

2247

NINA Rapport

Ranid herpesvirus 3 påvist på buttsnutefrosk

Ny amfibiesykdom konstantert på seks populasjoner av buttsnutefrosk, *Rana temporaria*, i Norge

Annette Taugbøl, Jeroen van der Kooij & Francesco Origi



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på engelsk, som NINA Report.

NINA Temahefte

Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. Heftene har vanligvis en populærvitenskapelig form med vekt på illustrasjoner. NINA Temahefte kan også utgis på engelsk, som NINA Special Report.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler og i populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Ranid herpesvirus 3 påvist på buttsnutefrosk

Ny amfibiesykdom konstantert på seks populasjoner av buttsnutefrosk, *Rana temporaria*, i Norge

Annette Taugbøl
Jeroen van der Kooij
Francesco Origgì

Taugbøl, A., van der Kooij, J & Origgi, F. 2023. *Ranid herpesvirus 3* påvist på buttsnutefrosk- Ny amfibiesykdom konstantert på seks populasjoner av buttsnutefrosk, *Rana temporaria*, i Norge. NINA Rapport 2247. Norsk institutt for naturforskning.

Lillehammer, Januar, 2023

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-5043-6

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

[Åpen]

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Frode Næstad

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Kristin Evensen Mathiesen

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-2468|2023

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Ingrid Regina Reinkind

FORSIDEBILDE

Frosk med store *Ranid herpes 3*- blemmer. © Jeroen van der Kooij

NØKKELOORD

- Nittedal
- Lillehammer
- Sykdom
- Amfibier
- eDNA
- Miljø-DNA
- miljøDNA
- Ranid herpes
- Virus

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo
Sognsveien 68
0855 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø
Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer
Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen
Thormøhlens gate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Taugbøl, A., van der Kooij, J & Origgi, F. 2023. *Ranid herpesvirus 3* påvist på buttsnutefrosk- Ny amfibiesykdom konstantert på seks populasjoner av buttsnutefrosk, *Rana temporaria*, i Norge. NINA Rapport 2247. Norsk institutt for naturforskning.

Det har lenge vært kjent at herpesvirus infiserer frosk og padde, men i hvilken grad og hvilken effekt infeksjonen har på bestandene er i stor grad ukjent. Frosk og padde infisert med *Ranid herpesvirus* er som regel assosiert med synlige utvendige gelelignende utvekster, men dette trenger ikke nødvendigvis alltid å være tilfelle (ulike sykdomstegn for de tre ulike kjente *Ranid herpesvirus*-ene som kan infisere amfibier).

Det ble svabret 10 frosk fra Sørli i 2021, der hele seks av ti prøver ble bekreftet positive, også fra frosk som ikke hadde synlige blemmer. En utvidet kartlegging av frosk og juvenile i 2022 påviste viruset i alle de fire geografiske områdene der det ble samlet inn frosk; Lillehammer, Sørli, Skytta og Gjelleråsen. I tillegg ble det for første gang bekreftet positive funn fra juvenile frosk (rompetroll)- noe som indikerer at adulte frosk smitter eggene i vannet; kunnskap som kan brukes for å begrense smitteomfanget i allerede infiserte dammer.

Vi har per i dag undersøkt et meget begrenset geografisk område i Norge for smitte, og det er meget begrenset kunnskap i litteraturen om konsekvenser av smitte av *Ranid herpesvirus* for frosk. Videre er det per i dag svært få amfibiepopulasjoner som overvåkes i Norge, så det vil være vanskelig å fange opp eventuell økt dødelighet direkte fra viruset og ikke f.eks. lav naturlig overlevelse av andre årsaker. Buttsnutefrosk er fortsatt vanlig i Norge, men bør allikevel inn i et overvåkningsprogram over populasjonstrender sammen med andre amfibier, da amfibier har blitt en svært sårbar gruppe på kort tid. En metode som kan vurderes er overvåkning av antall dyr ved standardisert innfangning og/eller telling av eggklaser, samt for eksempel genotyping av immungener (MHC-loci) for å følge opp genetisk diversitet innen populasjoner og områder.

Forfattere:

- Annette Taugbøl, Vormstuguvegen 40, 2624 Lillehammer, annette.taugbol@nina.no
- Jeroen van der Kooij, Naturformidling, konsekvensutredning og forskning, Rudsteinveien 67, 1480 Slattum, jevader@online.no
- Francesco Origgi, Institute of Animal Pathology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Länggassstrasse 122, 3001 Bern-CH, francesco.origgi@vetsuisse.unibe.ch

Innhold

Sammendrag.....	3
Forord.....	5
Innledning.....	6
1.1 Kort om parasitter.....	6
1.2 Kort om amfibier og deres immunsystem.....	6
1.3 Kort om <i>Ranid herpesvirus</i>	7
Materialer og metoder.....	8
2.1 Områdebeskrivelse.....	8
2.2 Innsamlingsprotokoll.....	8
Resultater og diskusjon.....	9
Referanser.....	11
Tilleggsinformasjon.....	12

Forord

Som en del av et kartleggingsoppdrag fra Miljødirektoratet, som omfattet påvisning av soppen *Batrachyrium dendrobatidis* (*Bd*) i Oslo-området, ble det våren 2021 også samlet inn svabre-prøver fra frosk ved Sørli i Nittedal. Prøvene ble samlet inn fra frosker som var på vei til gytedammen etter hibernering. Det ble ikke påvist *Bd* fra Sørli, men siden det ble oppdaget blemmelignende geleklumper på ryggen til to av individene (**Figur 1**) sendte vi bildene til kollegaer i Europa som gjorde oss oppmerksomme på at dette kunne dreie seg om herpesvirus. Prøvene fra Sørli ble derfor sendt til Bern Universitet, da det her nylig var beskrevet en ny type *Ranid* virus og oppsettet for testing allerede var på plass. Prøvene ble senere bekreftet positive og det ble gitt midler for en utvidet testing av frosk i Nittedalsområdet. Denne rapporten omfatter en oppsummering av resultatene fra innsamlingen 2021, samt resultatene fra den utvidede innsamling i Nittedal og Lillehammer våren 2022 – der det helt tilfeldig også ble oppdaget gelelignende klumper på frosk da seksåringen i huset var ute på fangst.

Prosjektet har vært finansiert av Miljødirektoratet og vi ønsker å rette en spesiell takk til Ingrid Regina Reinkind for god oppfølging av prosjektet.

Januar, 2022
Annette Taugbøl



1 Innledning

1.1 Kort om parasitter

Virus er små, obligate intracellulære parasitter som inneholder RNA eller DNA. Parasitter utgjør en stor andel arter og er viktige i de fleste økosystemer. I navnets betydning er en parasitt noen som utnytter andre, der det økologiske forholdet mellom en parasitt og dens vert klassifiseres etter hvordan utkommet er for hver partner; positivt, negativt eller nøytralt. Ved negativt utfall for en vert vil seleksjon favorisere verter som ikke blir smittet, eller verter som tolererer smitten ved å svekke parasitten.

At en vert unngår å bli infisert kan ha genetiske årsaker, ved at for eksempel immungener kan gi resistens mot en spesifikk parasitt, eller på andre måter svekker parasittens evne til å oppholde seg i eller formere seg i verten. For å overleve må parasitten evolvere seg i takt med vertens forsøk på å stenge den ute, og kampen mellom å utvikle nye trekk for å unngå å bli oppdaget, å svekkes eller å nøytraliseres går i en jevn evolusjonær runddans mellom arter- også kalt «The Red Queen» -hypotesen (Van Valen, 1973). Slike strategier er kostbare og selektert for kun så lenge reduksjonen i tilpasningsevne er høyere enn kostnaden av parasittens resistens eller toleranse. Siden evolusjonære tilpasningsevner ikke er uendelige vil populasjoner og/ eller arter som ikke lengre klarer å holde tritt i «Red-Queen-kappløpet» dø ut. En metode å bekjempe parasitter på er via immunsystemet.

1.2 Kort om amfibier og deres immunsystem

Amfibier er verter for en hel del ulike parasitter, der påvirkningsgraden spenner fra lav til dødelig for ulike amfibiarter (Herczeg et al. 2021). Amfibier er en forholdsvis avansert dyregruppe og har et velutviklet immunsystem med mange likheter til de mer utviklede vertebratene. Immunsystemet består av to hoveddeler; en medfødt/ uspesifikk del (engelsk: *innate*) og en ervervet/ spesifikt del (engelsk: *adaptivt*).

Det uspesifikke immunforsvaret består i første rekke av en fysisk barriere, som hud og ulike slimhinner, som gjør det vanskeligere for patogenene å komme inn i vertcellene. Det er videre ikke bare huden i seg selv som beskytter mot infeksjoner, da hudlaget hos de fleste organismer også består av ulike typer substanser. Substansene på huden kan igjen deles opp i en aktiv (fra verten selv) og en passiv del (indirekte fra verten). Den aktive delen i det passive immunforsvaret består av antimikrobielle peptider, steroider, alkaloider, og de passive delene består av «microbiomet»; som er bakterier og sopp som lever i hudlaget, der ulike typer bakterier f.eks kan spise opp angripende sopp direkte, eller også skille ut stoffer tilsvarende det verten gjør selv.

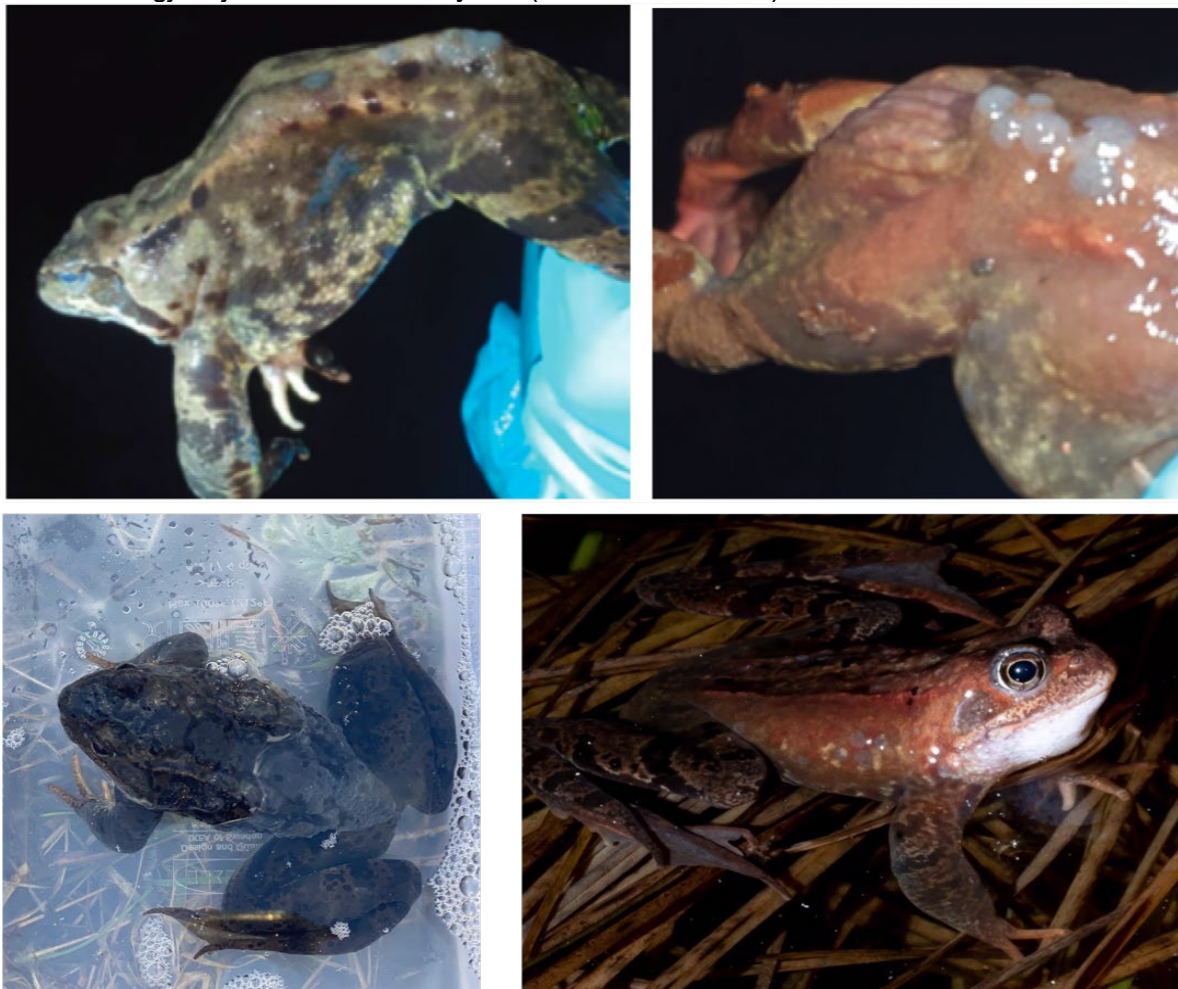
Neste del av det uspesifikke immunsystemet består av en noe mer spesialisert del, bygd opp av ulike typer «uspesifiserte» celler hvis funksjon er å drepe egne celler infisert med fremmedlegemer; spise opp infiserte celler (engelsk: *engulf*), samt å gi signaler videre til B- og T-celler i det adaptive immunsystemet. Det adaptive systemet er det vi kjenner som «immunitet», da tidligere smitte og/eller vaksiner gjør at vi sjelden blir syk av de samme patogenene flere ganger via «minne-T-celler».

Amfibier er vekselvarme dyr med forholdsvis tynn hud, der særlig det innate immunsystemet er avhengig av ytre forhold for å kunne virke optimalt (øko-immunobiologi). Abiotiske forhold, som temperatur, og biotiske forhold, som sammensetning av bakterier i gytedammen, kan gi ulike grader av tidlig beskyttelse mot patogener. Selv om immunsystemet gir beskyttelse mot mange naturlige parasitter, vil blant annet pågående klima-effekter, forurensing og innavl (som på sikt vil gi lavere genetisk variasjon også i immungener) som følge av tapte habitat, føre til nye likevekter for parasitt/vertforholdet, samt at det med økt spredning av arter fører til økt innslag av fremmede patogener, som ofte gir store konsekvenser for naive verter. Pågående klimaeffekter kan for eksempel føre til lavere enn normale-snømengder over ett eller flere år, som kan redusere vinteroverlevelse, lavere nedbør om våren kan gi uttørring av gytedammene, som igjen vil redusere tilskuddet av års-yngel til den totale bestanden.

1.3 Kort om *Ranid herpesvirus*

Det har lenge vært kjent at herpesvirus infiserer frosk og padde (Mckinnell, 1973), men i hvilken grad og hvilken effekt infeksjonen har på bestandene er i stor grad ukjent. Frosk og padde infisert med *Ranid herpesvirus* er som regel assosiert med synlige geleilignende utvekster på huden, men smittede individer trenger ikke alltid å ha synlige blemmer. Bortsett fra å danne svulster i hudlaget, kan RaHV-1- viruset også infisere metastatiske celler i lever, fettvevet og blære. Infeksjon påvirker også genetisk transkribering av ulike gener (Origgi et al. 2021).

Per i dag er det beskrevet tre ulike herpesvirus med amfibier som verter; *Ranid herpesvirus 1* (RaHV-1, også kalt Lucké kreft herpesvirus), *Ranid herpesvirus 2* (RaHV-2, også kalt froskevirus 4) og *Ranid herpesvirus 3*, alle i ordenen Herpevirales. Analyser av DNA-genomet til RaHV-1 og RaHV-3 viser tilhørighet i Alloherpesviridae-familien (Origgi et al. 2017), som er genetisk separert fra herpesvirus som infiserer vertebrater. Tilgang til DNA sekvenser av viruset har også gjort det enklere å gjenkjenne konserverte områder på DNAet som kan brukes til å gjenkjenne arten molekylært (Licheri et al. 2020).

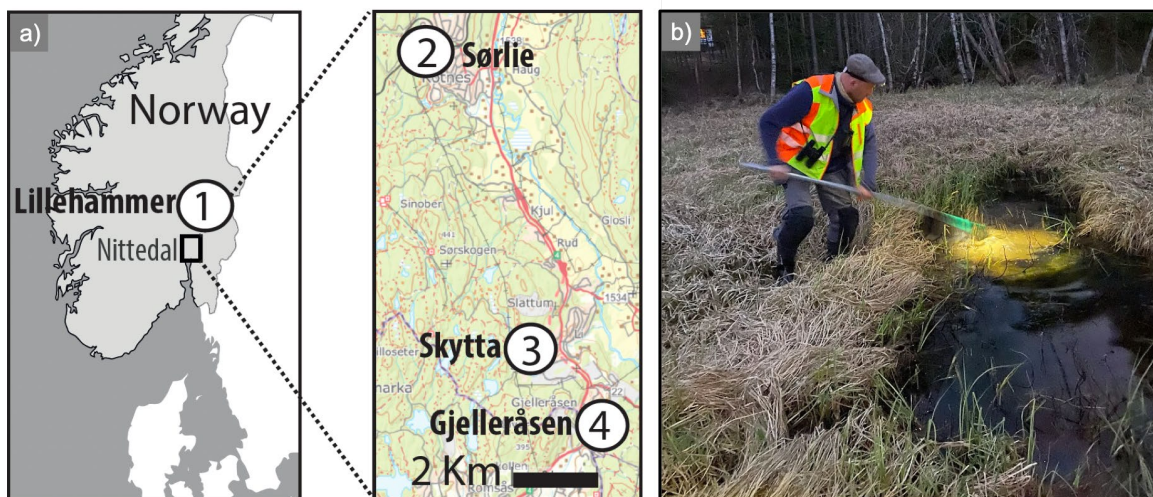


Figur 1. De to øvre bildene viser frosk fanget inn i 2021 i forbindelse med svabring av Bd, som senere viste seg å være infisert med RaHV-3. De to nedre bildene viser frosk fra henholdsvis Lillehammer og Sørliie samlet inn i 2022, der frosken til venstre har overlappende blemmer over hele bakparten, mens frosken til høyre har punktvisse blemmer på sidene. Foto: ©Jeroen van der Kooij/ Annette Taugbøl (frosken i Lillehammer).

2 Materialer og metoder

2.1 Områdebeskrivelse

Det ble samlet inn prøver fra ett område i 2021 (Sørli) og fra fire hovedområder i 2022 (Figur 2). Dammen i Lillehammer ligger ved en boligvei med spredt bebyggelse i beiteterrang. innsamlingsområdet ved Sørli består av to dammer (Lille og Store Vassøytjern); som blir betraktet som et damkompleks da dyrene vandrer mellom dammene. Dam-kordinater er oppgitt i tilleggsinformasjon som Tilleggstabell 1.



Figur 2. Innsamlingsområde. a) Norgeskartet viser grov posisjon for Lillehammer (1) og utsnitt av Nittedal, der kartutsnittet viser de tre innsamlingsområdene Sørli (2), Skytta (3) og Gjelleråsen (3). b) Viser innsamling med hovslag ved den ene dammen på Skytta.

2.2 Innsamlingsprotokoll

Froskene ble enten samlet inn på vei til dammen (for Sørli) eller aktivt hovet ut fra dammen. Ved innfangning av migrerende dyr ble hvert enkeltindivid/amplexus (en eller flere hanner som henger fast i en hunn) svabret direkte, mens ved innfangning med hov ble dyrene samlet i en bøtte før hver enkelt ble svabret og sluppet tilbake i dammen. Svaberen ble lagret i ATL-buffer før analyse av miljøDNA-spor fra virus på labb. Det ble totalt tatt prøver av 10 frosk ved Sørli i 2021, og totalt ble 27 frosk svabret i april/ mai 2022 for de fire geografiske områdene. Rompetrollene ble fanget inn fra fire dammer ved tre tidspunkt; 04.06, 26.06 og 10.07.2022 Etter fangst ble rompetrollene holdt i ca 0.3-0.4 liter vann i ca 1 time før vannet ble filtrert igjennom et 0.45-micron filter konservert i ATL-buffer.



Figur 3. Innsamling av rumpetroll.

3 Resultater og diskusjon

Det ble funnet positive RaHV-3 prøver fra samtlige områder testet i denne undersøkelsen, for både adulte frosker og på rumpetroll (Tabell 1). Herpesvirus er oppdaget i de fleste stedene der det er gjennomført kartleggingsstudier av utbredelsen (Franklinos et al. 2018), og det ble nylig også sekvensert en linje av viruset fra en sveitsisk padde, kalt *Bufo* *herpesvirus* 1 (BfHV1) (Origgi et al. 2018). Genetiske markører gjør identifisering av sykdom lettere og omfanget av påviste infiserte lokaliteter vil sannsynligvis øke fremover.

I Sveits har ulike paddepopulasjoner blitt observert med herpeslignende infeksjoner siden 2014, der de tilsynelatende kunne leve med infeksjonen da de ellers virket friske og bestanden holdt seg innenfor normale svingninger. I 2017 ble derimot flere dyr funnet omkommet, trolig av herpesinfeksjon (de hadde høye utbrudd av herpesvirus, men endelig dødsårsak er ukjent (Origgi et al. 2018)). Dette tilsier at populasjoner smittet med herpesvirus bør følges opp over tid, der man i tillegg til populasjonsestimering for populasjoner med allerede kjente utbrudd også må kartlegge utbredelsen til selve viruset/virusene. Per i dag er det ikke påvist *Ranid Herpesvirus* på padde i Norge, men det er kun 10 individer som er testet (fra Sørli, upubliserte resultater).

Tabell 1. Oversikt over positive *Ranid Herpesvirus -3* - resultater

Prøver	PrøveID	Område	Metode	Notater
Svabrer 2021	011,012*,013, 017*, 020	015, Sørli	Real Time PCR (upublisert), qualitative PCR*	Også testet <i>Bufo</i> <i>Bufo</i> : negative for BfHV1
Svabrer 2022	7, 11, 105	Sørli Skytta Lillehammer	Real time PCR (upublisert)	
Juvenile 2022	1, 2, 4, 7, 8, 10, 12	RumpetrollD Fontenedam Skytta Lillehammer	Real Time PCR (upublisert), qualitative PCR	

Frosk med større blemmer sees ofte på våren og om høsten. I verten øker RaHV-1 replikasjonen ved lavere temperaturer, i kontrast mot selve svulstene som øker ved høyere temperaturer. Ulike størrelser på blemmer kan derfor være relatert til alder på dyrene, slik at de øker med årene, men dette må undersøkes nærmere under naturlige forhold. Dyr fra nordlige breddegrader, med kortere sommersesong, slik som Norge, kan også dermed ha lengre perioder med virus-replikasjon. Observasjoner fra flere steder i Europa tyder på få observasjoner med blemmer under sommersesongen, noe som kan forklares med lavere replikasjon av viruset under høyere temperaturer, men også som en konsekvens av økt direkte dødelighet og/ eller som en økt predatortrisiko, som kan være tilfelle for dyr infisert med *Ranavirus* (Chinchar, 2014)- samtidig som det må påpekes at det observeres få dyr om sommeren. Dyr med små blemmer på våren vil ikke nødvendigvis utvikle synlige blemmer før sensommeren og kanskje allerede være i dårligere forfatning for overvintring enn friske individer. *Ranid herpes*-infeksjon er assosiert med dødelighetsutbrudd, og det er til dels anbefalt å ta ut svært smittede individer hvis disse oppdages, da man har hatt grunn til å tro at yngel infiseres, noe som vises fra rumpetrollprøvene i dette studie. Dette bør midlertidig testes ut i større omfang enn her.

Vi har per i dag undersøkt et meget begrenset geografisk område i Norge for smitte, og det er meget begrenset kunnskap i litteraturen om konsekvenser av smitte av *Ranid herpesvirus* for frosk. Videre er det per i dag svært få amfibiepopulasjoner som overvåkes i Norge, så det vil være vanskelig å fange opp eventuell økt dødelighet direkte fra viruset og ikke f.eks.

lav naturlig overlevelse av andre årsaker. Buttsnutefrosk er fortsatt vanlig i Norge, men bør allikevel inn i et overvåkningsprogram over populasjonstrender sammen med andre amfibier, da amfibier har blitt en svært sårbar gruppe på kort tid. En metode som kan vurderes er overvåkning av antall dyr ved standardisert innfangning og/eller telling av eggklaser, samt for eksempel genotyping av immungener (MHC-loci) for å følge opp genetisk diversitet innen populasjoner og områder.

4 Referanser

- Chinchar, V.G. & Waltzek, T.B. 2014. Ranaviruses: not just for frogs. *PLoS pathog* 10 (B): e1003850.
- Franklinos, L.H.V., Fernandez, J.R.R., Hydeskov, H.B. et al. 2018. Herpesvirus skin disease in free-living common frogs *Rana temporaria* in Great Britain. *Diseases of aquatic organisms*. 129 (3): 239-244
- Herczeg, D., Ujszegi, J., Kásler, A. et al. 2021. Host–multiparasite interactions in amphibians: a review. *Parasites vectors* 14: 296
- Licheri M, & Origgi FC. 2020. Consensus PCR protocols for the detection of amphibian herpesviruses (*Batrachovirus*). *Journal Vet. Diagn. Invest.* 32 (6): 864-872.
- Mckinnell, R.G. 1973. The Lucké frog kidney tumor and its herpesvirus, *American Zoologist*, 13 (1): 97–114
- Origgi, F.C., Schmidt, B.R., Lohmann, P., et al. 2017. *Ranid Herpesvirus 3* and proliferative dermatitis in free-ranging wild common frogs (*Rana Temporaria*). *Veterinary pathology*. 54 (4):686-694.
- Origgi, F.C., Otten, P., Lohmann, P., et al. 2018. *Bufo*id herpesvirus 1 (BfHV1) associated dermatitis and mortality in free ranging common toads (*Bufo bufo*) in Switzerland. *Scientific reports*. 8 (1): 14737
- Origgi, F.C., Otten, P., Lohmann, P., et al. 2021. Herpesvirus-Associated proliferative skin disease in frogs and toads: proposed Patpogenesis. *Veterinary pathology* 58 (4): 713-729.
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary theory* 1:1–30

5 Tilleggsinformasjon

Tilleggstabell 1. Koordinater for de ulike dammene.

Nummer	Dam	Nord	Øst
1	Lillehammer	61.14307	10.53527
2	Lille Vassoytjern	60.05868	10.85705
3a	Skytta 1	59.99163	10.90485
3b	Skytta 2	59.99157	10.90553
4a	Fontenedammen	59.98707	10.93927
4c	Rumpetrolldammen	59.98338	10.94260

Norsk institutt for naturforskning, NINA, er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og samspillet natur–samfunn.

NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø, Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal, og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i Rogaland.

NINAs virksomhet omfatter både forskning og utredning, miljøovervåking, rådgivning og evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og erfaring med både naturvitere og samfunnsvitere i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene, samfunnets bruk av naturen og sammenhenger med de store drivkreftene i naturen.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-5043-6

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger