

FAGLIG SLUTTRAPPORT



SLUTTRAPPORT FOR: BEGRENSE EFFEKTEN AV TENACIBAKULOSE I NORSK LAKSEOPPDRETT (LIMIT).

RAPPORTDATO	FHF-PROSJEKTNUMMER	UTFYLT AV
2. november 2020	901433	Are Nylund, Christian Rene Karlsen, Sverre Bang Småge, Erwan Lagadec, Aleksei Krasnov, Kristense Solheim, Marte Fredriksen

1. SAMMENDRAG

Norsk

Hudsår (hudproblemer) har vært et gjennomgående problem fra oppstart av lakseoppdrett i Norge og påvirker fisken i både ferskvann og sjø. Det er flere årsaker til disse problemene; suboptimal drift av anleggene, høye tettheter i merdene, sortering av fisk, transport, lusebehandlinger, og miljøforhold som planktoniske organismer (maneter), predatorer etc. Hudsår kan også forårsakes av en rekke patogener og flere arter bakterier er dokumentert å forårsake hudsår hvor noen av disse kontrolleres ved hjelp av vaksiner. De siste to tiår har imidlertid en ny hudsykdom, tenacibaculose, som er assosiert med *Tenacibaculum* spp., blitt etablert i Norge. Denne sykdommen utgjør hovedsakelig et problem i Troms og Finnmark selv om bakteriene er til stede langs hele norskekysten. Bakteriene forårsaker redusert vekst, hud og munnsår, dødelighet og nedgradering av laks etter slakting. Bakteriene er også et alvorlig velferdsproblem som industrien må forholde seg til og løse. Hovedmålene ved dette prosjektet var å lukke noen av de kunnskapshullene når det gjelder *Tenacibaculum* spp. og tenacibaculose i norsk oppdrett. Det er behov for mer kunnskap om; a) naturlige og menneskeskaptede reservoar for bakteriene (kunnskap som kan brukes til å hindre spredning), b) faktorer som utløser sykdommen, tenacibaculose (redusere betydningen av sykdommen i områder med høyt smittepress), c) bakterielle virulensmekanismer som er årsak til vevskader hos fisk (identifisering av genetiske markører for virulens, identifisering av ekstracellulære produkter som proteaser), d) intra- og interspesifikk variasjon hos *Tenacibaculum* spp. isolater fra

laks med tenacibaculose, e) utvikling av stabile og repeterbare smitte modeller for *Tenacibaculum* spp. som gir sykdom (blant annet viktig for testing av vaksiner). Målet er at ny kunnskap skal gjøre det mulig å redusere antall utbrudd med tenacibaculose, redusere tap i produksjon knyttet til bakteriene, bedre fiskevelferden, og lønnsomheten i lakseproduksjon i Norge.

Mangel på predikerte virulensfaktor, eksperimentell validering av kandidatgener og genetiske verktøy gjør at de mekanismer for *T. finnmarkense*-patogenesisen i stor grad har vært ukjent. For å forstå sykdomsforløpet bedre har en i dette prosjektet fått dannet komplette genomer av *T. finnmarkense*. Disse har så blitt karakterisert for å legge til rette for en mer funksjonell sammenligning blant annet ved å predikere kandidatgener som kan være relevant for interaksjonen mellom bakteriene og verten. Det er gjort videre undersøkelser på hvordan *Tenacibaculum* uttrykker disse genene under ulike temperaturer og når den kommer i kontakt med laksens skinn. To av genene, en collagenase og et termolysin, har så blitt karakterisert nærmere for aktivitet, men har ikke vist histopatologiske tegn på skinnen. Holdes fisken på forskjellig salinitet påvirkes også skinnen forskjellig selv om det ikke har lyktes å beskrive nøyaktig hvilke strukturelle endringer i skinnen som kan bedre beskyttelsen. Fra gen-uttrykkings studier får vi et mere sammensatt bilde der skinnen til laks, som har vært hold på noe lavere salinitet enn fullt sjøvann før sjøsetting (LSS = 26 ‰), kan være i bedre stand til å bekjempe en infeksjon. Ut ifra sammenligningene over tid i smitte modellen viser dette at skinnen er i kraftig utvikling og at dette sannsynligvis påvirker utfallet av infeksjoner. Det vil blant annet si at utfallet av eksponering mot skinn-patogener vil påvirkes i stor grad av hvor i «postsmoltfasen» skinnen befinner seg. Resultatene indikerer at næringen kan redusere konsekvensen av tenacibaculose ved å eksponere smolten for lave saliniteter før sjøsetting.

Nærmere 400 isolater av *Tenacibaculum* spp. er isolert fra laks og andre organismer i områder med tenacibaculose langs norskekysten. Av disse er 66 representative kloner fra forskjellige lokaliteter og verter genotypet ved hjelp av «Multi Locus Sequence typing» (MLST) og «Multi Locus Sequence Analysis» (MLSA). Analysene har vist at det foreligger en betydelig variasjon av *Tenacibaculum* spp. assosiert med utbrudd av sykdom i lakseoppdrett. De fleste klonene tilhører artene; *T. finnmarkense* og *T. dicentrarchi*. Det faktum at det synes å være en klar sammenheng mellom virulens og β -haemolytisk aktivitet (observert på blodagar) kan brukes til å oppnå raskere respons før det utvikles alvorlig sykdom i anleggene. Videre er det isolert virulente varianter fra forskjellige verter i forskjellige geografiske områder hvilket kan være av betydning for fremtidige strategier for bekjempelse av tenacibaculose.

English

Skin problems have been a constant occurrence since the start of salmon farming in Norway affecting the fish in both fresh and sea water. These problems can be due to several factors like; poor management practices, high stocking densities, handling of the salmon (sorting, transportation, lice treatments etc), and environmental conditions (including sunburns, freeze-ulcers, planktonic organisms like jellyfish, predators like birds etc), but may also be caused by a large variety of pathogens. Several bacteria are known to cause skin ulcers though most of these are controlled by vaccines. However, a new skin disease, tenacibaculosis associated with *Tenacibaculum* spp., has emerged during the last decade of salmon production in Norway. Tenacibaculosis is mainly a problem in Troms and Finnmark even though the putative causative agents in the genus are present along the entire Norwegian coast. The bacteria are causing reduced growth, skin and mouth ulcers, mortalities, and downgrading of the salmon at slaughtering, but are also a serious welfare problem that have to be addressed and solved by the industry. The main goals of this project are to close some of the knowledge gaps concerning *Tenacibaculum* spp in Norwegian salmon culture. More knowledge is needed about; a) natural and man-made reservoirs for the bacteria (information that can be used to prevent transmission), b) factors that triggers tenacibaculosis (reduce the impact of the disease in areas with a high infection pressure), c) bacterial virulence mechanisms involved in destruction of fish tissues (identification of genetic markers for virulence, identification of extracellular products (proteases etc)), d) intra- and interspecific variation in *Tenacibaculum* spp. isolates from salmon suffering from tenacibaculosis, and e) development of stable and repeatable challenge models for the causative *Tenacibaculum* spp (mitigation strategies, vaccine testing). This

knowledge should make it possible to reduce the number outbreaks of tenacibaculosis, improve the fish welfare and the salmon production in Norway.

Lack of information about virulence factors, experimental validation of candidate genes, and genetic tools means that the pathogenesis associated with *T. finnmarkense* is to a large extent unknown. To gain a better understanding of the pathogenesis we have established complete genomes of *T. finnmarkense*. Here, complete genomes of *T. finnmarkense* have been characterized to facilitate a more functional comparison and to predicate candidate genes that could be relevant for explaining the interactions between the bacterium and the hosts. Expression of these during different temperatures and when the bacteria are in contact with the host have been tested. Two genes, encoding a collagenase and termolysine, have been characterized with respect to activity, but it has not been possible to show any effect on the salmon skin. Rearing Atlantic salmon on different salinities will affect the skin, but it has not been possible to identify the structural changes in the skin that gives an improved protection. Transcriptional studies provide a more complex picture of the salmon skin after exposure to different salinities, and in a challenge experiment salmon smolt kept in low salinity (26 ‰) seawater (LSS) before sea launching were less susceptible to infection with *T. finnmarkense*. Based on these challenge studies it has been shown that the salmon skin goes through a substantial change and the results suggest that the transition to full-strength seawater may be a greater strain on fish produced in fresh water compared to LSS. This suggests that the impact of tenacibaculosis on farmed salmon could be reduced by exposure of the smolt to lower salinities than full strength seawater in a period before moving the smolt to full salinities in sea water.

Around 400 *Tenacibaculum* isolates were isolated throughout a massive sampling in fish farms suffering tenacibaculosis along the Norwegian coast. 66 strains representative of the different localities and hosts investigated were genotyped through a MLST scheme previously developed. The phylogenetic analysis (MLSA) revealed a high diversity of *Tenacibaculum* spp. associated with outbreaks, with most of the strains belonging to a *Tenacibaculum finnmarkense*/*Tenacibaculum dicentrarchi* clade. The association of virulence and β -haemolytic activity on blood agar might help to speed up the investigation during tenacibaculosis outbreaks. Repeated isolation of several virulent strains in different areas and from different hosts may have important implications for future combat strategies against tenacibaculosis.

2. INNLEDNING

Faglig bakgrunn

Hudlesjoner/sår har vært et vedvarende problem i siden oppstart av oppdrett av laks i ferskvann og sjø (Lunder et al 1995, Benediktsdottir et al 1998, Bornø & Linaker 2015). Hudlesjoner inkluderer anormal vekst, sår, og blødninger på hud, finner og munnleder. Noen av problemene skyldes mangelfull drift, høy tetthet av fisk, sortering, transport, avlusning osv, men kan også være forårsaket av miljøforhold (eks. predatorer, planktoniske organismer etc). En rekke patogener er også viktige årsaker til hudproblemer hos laks i oppdrett. Hudsår assosiert med *Vibrio* spp., *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Moritella viscosa* er i stor grad kontrollert ved hjelp av vaksiner, mens noen hudproblemer hos laks i ferskvann (*Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri*) er kontrollert til en viss grad via gode driftsrutiner. De siste 10 årene har det imidlertid vært et økende problem i lakseoppdrett assosiert med bakterier i slekten *Tenacibaculum*, som har vist seg å være til stede langs hele norskekysten hos både laks og rensefisk (Olsen et al 2011; Småge et al 2016). Det har lenge vært kjent at *T. maritimum* kan forårsake hudproblemer hos en rekke forskjellige fiskearter inkludert Atlantisk laks og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) (Wakabayashi et al 1986, Chen 1996, Soltani et al 1996, Ostland et al 1999, Santos et al 1999, Toranzo et al 2005, Habib et al 2014, Småge et al 2016b). I et nylig gjennomført smitteforsøk ble det vist at *T. finnmarkense* kan forårsake hudsår hos laks (Vold 2014, Småge et al 2015). Dette er den eneste kjente smittemodell som har kunnet reprodusere kliniske tegn på tenacibaculose hos frisk laks. Tenacibaculose i produksjon av laks er hovedsakelig et problem i Troms og Finnmark selv om det aktuelle agens er påvist langs hele norskekysten. Bakterien forårsaker redusert vekst, hud og munn

sår, dødelighet, og nedklassing av laks etter slakting. Sykdommen har også et potensiale til å skade omdømmet til industrien da sårskadene er svært synlige. Det er rimelig å anta at naturlige reservoar er viktig for primærinfeksjon av laks etter utsett, og at helsestatus hos laksen og miljøforhold kan spille en viktig rolle for mottakelighet for *Tenacibaculum* spp. Det har vist seg vanskelig å avgjøre hvilke stammer av *Tenacibaculum* som direkte kan forårsake sykdom, hvilke som er opportunister, og hvilke som er til stede uten å forårsake sykdom. Skade påført huden hos laks er sannsynligvis en viktig innfallsport for etablering av infeksjoner med *Tenacibaculum* spp. (Olsen et al 2011). Sykdommen kan kontrolleres og stoppes ved bruk av antibiotika, men økt bruk av antibiotika er ikke en ønsket utvikling. Fremtidig lakseindustri er avhengig av at forebyggende tiltak kommer på plass, og hvis mulig, at det utvikles vaksiner mot *Tenacibaculum* spp. Hudhelse er et område som det har vært et økt fokus på med henblikk på å redusere mottakelighet for patogener og bedre robustheten til laks i oppdrett. Hud mukus er den første fysiske og kjemiske barrieren som skal beskytte fisk mot patogene mikroorganismer (Shephard 1994). Mukus skilles kontinuerlig ut fra hudceller og frigis til omgivelsen, men er likevel en atraktant for fiskepatogene bakterier (Larsen et al 2001) og friske individer har alltid bakterier til stede i mukus (Larsen et al 2015). Dette viser at bakterier har festemekanismer som gjør det mulig å kolonisere huden hos fisk og dermed motstå vertens forsvarsmekanismer.

Epidermis hos laks består av en rekke forskjellige celletyper hvor keratocytter raskt kan migrere og dekke sår i huden og danne et beskyttende lag bare timer etter skade (Bullock et al 1978). Keratocytter hos laks er viktige for det ikke-spesifikke immunforsvaret og beskytter mot mikroorganismer (Åsbakk 2011). Bakterier kan imidlertid unngå fagocytose fra disse hudcellene og dermed kolonisere huden (Karlsen et al 2012, Lindell et al 2012). Fjerning av mukus/epidermis er vist å føre til økt dødelighet hos laks smittet med bakterier (Madetoja et al 2000; Svendsen & Bøgwald, 1997). I denne sammenheng vil det bli undersøkt i hvilken grad *Tenacibaculum* tilpasses og endrer sine vekstkarakteristika i kontakt med mukus, skinnets ytterste epidermislag, og det nedenforliggende dermislaget.

Dermis hos fisk inneholder et lag med kollagene fibre som forbinder epidermis til det underliggende muskellaget, men ved en *Tenacibaculum* infeksjoner det vanlig å observere fullstendig tap av epidermis og dermis og filamentøse bakterier er vanlig i dermis i slike tilfeller. Dette indikerer at *Tenacibaculum* kan penetrere epidermis og kolonisere dermis hvor proliferasjon fører til degradering av kollagenlaget med påfølgende tap av hud og skade på underliggende vev. I prosjektet genom vil data bli benyttet for å predikere kandidatgener relatert til adhesjon, proliferasjon og degradering av laksehud.

Innledende studier av diversiteten til *Tenacibaculum* spp. assosiert med tenacibaculose hos laks i produksjon indikerer at forskjellige «strains» kan være årsak til sykdommen, og at planktoniske organismer kanskje kan være vektor for noen av disse variantene (Sverre B. Småge Pers.obs.). Fylogenetiske analyser av syv isolater fra laks med tenacibaculose, basert på fem HK gener, viste en variasjon med affinitet til *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* og *T. ovolyticum* i tillegg til isolater med et mer fjernt slektskap til disse tre artene (Småge et al 2015). Innsamling av isolater av *Tenacibaculum* spp. i Nord Norge (>200 isolater) i løpet av tre år ha vist at variasjonen er betydelig større enn hva som fremgår av vitenskapelig publikasjoner (S.B. Småge pers.obs.). Dette prosjektet har som mål å karakterisere denne variasjon av *Tenacibaculum* spp. fra laks i oppdrett og fra omliggende miljø og andre fiskearter, i tillegg til at variasjon i virulens vil bli testet i smitteforsøk.

Den generelle antakelsen er at sårdannelse hos laks følger av at bakterier koloniserer fiskens hud eller overflatiske hudskader med påfølgende nekrotisering av vevet lokalt uten at infeksjonen blir systemisk. På et senere stadium blir fisken mottakelig for en dødelig systemisk infeksjon. Hovedmålet med prosjektet er å fylle hullet i eksisterende kunnskap om *Tenacibaculum* spp. og tenacibaculose i norsk lakseoppdrett. Områdene for fokus vil være: a) naturlig og menneskeskapte reservoar for bakteriene (informasjon som skal kunne brukes til å begrense spredning), b) identifisere faktorer som kan utløse tenacibaculose (reduere alvorlighetsgraden i områder med høyt infeksjons trykk), c) identifisere virulensmekanismer involvert i ødeleggelse av fiskevev (identifisere genetiske markører for virulens og ekstracellulære produkter, eks proteaser), d) kartlegge variasjon mellom arter og innad i arter hos bakterier assosiert med tenacibaculose, e) utvikle en stabil og repeterbar smittemodell for patogene *Tenacibaculum* spp. (viktig for fremtidig utvikling av vaksiner).

Prosjektets omfang

Dette prosjektet består av fem arbeidspakker med fokus på å øke eksisterende kunnskap om tenacibaculose hvor målet er å redusere antall utbrudd forårsaket av *Tenacibaculum* spp. i norsk lakseoppdrett. **API**: Innsamling av isolater av *Tenacibaculum* spp. **APII**: Utvikle stabile smitte-modeller. **APIII**: Identifisere virulensfaktorer hos *Tenacibaculum* spp. **APIV**: Kartlegge genomet til *Tenacibaculum finnmarkense*. **APV**: Genotype *Tenacibaculum* spp isolert fra laks og andre organismer langs norskekysten, samt undersøke mikrobiota dynamikken under infeksjon med *Tenacibaculum* og immunresponser i huden.

Prosjektorganisering

Deltakerne i prosjektgruppe har alle tidligere arbeidet med bakterier fra fisk og har alt gitt betydelige bidrag til den eksisterende kunnskapen om *Tenacibaculum* spp. i Norge. Prosjektet inkluderer industripartnere (Cermaq, Dr. Sverre B. Småge, Dr. Øyvind Breivik) med erfaring med tenacibaculose i lakseproduksjon, en sentral aktør (MarineHelse) på fiskehelse i Nord Norge, og forskningsmiljøer ved Universitetet i Bergen (UiB, Prof. Are Nylund og Egil Karlsbakk, og ingeniør Erwan Lagadec) og Nofima (Dr. Christian Rene Karlsen, Dr. Lene Sveen, Dr. Aleksei Krasnov, og Dr. Gerrit Timmerhaus). Både UiB og Nofima har den nødvendige infrastruktur og fasiliteter for gjennomføring dette prosjektet, inkludert fasiliteter godkjent for gjennomføring av smitteforsøk. Helgenom sekvensering (Next generation sequencing, deep-sequencing, Illumina) vil bli utført ved kommersielle laboratorier. De andre forskningsoppgavene vil bli utført ved UiB og Nofima. Nylund (UiB) vil fungere som prosjektleder og være ansvarlig for **APV**, Karlsbakk (UiB) vil være ansvarlig for **API**, og Lagadec (UiB) vil utføre laboratoriearbeidet på arbeidspakkene **I** og **V** ved UiB. Småge og Breivik (Cermaq) er ansvarlig for **APII**, mens Karlsen og Krasnov (Nofima) er ansvarlig for arbeidspakkene **APIII** og **APIV**, samt arbeidet med mikrobiota dynamikk og kartlegging av immunologiske responser i hud i forbindelse med *Tenacibaculum* infeksjon (**APV**).

Referansegruppe for prosjektet er: Per Anton Sæther (MarineHelse), Anne Tjessem (Grieg Seafood), Eirik Monsen (Lerøy Aurora), og Henrik Duesund (Cermaq).

Sven M. Jørgensen (FHF) har deltatt på møter med referansegruppen.

3. PROBLEMSTILLING OG FORMÅL

Prosjektets effektmål

Hovedmålet med dette prosjektet er å redusere betydningen av tenacibaculose i norsk lakseproduksjon. Dette omfatter økt fiskevelferd, reduserte tap og nedgradering av laks ved slakting med utgangspunkt i bedre kunnskap om bakterier i slekten *Tenacibaculum*.

Spesifikke mål er:

- Identifisering av naturlige og menneskeskapt reservoirer (kunnskap som kan benyttes til å hindre spredning av bakteriene).
- Forbedre dagens smitte-modeller for sykdomsfremkallende varianter i slekten *Tenacibaculum* (viktig for å evaluere ikke-medisinske behandlinger, spredning, patogenese, og vevstropisme).
- Dokumentere eksisterende intra- og interspesifikk variasjon hos *Tenacibaculum* spp. (viktig for fremtidig risikovurderinger knyttet til spredning og sykdom).

- d) Testing av varianter av *Tenacibaculum* spp. evner til å uttrykke virulens og gi sykdom hos laksefisk.
- e) Kartlegge endringer i laksehudens bakterieflora i forbindelse med infeksjoner av *Tenacibaculum* spp. og eventuelle immunreaksjoner.
- f) Kartlegge ko-faktorer som kan utløse tenacibaculose (dvs ny kunnskap som skal gi et grunnlag for utvikling av produksjonsstrategier som kan redusere risiko for sykdom).

Prosjektets resultatmål

Prosjektet har følgende leveranser:

- A. Presentasjon og deponering av genomet til *T. finnmarkense*.
- B. Etablering av real time RT PCR for deteksjon av virulens gener hos *T. finnmarkense*.
- C. Presentasjon av en reproducerbar smittemodell for *T. finnmarkense* (rapport eller vitenskapelig publikasjon).
- D. Populærvitenskapelig publikasjon med presentasjon av hud-helse hos laks relatert til bakterieinfeksjoner.
- E. Vitenskapelig presentasjon av virulensmekanismer hos *Tenacibaculum*.
- F. Vitenskapelig presentasjon som beskriver forandringer i hud struktur og hvordan mikrobiota påvirker genregulering i huden under utvikling av sår.
- G. Vitenskapelig presentasjon av genotyper av *Tenacibaculum* spp., ved bruk av MLST og MLSA (MLSP), isolert fra fisk i Norske kystnære områder.
- H. Protokoll for gjennomføring av smitteforsøk med virulente isolater av *T. finnmarkense*.
- I. «Faglig sluttrapport» etter retningslinjene til FHF.

4. PROSJEKTGJENNOMFØRING

Beskrivelse av metodikk og gjennomføring av prosjektet

API. Innsamling av isolater av *Tenacibaculum* spp.

Ved isolering av bakterier ble det fokusert på medlemmer av genus *Tenacibaculum* og dermed ble det benyttet agar (Følgende agar ble testet og benyttet: Marine Agar – MA, Blood Marine Agar – BAMA, og Kanamycin Blood Marine Agar - KABAMA) som var spesielt godt egnet for denne slekten med bakterier. Det var også et mål å isolere et representativt utvalg (diversitet) av *Tenacibaculum* spp. fra laks og andre organismer (eks. renseskjold) knyttet til lakseoppdrett langs hele norskekysten. Faktorer av betydning i forbindelse med isolering var: Tidspunkt for sjøsetting av smolt, temperatur og salinitet, behandling mot lakselus, AGD eller bakterier (bruk av antibiotika), dødelighet knyttet til tenacibaculose, andre diagnoser, og sykdomshistorie på lokaliteten. Etter isolering ble alle isolater sub-klonet og de enkelte klonene ble i første omgang identifisert ved hjelp av sekvensering av 16S. Det er hentet inn og lagret ca 400 isolater av *Tenacibaculum* spp i perioden 2011 til 2020. **Tabell 1** gir en oversikt over et utvalg av disse.

Tabell 1. Oversikt over antall (N=) utvalgte isolater av *Tenacibaculum* spp.. Ss = *Salmo salar*, Om = *Oncorhynchus mykiss*, Lb = *Labrus bergyllta*, Cl = *Cyclopterus lumpus*, Hh = *Hippoglossus hippoglossus*, Ch = *Clupea harengus*, Cc = *Cyanea capillata*, Dt = *Dipleurosoma typicum*.

	2011	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Fylke	N =	N =	N =	N =	N =	N =	N =	N =	
Finnmark		1-Ss	2- Hydrozoa 9-Ss	35 - Dt 31 - Ss	25 - Cl 8 - Ss				
Troms							102 - Ss	12 - Ss	
Nordland	1 - Ss	1-Ss						23 - Ss	
Trøndelag								6 - Hh	
Sogn og Fjordane			1 - Ss	2 - Om 6 - Ss			11 - Cl 5 - Ss		
Hordaland		1-Ss	3 - Lb	1-Cnidaria 1 - Cc 2 - Cl		8 - Ss		3 - Cl 5 - Om 48 - Ss	2 - Ch
Rogaland							4 - Cl	22 - Hh 8 - Om	
Akershus								11 - Ss	

Innsamling av isolater av *Tenacibaculum* spp. ble gjennomført som planlagt og utført av Cermaq (isolater fra før oppstart av prosjektet), MarinHelse (isolater fra anlegg med tenacibaculose i Troms under prosjektperioden), og Universitetet i Bergen (isolater fra laks, andre fiskearter og marine organismer hentet fra spredte områder langs norskekysten i prosjektperioden).

APII: Etablering av reproduerbare smitte modeller for aktuelle arter i slekten *Tenacibaculum*

I **APII** ble det utført smitteforsøk i to perioder. Alle smitteforsøkene ble utført hos ILAB i Bergen. I den første perioden (høst 2018) ble det utført smitteforsøk der vi forsøkte å forbedre eksisterende *T. finnmarkense* bad-smitte modell for laks, forbedre den eksisterende bad-smitte modell for *T. maritimum* for laks for norske *T. maritimum* isolater, utvikle en *T. finnmarkense* bad-smitte modell for rognkjeks, samt å utvikle en *T. maritimum* bad-smitte modell for norske *T. maritimum* isolater til rognkjeks. Smitteforsøkene ble gjennomført i tre delforsøk. I første delforsøk ble smitte modell for laks med *T. finnmarkense* og *T. maritimum* testet, mens smitte modeller for de samme bakteriene til bruk på rognkjeks ble utført i delforsøk 2. I delforsøk 3 benyttet vi de utviklede/forbedrede bad-smitte modellene fra delforsøk 1 og 2, til å undersøke mulig horisontal overføring av *T. finnmarkense* strain HFJ (virulent) og norske *T. maritimum* (ett *T. maritimum* isolat fra laks og ett fra rognkjeks) fra rognkjeks til laks i kohabiteringsforsøk. Som en naturlig del av dette smitteforsøket ble forskjellene i virulens mellom ulike *Tenacibaculum* spp. undersøkt.

I andre periode (sommer/høst 2019) ble det utført et nytt smitteforsøk med *Tenacibaculum finnmarkense* strain HFJ^T. Formålet med forsøket var å forbedre og verifisere smitte modellen for *Tenacibaculum finnmarkense* til bruk på 8 °C og deretter bruke denne til å undersøke om ulike saliniteter under smoltproduksjon har en effekt på smoltens mottakelighet for tenacibaculose etter overgang til sjøvann. I forsøket ble to vannkvaliteter (rent ferskvann (F) og lav styrke sjøvann 26‰ (LSS)) sammenlignet, hvor smoltgrupper ble holdt i ulike lengde (tid) i disse ulike vannkvalitetene før smitte med *T. finnmarkense*. En masterstudent ved fiskehelsestudiet ved UiB (Kristense Solheim) var med i planlegging, gjennomføring og avslutning av forsøket, samt utførte analysearbeid av materialet fra forsøket. Smitteforsøket ble gjennomført i tre deler. I eksperiment 1F ble mottakeligheten for tenacibaculose hos nylig smoltifisert smolt (80 g) undersøkt. Smolten ble overført direkte fra ferskvann til sjøvann før smitte. I eksperiment 2F og 2LSS ble mottakeligheten for tenacibaculose hos smolt (120-130 g) som har gått på de to ulike vannkvalitetene i 4 uker undersøkt. I eksperiment 3F og 3LSS ble mottakeligheten for tenacibaculose hos smolt (200 g) som

har gått på de to ulike vannkvalitetene i 8 uker undersøkt. I forkant av hvert eksperiment ble fisken prøvetatt for SmoltTimer analyser for å sikre at fisken ikke hadde gått ut av smoltvinduet før smitte, noe som kunne påvirke resultatene.

APIII. Identifisere virulensfaktorer hos *Tenacibaculum* spp.

Temperatur- og vevseffekter på *Tenacibaculum*-ekspressjon av kandidatgener

For å undersøke effekten av temperatur ble fem *Tenacibaculum*-stammer (*T. finnmarkense* typeart og sp2, *Tenacibaculum* sp Hammer, *Tenacibaculum* sp S1F6, *Tenacibaculum* sp S1E2J8, se **Tabell 3**) dyrket på 8 °C og 12 °C i marine broth 2216 (Difco). Vekstkurvene ble brukt for å finne høstningspunktet som ble satt til OD600 = 1. For å undersøke effekten av vev ble *T. finnmarkense* HJF og sp.2 dyrket på 8 °C til OD600 = 0,5 til estimerte konsentrasjoner for *T. finnmarkense* HJF og sp.2 til $73,2 \pm 11,3 \times 10^6$ CFU mL⁻¹ og $49,9 \pm 4,3 \times 10^6$ CFU mL⁻¹. Kulturer ble deretter delt og tilsatt enten hudslim (mucus) av atlantisk laks, skjell (med epitellag) plukket fra huden på atlantisk laks, eller biter fra dermis delen av huden under skjellene. Triplikater av hver behandling ble høstet ved bruk av RNAprotect® (Qiagen) da kontrollen (uten vev tilsatt) nådde en vekst på OD600 = 1.0. Supernatanten ble fjernet, og pelleten brukt til å isolere total RNA ved bruk av PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen), renses med PureLink™ DNase (on-column) før RNA-konsentrasjonen ble estimert med NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific) og integriteten og renheten bekreftet med BioAnalyzer (Agilent Technologies).

Seks referansegener, gyrase subunit B (*gyrB*), ATP synthase subunit beta (*atpD*), DNA topoisomerase (*fusA*), Phosphoglycerate kinase (*pgk*), RNA polymerase-beta subunit (*rpoB*) and elongation factor Tu (*tuf*) ble evaluert som kontrollgener i tillegg til de 19 kandidatgenene; antitoxin *yefM*, toxin *yoeB*, actin cross-linking toxin *vgrG1*, thermolysin *tenT*, two thiol-activated cytolysins, insecticidal toxin complex protein, sialic acid O-acetyltransferase *neuD*, toxin-antitoxin system *hicA* and *relE* toxin components, plasmid maintenance system killer protein, colicin v, lysozyme, membrane associated erythrocyte binding-like protein *maebl*, tenacilysin/pneumolysin, peptidase S8, to M43 peptidaser and en bakterie collagenase fra peptidasefamilien M9 *pepM9* (**Tabell 2**). Primere ble designet med Primer OligoPerfect (ThermoFisher Cloud) og verifisert som genspesifikke fra amplifiserte PCR-produkter ved bruk av superscript fusion mix (Invitrogen) som ble sekvensert og bekreftet identiske med de respektive gensekvensene. Primertestene for qRT-PCR-eksperimentene ble kjørt ved bruk av QuantStudio5 -instrument (ThermoFisher, MA, USA) og PowerUp SYBR grønn PCR-masterblanding (Invitrogen). Spesifisiteten, smeltetemperatur, R2 til standardkurven og Ct min / max verdier var innenfor forventede verdier. Effektivitet av reaksjoner ble beregnet med ligningen $E = 10^{(eksp-1) / linje}$ (Phaffl 2001). cDNA ble syntetisert fra RNA ved bruk av et TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit og heksamerprotokollen (Applied Biosystems). Kvantitativ PCR kulturstudiene beskrevet over ble så utført i QuantStudio5-instrumentet. Data fra alle prøver er generert ut ifra biologiske triplikater. For hvert primersett er der inkludert en negativ kontroll og relative uttrykk av gener er normalisert til fire av husholdningsgenene, *gyrB*, *atpD*, *fusA* og *tuf*, for hver av betingelsene som er testet.

Tabell 2. Liste over primere for qPCR

Primer	Sequence (5'-3')	Amplikonstørrelse
toxRelE_F_1	AGCAAAACTTCAAAATGATCCAAACT	
toxRelE_R_1	CCGTGTGTTGATAATACAAGCGT	150
thiolcyt_F_1	TATCCGAACCCAACACCCG	
thiolcyt_R_1	GCCTTAGGCGTTACTGTTGC	273
instox_F_1	GGGCAAAACAATGGGATGCT	
instox_R_1	GCCTTACCTTTGCCATTCGT	122
toxHicA_F_12	TGAGTAATCCTAAAGATTTAACATGGG	159

toxHicA_R_1	TGCTAGGGTGTGGTTTGTGT	
syskill_F_1	ACTTTACGAAGAAGGTAAGGCA	
syskill_R_1	TGGTTCTTCTCCTTCAACCGA	235
acetNeuD_F_1	AGTTGTAATGCATTGCGCTGT	
acetNeuD_R_1	TTCCTGCGCCAATAGTAGCC	233
thermlys_F_1	CGCCAACAGCTTGTGAAACA	
thermlys_R_1	TGCTGGTACTGTTGGAGCTG	104
cytolys_F_1	GGTGGAATTAGAGGCGGCTT	
cytolys_R_1	CCTGTCCTGCAATCGTAGCA	143
VGRG1_F_1	AGCCAACACTTACAAGCCTACT	
VGRG1_R_1	TCGACTTTAAGGATTCAACCTCT	221
atoxYefM_F_1	TCCGTTGGCAATTCCGTCTT	
atoxYefM_R_1	ACCAAACCACCTGCAAATGC	294
toxYoeB_F_6	GCTCCACAGCTTCGAAATGT	
toxYoeB_R_6	CGCTGTTGTTGTCCTCCTGA	206
colicinV_F_1	GGTAGCCTCTTTGGTCGCTT	
colicinV_R_1	ATGTTCCCTGCAAAAGCGGTT	135
lysozym_F_1	TGGGAAGAGCGTGTAAGAGT	
lysozym_R_1	CGGTTCCCTGTTTGCACAATGT	184
maebl_F_1	GACAACGCGCAACCAAAGTT	
maebl_R_1	TCGGGCTGATCGAATGTTGA	148
conhyp_F_9	GCAGATAGCGCCTTTTGAGG	
conhyp_R_9	CCCTTGGTGCCGATATTGGT	203
pepS8_F_4	CGGAACACACGTTACCGGTA	
pepS8_R_4	TGCTCCGTTATCAACAGCGT	166
pepM43a_F_1	TACGCTTCAGGACACGCATT	
pepM43a_R_4	ACCCATTGTTGGCGGTGTAT	252
pepM43b_F_1	ATTACAGCGACCACAGGAGC	
pepM43b_R_1	TTGACCTGGATATGCAGCGG	225
pepM9_F_1	CAGCACCTGCACTTCCTACA	
pepM9_R_1	CAGCATCGGCAACTGCTTTT	279
gyrB_F_3	AGATTCGGCAGGTGGAACAG	
gyrB_R_3	TCGACATCGGCATCACACAT	243
atpD_F_1	TGCAAAAGGACACGGAGGTT	
atpD_R_1	CTTGTGCTTCTCCTGCTCCA	299
fusA_F_11	TGAAGCAGGGGATATCGGTT	
fusA_R_11	AGTTTTAGGCTCAACCGCGA	142
pgk_F_1	GGGCGTCCTAAAGCTCAAGA	
pgk_R_1	TGCGCAATTACAGCCGTAGA	299
rpoB_F_1	GTTCTTGGATGGGCAGGTCA	
rpoB_R_13	CGATAGAACGCGCATGCATT	238
tuf_F_9	GGTACTGTTGCAACTGGTCG	
tuf_R_9	AATGGAGTGTGACGTCCACC	299

Strukturmodellering, kloning og uttrykk av to kandidatgener

Aminosyresekvensen til *T. finnmarkense* PepM9 og termolysin TenT ble brukt for søk mot kjente templat og motiver ved hjelp av BLASTp (Altschul 1997) mot proteindatabank (PDB) -databasen og SWISS-MODEL-serveren (Waterhouse 2018). SignalP 5.0 (Almagro 2019) ble anvendt for prediksjon av signalpeptider. Modellene ble evaluert og de første N-terminalen 202 aminosyrene i TenT-sekvensen ble tatt bort for å fjerne en signalsekvens og et propeptid. 25 aminosyrer fra den N-terminale delen av PepM9-sekvensen ble også tatt bort. Fra de gjenværende aminosyresekvensene ble syntetiske gensekvenser konstruert ved bruk av kodonoptimalisering for ekspresjon i *Escherichia coli* med en forlengelse som inkluderte et N-His₆-merke. De modifiserte sekvensene av *pepM9* og *tenT* ble kommersielt produsert av Biologics International Corp (BIC), renheten bestemt av SDS-PAGE og de rekombinante produktene verifisert av Western Blot.

Enzymaktivitet

Proteaseanalyser med TenT og ble utført ved bruk av Pierce Colorimetric Protease Assay Kit (ThermoScientific) etter produsentens protokoller. Kollagenaseaktivitet av TenT og PepM9 ble vurdert ved bruk av collagenase activity colorimetric assay kit (Sigma-Aldrich) etter produsentens protokoller. Det ble brukt ti ganger fortyndinger av testproteinene i tillegg til kitkontrollene. Begge analysene ble utført ved 8 °C og 20 °C. For begge analysemetodene ble tre replikater av hver fortynding kvantifisert, og gjennomsnitt og standardavvik for datapunkter ble beregnet.

Semi *in vivo* skinnmodell

Proteinløsninger av PepM9 (0,025 mg / ml) og TenT (0,058 mg / ml) ble løst i cellekulturmedium L-15 (Sigma-Aldrich). Modellen benyttet 12 atlantisk laks gående i sjøvann på 11 °C. Fisk ble avlivet med en overdose av Finquel vet (MSD Animal Health), og hver fisk ble injisert subkutant med 0,05 ml av PepM9, TenT, en miks av begge, og kontroll (cellekulturmedium L-15). Etter injeksjon ble fisken lagt tilbake i tanken med sjøvann (11 °C), og skinnen ble prøvetatt etter 2 timer. Ni kontrollprøver og ni prøver fra de injiserte områdene med TenT, PepM9 og begge ble dissekert og lagt på bufret formalin. Preparering og histologisk evaluering ble utført som tidligere beskrevet (Sveen et al. 2019).

Tenacibaculum-motilitet

Isolater tidligere hentet fra skinnen på atlantisk laks fra slektene *Tenacibaculum*, *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Psychrobacterium* og *Moritella*, ble undersøkt for bakterie-bakterie interaksjoner. Kolonier voksende på marin agar ble dyrket opp i marin broth til A600 ~ 1.0. En pøse (1 µl) av en av bakteriesuspensjonene ble så strøket i en rett linje på en plate med marin agar. Neste kultur ble strøket vinkelrett på denne for å krysse den opprinnelige kulturen. For å få begge krysskombinasjonene ble begge kulturer også strøket vinkelrett på hverandre i motsatt rekkefølge. Denne metoden ble fulgt for alle isolater. Kontroller av rene bakteriekulturer ble strøket i et identisk kryssmønster. Triplikate plater ble inkubert ved 12 °C og inspisert etter tre dager.

APIII er blitt gjennomført som planlagt.

APIV Kartlegge genomet til *Tenacibaculum finnmarkense*.

Sekvensering av *Tenacibaculum* genomer

Tenacibaculum-stammene som ble brukt til genomsekvensering ble dyrket ved 12 °C i marin broth 2216 (Difco). Genomisk DNA ble ekstrahert med QIAGEN Genomic-tip 500/G i henhold til instruksjonene. For sekvensering ble Pacific Biosciences RS II anvendt og sekvensert ved Norsk sekvenseringssenter (www.sequencing.uio.no). Genomene er lukket, annotert med Prokka og størrelsen er oppgitt i **Tabell 3**.

Tabell 3. Genom-sekvenserte isolater av *Tenacibaculum*

Isolat	Isolert fra	Genom Mb
<i>T. finnmarkense</i> type	Sår	3,16
<i>T. finnmarkense</i> tsp2	Sår	3,09
<i>Tenacibaculum</i> sp. Hammer H120214 F8	Sår	3,09
<i>Tenacibaculum</i> sp. S1F6	Sår	3,16
<i>Tenacibaculum</i> sp. S1E2J8	Fra manet	2,56

Komparative analyser og predikering av virulensgener i *Tenacibaculum*-isolatene

For å predikere relevante virulensgener som skulle brukes i RT-qPCR-analysen som er beskrevet nedenfor ble flere metoder kombinert. Genomiske øyer (GI) og domeneanalyser ble brukt få å se etter mulige virulensgener. Virulente proteiner ble videre predikert ved hjelp av MP3-programvaren (Gupta 2014) ved å ta i bruk *T. finnmarkense*-genomet som templat. Ved å konstruere en søkbar database fra genomet til *T. finnmarkense* ble søk utført ved å sammenligne likheten med antatte virulensfaktorer for andre skinnpatogener hos salmonider som *Moritella viscosa*, *Aliivibrio wodanis*, og de mere fylogenetiske relaterte *Tenacibaculum maritimum* og *Flavobacterium columnare*. I tillegg er mikrobielle kollagenaser, keratinaser, og mucinaser hentet fra UniProtKB-databasen for å finne lignende sekvenser i genomet til de sekvenserte *Tenacibaculum*-isolatene. Tilstedeværelsen av kandidatgenen funnet i *T. finnmarkense* ble sammenlignet med tilstedeværelsen i de andre fire sekvenserte *Tenacibaculum*-stammene. Dette for å redusere alternativene som skulle med i RT-qPCR-analysen.

APIV er blitt gjennomført som planlagt.

APV: Genotyping av *Tenacibaculum* spp., microbiota dynamikk under infeksjon med *Tenacibaculum* og følgende immunresponser i hud.

Genotyping av *Tenacibaculum* spp isolert fra laks og andre organismer langs norskekysten

Diagnosen tenacibaculosis har vanligvis vært basert på isolasjonen av *Tenacibaculum* spp. fra laks med sårproblematikk etterfulgt av morfologisk, biokjemisk og serologisk karakterisering og analyse av bakterienes antimikrobielle følsomhetsprofiler (Fernández-Álvarez and Santos, 2018). «Multiple Locus Sequence Typing» (MLST) and «Multi Locus Sequence Analysis» (MLSA) har imidlertid i økende grad blitt brukt til bakteriell genotyping (Avendaño-Herrera et al. 2016; Småge et al. 2016; Frisch et al. 2018; Olsen et al. 2017). Bakteriell genotyping har faktisk blitt et viktig verktøy for diagnose og studier av epizootier. Denne prosedyren karakteriserer isolater ved hjelp av arvestoff (sekvenser av flere husholdningsgener - HKG). Hvert HKG som inngår i analysen av en bakterieart tilhører forskjellige alleler, og for hvert isolat definerer allelene til hvert locus den alleliske profilen eller sekvens-typen (ST). Disse profilene av isolater kan sammenlignes med andre isolater i en sentral database på MLST-nettstedet (<https://pubmlst.org/tenacibaculum/>). *Tenacibaculum*-isolatene fra **API** ble genotypet av ved hjelp av et MLST system utviklet av Habib et al. i 2014, og dette muliggjør en sammenligning med andre norske stammer som tidligere er lagt inn i systemet. En Bayesian-analyse ble deretter gjennomført, inkludert disse 66 stammene, noen referanse-genomer, og norske stammer som tidligere er beskrevet og tilgjengelig i GenBank.

Tenacibaculum-stammer isolert og klonet i **API** ble brukt i **APV**. 66 stammer, som representerte de forskjellige lokalitetene og vertene som ble undersøkt, ble deretter genotypet gjennom «Multi Locus Sequence Typing» (MLST) utviklet av Habib et al. (2014) og «Multi Locus Sequence Analysis» (MLSA). Alle isolatene ble deponert på MLST-nettstedet for å øke *Tenacibaculum*-databasen. Sekvensene produsert gjennom DNA-sekvensering er deponert i GenBank og er fullt tilgjengelig for det vitenskapelige samfunnet.

Velferdsvurdering og prøvetaking for videre molekylære analyser fra forsøket (APIII) med to vannkvaliteter rent ferskvann (F) og lav styrke sjøvann 26ppt (LSS).

Vekt (g) og lengde (cm) ble målt og kondisjonsfaktor (CF) utregnet fra 24 fisk i hver gruppe før smitte, og 9 fisk i hver av gruppene etter smitte (**Tabell 4**). Gjennomsnittet i gruppene er brukt for å gi et estimat på om fisken som er prøvetatt anses som representative av fiskegruppene, både 0 % og 26 % over tid, og av fisken som ble prøvetatt under smitteforsøket. Den samme fisken ble evaluert visuelt og scoret for velferdsparametere ved å kategorisere finner, snute, blødning i huden og skjelltap i en av fire kategorier etter (Noble et al., 2018): ingen, mindre, moderate og alvorlige effekter. Betydningen av de ulike velferdsindikatorerne vil variere under ulike betingelser, og er her ikke vektet. Scoren er derfor ikke brukt til å direkte evaluere individets velferdsstatus, men for å karakterisere kvantifiserbare effekter fra behandlingen og i tillegg brukt som et supplement til å velge vevsprøver for videre evaluering av molekylære responser. Områder på fisken som er prøvetatt er vist i **Figur 1**. For underkjeven ble saks brukt for å klippe den løs og deretter delt i to, venstre side ble overført til RNAlater og høyre side på formalin. To hudområder ble dissekert fra venstre side av hver fisk i området bakenfor ryggfinnen og over sidelinjen, i området ovenfor gattet og halefinnen. Prøver til histologi ble tilsatt 10 % bufret formalin og lagret ved 4 °C. Prøver for microarrayanalyse ble lagret i RNAlater™. Prøver ble holdt kjølig under transport og lagret ved -80 °C til RNA-ekstraksjon.

Tabell 4. Vekt og kondisjonsfaktor av fisk for histologiske og transkripsjonsanalyser

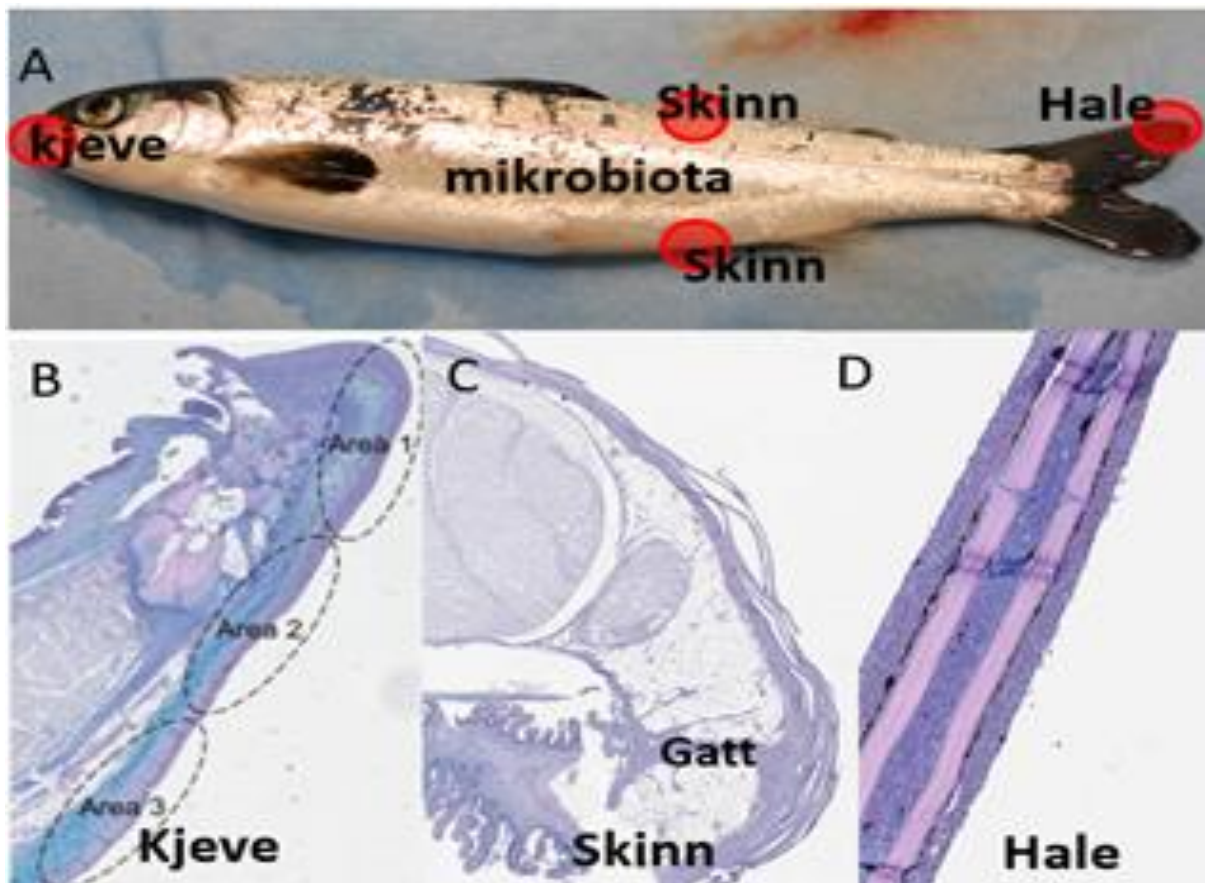
Måned	Salinitet	N før/smittekontroll/smitte	Vekt (g) / kondisjonsfaktor		
			Før smitte	Smittekontroll	3 dager etter smitte
Mai	0 ‰	15/6/9	71.5 ± 8.0 / 1.23 ± 0.04	70.1 ± 8.4 / 1.07 ± 0.05	65.6 ± 13.9 / 1.06 ± 0.05
Juni	0 ‰	12/6/9	104.7 ± 12.6 / 1.12 ± 0.04	101.8 ± 15.3 / 1.11 ± 0.07	98.4 ± 12.4 / 1.03 ± 0.05
Juni	26 ‰	12/6/9	77.7 ± 14.8 / 1.07 ± 0.07	92.2 ± 7.8 / 1.06 ± 0.04	98.2 ± 15.8 / 1.14 ± 0.09
Juli	0 ‰	12/6/9	141.1 ± 21.8 / 1.12 ± 0.08	157.8 ± 27.6 / 1.15 ± 0.11	151.1 ± 17.9 / 1.07 ± 0.06
Juli	26 ‰	12/6/9	119.1 ± 20.5 / 1.12 ± 0.06	133.7 ± 20.2 / 1.12 ± 0.03	129.0 ± 22.5 / 1.13 ± 0.07

Histologi

Dorsal, ventral hud, kjeve og finne ble fiksert i formalin og snittet og farget med AB/PAS eller immunmerket (**Figur 1**). Masterstudent Marte Fredriksen ved fiskehelsestudiet ved UiB bidro med dette arbeidet. Snittene ble enten analysert manuelt, eller ved hjelp av Nofimas AI-modell på skinn som beskrevet av Sveen et. al. 2020. På grunn av et stort prøveantall (4 vev x 10 fisk x 9 uttak), ble utvalgte prøver valgt for analyse (**Tabell i Figur 14**).

Produksjonsenheten (0 ‰ (F) og 26 ‰ (LSS)): Ventrale (n = 30) og dorsale (n = 30) skinnprøver fra produksjonsenheten (0 ‰ (f) og 26 ‰ (lss)) ble analysert digitalt på plattformen Aiforia® (Aiforia Technologies Oy) AI-modell for skinn (Sveen et al 2020). Den ventrale hudprøven ble definert i to områder: ventral og gatt (**Figur 1**), mens analysen ble utført på hele skinnprøven fra dorsal side. Det ble også kjørt AI-analyser på smittede prøver. Noe av utfordringen med denne analysen var at AI-modellen var tilpasset normalt skinn i området mellom ryggfinne og sidelinjen. Ventralt skinn skiller seg noe fra dorsalt skinn, spesielt i området rundt gattområdet. Skinn etter smitte endres særdeles i morfologi, og AI-analyser på dette skinnen viste seg å være problematisk. En AI-modell vil kun være i stand til å gjenkjenne strukturer som inngår i treningssettet. Derfor ble det brukt en del tid på å trene opp AI-modellen til å gjenkjenne skinn fra smittet fisk, og skinn i gattområdet. Da kjevemorfologi skilte seg betraktelig fra skinnmorfologi ble kjevemålinger utført

manuelt ved bruk av Aperio Image Scope. Ettersom den histologiske strukturen på kjeven varierte betydelig mellom tuppen av kjeven, og sidene, ble det definert tre områder: Område 1, Område 2 og Område 3 (**Figur 1**). Sårutvikling ses oftest i område 1, og vi var derfor interessert i eventuelle forskjeller mellom de ulike områdene på kjeven. For hvert område av kjeven ble tykkelsen målt for epidermis (μm ; seks lengdemålinger per område) og areal (μm^2), og også antall og plassering av slimceller.



Vev	Produksjonsenhet			Overføring til sjø			Smitte		
	Mai	Juni	July	Mai	Juni	July	Mai	Juni	July
Kjeve	M	M	M	HE	HE	HE		IH	IH
Ventralt skinn	AI	AI, MA	AI, MA		IH, MA	HE, MA		HE, MA	HE, MA
Dorsalt skinn	AI	AI	AI					IH	IH

Figur 1. Oversikt over områder av skinnen som ble undersøkt med histologiske analyser. Hovedhensikten med de histologiske målingene var å identifisere mulige forskjeller i vevsmorfologi hos frisk fisk i produksjonsenheten, som følge av produksjon i ferskvann eller lavsalinitet. Eksempler er vist fra kjeve (B), i området over gattet (C) og hale (D). Tabellen viser vevsprøver som ble analysert og hvordan, immunohistokjemi (IH), farget med AB/PAS og analysert manuelt (M) eller med AI-model (AI). Prøver til microarray (MA) analyser er også indikert tabellen.

Overføring til sjø: Etter overføring til sjø ble det fokusert på endringer i det ytre epitellaget. Prøvene ble scoret manuelt på en skale fra 0 til 3, hvor 0 representerte intakt epitellag, mens 3 fullstendig tap av vev.

Smitte: Histopatologiske endringer i vevene ble gjennomgått. Videre ble utvalgte prøver fra kjeve og dorsale- og ventrale skinnprøver immunmerket for å verifisere tilstedeværelse av bakterien, og distribusjon i de ulike vevene som er til stede i skinnet.

Microarrayanalyser

Transkriptomanalyser i epidermis og dermis ble utført ved bruk av Nofimas 44 k microarray-oligonukleotidprober som inneholder alle kjente proteinkodende gener fra atlantisk laks (Salgeno-2). Fra hovedforsøket er prøvematerialet inndelt i følgende grupper: Fisk fra holdetankene, fisk holdt på ferskvann (0 ‰), fisk holdt på brakkvann (26 ‰), 0 og 26 ‰ gruppene overført til smittecelle (kontrollprøver smitteforsøk), 0 og 26 ppt grupper smittet. Nofimas bioinformatikk pipeline STARS ble brukt til databehandling. Ekspresjonsratioer (ER) for alle individuelle prober ble utregnet ut ifra gjennomsnittsverdien av alle prøver. Differensiell forskjell i uttrykk av gener (DEG) er definert som: $\log_2\text{-ER} > | 0.8 |$ (1,74 ganger) og $p < 0.05$.

I prosjekt og styringsgruppemøtet i september 2019 ble det foreslått endringer i APV. Fra smitteforsøket utført i mai 2019 ble skinnprøver for microarray delt i ulike skinnlag for å gi et mer nyansert og spesifikt bilde av hvilke responser som skjer hvor i huden. Det var i tillegg store endringer mellom kontrollgruppene for smittet fisk basert på tidspunktet smitten ble gjennomført på. Dette gjorde at prosessen med å overføre fisken til sjøvann også måtte inkluderes i analysene. Dette økte kostnadene for genuttryksanalyser. Ved å omdisponere midlene fra mikrobiotadelen åpnet det seg også en mulighet for å bruke immunohistokjemianalyser. Begrunnelsen bak var todelt. I tillegg til de store forskjellene mellom kontrollgruppene, utviklet fisken sår på kjeve og buk samtidig som epitellaget ikke var intakt og det anses at dette er en overstyrende faktor sammenlignet med kommensale bakterier. Fra histologiske analyser ble det også observert at epidemis i mange av prøvene manglet. Erfaringsmessig påvirker dette ekstraksjonsprosessen slik at det blir mye DNA fra verten i prøvematerialet. Til sammen anses det at evt mikrobielle profiler ville ha liten reell biologisk verdi i dette tilfellet.

5. OPPNÅDDE RESULTATER, DISKUSJON OG KONKLUSJON

API. Målet med innsamling av isolater var å få på plass et representativt utvalg av *Tenacibaculum* spp. knyttet til lakseoppdrett og assosierte marine organismer i Norge. Alle isolater samlet inn i prosjektperioden er klonet og lagret ved UiB. Ca 400 isolater ble samlet inn fra laks og andre fisk i tillegg til isolater fra planktoniske organismer. Det er til dels stor variasjon mellom isolatene, men en rekke isolater fra forskjellige områder langs kysten er like (Se **APV**). Isolatene som er lagret ved UIB vil være tilgjengelig for videre studier av *Tenacibaculum* spp.

AP II. Smitteforsøk 2018

Delforsøk 1.

Badsmitte med *T. finnmarkense* strain HFJ^T.

I delforsøk 1a lyktes det ikke å smitte laksen med *T. finnmarkense* ved bruk av høyere vanntemperaturer (8°C og 10°C) og kortere smittetid (2 timer) i forhold til tidligere forsøk (Småge et al., 2018). For *T. finnmarkense* var målkonsentrasjon satt til 1.0×10^5 bakterier ml⁻¹ under badsmitten. Bakteriekonsentrasjon ble målt retrospektivt til 4.07×10^5 bakterier ml⁻¹. Vi konkluderer med at det ikke lyktes å smitte laksen på grunn av en for lav konsentrasjon av bakterier, dvs for lite bakterier under badsmitten til å gi sykdom. Av erfaring vet en at smitte med *T. finnmarkense* er doseavhengig og at det sannsynligvis er nødvendig å nå et visst bakterienivå før det resulterer i

tenacibaculose. For å kompensere for den reduserte smittetiden og høynede temperaturen trengs det sannsynligvis en høyere bakteriekonsentrasjon under badsmitte for å gi tenacibaculose. Ettersom fisk smittet med *T. finnmarkense* ikke utviklet tenacibaculose, ble det fra hvert kar samlet to fisk etter en uke og to fisk ved avslutning. Dette for å undersøke tilstedeværelsen av bakterien ved hjelp av qPCR-analyser. Disse analysene viste enten svært høye CT-verdier eller at de var negative for *T. finnmarkense*, noe som støtter opp om at infeksjonen ikke ble etablert. Det ble derfor i en endringssøknad til mattilsynet, søkt om å få utføre *T. finnmarkense* badsmitte av laksesmolt ved 8°C i et nytt forsøk, 1b, med høyere bakteriekonsentrasjoner. Ved sampling og ved avslutning av forsøk 1a ble alle fiskene undersøkt og scoret for kliniske tegn i eget skjema.

Badsmitte med Norske *T. maritimum* isolater.

I delforsøk 1a lyktes det ikke å smitte laksen med norske *T. maritimum* ved bruk av smittemodell utviklet for Canadiske *T. maritimum* ved 12 °C. For *T. maritimum* var målkonsentrasjon satt til 1.0×10^7 bakterier ml⁻¹ under badsmitten for de to isolatene som ble testet. Bakteriekonsentrasjon ble målt retrospektivt til $8,4 \times 10^6$ bakterier ml⁻¹ for isolat 1, og 1.13×10^7 bakterier ml⁻¹ for isolat 2. Dette var nært ønsket målkonsentrasjon.

I forsøket lyktes det ikke å smitte laks med de to norske *T. maritimum*-isolatene, selv om konsentrasjonen brukt i forsøkene var lik den ønskede målkonsentrasjon for hvor det var forventet at man skulle få etablert *T. maritimum* infeksjon. Det ble derfor fra hvert kar samlet to fisk etter en uke og to fisk ved avslutning. Dette for å undersøke tilstedeværelsen av bakterien ved hjelp av Real Time RT-PCR-analyser. Disse analysene viste enten svært høye CT-verdier eller at de var negative for *T. maritimum*, noe som støtter opp om at infeksjon ikke hadde blitt etablert. Grunnen til at laksen ikke utviklet sykdom som følge av *T. maritimum* smitte i dette forsøket er uvisst da lite er kjent om de sykdomsfremkallende egenskapene til Norske *T. maritimum* isolater. Resultatet kan derfor skyldes at disse isolatene er mindre virulente enn hva som er tilfellet for andre *T. maritimum*-isolater. Ved sampling og ved avslutning av forsøk 1a ble alle fiskene undersøkt og scoret for kliniske tegn i eget skjema.

Delforsøk 2. Utvikle bad-smittemodeller for *T. finnmarkense* og *T. maritimum* for rognkjeks

Badsmitte *T. finnmarkense*.

I delforsøk 2a lyktes det ikke å smitte rognkjeks med *T. finnmarkense* ved 8 °C og 2 timer smittetid. For *T. finnmarkense* var målkonsentrasjon i dette forsøket økt til 1.0×10^6 bakterier ml⁻¹ under badsmitten basert på resultatene fra forsøk 1a. Bakteriekonsentrasjon ble målt retrospektivt til 2.09×10^6 bakterier ml⁻¹, noe som var nært ønsket målkonsentrasjon.

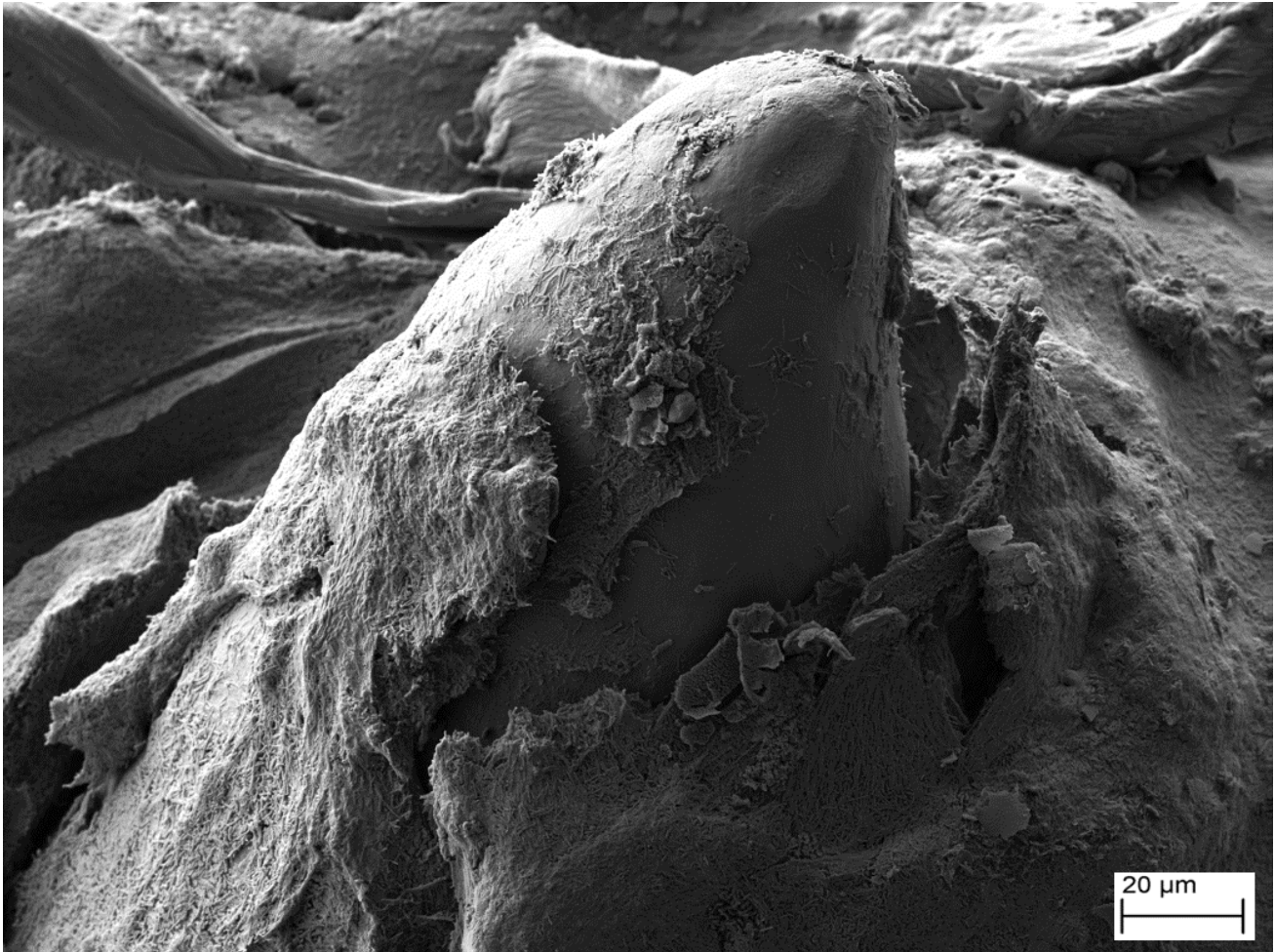
Etter 10 dager ble tre fisk fra hvert kar (kar 1-2) samlet for qPCR-analyser og bakteriedyrking. qPCR- analysene viste enten svært høye CT-verdier eller at de var negative for *T. finnmarkense*. Det lyktes heller ikke å dyrke bakterier fra hud. Dette støtter opp om at infeksjon ikke var etablert. At en ikke lyktes med å etablere infeksjon hos rognkjeks med *T. finnmarkense*-isolatet brukt i forsøket, kan tyde på at dette isolatet ikke gir sykdom for rognkjeks under de testede forholdene.

Badsmitte *T. maritimum*.

I delforsøk 2a lyktes det med å smitte rognkjeks med *T. maritimum* isolat 1 og 2. For *T. maritimum* var målkonsentrasjonen satt til 1.0×10^7 bakterier ml⁻¹. Bakteriekonsentrasjon ble målt retrospektivt til 1.06×10^7 bakterier ml⁻¹ for isolat 1 (NS17 fra laks) og 1.06×10^7 for isolat 2 (NLF15 fra rognkjeks), noe som identisk med ønsket målkonsentrasjon.

Rognkjeksene ble nøye fulgt opp etter smitte. Etter 6 dager (isolat 1), ble det observert hudforandringer på enkelte fisker. Denne forandringen kunne beskrives som en «donut» lignende struktur rundt hudpiggen. Det ble ikke observert noen unormal adferd hos disse affiserte fiskene og de søkte aktivt fôr. Dette kliniske bildet er ikke tidligere beskrevet for *T. maritimum*. I samråd med PMSK (person med særskilt kontrollansvar) og fiskehelseansvarlig (ILAB) ble det besluttet at ved observasjon av tydelig «donut» rundt hudpiggen så skal fisk tas ut av forsøket. Smitte med *T. maritimum*- isolat 2 gav identisk sykdomsforløp og sykdomstegn som ved smitte med *T. maritimum*-isolat 1.

Real Time RT-PCR analyser, histologiske og bakteriologiske undersøkelser og skanning elektronmikroskopi av affisert vev (**Figur 2**), var positive for tilstedeværelse av *T. maritimum* og viste at en infeksjon var etablert. Ingen sykdomstegn eller unormal adferd hos rognkjeksen ble observert i kontrollkar. Ved sampling og ved avslutning av forsøk 2a ble alle fiskene undersøkt og scoret for kliniske tegn i eget skjema.



Figur 2. SEM av hudpiggg hos rognkjeks smittet med norsk *T. maritimum* isolat fra smitteforsøk utført i AP II i 2018. Bildet viser store mengder bakterier med *T. maritimum* morfologi rundt hudpiggen («donut»).

Delforsøk 3. Kohabiteringsforsøk med rognkjeks og laks.

I delforsøk 3 ble rognkjeks smittet med *T. maritimum* isolat 1 og 2 på samme måte som i forsøk 2a. For *T. maritimum* var målkonsentrasjonen satt til 1.0×10^7 bakterier ml^{-1} . Bakteriekonsentrasjon ble målt retrospektivt til 2.22×10^7 bakterier ml^{-1} for isolat 1 og 3.2×10^7 for isolat 2, noe som er litt høyere enn målkonsentrasjonen. Dersom det ikke ble observert kliniske tegn på sykdom hos fiskene i forsøket, ble det planlagt et prøveuttak 10 og 20 dager etter smitte/overføring.

Sheddere: Syv dager etter smitte med *T. maritimum* isolat 1, ble de første rognkjeksene med tegn til «donut» tatt ut av forsøket. Alle rognkjeksene smittet med isolat 1 utviklet «donut» i forsøket. 5 dager etter smitte i med *T. maritimum* isolat 2, ble de første rognkjeksene med tegn til «donut» tatt ut av forsøket. Alle rognkjeksene smittet med isolat 2 utviklet «donut» i forsøket. At «donut» ble observert tidligere i disse karene, skyldes sannsynligvis at det var litt høyere bakteriekonsentrasjon i smitten enn målkonsentrasjonen. I kontrollkarene ble det ikke observert noen adferdsmessige eller kliniske tegn til sykdom hos rognkjeks.

Kohabitanter: Ti dager etter overførsel til smittekar var det ikke observert adferdsmessige eller kliniske tegn til sykdom hos laks. Tre tilfeldige laks ble samlet fra hver kar til Real Time RT-PCR, histologi og bakterieprøver. I løpet av perioden mellom 10 og 20 dagers sampling, ble det i hvert kar tatt ut laks med tegn til sykdom (unormal adferd, petekkiale hudblødninger eller begynnende hudlesjoner).

20 dager etter overførsel til smittekar ble tre tilfeldige laks samlet fra hver kar til Real Time RT-PCR, histologi og bakterieprøver. I kontrollkarene ble det observert noe finneslitasje hos laks.

Ved sampling og avslutning av forsøket ble alle fiskene undersøkt og scoret for kliniske tegn i eget skjema. Resultat fra bakteriedyrking og sekvensering viste at *T. maritimum* var til stede hos laks med begynnende hudlesjoner. Real Time RT-PCR analyser viste at majoriteten av de samplede fiskene hadde tilstedeværelse av *T. maritimum* på hud og i mindre grad på gjeller. Alle fisker var negative for *Moritella viscosa*.

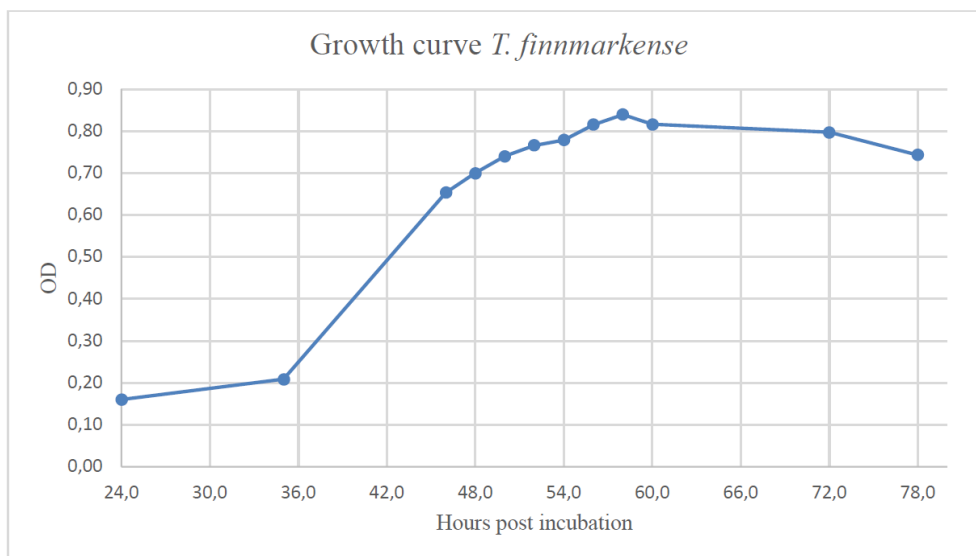
AP II Virulenstesting av ulike *Tenacibaculum* spp

I forsøkene utført i 2018, var det tydelig at det er variasjon i mottakelighet for *T. finnmarkense* strain HFJ mellom laks og rognkjeks. Høy dose *T. finnmarkense* gav ingen sykdom på rognkjeks og tyder på at *T. finnmarkense* strain HFJ ikke er virulent for rognkjeks. En tilsvarende dose ble testet ut på laks i pre-smitte for forsøkene utført i 2019. Denne gav 80 % dødelighet. For *T. maritimum* ble det ikke registrert forskjeller i kliniske tegn hos rognkjeks mellom de to isolatene testet. For laks lyktes det ikke med direkte badsmitte med de samme isolatene, men ved kohabitering ble bakterien overført og sykdom etablert. Dette tyder på at en mer kontinuerlig smitte er nødvendig for å gi sykdom hos laks med disse isolatene. Dette tyder også på at norske *T. maritimum* isolater er mindre virulente en Canadiske *T. maritimum*. Likevel kan den redusert mottakelighet hos laksen for *T. maritimum* også skyldes at den hadde gått på 26 promille sjøvann forut for smitte (Basert på resultatene fra smitteforsøk utført i 2019, se under).

AP II. Smitteforsøk 2019.

Etablering av smitteprotokoll for *T. finnmarkense* ved 8 °C

Før oppstart av smitteforsøkene ble utført et vekstkurveforsøk for *T. finnmarkense* isolat HFJ^T. Disse vekstkurvene viste en ideell Optisk tetthet (OD) og celletall ved 53-54 timers dyrking i risteinkubator på 140 rpm og 16 °C. Se figur under (**Figur 3**):



Figur 3. Vekstkurve for *T. finnmarkense* stamme HFJ^T dyrket i Difco 2216 Marine Broth (MB).

Fra resultatene i smitteforsøkene er det klart at *T. finnmarkense* isolat HFJ^T har en snever terskel for å indusere tenacibaculose. Fra pre-smitte ble det klart at en smittedose på 2.2×10^6 cfu/ml og to timers smittetid gav 80 % dødelighet, mens en smittedose på 7.7×10^5 gav 0 % dødelighet. En dose på 2.2×10^6 i to timer er også ca 10 ganger så mye bakterier som det som er vist å gi 80 % dødelighet ved 4 °C. Dette gjenspeiler det man ser fra felt hvor sårutvikling er særlig knyttet opp mot lave sjøvannstemperaturer. I tillegg ble fisken smittet i eksterne kar, noe som betyr at fisken må håves før og etter smitte. Dette håndteringssteget kan derfor være et nødvendig steg i smitteprotokollen for å gi sykdom ved 8 °C. Dette håndteringssteget er ikke nødvendig for å gi sykdommen på 4 °C.

Dosen som ble brukt i presmitten og som gav 80 % dødelighet ble forsøkt gjenskapt i de påfølgende smitteforsøkene. Dette lyktes ikke helt siden en fikk maksimalt 49 % dødelighet. Fra celledetallmålingene var det derimot klart at antall celler var noe lavere (1.7×10^6) enn i presmitten. Det er likevel ikke store forskjeller i antall bakterier mellom disse forsøkene. Dette viser at OD og dyrkningstid kan brukes til å nokså nøyaktig bestemme celledetallet for denne bakterien i smitteforsøk. Det som gjør det utfordrende å smitte med *T. finnmarkense* isolat HFJ^T ved 8 °C er derfor den snevre terskelen for når den gir sykdom.

Effekten av å holde laks i ulike vannkvaliteter før overføring til sjøvann på mottakelighet for tenacibaculose.

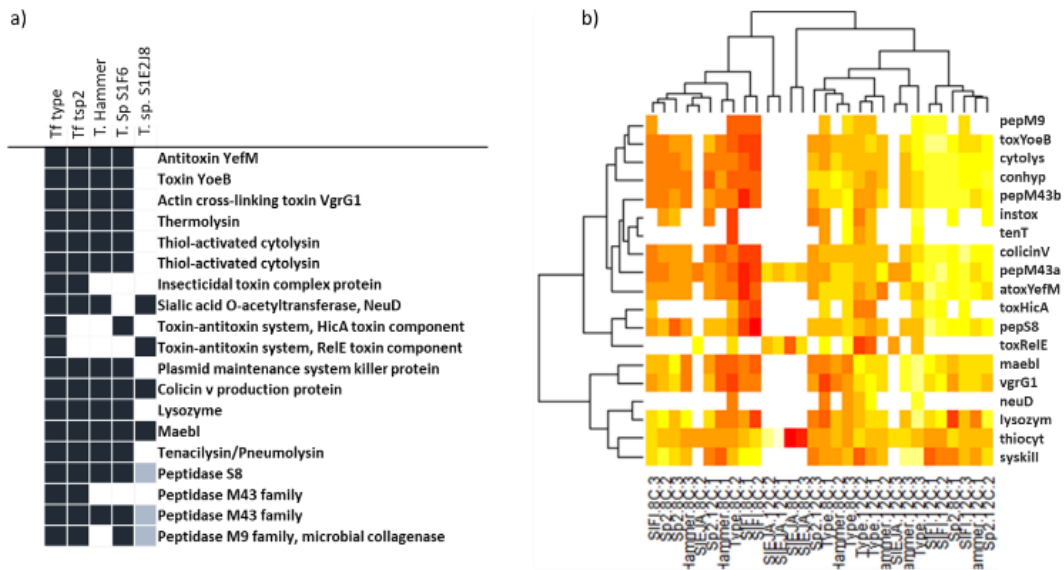
Formålet med dette forsøket var å forbedre den eksisterende smitte modellen for *Tenacibaculum finnmarkense* ved 8 °C og bruke denne til å undersøke om ulike saliniteter under smoltproduksjon har en effekt på smoltens mottakelighet for tenacibaculose etter overgang til sjøvann. To vannkvaliteter (rent ferskvann (F) og lav styrke sjøvann 26‰ (LSS)) ble sammenlignet, hvor smoltgrupper ble holdt i ulike lengde (tid) i de ulike vannkvalitetene før de ble smittet med *T. finnmarkense* (K. Solheim, Master grad)). (Dette forsøket er også knyttet opp mot **APV** - M. Fredriksen, Master grad). I forsøket ble sykdommen reproduert. I forsøk 1 og 3 fikk vi noe lavere dødelighet enn ønsket for tydelig å kunne si noe om effekten av de ulike produksjonsregimene. I forsøk 2 fikk vi 49 % dødelighet i ferskvannsgruppen og 16 % dødelighet i LSS-gruppa, noe som er statistisk signifikant og viser tydelig effekt av å holde fisken i LSS før smitte. I forsøk 3 var det også en trend til høyere dødelighet hos ferskvannsgruppen (K. Solheim, Master grad). I alle delforsøkene ble det tatt ut vevsprøver både før og etter smitte for å undersøke hudstrukturer og immunsystemet i huden (AP V). Resultatene fra disse analysene vil trolig være viktig for å kunne forstå hvorfor LSS-gruppa er mer robust enn ferskvannsgruppen (M. Fredriksen, Master grad).

Resultatene fra dette forsøket vil være svært viktig for oppdrettsnæringa med tanke på nye produksjonsstrategier for smolt, som vil kunne redusere tilfellene av tenacibaculose hos nylig sjø satt laks.

APIII og APIV. Genomet og virulensfaktorer i *Tenacibaculum*

Det er helgenomsekvensert fem isolater av *Tenacibaculum*. Fire fra sår (inkludert *T. finnmarkense*) og en fra manet. Alle fem isolatene er sekvensert med PacBio og fire av isolatene inkludert *T. finnmarkense* har helt lukkede genom. Ett av isolatene ser ut til å inneholde et mindre sirkulært DNA element. Dette vil være uvanlig for genusslekten, men våtlabsdata er nødvendig for å verifisere dette som et plasmidelement. Alle genomene er relativt små slik som hos flere arter av *Tenacibaculum*. De fra sår har genomer på 3,09 – 3,16 Mb. *Tenacibaculum* fra manet er på 2,56 Mb. Ved å klassifisere genene inn i core-gener som alle har, er dette rundt 1600 gener. Gener som noen, men ikke alle har, altså ekstra- eller tilhørs-gener inkluderer rundt 500 gener for de fire sår bakteriene. Rundt femti av disse genene har også manetisolatet. Antall unike gener som er funnet i bare ett av de fire sår isolatene er mellom 13 og 80 gener. Det er manet-isolatet som skiller seg ut i antall gener som er unike mellom disse isolatene. Denne har 330 unike gener. Fylogenetisk er de fire *Tenacibaculum* isolatene fra sår relativt like ut ifra genomsekvensen. Disse danner en subgruppe sammenlignet med andre *Tenacibaculum* spp. Isolatet fra manet utgjør en egen forgreining i den taksonomiske

strukturen av *Tenacibaculum*. Dette gjenspeiles også i kandidatgenene for *Tenacibaculum*-virulens i **Figur 4** der genomene fra de sekvenserte isolatene er brukt for å indentifisere mulige virulensfaktorer slik som beskrevet i metodedelene. En preliminær screening av *T. finnmarkense* mot virulensdatabaser og søkeverktøy viste ingen klare sekreerte toksiner. Dette er også i tråd med publikasjonen på referansegenom for *T. finnmarkense* til Bridel et al. (2018). Bakterien inneholder imidlertid en god del av andre assosierte virulensfaktorer som sekresjonssystemer, opptakssystemer for jern etc. For å undersøke hvordan *Tenacibaculum* regulerer uttrykk av noen av disse genene er listen av undersøkte gener redusert til 19 kandidatgener. Hvilke gener som finnes i de ulike isolatene, er illustrert i **Figur 4**.



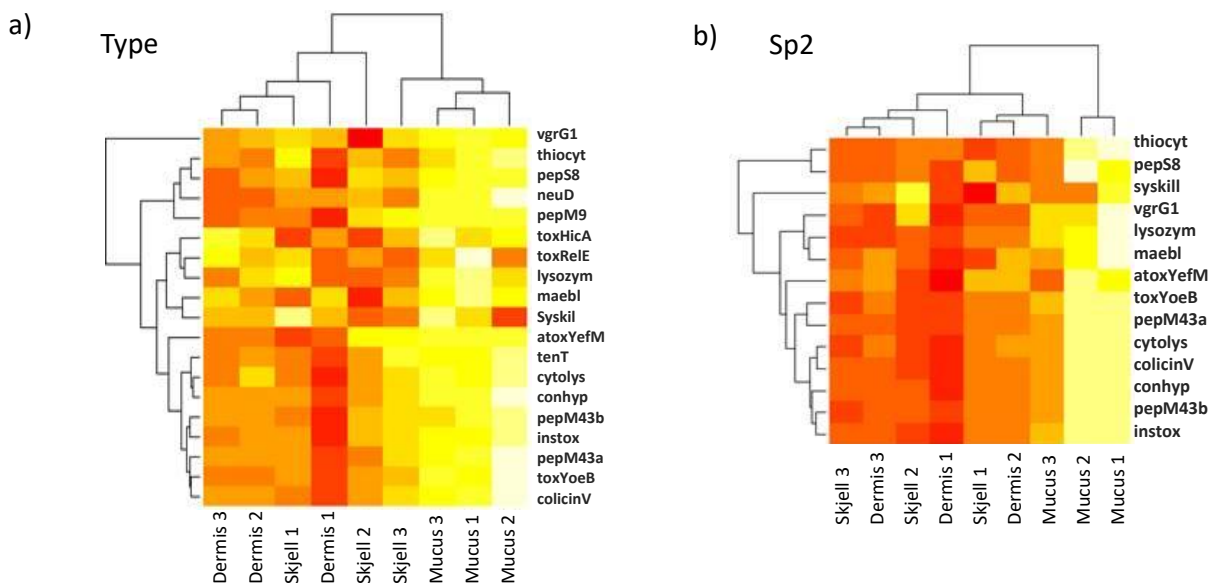
Figur 4. Predikerte putative virulensfaktorer i *Tenacibaculum* fra fem ulike isolater. Tf type viser til *T. finnmarkense* HFJ^T. Sort indikerer tilstedeværelse, hvitt fravær og grå sekvenser med lav likhet. Heatmap viser relativt uttrykk (log₁₀ RE) av virulensgener hos av hver enkelt stamme av *Tenacibaculum* på 8 °C og 12 °C. Rød farge indikerer lavt uttrykk, gult indikerer høyt uttrykk, hvitt ikke uttrykt.

Noen av kandidatgenene er sekreerte toksiner som er predikert ut ifra det som er kjent i fra andre bakterietyper. Actin cross-linking toxin (*vgrG1*) er linket til transportsystem og sekresjon der denne er vist å påføre cytotoxiske effekter på celler ved at den bryter ned aktinstrukturer i cytoskjelettet. Dette ser ut til å være rettet mot fagocytiserende celler og kan hindre makrofagers evne til å ta opp bakteriene. Termolysin *tenT* er et metalloprotease enzym der strukturen til dette proteinet gjør at det ikke denaturerer så lett med varme. Thiol-aktivert cytolysins produseres og skilles også av ulike typer bakterier der enzymet har evnen til å lysere kolesterolholdige membraner og er et poredannende toksin. En annen link til virulens er at enzymet også kan påvirke immuncellefunksjon og cytokininduksjon. Insecticidal toxin complex protein, er et type toxinkompleks som finnes i mange ulike bakterier, også *M. viscosa*. Fra andre bakteriearter er det vist å være et poredannende enzym. Membran assosiert erythrocytt binding-like protein *maeb1* er hos andre involvert i infeksjon av blodceller. Tenacilysin/pneumolysin er et putativt poredannende toksin som kan lysere celler og under infeksjon forstyrre immunresponsen. Peptidase S8 og M43 er proteinnedbrytende enzymer som kan være med på reguleringsmekanismer eller også lysis av celler. Peptidase *pepM9* bryter ned collagenfilamenter. En annen type toksiner er rettet mot andre bakterier som da potensielt vil kunne være positivt for *Tenacibaculum* under ulike betingelser. Colicin V, er en type bakteriocin som noen bakterier skiller ut for å drepe nært beslektede bakterieceller som vil da f.eks redusere konkurransen om essensielle næringsstoffer. Lysozyme er et annet antimikrobielt enzym som ødelegger peptidoglykanet i celleveggen slik at bakterien dør. En annen type mulig virulensfaktor er sialic acid

O-acetyltransferase *neuD*. Denne er en del av sialinsyresynteseveien som bakterier kan bruke til å forme polysakkaridstrukturen som peker ut fra yttermembranen og som er vist i ulike bakterietyper at kan være en måte å unngå vertens immunresponser på. Der er også tatt med flere kandidatgener som kan knyttes til regulering av vekst. Antitoxin *yefM* og toxin *yoeB* finnes i genomer fra mange ulike bakterietyper. Dette er proteiner som påvirker bakterien direkte og er vist å påvirke plasmidstabilitet, stressmekanismer, vekst og involvert i virulens. Genene *hicA*, *relE* og plasmid maintenance system killer protein, er toksinkomponentene fra andre, men lignende toksin-antitoxin komplekser som er med på å regulere vekst. Det er også vist i andre bakterietyper at ulike systemer kan påvirke hverandre.

Vekststudier av de fem isolatene har blitt gjennomført ved 8°C og 12°C i vekstmediumet marine broth som skal etterligne sjøvann med litt næring. Dette er gjort for å sikre at bakteriene har vært i logaritmisk vekstfase ved prøvetakning til qPCR assayet. Relativt i våre forsøk så vokser S1E2J8 (fra manet) raskest og S1E6 seinest. Stammene Hammer, Typeart og sp2 (alle fra sår) legger seg mellom disse.

Ikke alle gener i tabellen er predikert i alle bakteriene og dette stemmer bra med uttrykket fra qPCR assayet (**Figur 4**). Det fremkommer ikke veldig store forskjeller basert på temperatureffekten 8°C og 12°C for isolatene. Assayet viser imidlertid klare forskjeller i uttrykk av genene mellom isolatene. Typestammen viser et mye høyere uttrykk av *neuD* som er et nøkkelenzym i produksjonen av sialinsyre. Dette er en mekanisme som noen patogener bruker til å kapsle yttermembranen sin inn slik at de etterligner mer celledelingsmembraner til verten og på den måten unnslipper vertens immunforsvar. PepM9 er en peptidase som muligens kan bryte ned collagenfraksjoner. Dette er av interesse ettersom det tyder på at det er bindevevet i huden som brytes ned under en infeksjon. PepM9 er høyt uttrykt i både typestammen og S1E6. Også en thermolysin-lik protease er høyt uttrykt i typestammen. Insecticidal toxin complex er også uttrykt i typestammen og sp2 som ikke finnes i de andre. Dette systemet translokerer et toxin som påvirker actinpolymeriseringen i celler. Ut ifra forskjeller mellom isolatene i genuttrykket av virulensgenene som er testet her kan Typestammen være mere virulent enn de andre på bakgrunn av ett eller samspill mellom *neuD*, *pepM9*, thermolysin og et insecticidal toxin

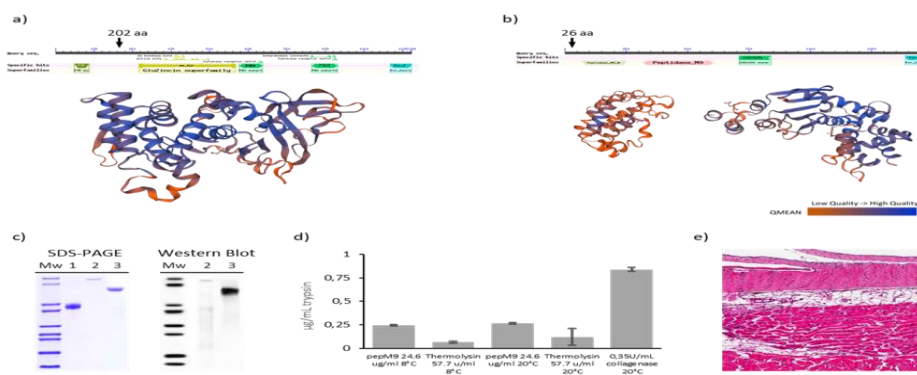


Figur 5. Heatmaps viser relativt uttrykk (log₁₀ RE) av virulensgener hos av hver enkelt stamme av *Tenacibaculum*. Uttrykk av virulensgenene i *T. finnmarkense* HFJ^T (a) og Sp2 (b). Rød farge indikerer lavt uttrykk, gult indikerer høyt uttrykk. Uttrykket er relativt til vekstmediumet og sammenlignet i biologiske triplikater med skinnmucus 1-3, skjell 1-3 og dermis 1-3. Gener som ikke er uttrykt, er ikke inkludert i figurene. *toxHicA*, *toxRelE*, *neuD*, *tenT* og *pepM9* var ikke uttrykt i Sp2.

Det er i tillegg undersøkt hvordan disse virulensgenene er uttrykt når bakterien kommer i kontakt med fiskeskinn. Det er tatt utgangspunkt i HFJ^T og Sp2-stammen. Disse har vært dyrket i marine broth som så har blitt tilsatt en av tre komponenter: 1) mukus fra lakseskinnet, 2) skjell, 3) dermis (skinnen uten skjell). Uttrykket av virulensgenene er relativt sammenlignet til veksten i marine broth. Se uttryksforskjeller i **Figur 5**. For begge isolatene testet så er uttrykket høyest ved kontakt med mukus. *Tenacibaculum* er en del av gruppen *Flavobacter* som er kjent for å kunne nyttiggjøre seg av mukus og mukuskomponenter. Det er likevel litt overaskende at trenden i datasettet med høyere uttrykk i mukus gjelder for alle virulensgenene. Basert på uttryksforskjellene så er to av genene blitt uttrykt rekombinant, henholdsvis *pepM9* og thermolysin *tenT* for å undersøke effekten disse har på fiskeskinn.

Rekombinant TenT og PepM9

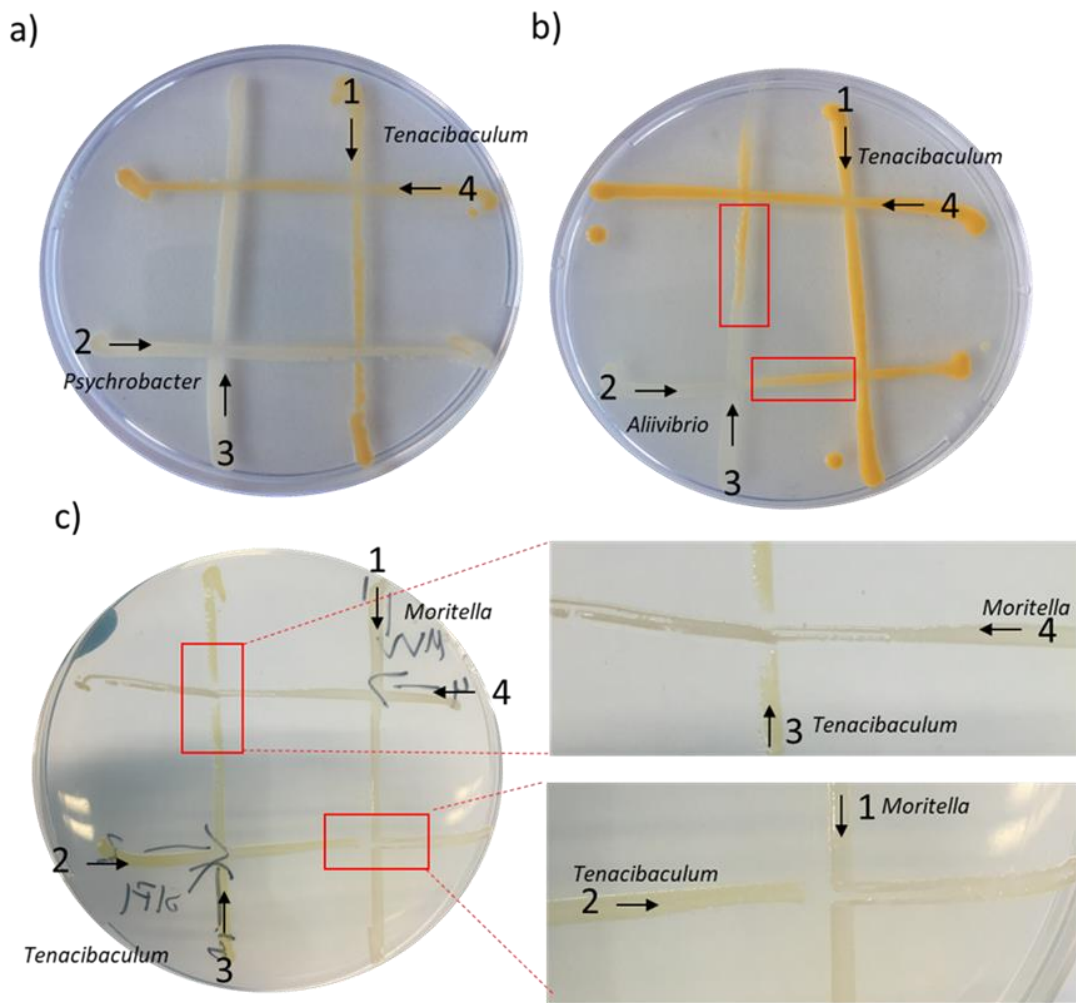
I tidligere studier har *T. finnmarkense* vist seg å være til stede i kollagenrikt vev i huden men også i degenerert vev rundt hudlesjoner med en aktivitet som indikerer proteaseaktivitet. Dette er videre dokumentert i dette prosjektet. Domenestrukturen til TenT inkluderer et signalpeptid (aminosyrene 1-24) og et fungalsin / thermolysin propeptidmotiv i N-terminalenden (aminosyrene 61-109). I tillegg til disse predikerte domenestrukturere indikeres også en Zn-avhengig metalloprotease (aminosyrene 270-583) i peptidase M4-familien, inkludert termolysin. Proteinstrukturmodelleringen ved bruk av modellmal PDB ID 5a37.aA hadde en sekvensidentitet på 37,8% og en QMEAN Z-score på -3,64 som gir en grei sannsynlighet på modellen. I tillegg er det to fibronektin type II-domener, hver med cytokinreseptormotiver (aminosyrene 595 - 661, 830-900) og et C-terminal T9SS-domene (aminosyrene 1084-1154). For PepM9 har propeptider i andre PepM9-lignende proteiner tidligere blitt vist i å hemme peptidaseaktiviteten og ble derfor ikke inkludert i den klonede sekvensen. Domenestrukturen til PepM9 inneholder et signalpeptid (aminosyrene 1-31) som ble tatt bort i den klonede sekvensen. N-terminaldelen av sekvensen dekker også to peptidase M9-domener funnet i mikrobiell kollagenasemetalloproteaser, etterfulgt av et PKD-domene og et C-terminal T9SS-domene. Strukturmodellen med de to M9-domenene viser lav homologi for det ene (indikert med orange farge), men bra for det andre (indikert med blå farge) (**Figur 5b**). De rekombinant uttrykte og rensede proteinene viste ingen kollagenaseaktivitet og er ikke vist her. Proteaseaktivitet ved bruk av kasein som substrat ble påvist for begge proteiner. PepM9 hadde en høyere proteolytisk aktivitet sammenlignet med TenT ved bruk av trypsinaktivitet som referanse (**Figur 5d**). Ingen histopatologisk effekt av subkutant injiserte rekombinante proteinløsninger kunne observeres i atlantisk laks fra den semi *in vivo* hudmodellen som ble brukt (**Figur 5e**).



Figur 5. Rekombinante proteiner av *T. finnmarkense*. a) Motiv og domener fra TenT inkludert struktur av homologimodellen. b) Motiv og domener av PepM9 inkludert struktur av homologimodellen. c) Rekombinant uttrykte og rensede proteiner. Felt 1: BSA (1,80 µg), Felt 2: PepM9-protein (0,80 µg), Felt 3: TenT-protein, Mw: vektmarkør (2,00 µg). Western Blot med bruk av Anti-His antistoff. d) Pierce Colorimetric Protease Assay Kit kjørt ved 8 ° C og 20 ° C med kasein som substrat for å teste proteolytisk aktivitet til TenT og PepM9 i tillegg til en kommersielt tilgjengelig kollagenase. e) Representativt bilde av skinnen fra atlantisk laks subkutant injisert med 0,05 ml rekombinant proteinløsning uten noen indikasjon på histopatologi.

Bakterieinteraksjoner

Tenacibaculum-isolater vokser godt i marin buljong. Ved å bruke andre marine isolater fra slektene *Aliivibrio*, *Moritella*, *Flavobacterium*, *Photobacterium* og *Psychrobacterium* som har en tilsvarende vekstrate i dette mediet ved lave temperaturer, kunne det undersøkes eventuelle interaksjonseffekter ved co-kultivering på plate (**Figur 6**). Ved å undersøke vekstutvikling ble et motilitetsmønster observert. Selv om det ikke er godt kategorisert hvordan *Tenacibaculum* regulerer og kontrollerer glidemotilitet, er det vist her at *Tenacibaculum* glir når de er i kontakt med *Aliivibrio*. Dette ble observert som en generell respons for de fem testede *Tenacibaculum*-typene og tre forskjellige *Aliivibrio*-isolater. Ingen direkte hemmende effekter av *Tenacibaculum* ble funnet. Det ble imidlertid observert fra platene at *Tenacibaculum* kunne ha mindre veksten i nærheten av *Moritella*.



Figur 6. Bakterievekst på marin agar plater. To isolater ble strøket vinkelrett på hverandre for å krysse hverandre. For å få begge krysskombinasjonene av de to isolatene ble de også strøket vinkelrett på hverandre i motsatt rekkefølge. Det er vist ved nummereringen 1 til 4 som viser til rekkefølgen ved utstrykingen. Dette gir fire mulige krysskombinasjoner: isolat 1 krysser seg selv (kombinasjon 1 og 4). Isolat 2 krysser isolat 1 (kombinasjon 1 og 2), Isolat 2 krysser seg selv (kombinasjon 2 og 3), isolat 1 krysser isolat 2 (kombinasjon 3 og 4). a) viser eksempel på at det ikke observeres noen interaksjon. b) de røde rektanglene viser til *Tenacibaculum* som beveger seg på *Aliivibrio* mot utplatingsretningen. c) viser effekt på vekst av *Tenacibaculum* der de røde rektanglene er forstørret i d).

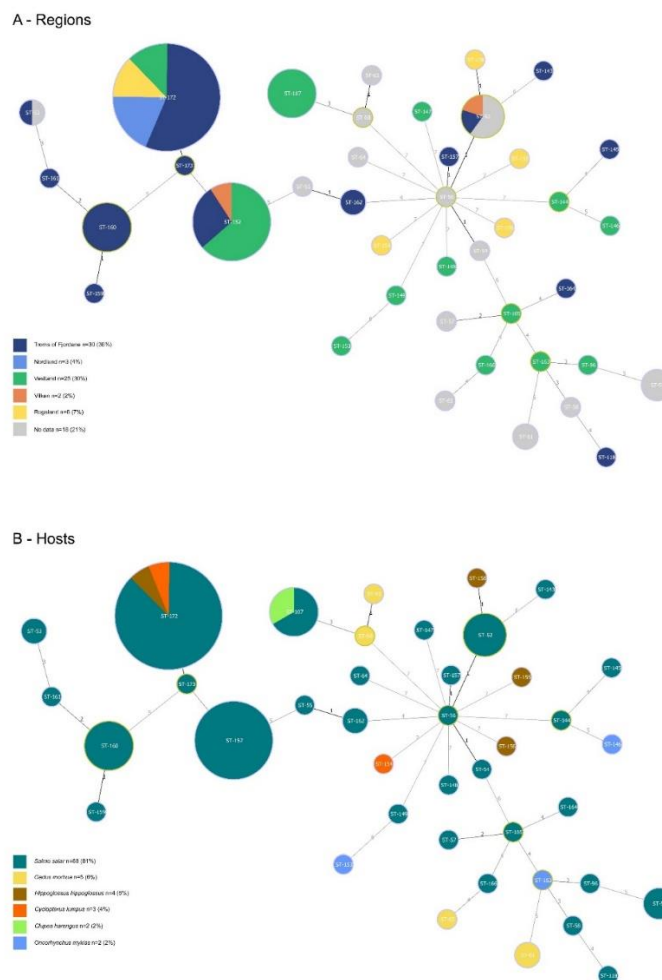
APV: Basert på «Multi Locus Sequence Typing» (MLST) utviklet av Habib et al. (2014), har vi sekvenserte syv husholdningsgener: *atpA* (567 bp), *dnaK* (573 bp), *glyA* (558 bp), *gyrB* (597 bp), *infB* (564 bp), *rlmN* (549 bp) and *tgt* (486 bp) fra 66 utvalgte isolater. Det etablerte MLST-nettstedet (<https://pubmlst.org/tenacibaculum/>) gir unike allele-markører for hver av de syv studerte loci, og definerte tilsvarende alleliske profiler (Sequence Type, ST) for hver stamme. 29 STs ble tildelt disse 66 stammene, hvorav 27 var nye for databasen. Alle disse nye ST beskrevet fra dette prosjektet, samt tilhørende data, er nå fullt tilgjengelig for det vitenskapelige samfunnet på MLST-nettstedet (**Tabell 4**).

Table 4. Alleliske profiler for 66 utvalgte *Tenacibaculum*-stamme fra dette prosjektet, og unike alleliske indikatorer for de syv loci som er vurdert i MLST systemet. ST nummer er tildelt av det etablerte *Tenacibaculum* MLST-nettstedet (<https://pubmlst.org/tenacibaculum/>).

Isolat	atpA	dnaK	glyA	gyrB	infB	rlmN	tgt	ST
LIM001	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM002	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM003	1007	1007	1007	28	1006	8	1005	ST-165
LIM004	1007	10	15	27	1007	1009	1005	ST-96
LIM005	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM006	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM007	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM008	1006	1004	1006	1005	1004	1006	1006	ST-162
LIM009	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM010	1005	1005	1005	1004	1005	1005	1004	ST-53
LIM011	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM012	1007	11	1008	45	18	28	1005	ST-118
LIM013	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM014	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM016	1007	1007	29	35	31	24	1005	ST-164
LIM017	22	32	32	24	23	19	1004	ST-143
LIM018	1006	1004	1006	1005	1004	1006	1006	ST-162
LIM020	1004	1004	1004	1003	1004	31	1006	ST-157
LIM023	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM024	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107
LIM025	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107
LIM026	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM027	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM032	1004	1004	1004	1003	1004	1004	1004	ST-52
LIM033	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM036	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107
LIM040	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM042	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM043	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM044	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM046	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM047	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM048	29	33	30	18	21	1005	1004	ST-173
LIM049	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM050	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM051	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM052	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM053	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM054	1005	22	1005	23	21	1005	23	ST-159
LIM055	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM056	1007	1007	1012	22	18	13	1005	ST-166
LIM057	25	18	34	37	35	22	29	ST-144
LIM058	26	19	26	46	37	17	30	ST-147
LIM059	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM060	1005	22	1005	25	21	1005	23	ST-160
LIM061	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM062	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM063	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107
LIM064	1004	1007	1004	1003	1004	1004	1004	ST-158
LIM065	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM066	1007	1007	15	52	1007	1008	1005	ST-163

LIM067	25	18	34	41	28	18	32	ST-145
LIM068	1005	22	1005	1004	21	1005	3	ST-161
LIM069	27	29	42	43	42	32	36	ST-148
LIM070	28	26	25	50	22	16	28	ST-149
LIM071	29	1006	30	1005	34	1005	1004	ST-152
LIM072	25	18	36	40	25	23	33	ST-146
LIM073	30	20	27	26	22	14	31	ST-153
LIM074	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM075	31	21	33	31	43	27	34	ST-154
LIM076	1004	1004	1004	1003	1004	1004	1004	ST-52
LIM077	29	33	41	18	21	1005	1004	ST-172
LIM078	32	24	44	49	30	34	37	ST-155
LIM079	33	28	45	44	29	33	35	ST-156
LIM080	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107
LIM081	21	1010	1010	30	1009	1010	20	ST-107

For å bestemme DNA-slektskap mellom *Tenacibaculum*-stammer, er det generert et «minimum spanning tree» basert på de syv loci (**Figur 7**).



Figur 7. Minimum spanning tree av *Tenacibaculum*-stammer basert på 7 loci (*atpa*, *dnak*, *glys*, *gyrb*, *infb*, *rlmn* and *tgt*). Sequence types identifiseres med et tall (ST-). Sirkelstørrelse gjenspeiler deres mengde i datasettet. Gruppens grunnleggere er omgitt av en gul sirkel. Datasettet inkluderer 66 STs fra denne studien og 18 STs som allerede er publisert (uten geografiske data). Analysen presenteres med vekt på regioner (A) eller verter (B).

To STs isolert fra laks har tidligere blitt isolert fra laks i 2010 (ST-53) og 2011 (ST-52). Av de 27 nye STs er 22 relatert til ett enkelt utbrudd og en enkelt fiskeart. Hver av dem representerer derfor bare en belastning på figuren. Det viktigste var at fem STs ble isolert flere ganger. ST-160 og ST-162 var assosiert med flere forskjellige ulcerative utbrudd som skjedde i april 2018 i fylkene Troms og Finnmark. ST-107 ble isolert i Vestland, på laks og sild. Det er sannsynligvis den første isolasjonen av en *Tenacibaculum* spp. fra sild. Denne ST har blitt gjenfunnet flere ganger på salmonider: i mars, april og november 2019. ST-152 er assosiert med utbrudd i lakseoppdrettsanlegg. Vi isolerte den fra laks med ulcerøs sykdom fra april 2017 til september 2019, i Troms og Finnmark, Vestland og Viken. ST-172 ble isolert fra laks, rognkjeks og kveite fra april 2018 til mai 2019, i Troms og Finnmark, Nordland, Vestland og Rogaland.

Multi Locus Sequence Analysis

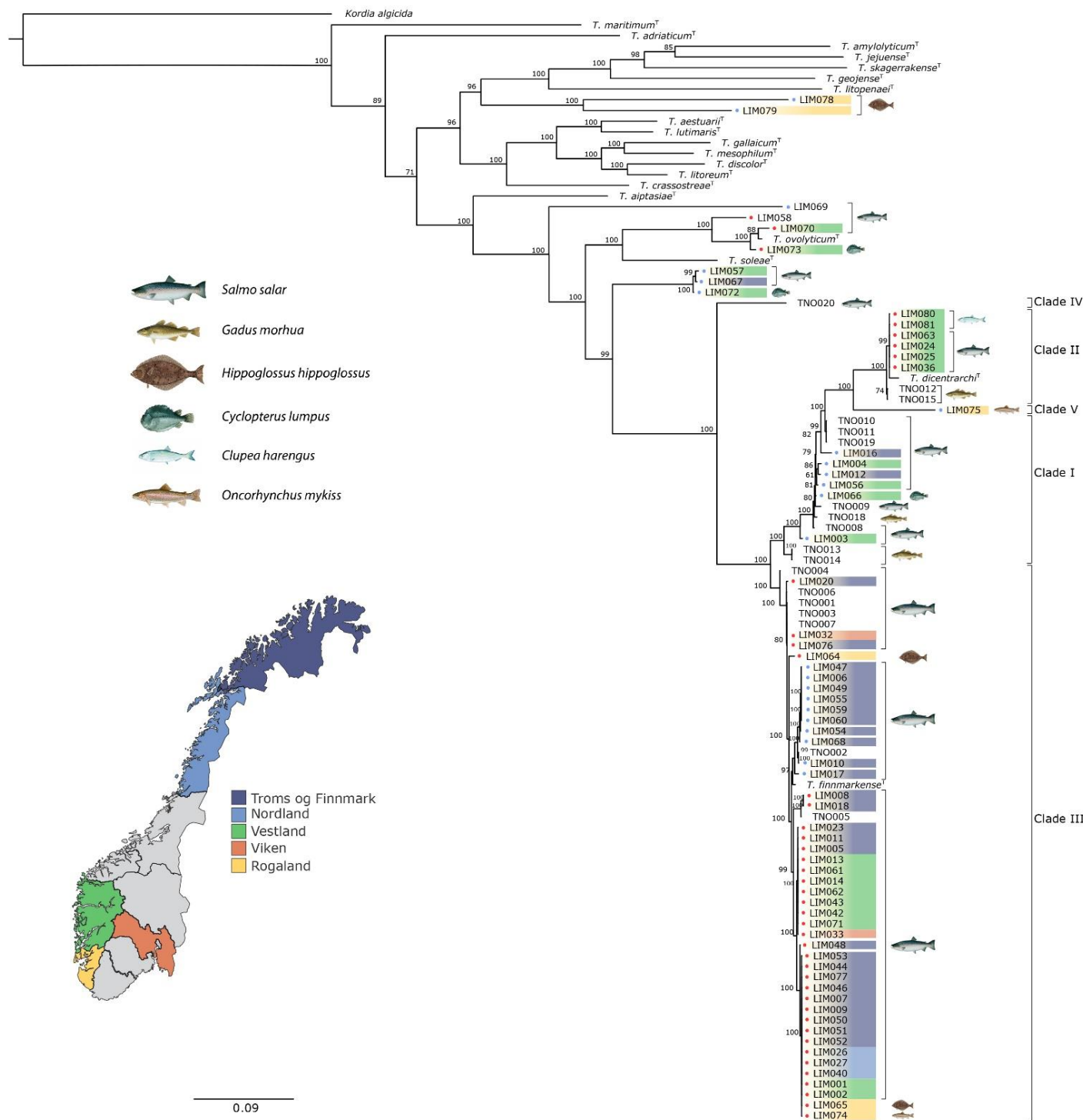
Basert på analysen av de syv vurderte genene (total lengde på 3894 bp) ble det konstruert et fylogenetisk tre (**Figur 8**). For å gi en sammenligning med *Tenacibaculum*-stammer som tidligere er beskrevet i Norge, inkluderte vi i denne analysen 37 sekvenser fra GenBank: 18 stammer som tidligere var isolert i Norge mellom 1996 og 2011 (nemlig TNO), og 19 type-isolater i slekten *Tenacibaculum*: *T. adriaticum*T, *T. aestuarii*T, *T. aiptasiae*T, *T. amylolyticum*T, *T. crassostreae*T, *T. discolor*T, *T. dicentrarchi*T, *T. finnmarkense*T, *T. gallaicum*T, *T. geojense*T, *T. jejuense*T, *T. litopenaei*T, *T. litoreum*T, *T. lutimaris*T, *T. maritimum*T, *T. mesophilum*T, *T. ovolyticum*T, *T. skagerrakense*T, *T. soleae*T.

57 av de 66 stammene (83%) inkludert i MLSA tilhører en stor og svært diversifisert *T. dicentrarchi* / *T. finnmarkense* gruppe som ytterligere kunne skilles i fem distinkte grupper (clade: I, II, III, IV og V). Clade I består av 14 norske *Tenacibaculum*-stammer isolert fra atlantehavslaks, rognkjeks, og atlantisk torsk. Ingen av de seks stammene fra denne studien viste noen β -hemolytisk egenskap. Clade II består av åtte stammer (isolert fra atlantisk laks i mars, april og november 2019 og fra atlantisk sild i februar 2020) og inkluderer stammen *T. dicentrarchi*. De seks isolatene fra denne studien presenterte β -hemolytisk aktivitet på blodagar og var assosiert med kliniske tegn på tenacibaculosis (hudsår og erosjon av finner og munn) og dødelighet.

Clade III inneholder flertallet av *Tenacibaculum*-isolatene i den foreliggende studien (n = 44), og inkluderer typearten *T. finnmarkense* og syv isolater tidligere beskrevet i Norge. 41 av de 44 isolatene ble samlet fra atlantisk laks fra Troms og Finnmark, Nordland, Vestland og Viken. Alle disse isolatene presenterte en β -hemolytisk aktivitet på blodagar, med unntak av ti isolater fra atlantisk laks. De to hovedsekvens typene ST-152 og ST-172 tilhører Clade III.

Clade IV og Clade V er begge representert av et enkelt isolat. LIM057, LIM067 og LIM072 danner en monofyletisk gruppe nært knyttet til *T. finnmarkense* / *T. dicentrarchi* gruppen. De ble isolert fra atlantisk laks og rognkjeks i Vestland og Troms og Finnmark.

Tre stammer isolert fra laks og rognkjeks på Vestland er nært beslektet med *T. ovolyticum* (LIM058, LIM070 og LIM073) og viste β -hemolytisk aktivitet på blodagar. LIM069 ble isolert fra en laks på Vestland i april 2019 og ga ingen β -hemolytisk aktivitet på blodagar. LIM078 og LIM079 er to distinkte stammer som er isolert fra oppdrettet Atlantic kveite i Rogaland. Begge stammene viste ingen β -hemolytisk aktivitet.



Figur 8. Bayesisk fylogenetisk tre av 103 *Tenacibaculum*-stammer basert på sekvenser av syv gener (*atpa*, *dnak*, *glya*, *gyrb*, *infb*, *rlmn* og *tgt*, total lengde på: 3894 bp). Disse representerer 66 *Tenacibaculum*-stammer fra dette studium (LIM-stammer), 37 hentet fra GenBank (TNO-) og 19 *Tenacibaculum* type-arter. Posterior sannsynligheter er indikert ved hver node. Fiskesymboler indikerer verten som hver stamme har blitt isolert fra (LIM og TNO) og farger indikerer den norske administrative regionen, i samsvar med kartet (data er ikke kjent for TNO-stammer). Fargeprikker foran viser de norske stammene som er isolert i dette studiet (LIM) og indikerer om stammene som presenteres viser noen hemolytisk aktivitet på blodagar (rød prikk) eller ikke (blå prikk) hemolytisk aktivitet på blodagar. Cladedene I-V tilsvarer strukturen til *T. finnmarkense* / *T. dicentrarchi* gruppen.

APV. Genotyping *Tenacibaculum* spp.

Resultatene fra den nåværende studien bekrefter det store mangfoldet av *Tenacibaculum*-stammer som finnes i oppdrettsanlegg langs norskekysten og deres assosiasjoner med tenacibaculose-utbrudd.

Denne studien presenterer 66 nye *Tenacibaculum*-stammer isolert og genotypet, samlet i perioden april 2017 til februar 2020. 57 av disse tilhører en større clade inkludert alle *T. finnmarkense* og *T. dicentrarchi* stammer. Fylogenetisk analyse viser at disse 57 norske stammene er strukturert i fem forskjellige clades bestående av *T. finnmarkense* clade I og III, *T. dicentrarchi* clade II og *Tenacibaculum* sp. clade IV og V. Det høye mangfoldet av den norske *Tenacibaculum* spp. er også fremhevet av tilstedeværelsen av stammer relatert til *T. ovolyticum* og av noen stammer som ikke er nært beslektet med noen kjente *Tenacibaculum*-arter. LIM078 og LIM079 (isolert fra atlantisk kveite i Rogaland), LIM069 (isolert fra atlantisk laks i Vestland) og LIM057, LIM067 og LIM072 (isolert fra atlantisk laks og rognkjeks i Troms og Vestland) er ikke nært knyttet til noen *Tenacibaculum* spp. Likevel er det nødvendig med ytterligere identifiseringstrinn for å konkludere med om disse nye stammene representerer nye *Tenacibaculum*-arter.

Den fylogenetiske analysen viste tydelig at flertallet av isolatene tilhører arten *T. finnmarkense* med et flertall isolater som er gruppert i clade III. De fleste av clade III-stammene har β -hemolytisk aktivitet. *T. dicentrarchi*-stammen isolert på Vestland (ST-107, β -hemolytisk) var assosiert med tenacibaculose og dødelighet hos både atlantisk laks og atlantisk sild.

De tre stammene nært beslektet med *T. ovolyticum* var assosiert med symptomer og viste β -hemolytiske aktiviteter under dyrking på blodagar plater. Dette er den første rapporten om patogenisitet til *T. ovolyticum* mot atlantisk laks og rognkjeks.

Samlet sett ser ikke-hemolytiske *Tenacibaculum*-stammer ut til å være mindre patogene og bør ikke forårsake sykdomsutbrudd. Selv om noen ikke-hemolytiske stammer i dette datasettet ser ut til å være assosiert med tenacibaculose (ST-160, clade III), kan vi anta at β -hemolytisk er knyttet til *Tenacibaculum* virulens. I den forbindelse er blodagar type et sterkt verktøy for å vurdere den potensielle virulensen til *Tenacibaculum*-stammene (Småge et al submitted).

Stammer tilhørende *T. finnmarkense* clade I og III er tilstede langs hele norskekysten, fra Oslo (Viken) i sørøst til Finnmark i nord. clade II ("*T. dicentrarchi* clade") og alle stammene nært knyttet til *T. ovolyticum* ble bare isolert på Vestland. Årsaken til at *T. dicentrarchi* og *T. ovolyticum* ser ut til å være mest til stede på Vestlandet er ukjent, men kan være knyttet til flere faktorer som høyere sjøvannstemperatur på Vestlandet sammenlignet med Nord-Norge.

81% av de nye sekvens typene ble isolert fra en enkelt utbruddshendelse og var derfor forbundet med en enkelt lokalitet og vert. Disse funnene styrket resultatene fra tidligere studier som viste at de fleste *Tenacibaculum*-stammer isolert fra oppdrettsfisk i Norge bare fantes på et begrenset geografisk område (Habib et al., 2014, Olsen et al., 2017). Våre resultater viser imidlertid at flere STs har evnen til å spre seg innenfor et bredt geografisk område og er assosiert med tenacibaculose hos forskjellige vertarter. ST-152 er assosiert med utbrudd av tenacibaculose i oppdrettet atlantiske laks i fire forskjellige fylker: Troms, Finnmark, Vestland og Viken. ST-172 er den stammen som har størst utbredelse, fra Finnmark i nord, til Rogaland i sør. Den er også forbundet med alvorlig tenacibaculose. Dette kan indikere at ST-172 har en bredere toleranse for forskjellige sjøvannsforhold (saltholdighet og temperatur) enn *T. dicentrarchi*. Enda viktigere, begge STs ble isolert flere ganger gjennom prøvetakingsperioden, fra april 2017 til mai 2019. Hvordan de sprer seg langs norskekysten og hvordan de kan opprettholde seg i miljøet mellom utbrudd, er fortsatt ukjent. Dessuten har ST-172 blitt isolert fra tre forskjellige fiskearter: atlantisk laks, regnbueørret og rognkjeks.

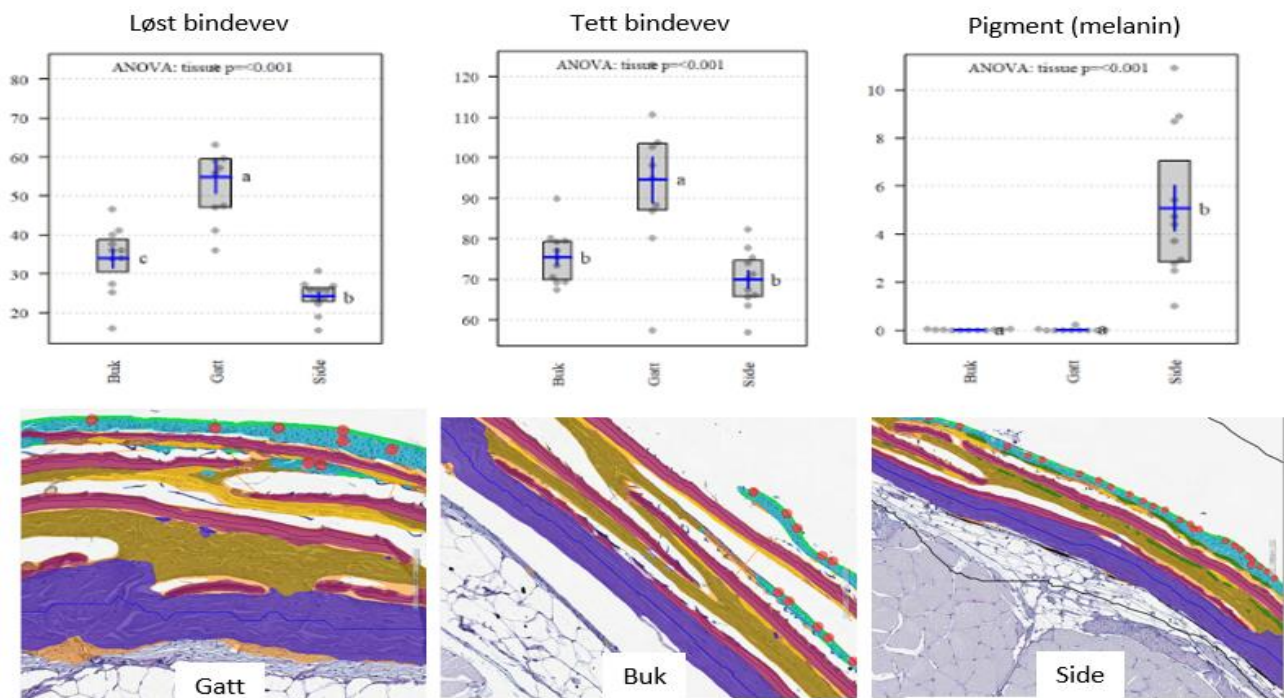
Samlet sett støtter resultatene fra denne studien konklusjonene fra tidligere studier og bekrefter mangfoldet av *Tenacibaculum*-stammer som smitter oppdrettsfisk i Norge. Faktisk er flere *Tenacibaculum*-arter til stede og kan føre til utbrudd. Dette høye antallet forskjellige stammer av *Tenacibaculum* spp. og deres geografiske fordeling er en stor utfordring for havbruk, ikke bare i Norge, men også globalt.

APV. Hudens utvikling og kartlegging av responser i hud fra smolt i ferskvann versus 26 promille sjøvann eksponert mot *Tenacibaculum*

Histologi

Ut ifra smittetesten i **AP II** ville det undersøkes hvordan ulik salinitet og lengde opphold i sjøvann påvirker skinnets ytre barrierefunksjon mot *Tenacibaculum*-infeksjon samt påvirkninger. Først ble det undersøkt hvilke strukturelle endringer som skjer i smolt som holdes på ferskvann versus lavstyrke sjøvann. Dette la grunnlaget for forståelsen av skinnets utvikling og hvilke skinnbarrierer som endres basert på de to vannkvalitetene. Fra smittematerialet er det gitt fokus til den gruppen som gav størst kontrast i dødelighet (smitterunde 2: de i ferskvanngruppen fikk 49 % dødelighet og lav styrke sjøvann fikk 16% dødelighet) for å karakterisere hvilke endringer som fører til økt mottakelighet for sår sykdom.

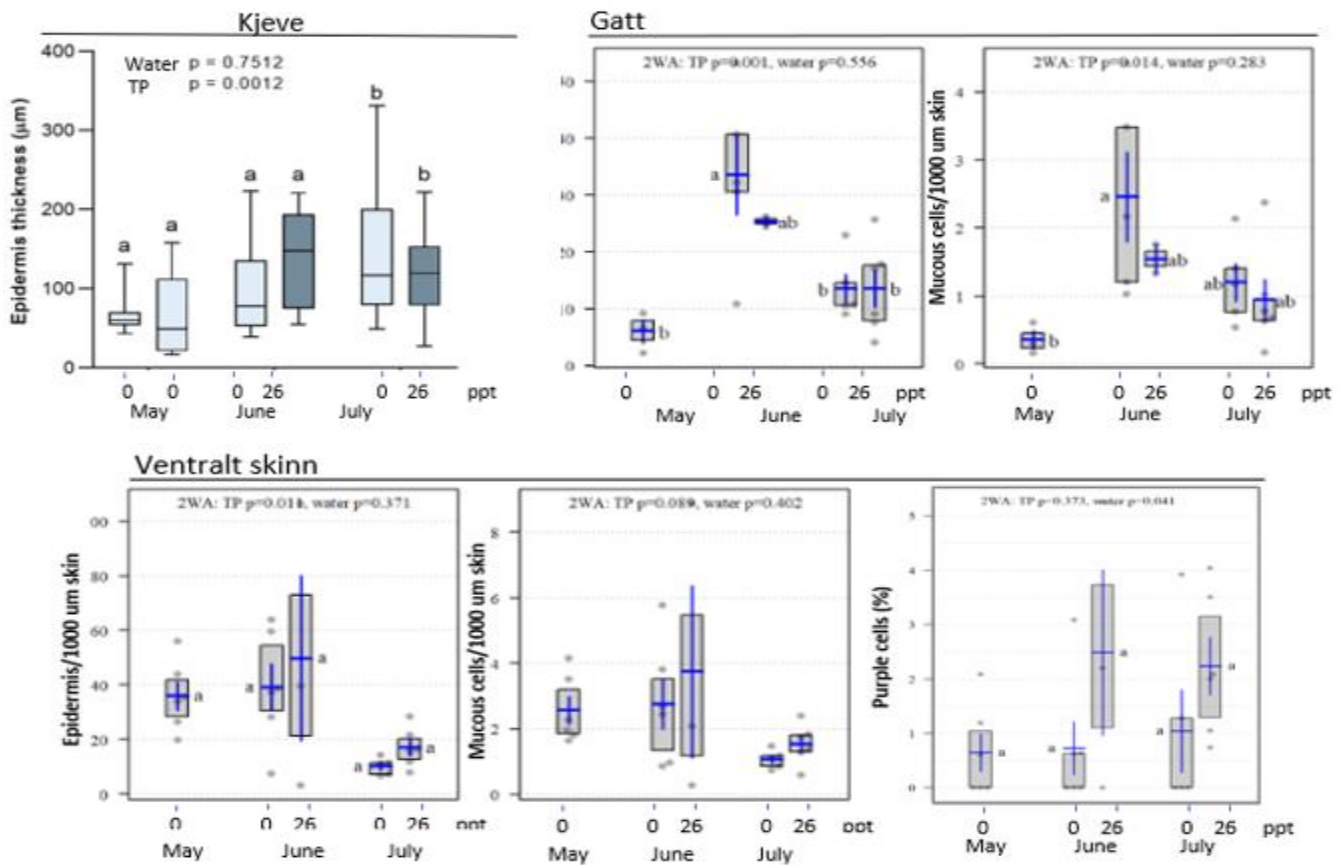
Fra forsøket er det valgt ut 90 fisk. Hver av disse har fire områder som er prøvetatt; kjeve, siden, gatt og hale. Dette gir et omfattende materiale som er analysert for strukturelle komponenter i skinn som mukusceller, tykkelse av epidermis, tykkelse av dermis, skjelltap etc.



Figur 9. AI-analyse, sammenligning av ventrale skinn prøver (buk og gatt) med skinn fra side. Panelene under viser automatisk gjenkjenning av ulike vev og celletyper i skinn

Sammenligning av vevsprøver: Ettersom lesjoner oftest oppstår ved gatt eller tuppen av kjeven ønsket vi først å karakterisere, og deretter sammenligne vevene. De generelle mikroskopiske egenskapene til kjeve og skinn (dorsal, ventral og gat) viste et ytre epitellag (epidermis) og en indre dermis. I det dermale laget var *stratum spongiosum* til stede i alle prøver, mens et veldefinert *stratum compactum* var mest fremtredende i dorsale og ventrale hudprøver. I gattområdet var bindevevet tykkere (både løst og tett bindevev), sammenlignet med dorsale og ventrale hudprøver (**Figur 9**), med kraftige forbindelser til indre organer (muskelvev og endetarm). Skinn på dorsal side hadde

rikelig med pigmentceller (melanocytter), mens det var få melanocytter i skinn fra ventral side og i kjeveprøver. Videre varierte kjeveepitelet sterkt med posisjon, epitelet var tykkst ved tuppen og i samme område var slimceller nesten fraværende. Tykkelsen på epiteler ble redusert og antall slimceller økte etter hvert som avstanden til tuppen økte. Med andre ord ble epitellaget på kjeven mer likt det vi ser i skinn når avstanden øker. Benstrukturer var til stede i alle vevene som skjell (ventral og dorsal hud), og kjeveben (kjeve).

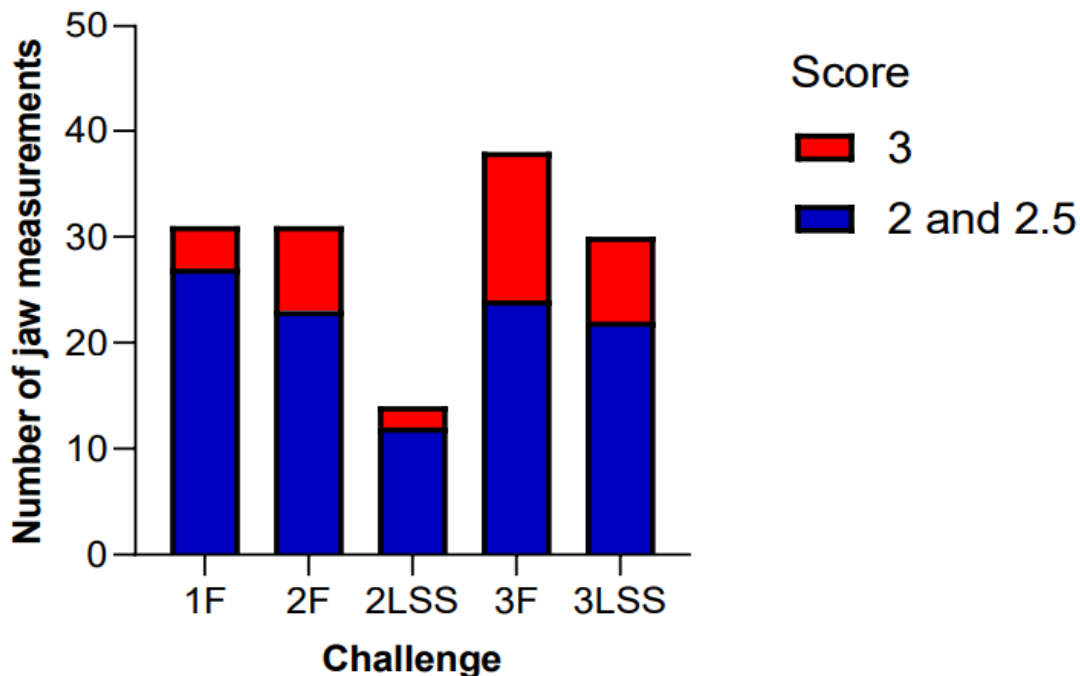


Figur 10. Effekt av salinitet (0 ‰ og 26 ‰) på skinn og kjeve. To-veis-ANOVA (2WA) p-verdier for tidspunkt (måned) og 0 ‰ er. I tilfelle signifikante forskjeller ble parvise sammenligninger (Tukey-test) utført.

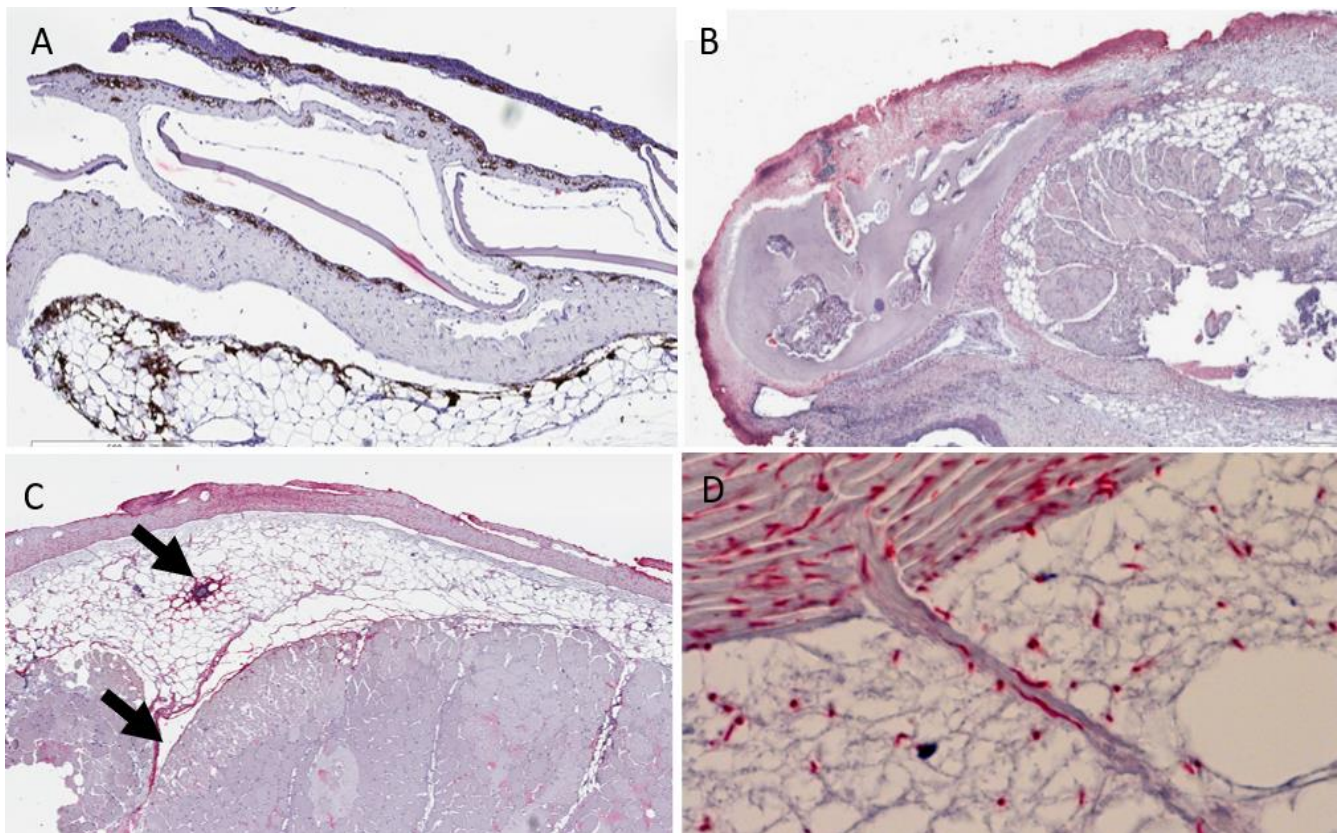
Få observerbare endringer ble funnet som respons på produksjonstid og salinitet. I kjeven økte tykkelsen på epidermis over tid hos fisk oppdrettet ved 0 ‰ ($p = 0.0012$), mens kjeveepitelialtykkelsen for fisk oppdrettet ved 26 ‰ var redusert ved siste prøvetaking. I skinn fra ventralt område og gatt ble epidermis ($p < 0.02$) og antall slimceller ($p < 0.005$) påvirket av tid (mai - juli), og var tykkst i juni. Andelen lilla slimete celler var høyere i det ventrale området av fisk oppdrettet ved 26 ‰. Dorsalhuden forble upåvirket av både tid og behandling. **Figur 10.** AI-analyse, sammenligning av ventrale skinn.

Histopatologi:

Overføring til sjø førte til skader på epidermis i alle gruppene, men epidermis i f gruppene så ut til å være utsatt for skade (**Figur 11**). Etter smitte, bekreftet immunmerking tilstedeværelse av lange stavformede bakterier (**Figur 12**). I kjeve og ventrale skinnprøver var det store forskjeller i histopatologi, fra normalt utseende til tap av vev og strukturer. Bakterien ble hyppigst observert i tuppen av kjeven (område 1), og i gattområdet. Prøver som farget positivt med immunmerking viste vanligvis tap av epidermis, med infiltrasjon av inflammatoriske celler, og enten tomme utvidede blodkar, eller blodkar med stuvning. I noen prøver ble epitelvevet erstattet av et tykt lag med bakterier, og bakteriene ble observert i det dermale dermis rommet. I dermis fulgte bakterien retningen til kollagenfibrene. I det tette bindevevet dukket bakteriene dermed opp som små røde sirkler eller staver avhengig av retningen til de alternerende kollagenfibrene. I to ventrale prøver ble bakterien også funnet i indre vev. Videre antyder observasjoner at prøver med høyere forekomst av bakterier hadde et lavere antall inflammatoriske celler, men flere prøver er nødvendige for å verifisere dette. I dorsalt skinn vev ble det kun observert noen få bakterier i en prøve. Generelt i dorsale vevsprøver fra smittet fisk ble det også observert kraftige melanin responser i epidermis, dermis og hypodermis, trolig en beskyttelsesrespons mot bakterien.



Figur 11. Kjeveepitel etter overføring til sjø. Skalaen går fra 0 – 3, der 0 er normal og 3 fravær av epitel

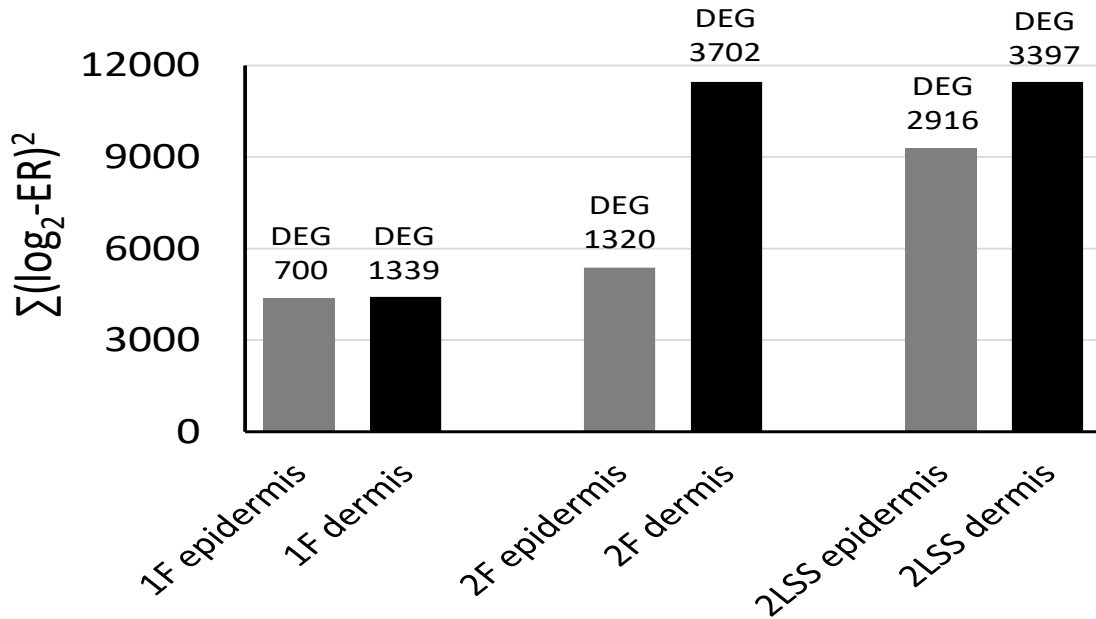


Figur 12. Immunmerking etter smitt med *T. finnmarkense*. A) Kraftig melanisering dorsal skinnprøve. B) Kjeve med *T. finnmarkense*. C) Vevsprøve fra ventralt område, kraftig utbredelse av bakterien i skinn og andre bindevevsdrag (myosept, rundt blodårer, muskelfibre etc.). D) *T. finnmarkense* i overgangen fra skinn til myosept.

Transkripsjonsprofiler i skinn

Materialet til microarray baserer seg på de samme fiskene som er brukt til histologi, men i et mindre omfang antallsmessig. Gruppene er sammenlignet med hverandre når de er prøvetatt i holdetanker på de to vannkvalitetene, etter at de er overført til sjøvann, og fra smitte modellen. Området som er valgt er vevet som ligger like før gattet og som ser ut til å være enda et område på laksen som er mere mottakelig for sårutvikling forårsaket av *T. finnmarkense*. Både sår og intakt vev er brukt. Vevet er delt opp i epidermis og dermis.

Det legges her mest vekt på å vise noen av resultatene på de responsene i skinn som kommer etter smitte. Transkripsjonsdataene er oppsummert i **Figur 13** der stolpediagrammet viser summen av forskjellene i uttrykk mellom gruppene. Over hver stolpe vises antall gener som er forskjellig uttrykt (differently expressed genes DEG). Sammenligningen viser at summen av forskjeller er større i skinn til fisken som er hold til juni (2F (0 ‰) og 2LLS (26 ‰)), altså 4 uker lenger enn 1 F (0 ‰). For junifisken er det ikke forskjell mellom ferskvann og brakkvann, men for ferskvannsfisken (2F) er det forskjeller mellom epidermis og dermis. Denne forskjellen ses ikke i de to andre gruppene.

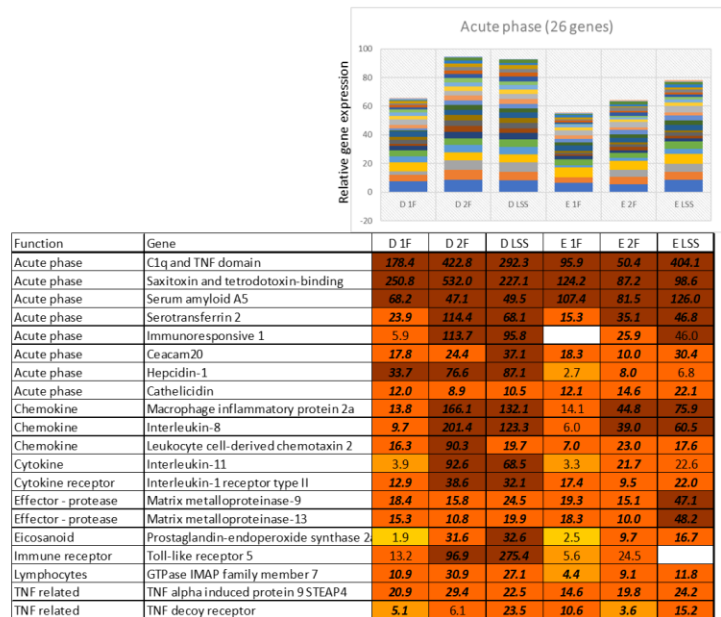


Figur 13. Responser i skinn fra smittet fisk. Fisk fra første smitterunde utført i mai kom fra ferskvann (1F). Andre smitterunde i juni 4 uker etter brukte to grupper som kom fra 0 ‰ ferskvann (2F) eller 26 ‰ brakkvann (2LSS). Skinnen er delt i epidermis og dermis. Søylenes visersummen av ekspresjonsratioen der antall ulike uttrykte gener (DEG) som dette inkluderer er vist over.

a)

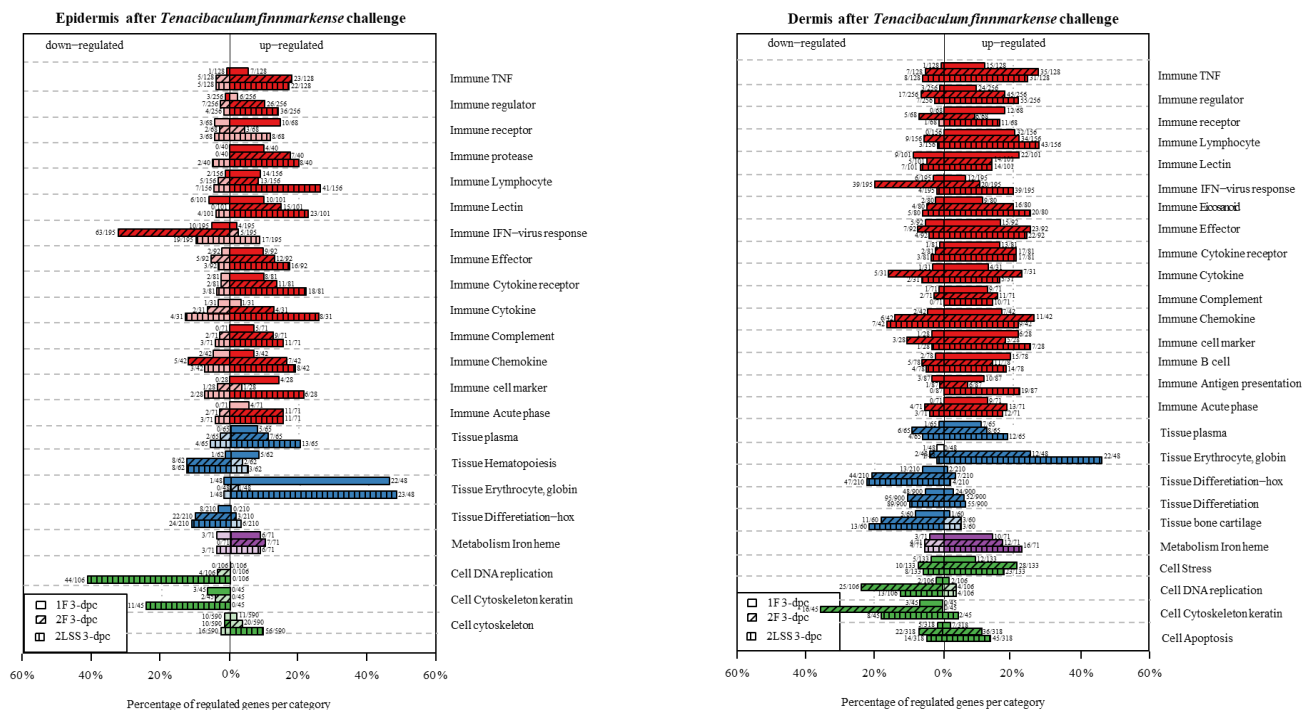
Groups	Genes	D 1F	D 2F	D LSS	E 1F	E 2F	E LSS
Immune and defence responses							
Acute phase	26	<u>4.22</u>	<u>7.74</u>	<u>7.99</u>	<u>3.59</u>	<u>4.13</u>	<u>5.74</u>
Antigen presentation	10	1.14	1.26	<u>1.77</u>	0.93	1.16	1.32
B cell	15	<u>1.66</u>	<u>2.04</u>	<u>2.36</u>	<u>1.81</u>	<u>1.51</u>	<u>2.42</u>
Immune cell markers	9	<u>2.19</u>	<u>2.31</u>	<u>2.68</u>	2.35	1.45	2.33
Chemokine receptors	5	<u>2.56</u>	<u>2.95</u>	<u>4.49</u>	<u>2.93</u>	<u>1.99</u>	<u>3.53</u>
Complement	14	1.88	<u>3.39</u>	<u>2.79</u>	<u>1.84</u>	<u>2.29</u>	<u>2.48</u>
Cytokine receptor	23	<u>1.99</u>	<u>2.50</u>	<u>3.05</u>	<u>2.21</u>	<u>1.82</u>	<u>3.09</u>
Effectors	28	<u>2.22</u>	<u>3.11</u>	<u>3.73</u>	<u>2.28</u>	<u>2.41</u>	<u>3.19</u>
Eicosanoid metabolism	28	<u>1.55</u>	<u>1.83</u>	<u>2.38</u>	1.52	1.41	1.71
Erythrocyte, globin	24	<u>1.41</u>	<u>2.11</u>	<u>2.59</u>	<u>3.03</u>	<u>1.93</u>	<u>5.91</u>
Lectins	37	1.51	1.64	1.65	<u>1.89</u>	<u>1.83</u>	<u>2.86</u>
Lymphocytes	49	<u>1.68</u>	<u>2.11</u>	<u>2.48</u>	<u>1.81</u>	<u>1.66</u>	<u>2.24</u>
Plasma proteins	12	<u>1.65</u>	<u>2.75</u>	<u>2.41</u>	<u>2.47</u>	<u>3.05</u>	<u>4.43</u>
Proteases	13	<u>2.32</u>	<u>3.53</u>	<u>3.53</u>	<u>2.72</u>	<u>3.43</u>	<u>4.94</u>
Pathogen receptors	19	1.72	<u>2.27</u>	<u>2.59</u>	<u>1.82</u>	1.39	<u>1.78</u>
Immune regulators	53	<u>1.47</u>	<u>1.76</u>	<u>2.01</u>	<u>1.42</u>	<u>1.63</u>	<u>1.92</u>
T cells	23	1.36	1.66	1.97	1.22	1.17	1.62
TNF-related	31	<u>1.94</u>	<u>4.48</u>	<u>3.95</u>	<u>1.92</u>	<u>2.93</u>	<u>3.11</u>
Iron & heme metabolism	14	2.06	<u>3.24</u>	<u>3.62</u>	<u>1.95</u>	<u>2.14</u>	<u>2.45</u>
Stress	20	<u>1.69</u>	<u>2.76</u>	<u>3.28</u>	<u>1.92</u>	<u>2.61</u>	<u>3.03</u>
Cellular and systemic structures and functions							
DNA replication	27	<u>-1.20</u>	<u>-2.14</u>	<u>-1.76</u>	<u>-1.42</u>	<u>-1.58</u>	<u>-2.50</u>
DNA repair	10	-1.16	<u>-1.96</u>	<u>-1.74</u>	<u>-1.42</u>	<u>-1.39</u>	<u>-1.96</u>
Cytoskeleton keratin	16	<u>-2.04</u>	<u>-4.34</u>	<u>-2.97</u>	<u>-1.73</u>	<u>-1.81</u>	<u>-2.49</u>
Chromosome	50	<u>-1.30</u>	<u>-2.01</u>	<u>-1.75</u>	<u>-1.30</u>	<u>-1.43</u>	<u>-1.60</u>
Bone & cartilage	11	-1.58	<u>-2.17</u>	<u>-2.00</u>	-1.25	-1.39	-1.44
Endocrine	20	1.22	1.98	<u>2.24</u>	1.31	1.99	<u>2.25</u>
Collagens	26	<u>-2.39</u>	<u>-1.47</u>	<u>-2.00</u>	<u>-1.81</u>	<u>-1.37</u>	<u>-1.77</u>
Differentiation-hox	37	<u>-1.38</u>	<u>-2.43</u>	<u>-2.30</u>	<u>-1.37</u>	<u>-1.56</u>	<u>-1.59</u>

b)



Figur 14. Transkripsjonsresponser ved infeksjon med *Tenacibaculum*. a) Gener er delt inn i funksjonelle gengrupper. Antall gener innen hver gruppe er vist. Data er vist som ganger regulert i smittet sammenlignet med usmittet kontroll. Signifikante verdier ($p < 0.05$) er vist med understreket fet kursive tall. Oppregulerte i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger. Grupper som er signifikant forskjellig mellom 1F og 2F/2LSS er skrevet i rødt. b) Eksempel av ekspresjonsmønster av gener relatert til acute phase der stolpene viser log₂-ekspresjonsratio. Under en tabell med de 20 mest oppregulerte immungenene i studien.

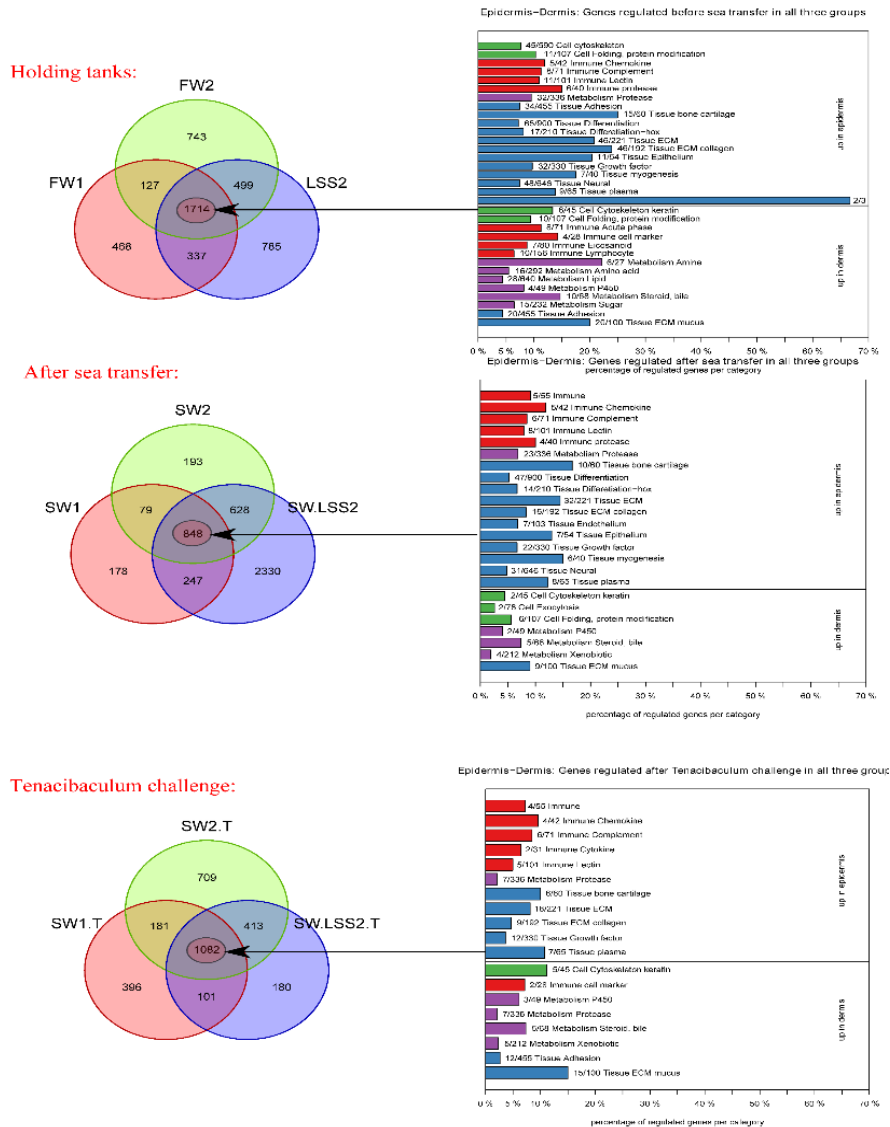
Ved å se på antall gener som er regulert så er det igjen størst endring i skinnen til 2 F og 2LSS sammenlignet med 1F som ble smittet. Deles skinnen opp i epidermis og dermis er det også store forskjeller i skinnen til fisken som er holdt på ferskvann (2F). Ved å se på de ca. 7000 genene som er regulert forskjellig så er både epidermis og dermis i LSS fisken forskjellig til sammenligning mot fisk holdt på ferskvann (1F og 2F). Deler man transkripsjonsprofilene inn i koordinerte uttrykksendringer der hele eller flertallet av gener innen en funksjonsgruppe er enten opp eller nedregulert så gir infeksjon med *Tenacibaculum* klare resultater (**Figur 14 og 15**). Et bredt spekter av immunresponser ble aktivert ved infeksjon. Dette inkluderer gener som er involvert i mekanismer for å gjenkjenne fremmed materiale og signalisering som kjemokiner og eikosoide), det medfødte humorale og cellulære responser, gener assosiert med lymfocytter inkludert B-celler, stress og økt sirkulasjon indikert med økte transkripsjoner av hemoglobiner - markører av erytrocytter. Dette var parallelt med nedregulering av ulike cellulære prosesser og flere gengrupper som koder for intracellulære og ekstracellulære strukturelle proteiner (**Figur 14 og 15**). Skinnen ser ut til å prioritere immunresponser for forsvar på bekostning av vedlikehold og utvikling av celler og vev som er betegnende for akutte faser av smittsomme sykdommer. Resultatene her er også sammenlignbart med tidligere studier med skinnpatogener.



Figur 15. Utvalg av gengrupper som er oppregulert eller nedregulert i epidermis og dermis i skinn infisert med *Tenacibaculum* finnmarkense 3 dager etter smitte (3-dpc) for gruppene 1F, 2F og 2LSS. Figuren viser ikke relativ ekspresjonsratio, men antallet av signifikante regulerte gener av totalen per kategori.

Det er gjort flere sammenligninger av fisken i studiet utover direkte respons mot smitte (**Figur 16**). En er overføringen fra holdetankene (Ferskvann og LSS) til smittecellene (fullt sjøvann). Denne overføringen førte til store endringer i genuttrykk, og i antall sammenlignbart med bakterieinfeksjonen. Epidermis var klart mest påvirket. Det var imidlertid overraskende at postsmolten på begge vannkvaliteter (2F/2LSS) viste større endringer enn (1F). I motsetning til smitten så gav ikke dette den samme meningsfulle trenden i funksjonelle grupper. Det virker som at dette er et forhold/behandling som fører til massive, men kaotiske, forstyrrelser. At skinnen til

postsmoltfiskene i denne perioden er destabilisert på en måte der den i mindre grad er i stand til å respondere koordinert for å nøytralisere virkningene av et nytt miljø. En annen sammenligning er av fisken som ble holdt på ferskvann og LSS i holddetanker og smitteseller der forskjellene var markant større i smittesellene. Trenden er lavere stimulering av immunforsvaret og stressresponser i LSS fisken på smittesellene (full styrke sjøvann). Dette kan igjen indikere at fisken som har gått på LSS tåler overføringen hakket bedre til nytt miljø i smittesellen (full styrke sjøvann). At den klarer å omstille seg raskere og/eller ikke vil være påvirket i like stor grad som ferskvannsfisken og på den måten også kunne respondere bedre mot en infeksjonssykdom.



Figur 16. Gener som er opp eller nedregulert i epidermis og dermis i alle de tre studiebetingelsene der fisken enten er i holddetankene ferskvann 1F og ferskvann/brakkvann 2F/2LSS, etter at de samme gruppene er overført til sjøvann, og fra smittemodellen. For hver av disse tre studiebetingelsene er gruppene 1F, 2F og 2LSS sammenlignet med hverandre. Venn diagrammene viser antall gener som er unike, deles mellom to av gruppene eller reguleres i alle gruppene. For hver av de tre studiebetingelsene er det videre vist eksempler fra hva som er felles opp eller nedregulert i epidermis og dermis mellom alle tre gruppene til høyre i figuren. Dette er vist som stolpediagrammer med antallet av signifikante regulerte gener av totalen per kategori

Diskusjon

Genomene i APIV er brukt til å definere mulige virulensgener og i tråd med publikasjonen til Bridel et al. (2018) var det få klare toksin-lignende gener å finne. Bakterien inneholder imidlertid en god del av andre assosierte virulensfaktorer som sekresjonssystemer, opptakssystemer for jern etc. Det antas likevel at bakterien har evne til å sekretere et eller flere toksiner som en viktig faktor i sårdannelsen.

Ulike predikerte virulensgener ble redusert ned til 19 og uttrykk ble sammenlignet mellom isolater, temperatur og når bakterien kommer i kontakt med fiskeskin. Assayet viste forskjeller i uttrykk av genene mellom isolatene. Typestammen viser et mye høyere uttrykk av *neuD* som er et nøkkelenzym i produksjonen av sialinsyre. Dette er en mekanisme som noen patogener bruker til å kapsle yttermembranen sin inn slik at de etterligner mer cellemembraner til vertsorganismen og på den måten unnslipper vertens immunforsvar. PepM9 er en peptidase som muligens kan bryte ned collagenfraksjoner. Dette er av interesse ettersom det tyder på at bindevevet i huden kan brytes ned under en infeksjon og også brukes av bakterien til å bevege seg i vevet. PepM9 er høyt uttrykt i både typestammen og S1E6. Også en thermolysin-lik protease *tenT* er høyt uttrykt i typestammen. Insecticidal toxin complex er også uttrykt i typestammen og *sp2* som ikke finnes i de andre. Dette systemet translokerer et toxin som påvirker actinpolymeriseringen i celler. Ut ifra forskjeller mellom isolatene i genuttrykket av virulensgenene som er testet her kan Typestammen være mere virulent enn de andre på bakgrunn av ett eller samspill mellom *neuD*, *pepM9*, thermolysin og et insecticidal toxin.

Aktiviteten til collagenasen PepM9 og thermolycinet TenT ble undersøkt med både protease kit og collagenase kit. Spesifikk collagenasaaktivitet ble ikke påvist, men begge proteinene har noe proteaseaktivitet. Aktiviteten er så lav at de ikke per nå kan regnes som proteaseenzymer. Det er imidlertid uvisst om proteinene har foldet seg korrekt fra *E. coli* systemet som da kan påvirke aktiviteten eller om kittene eller andre faktorer har gjort at aktiviteten har blitt lav. Proteinene ble også subkutant testet i en skinnmodell men det ble heller ikke her opp servert noen histopatologiske forandringer. At uttrykk av proteinene ser ut til å bli stimulert av fiskeskinnskomponenter, men ikke ha noen aktivitet som indikerer direkte involvering av nedbrytningen av vev kan antyde at disse proteinene heller kan være involvert som membranproteiner i bakterien knyttet til motilitet.

Prosjektet har testet transkripsjonsendringer av mulige virulensgener hos *T. finnmarkense*, men det er enda ikke avklart hvordan infeksjonen starter og hva det er som gjør at bakterien er virulent. Evnen skinnen har til å respondere mot en infeksjon synes å være relevant og er diskutert nedenfor. En annen mulig faktor som kan påvirke infeksjonsforløpet er bakterie-bakterie interaksjoner mellom *T. finnmarkense* og andre bakterier i vannet eller i mukuslaget i skinnen. Bakterier har ulike måter å bevege seg på. *Tenacibaculum* tilhører en gruppe som bruker glidende bevegelse eller «gliding motility». I denne gruppen mangler grunnleggende forståelse for hvilke mekanismer som gjelder for en slik funksjon til sammenligning med det mye grundigere karakteriserte flagellsystemet. En modell er imidlertid at bakterien produserer adhesiner som festes i et slags belteband som ligger som en helisk struktur rundt bakteriemembranen. Etter hvert som dette båndet går fra front mot bakenden, roterer bakterien også fremover. *Tenacibaculum* beveger seg der det finnes kontakt med *Aliivibrio*-bakterier. En mulig forklaring for at *Tenacibaculum*-motilitet muligjgjøres av at disse kan bevege seg over overflaten/membranene til *Aliivibrio*-bakteriene. En annen er at *Aliivibrio* skiller ut molekyler på overflaten eller omgivelsene rundt cellene som gir en kjemotaktisk respons til *Tenacibaculum*. Det er imidlertid ikke oss bekjent at noe lignende er rapportert i litteraturen. En slik sammenheng der *Aliivibrio* kan påvirke bevegelse til *Tenacibaculum* kan være interessant for et infeksjonsforløp. Bevegelse av denne typen er koblet til sekresjonssystemer og kan potensielt være koblet til sekresjon

av andre faktorer som f.eks proteaser. Om de to proteinene PepM9 og TenT kan være involvert i motiliteten til bakterien burde undersøkes nærmere.

Hypotesen var at ulik salinitet og lengde opphold i brakkvann påvirker skinnets ytre barrierefunksjon mot *Tenacibaculum*-infeksjon. Først ble det undersøkt hvilke strukturelle endringer som skjer når fisk holdes på ferskvann versus lavstyrke sjøvann. Dette la grunnlaget for forståelsen av skinnets utvikling, og hvilke skinnbarrierer som endres basert på de to vannkvalitetene. Fra smittematerialet er det gitt fokus til den gruppen som gav størst kontrast (smitte ved 4 uker på ferskvann (2F) / lav styrke sjøvann (2LSS) for å karakterisere hvilke endringer som fører til økt mottakelighet for sår sykdom.

Kjevepartiet er forbundet med sårutvikling og tenacibaculose i laks. Resultatene fra histologien er også korrelert med sår score og velferdsparametere på de samme gruppene. Ved bruk av histologiske teknikker så man at skinnets utvikling seg litt forskjellig i de to vannkvalitetene. Den klareste effekten var et mere skadet epidermis i ferskvannsfisken etter overføring til sjø som videre forverret seg under infeksjonen. Ved å sette dette i sammenheng med dødeligheten så tror vi at overgangen til fullstyrke sjøvann er en større belastning for ferskvannsfisk enn LSS fisk. Dette tyder på at fisken kan adapteres ved å holdes på LSS før overflytting til sjøvann. Både ferskvannsfisk og LSS fisk hadde skjelltap og derfor også tap av epidermis. Det kan derfor være at LSS fisken har en bedre evne til å respondere på en infeksjon uten at dette reflekteres direkte fra strukturer i huden. I tillegg til kjevepartiet er også bakpartiet utsatt for sårutvikling forårsaket av *T. finnmarkense*. Foruten histopatologiske effekter fra *T. finnmarkense* er også andre funn fremhevet. Blant annet så er det også i dette forsøket vist at antall mukosceller korrelerer med tykkelsen av skinnets. Mukoscellene legger seg også annerledes i stresset fisk. Dette burde tas i betraktning når andelen mukosceller tas i betraktning som en forklaring på beskyttelse eller respons til stimuli.

Videre er det tydelig at vevet i huden er ulikt i de områdene som ble analysert. Kjeve, gatt og finner er mer eksponert mot overflate skader enn sidepartiet hos fisken. Dette er en mulig forklaring på hvorfor sårproblematikk oftest oppstår i disse områdene. Samtidig skal man ikke utelukke at den kraftige pigmenteringsresponsen i dorsalt skinn er med på å hindre bakterien i å infisere de indre kollagenrike hudlagene.

Et annet interessant funn er bakteriens tilsynelatende evne til å følge retningen på kollagenfibrene i dermis. Det er derfor nærliggende å anta at bakterien benytter bindevevsdragene for å forflytte seg i fisken. Ved kraftig infeksjon finner vi bakterien igjen i bindevevsdrag rundt muskelsegmenter, tarm, blodårer i gattområde. Derimot er det lave nivåer av bakterien i blodet. I området rundt gattet er det kort forbindelse mellom skinnets bindevev og det som omgir andre indre organer. Det er uvisst om infeksjon i gattområdet fører til mer alvorlig sykdomsforløp enn infeksjon i f.eks. hale.

Forskjellig salinitet forut for sjøsetting påvirker skinnets utvikling forskjellig, men det ikke har lyktes å beskrive nøyaktig hvilke strukturelle endringer det er som kan bedre beskyttelsen. Fra en sammenstilling av alle transkripsjonsanalysene av skinnets ser skinnets ut til å prioritere immunresponser for forsvar på bekostning av vedlikehold og utvikling av celler og vev som er betegnende for akutte faser av smittsomme sykdommer. Resultatene her er også sammenlignbart med tidligere studier med skinnpatogener. Transkripsjonsresultatene gir et mere sammensatt bilde der skinnets til LSS kan være i bedre stand til å bekjempe en infeksjon. Ut ifra sammenligningene over tid i smittemodellen viser dette at skinnets er i kraftig utvikling og at dette sannsynligvis påvirker utfallet av infeksjoner. Det vil blant annet si at å reprodusere utfallet av smittforsøk med skinnpatogener vil påvirkes i stor grad av hvor i «postsmoltfasen» skinnets befinner seg. Dette vil være en god forklaringsmodell på hvorfor det er så krevende å standardiserer denne typen smittforsøk.

6. HOVEDFUNN

- *Tenacibaculum* mangfoldet i Norge er omfattende, og flere stammer finnes over et stort geografisk område, over flere år, og er i stand til å infisere forskjellige fiskearter.
- Norske *T. maritimum* isolater gir kratersyke («donut» syndrom) hos rognkjeks.
- Norske *T. maritimum* isolater smitter horisontalt fra rognkjeks til laks og gir sykdom hos laks.
- Det er lite horisontal smitte av *T. finnmarkense* mellom laks.
- Det kreves en høyere dose av *T. finnmarkense* for å gi sykdom ved 8 °C enn ved 4 °C.
- Signifikant reduserende effekt på smoltens mottakelighet for tenacibaculose etter overføring til sjø og smitte ved å holde smolten i 4 uker på 26 promille sjøvann. (Å holde smolt på 26 promille sjøvann før smitte med *T. finnmarkense* har en positiv effekt på fiskens velferd basert på velferdsscoreing.)
- Ut fra transkripsjonsprofilen kan *T. finnmarkense* være mere virulent på bakgrunn av et samspill mellom neuD, pepM9, thermolysin og et insecticidal toxin.
- Måten bakterien beveger seg på (følger binnevevsdragene i skinnet) gir ny kunnskap om sykdomsforløpet.
- Transkripsjonsanalysene viser at skinnet prioriterer immunresponser som forsvar på bekostning av vedlikehold og LSS fisken ser ut til å kunne ha en bedre evne til å respondere på en infeksjon
- Ut ifra sammenligningene over tid i smitte modellen viser denne at skinnet er i kraftig utvikling. Utfallet av eksponering mot skinnpatogener vil sannsynligvis påvirkes i stor grad av hvor i «postsmoltfasen» skinnet befinner seg.

7. LEVERANSER

En «Genome-announcement» av *T. finnmarkense* ble publisert allerede februar i 2018 av Bridel et al., (2018). Resultater fra AP III kombineres med AP IV i manuskriptet "Genomic insight into the virulence and genetic diversity of *Tenacibaculum* spp. associated with ulcerated Atlantic salmon"

Prosjektet har etablert metode for qPCR av virulensgener som beskrevet i sluttrapporten og publiseres i ovenfornevnte manuskript.

Scientific publication on the virulence mechanisms of *Tenacibaculum*. <https://nofima.no/verdt-a-vite/verdt-a-vite-om-fiskens-skin/#sarproblemer>: Karlsen et al (2020). «Salt water acclimatization strengthens the skin of post-smolt Atlantic salmon" (Thefishsite.com, hatcheryfm.com, fishfocus.co.uk mm).

Lagadec E, Småge S, Trösse C, Nylund A (submitted to PlosOne). A phylogenetic analysis of Norwegian *Tenacibaculum* strains confirms high diversity and suggests circulation of ubiquitous pathogenic strains.

Protocol for performing av challenge experiment using virulent *T. finnmarkense*: (Kristense Solheim (2020). The effect of using different salinities in smolt production on the susceptibility to tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts after seawater transfer – Establishing a challenge model for *Tenacibaculum finnmarkense* strain HFJT at 8 °C. Master thesis, Department of Biological Sciences, University of Bergen, 90 pp.)

«Faglig sluttrapport» according the guidelines of FHF (vedlagte rapport).

Rapporter

Framdriftsrapport (for FHF-prosjektet: 901433) datert 27.06. 2019.

Framdriftsrapport (for FHF-prosjektet: 901433) datert 20.12. 2019.

Framdriftsrapport (for FHF-prosjektet: 901433) datert 30.06. 2020.

Sluttrapport (for FHF-prosjektet: 901433) datert 02.11.2020.

Formidling/presentasjoner

Lagadec E, Småge SB, Frisch K, Nylund A (2019). Genotyping system as a tool for studying transmission of *Tenacibaculum* spp. in Norway. Frisk Fisk 2019. 6 – 7 Februar Tromsø.

Småge SB, Knutsen LE, Frisch K, Brevik Ø, Nimmongkol P, Lagadec E, Nylund A (2019). Tenacibaculose hos laks og rognkjeks. Frisk Fisk 2019. 6 – 7 Februar Tromsø.

Småge et al (September 2019). Tenacibaculosis in the sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L". Muntlig presentasjon på EAFP 2019, Porto, Portugal.

Brevik et al (September 2019). *Tenacibaculum* infections in farmed Atlantic salmon". Poster-presentasjon på EAFP 2019, Porto, Portugal.

Karlsen, C.R., Ytteborg, E., Sveen, L., Timmerhaus, G., Småge S.B., Krasnov, A. (2019) Atlantic salmon skin function and development in the post smolt stage after seawater transfer. 1st International Symposium on Mucosal Health in Aquaculture (MHA2019). Oslo, Norway, 11-13 September 2019.

Karlsen C, Ytteborg E, Sveen L, Timmerhaus G, Krasnov A (2020) Skinnets ytterste lag og hvordan det opprettholder god fiskehelse. Abstrakt Havbruk 2020.

Fredriksen M, Karlsen C, E, Sveen L, Solheim K, Småge SB (2020) Laksens ytre barrierer og effekten av to ulike produksjonsstrategier på mottakelighet for tenacibaculose. Abstrakt Havbruk 2020.

Kristense Solheim (2020). «Effekten av to ulike smoltproduksjonsstrategiar på mottakelegheit for tenacibakulose hos laks». Muntlig presentasjon på Havbruk 2020.

Karlsen et al (2020). Saltvannstilpasning gjør skinnen til postsmolten sterkere og «Salt water acclimatisation strengthens the skin of post-smolt Atlantic salmon" sendt til nofima.no og norske og engelske fagmedia som f.eks (kyst.no, fisk.no, hatcheryfm.com, fishfocus.co.uk mm) <https://nofima.no/verdt-a-vite/verdt-a-vite-om-fiskens-skin/#sarproblemer>

Masteroppgaver

Kristense Solheim (2020). The effect of using different salinities in smolt production on the susceptibility to tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts after seawater transfer – Establishing a challenge model for *Tenacibaculum finnmarkense* strain HFJT at 8 °C. Master thesis, Department of Biological Sciences, University of Bergen, 90 pp.

Marte Fredriksen (2020). Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin barriers and the effect of two different production systems on susceptibility of *Tenacibaculum finnmarkense*. Master thesis, Department of Biological Sciences, University of Bergen, 54 pp.

Vitenskapelige publikasjoner

Småge S, Frisch K, Lagadec E, Jakobsen Brevik Ø, Duesund H, Nylund A (submitted). Improved growth medium for the isolation and identification of fish pathogenic *Tenacibaculum* spp.

Lagadec E, Småge S, Trosse C, Nylund A (submitted to PlosOne). A phylogenetic analysis of Norwegian *Tenacibaculum* strains confirms high diversity and suggests circulation of ubiquitous pathogenic strains.

Manuskript under utarbeidelse. Karlsen med flere (2020). "Genomic insight into the virulence and genetic diversity of *Tenacibaculum* spp. associated with ulcerated Atlantic salmon"

Manuskript under utarbeidelse. Karlsen med flere (2020). «Saltwater acclimatization strengthens the skin of post-smolt Atlantic salmon»

Manuskript under utarbeidelse (Småge m.fl. 2020/21). Description of *T. maritimum* infections in farmed lumpfish and the horizontal transfer of *T. maritimum* from diseased lumpfish to salmon in a cohabitation experiment using two Norwegian *T. maritimum* isolates.

Manuskript under utarbeidelse (Småge, Solheim m.fl. 2020/2021) The effect of using different salinities in smolt production on the susceptibility to tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts after seawater transfer.

Litteratur

- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., et al. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 37(4), 420-423. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17), 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Avendaño-Herrera R, E.Toranzo, A., Beatriz, M., 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 255-266.
- Benediktsdottir, E., Helgason, S., Sigurjonsdottir, H., 1998. *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *Journal of Fish Diseases* 21, 19-28.
- Bornø, G., Linaker (eds), M.L., 2015. Fiskehelserapporten 2014. Veterinary Institute, Harstad, Norway.
- Bridel, S., Olsen, A.-B., Nilsen, H., Bernardet, J.-F., Achaz, G., Avendaño-Herrera, R., et al. (2018). Comparative Genomics of *Tenacibaculum dicentrarchi* and "Tenacibaculum finnmarkense" Highlights Intricate Evolution of Fish-Pathogenic Species. *Genome Biology and Evolution* 10(2), 452-457. doi: 10.1093/gbe/evy020 %J Genome Biology and Evolution.
- Bullock, A.M., Marks, R., Roberts, R.J., 1978. Cell-kinetics of teleost fish epidermis—epidermal mitotic-activity in relation to wound-healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool.* 185, 197–204.
- Chen MF, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *J Aquat Anim Health* 7: 318 – 326.
- Gupta, A., Kapil, R., Dhakan, D.B., and Sharma, V.K. (2014). MP3: A Software Tool for the Prediction of Pathogenic Proteins in Genomic and Metagenomic Data. *PLOS ONE* 9(4), e93907. doi: 10.1371/journal.pone.0093907.
- Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J.F., Olsen, A.B., Nilsen, H., Toranzo, A.E., Castro, N., Nicolas, P., Duchaud, E., 2014. Multilocus sequence analysis of the marine bacterial genus *Tenacibaculum* suggests parallel evolution of fish pathogenicity and endemic colonization of aquaculture systems. *Appl Environ Microbiol* 80, 5503-5514.
- Karlsen C., Sørum H., Willassen N.P. & Åsbakk K. (2012) *Moritella viscosa* bypasses Atlantic salmon epidermal keratocyte clearing activity and might use skin surfaces as a port of infection. *Veterinary Microbiology* 154, 353-62.
- Larsen A., Bullard S., Womble M. & Arias C. (2015) Community structure of skin microbiome of Gulf killifish, *Fundulus grandis*, is driven by seasonality and not exposure to oiled sediments in a Louisiana salt marsh. *Microbial Ecology* 70, 534-44.
- Larsen M.H., Larsen J.L. & Olsen J.E. (2001) Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. *FEMS Microbiology Ecology* 38, 77-80.
- Lindell K., Fahlgren A., Hjerde E., Willassen N.-P., Fällman M. & Milton D.L. (2012) Lipopolysaccharide O-antigen prevents phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin epithelial cells. *PLoS ONE* 7, e37678.

- Lunder, T., Evensen, O., Holstad, G., Hastein, T., 1995. Winter ulcer in the Atlantic salmon *Salmo salar* - Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 39-49.
- Madetoja, J., Nyman, P., Wiklund, T., 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ* 43, 27-38.
- Noble, C., Gismervik, S., Iversen, M., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L., et al. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic Salmon: tools for assessing fish welfare.
- Olsen, A.B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sørum, H., Colquhoun, D.J., 2011. *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* 94, 189-199.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Shephard K.L. (1994) Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 401-29.
- Småge, S.B., 2014. Genotypic and phenotypic characterization of *Tenacibaculum* spp. isolated from skin ulcers in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Master thesis, Department of Biology, University of Bergen, pp 77.
- Småge SB, Brevik ØJ, Duesund H, Ottem KF, Watanabe K, Nylund A (2015). *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov., a fish pathogenic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from Atlantic salmon. *Antonie van Leeuwenhoek* DOI 10.1007/s10482-015-0630-0.
- Småge SB, Frisch K, Brevik ØJ, Watanabe K, Nylund A (2016). First isolation, identification and characterization of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture* 464: 178 – 184.
- Sveen, L., Karlsen, C., and Ytteborg, E. (2020). Mechanical induced wounds in fish – a review on models and healing mechanisms. *Reviews in Aquaculture* n/a(n/a). doi: 10.1111/raq.12443.
- Sveen, L.R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Stefansson, S.O., Handeland, S.O., et al. (2018). High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scientific Reports* 8(1), 16907. doi: 10.1038/s41598-018-35002-5.
- Svendsen, Y.S., Børgwald, J., 1997. Influence of artificial wound and nonintact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 317-325.
- Vold V (2014). Challenge experiment with field isolates of *Tenacibaculum* spp. isolated from moribund Atlantic salmon (*Salmo salar*). Master of Science Thesis, Department of Biology, University of Bergen.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46(W1), W296-W303. doi: 10.1093/nar/gky427 %J Nucleic Acids Research.
- Åsbakk K. (2001) Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin. *Journal of Fish Biology* 58, 953-66.