perioden (medio august til medio oktober) som skulle kunne forårsake dødelighet av marine organismer. Det var forholdsvis få observasjoner av toksinproduserende arter (”skjelligifter”) i området og få/ingen arter som tidligere er knyttet til fiskedødelighet i våre farvann.

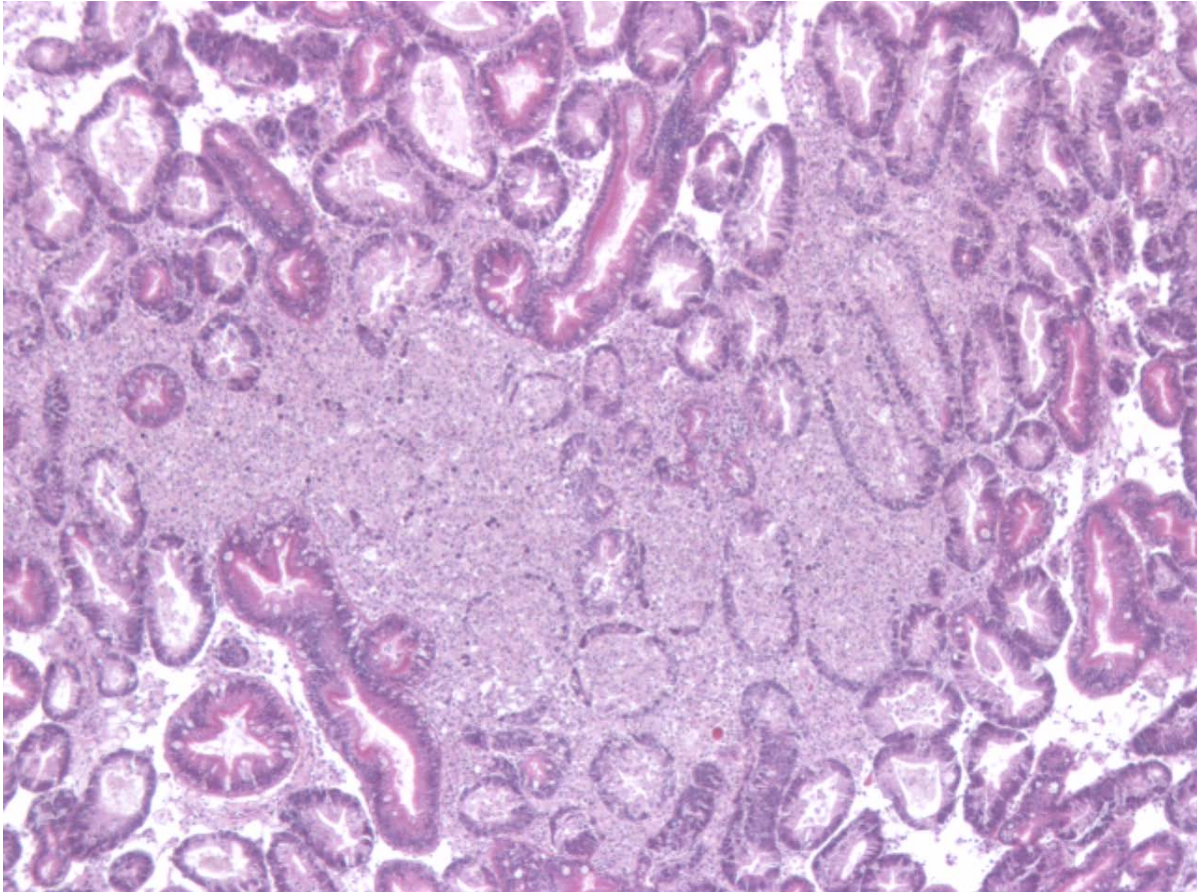
*Dictyocha speculum* har tidligere vært knyttet til dødelighet hos fisk på grunn av mekaniske skader i gjellene ved høye konsentrasjoner. Det er kjent fra litteraturen at høye konsentrasjoner av enkelte arter av dinoflagellater (eks *Akashiwo sanguinea*) kan ha negativ effekt på stillehavsøsters. Arten har ikke vært registrert hos oss i den aktuelle perioden. *Pseudochattonella* og *Vicicitus* (tidligere kalt *Chattonella*) har hovedsakelig vært knyttet til dødelighet hos fisk. I litteraturen er det ingen tydelige sammenhenger mellom disse artene og dødelighet hos stillehavsøsters. I norske farvann fant dødeligheten av stillehavsøsters sted i begynnelsen av september i Ytre Oslofjord, i den aktuelle perioden var sammensetningen av planteplankton tilnærmet normal. Arter som er trukket frem i diskusjon omkring dødeligheten ble først tallrike i månedsskiftet september–oktober. Basert på algesammensetningen ser det ut til at det har vært forholdsvis stor tilførsel av ferskvann til ytre del av Oslofjorden i denne perioden.

### **Innsending av materiale og analyser ved Havforskningsinstituttet**

Det ble tatt ut 20 overlevende stillehavsøsters fra bestanden ved Hui den 25. september. Det ble i tillegg tatt ut to blåskjell og fem flatøsters. I tillegg ble det, som kontroll, hentet tre stillehavsøsters fra en lokalitet i Tvedestrand, hvor det ikke var registrert dødelighet. Skjellene ble fraktet levende til Bergen den 29. september.

Stillehavsøstersene fra Hui og Tvedestrand ble åpnet og vev fiksert i Davidsons fikseringsvæske, innleiret i paraffinvoks, snittet, farget og mikroskopert ved 50–1000 x forstørrelse. Det ble ikke observert parasitter eller bakterier i prøvene. Mikroskoperingen viste at skjellene gjennomgående var magre (tomme gonader og små lagre av opplagsnæring), samt passive fordøyelsesvev. Dette er generelle tegn som kan skyldes dårlig fødetilgang eller

dårlige miljøforhold. Effekten på fordøyelsesvev kan være forårsaket av lagring og transport. To skjell var døende. I ett skjell (nr. 17 som ble videre undersøkt, se under) ble det observert områder med oppløst vev i bindevev og fordøyelsesvev (figur 3). Dette ble vurdert som en patologisk forandring (sykdomstegn), men uten at det var mulig å påvise årsaken ved mikroskopering.

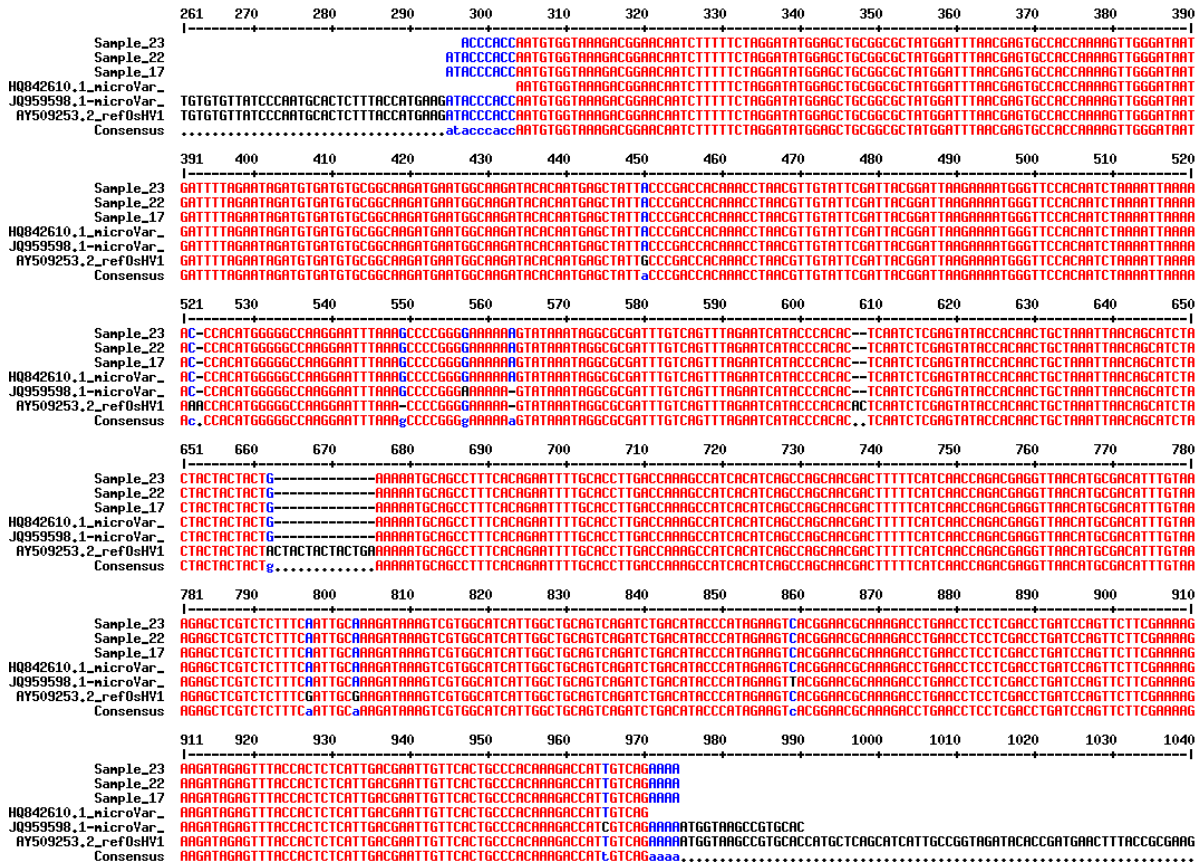


**Figur 3:** Vev fra stillehavsøsters fra Hui i Vestfold. Område i fordøyelsesvevet er nekrotisert, fordøyelsesvevet er oppløst og området fylt med oppløst cellemateriale og hemocytter. Paraffinnleiret snitt, HE-farge x 50.

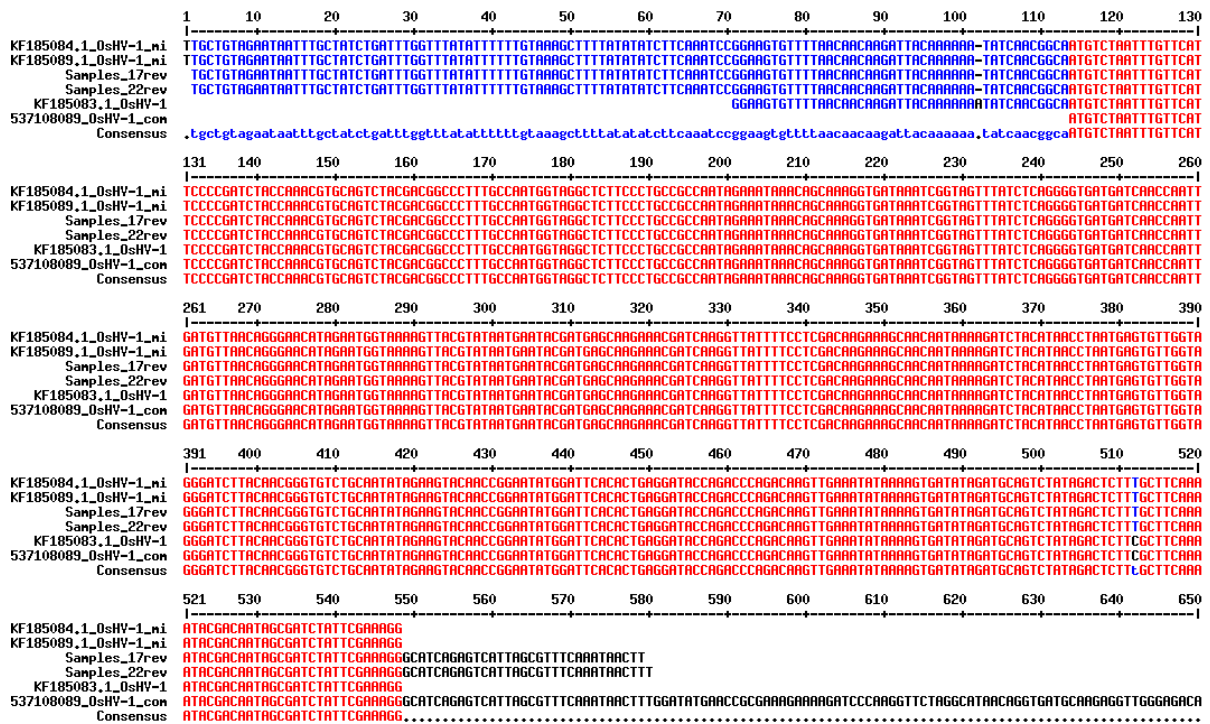
Det ble tatt ut biter av kappevev fra hver østers til PCR-analyse for østers herpesvirus (OsHV-1). DNA ekstraksjon og to ulike sanntids-PCR-analyser er gjort iht. prosedyre fra referanselaboratoriet og som beskrevet av [Barbosa-Solomieu m.fl. \(2004\)](#), [Pepin m.fl. \(2008\)](#) og [Webb m.fl. \(2007\)](#). Den sistnevnte metoden er den ene av to metoder som nå blir brukt ved referanselaboratoriet i Frankrike for screening av OsHV-1. Metoden detekterer alle varianter av OsHV-1 som hittil er beskrevet, men skiller ikke mellom OsHV-1 ([GenBank # AY509253](#)) og OsHV-1  $\mu$ var ([GenBank # HQ842610](#)). Begge analysene ga positivt utslag på østers herpesvirus (OsHV-1) på 19 av 23 skjellprøver. For å verifisere resultatet ble PCR-produktene fra 4 positive østers og positiv kontroll amplifisert ved bruk av primerparene C2 og C6, samt IA1 og IA2 ([Renault & Arzul 2001](#), [Segarra m.fl. 2010](#)). DNA ble sekvensert på sekvenslaboratoriet ved Universitetet i Bergen. I prøver som var amplifisert ved bruk av primerne C2 og C6 var det 100 % samsvar med sekvenser fra OsHV-1  $\mu$ var (HQ842610.1,



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HQ842610.1>) som hører til stamme *ostreid herpesvirus 1* microvar (OsHV-1μvar). Se figur 4. Prøvene 17 og 22 som ble amplifisert og sekvensert ved bruk av primerne IA1 og IA2 var også 100 % i samsvar med sekvenser fra OsHV-1 μvar (KF185084.1 og KF185089.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KF185089.1>) (figur 5).



**Figur 4:** Sekvenssammenstilling av PCR-produkter amplifisert fra stillehavsosters, prøver nr. 17, 22 og 23, ved bruk av PCR-primere C2 og C6 lokalisert i ORF4 hos *ostreid herpesvirus 1* (som beskrevet i Segarra m.fl. 2010).



**Figur 5:** Sekvenssammenstilling av PCR-produkter amplifisert fra stillehavsøsters, prøver nr. 17 og 22, ved bruk av PCR primere IA1 og IA2 lokalisert i ORF43 hos *ostreid herpesvirus 1* (som beskrevet i Segarra m.fl. 2010).

## Diskusjon og konklusjoner

Det er registrert høy dødelighet i stillehavsbestander fra Sverige (Strömstad-området) til Oslofjorden, vestover til Tønsberg-området. Dødelighetstilfellene er påfallende sammenfallende i tid og forløp, noe som kan tyde på en felles årsak.

Temperaturdata fra Oslofjorden viser at skjellene har opplevd en svært høy temperatur etter gyteperioden, noe som kan ha ført til en svekking og økt risiko for sykdom. Algedata fra området underbygger vår antakelse av at dødeligheten ikke er forårsaket av, eller påvirket av, tilstedeværelse av kjente skadelige mikroalger. Det er dokumentert at enkelte arter av skadelige alger vil kunne ha en negativ effekt (men ikke akutt dødelighet) på stillehavsøsters, men disse artene ble ikke registrert i den aktuelle perioden i Oslofjorden. Det bemerkes også at dødeligheten var artsspesifikk; det ble ikke registrert dødelighet av blåskjell og flatøsters i de affiserte områdene. Dette tyder på at dødeligheten var forårsaket av sykdom, ikke miljøforhold.

Prøver fra 20 stillehavsøsters fra Hui i Vestfold samt tre skjell fra Tvedestrand ble undersøkt mikroskopisk. Mikroskoperingen viste sykdomstegn i én østers fra Hui, men det kunne ikke observeres sykdomsfremkallende organismer i prøven. Det ble gjort sanntids-PCR-analyser av vevsprøver som ga positivt utslag på østers herpesvirus (OsHV-1) på 19 av 23 skjellprøver, inklusiv to stillehavsøsters fra Tvedestrand (hvor det ikke er registrert dødelighet).

Sekvensering av DNA fra disse bekrefter at vi har OsHV-1  $\mu$ var til stede i østersen både ved Hui og Tvedestrand. OsHV-1  $\mu$ var er en variant som ser ut til å være særlig patogen for stillehavsøsters (Segarra m.fl. 2010), og forbundet med høy dødelighet i Frankrike, Irland og Storbritannia. Funnet av denne varianten gjør det sannsynlig at viruset var medvirkende årsak til dødeligheten på bestandene i Vestfold.

Funn av OsHV-1  $\mu$ var kan få konsekvenser for skjellnæringen. EU innførte i 2010 en forordning (Commission Regulation (EU) No 175/2010, senere erstattet av Commission Regulation No 350/2011) som krever at det skal dokumenteres at stamskjellbestander av stillehavsøsters er fri for OsHV-1  $\mu$ var før det omsettes yngel til videredyrking i andre områder (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:097:0009:0019:EN:PDF>). Forordningen inkluderer også gjenutleggingsområder og levendelagre for konsumskjell. Det er satt i gang en prosess som viderefører forordningen og hvor det arbeides for å få infeksjoner med OsHV-1  $\mu$ var inkludert i OIEs liste over meldepliktige sykdommer. Det er derfor behov for en oversikt over utbredelse, samt hvilke typer/varianter av OsHV-1 som finnes i stillehavsøstersen i hele artens utbredelsesområde. Det er også viktig å belyse om andre skjellarter kan fungere som bærere eller reservoarer av viruset.

Det arbeides videre for å identifisere andre forhold som kan ha hatt innvirkning på dødeligheten i september. Arbeidet vil bli koordinert med svenske kolleger for å oppklare mulige årsaker til dødelighetene som ble registrert i svenske bestander, og danne et mer fullstendig bilde av situasjonen.

## Takk

Takk til Ingrid U. Fiksdal for prosessering av materiale og Stéphane Villoing og Egil Karlsbakk for hjelp med tolking av sekvensdata.

## Kilder

- Barbosa-Solomieu V, Miossec L, Vazquez-Juarez R, Ascencio-Valle F, Renault T (2004). Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *Journal of Virological Methods* 119: 65-72.
- Batista FM, Arzul I, Pepin J-F, Ruano R, Friedman CS, Boudry, Renault T (2007). Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. *Journal of Virological Methods* 139: 1-11.
- Bodvin T, Moy F, Jelmert A, Mortensen, S (2013). Registrering av vekst og fortetning av stillehavsøsters (*Crassostrea gigas*) på fem utvalgte lokaliteter. Årsrapport 2013. Rapport fra Havforskningsinstituttet nr 34-2013. 23 sider.
- Burge CA, Strenge RE, Friedman CS (2011). Detection of oyster herpesvirus in commercial bivalves in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 94: 107-116.
- Dolmer P, Holm MW, Strand Å, Lindegarth S, Bodvin T, Norling P, Mortensen S (2014). The invasive Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Scandinavian coastal waters: a risk assessment on the impact in different habitats and climate conditions, *Fisken og havet* nr 2, 2014, 67 s.

EFSA Panel on Animal Health and welfare (2010). Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. EFSA Journal 2010:8(11):1894

Pepin JF, Riou A, Renault T (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. Journal of Virological Methods 149:269-276.

Renault T, Arzul I (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. Journal of Fish Diseases 24:161-167.

Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T (2010) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. Virus Research 155: 28-34

Webb SC, Fidler A, Renault T (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. Aquaculture 272: 126-139.

Wrange AL, Valero J, Harketstad LS, Strand Ø, Lindegarth S, Christensen HT, Dolmer P, Kristensen PS, Mortensen S (2010) Massive settlements of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Scandinavia. Biological Invasions, 12 (5):1145- 1152 (DOI: 10.1007/s10530-009-9535-z).