



Miljø-DNA sporing av *Yersinia ruckeri* hos norsk oppdrettslaks

Veterinærinstituttet har i flere år forsket på bakteriesykdommen yersiniose i norsk fiskeoppdrett. Etter en dramatisk økning av denne sykdommen hos stor oppdrettslaks i sjøfasen i Midt-Norge i perioden 2016-2018, fikk vi innvilget to prosjekter finansiert av henholdsvis FHF og NFR. I prosjektene undersøkte vi kliniske og 'skjulte' infeksjoner med *Yersinia ruckeri* hos settefisk og sjøsatt laks. Vi utviklet et PCR-basert sporingsverktøy, i kombinasjon med såkalt miljø-DNA-undersøkelse, for å påvise en sykdomsfremkallende variant av *Y. ruckeri*. Denne varianten er vist ansvarlig for alle alvorlige yersiniose-utbrudd hos norsk laks de siste 30 årene. Her oppsummerer vi funnene etter å ha tatt denne teknologien i bruk.

Av David Strand¹, Anita Rønneseth², Andreas Riborg^{1,3}, Snorre Gulla¹, Saima N. Muhammad¹, Jannicke Wiik-Nielsen¹ og Duncan J. Colquhoun^{1,2}

¹Veterinærinstituttet, ²Universitet i Bergen, ³Vaxxinoa Norge AS

Yersiniose skyldes infeksjon med bakterien *Yersinia ruckeri*. Internasjonalt er denne sykdommen hovedsakelig et problem i oppdrett av regnbueørret, men i Norge ser vi yersiniose nesten bare hos atlantisk laks, med unntak av noen få tilfeller hos oppdrettsrøye. Det finnes mange genetiske varianter av *Y. ruckeri* i sette- og stamfiskanlegg, av og til også i villaks, men bare én av variantene forårsaker alvorlig sykdom hos laks i Norge, såkalt klonal kompleks 1 (CC1).

Yersiniose i sjøfasen

Før introduksjon av stikkvaksiner mot yersiniose utgjorde sykdommen et økende problem for sjøsatt laks i Midt-Norge i perioden 2016-2018. Flere utbrudd ble påvist hos laks andre år i sjø og i mange tilfeller kunne det ikke vises direkte sammenheng med *Y. ruckeri*-problematikk i ferskvannsfasen. Genotypisk sammenligning av isolater fra nærliggende anlegg i sjøen tyder ikke på spredning mellom de undersøkte anleggene. Vi har sett nærmere på denne problemstillingen med en hypotese om at utbrudd i sjøfasen forårsakes av aktivering av underliggende, 'skjult' *Y. ruckeri*-infeksjon med opprinnelse i settefiskfasen.

I prosjektene undersøkte vi utbredelsen av den sykdomsfremkallende CC1-varianten og øvrige varianter av *Y. ruckeri* i miljøet i ulike settefiskanlegg. Vi undersøkte også vannet i behandlingskamre under termisk avlusning i sjø for å se om utskillelse og oppsamling av bakterien i kammeret kunne relateres til utbruddene

av yersiniose sent i sjøfasen. Resultatene fra disse undersøkelsene ble så testet i smitteforsøk.

Prøvetaking av fiskens omgivelser istedenfor av fiskevev

Det er vanskelig å påvise infeksjoner som ligger 'skjult' i fiskepopulasjoner. Slike infeksjoner har ofte lav prevalens, og derfor valgte vi å fokusere på prøver tatt fra miljøet i anleggene istedenfor å gjøre et omfattende prøveuttak av vev fra fisk. Metoden kalles miljø-DNA (environmental DNA/eDNA) og baserer seg på påvisning av bakterielt DNA som frigis til omgivelsene fra bakteriene. Veterinærinstituttet har tidligere utviklet og bruker dette verktøyet blant annet i overvåkningsprogrammer for lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* og soppen *Aphanomyces astaci* som forårsaker krepsepest.

For å skille mellom sykdomsfremkallende og øvrige varianter av *Y. ruckeri* i anleggene, utviklet vi to PCR-metoder basert på sammenligning av hel-genomsekvenser fra 438 isolater; én for generell påvisning av arten *Y. ruckeri* og én som bare påviser den sykdomsfremkallende CC1-varianten.

Biofilm fra miljøet i settefiskanlegg

Før vi gikk i gang med screening for *Y. ruckeri* i miljøet i ulike settefiskanlegg i Midt-Norge, valgte vi ut fire 'validerings'-anlegg. Fra disse anleggene ble det gjort omfattende prøvetaking for å finne egnede prøvetakingssteder for analyse av miljø-DNA og for å etablere en enkel og effektiv prøvetakingsmetode. Anleggene

ble valgt fordi de hadde en historikk med yersiniose, noe som økte sannsynligheten for at sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* var tilstede.

Miljøprøvene som ble testet var vann og biofilm (se figur 1). Vannprøvene ble tatt fra overflatevann, midt i karet og fra utløpsvann. Biofilm ble tatt med svaber i vannspeilet på alle karvegger, samt fra stigerør og avløp. I anleggene hvor det ble påvist *Y. ruckeri* ble bakterien påvist ved begge prøvetakings-metodene. Vi valgte derfor biofilm som prøvemateriale fordi metoden med vannprøver tok lenger tid, og krevde mer utstyr og opplæring.

Både sykdomsfremkallende og ikke-sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* i samme settefiskanlegg

Sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* ble påvist i alle de fire 'validerings'-anleggene. I startfôringsavdelingen på et av anleggene (se figur 2) ble det kun påvist ikke-sykdomsfremkallende *Y. ruckeri*, mens den sykdomsfremkallende varianten ble påvist i varierende mengder i etterfølgende gjennomstrømnings-avdelinger og i RAS-avdelingen. Dette viser at det er flere varianter av *Y. ruckeri* tilstede i anlegget, muligens også i de andre avdelingene, som blir 'skjult' bak påvisningen av den sykdomsfremkallende CC1-varianten.

Økende vaksinedekning

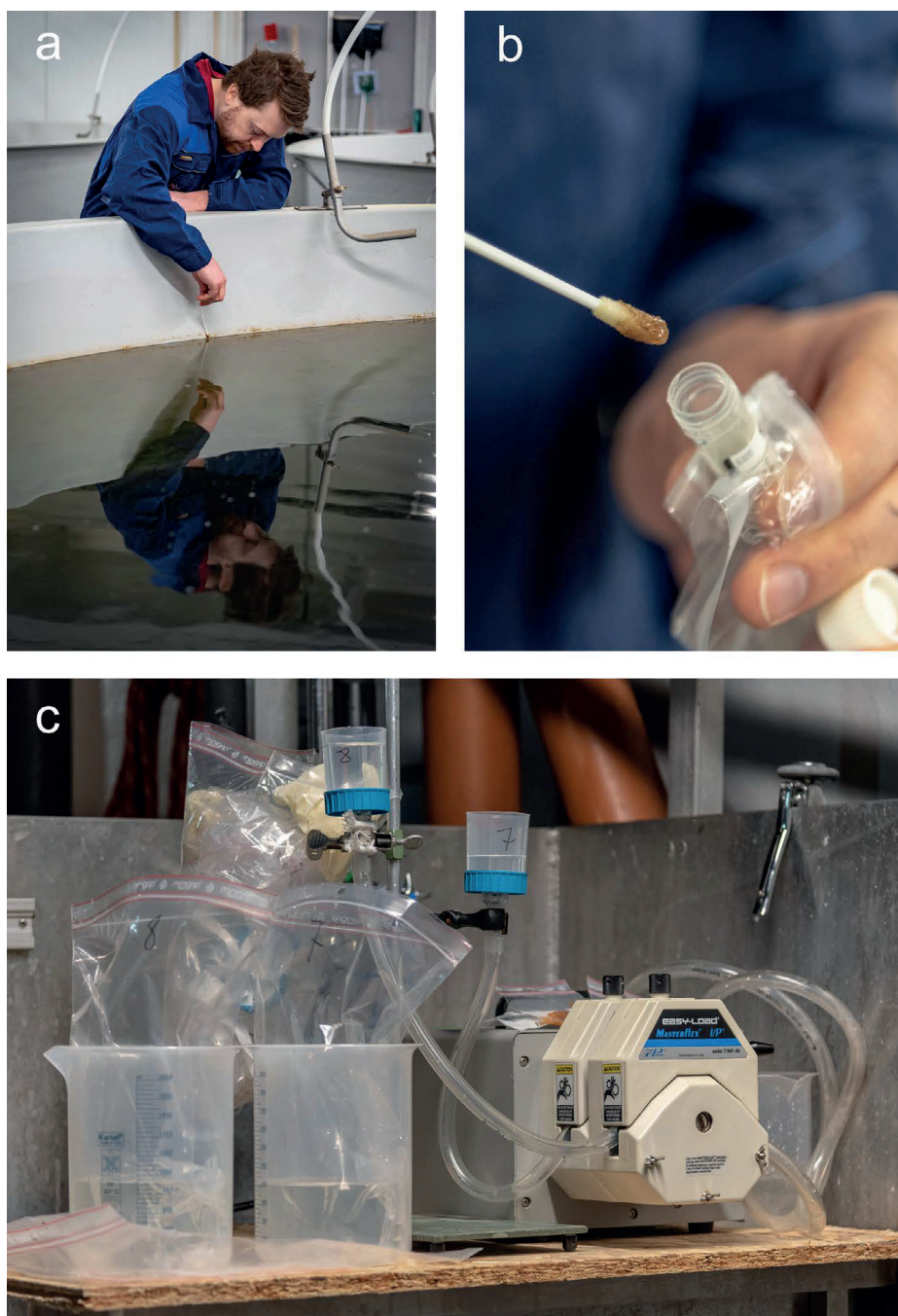
Etter vellykket undersøkelse av 'validerings'-anleggene, satte vi i gang den planlagte screeningen av settefiskanlegg som leverer smolt til sjø i Midt-Norge. For hvert anlegg ble det tatt biofilmprøver fra diverse overflater og avløp knyttet til kar med og uten yersiniose-vaksinert fisk. Det ble også innhentet relevante produksjonsdata som vaksinestatus og eventuelt vaksineringsstidspunkt.

Etterhvert så vi en klar sammenheng mellom økt påvisning av den sykdomsfremkallende CC1-varianten av *Y. ruckeri* og vaksineringsstatus mot yersiniose i forkant av prøvetakingen. Ved undersøkelse av 13 anlegg ble sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* påvist i 7 av anleggene hvor stikkvaksineringsstatus mot yersiniose hadde blitt utført 1 – 4 uker i forkant av prøvetakingen. Det ble ikke påvist sykdomsfremkallende *Y. ruckeri*

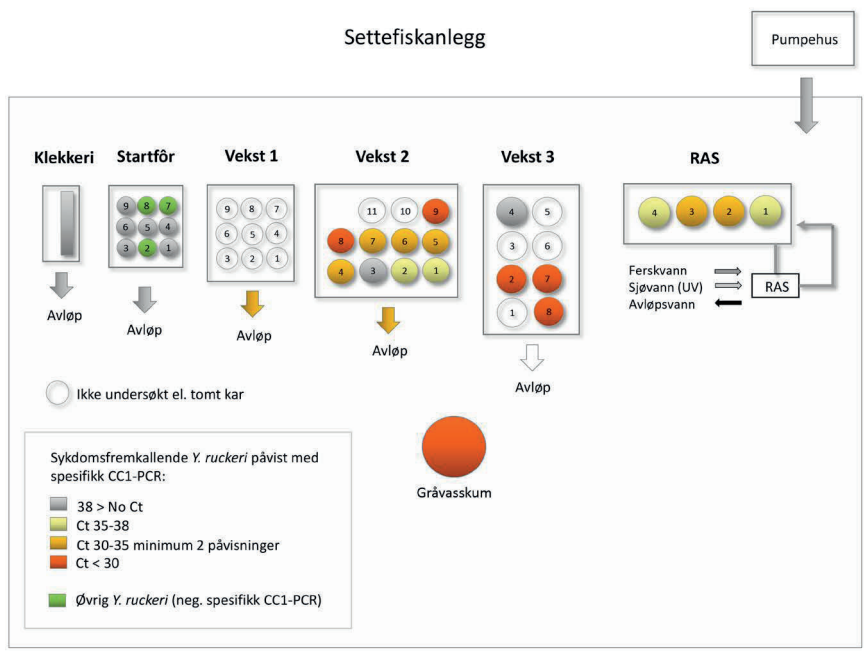
i de resterende 6 anleggene som enten var uvaksinert eller vaksinert mer enn 2 måneder i forkant av prøvetaking (se figur 3).

Vaksinerester påvises i miljø-DNA

For å undersøke om det var en kobling mellom vaksineringsstatus og PCR-påvisning av den sykdomsfremkallende varianten av *Y. ruckeri*, fulgte vi to vaksineringsperioder hos ett anlegg som tidligere var bekreftet fri for denne varianten. Prøver ble tatt i forkant av vaksineringsstatus og



Figur 1. Prøvetaking av miljø-DNA. a) og b) Biofilm prøvetatt med svaber. c) Filtrering av vannprøver.



Figur 2. PCR-analyse for sykdomsfremkallende (CC1) og øvrig Yersinia ruckeri (ikke-sykdomsfremkallende) i et settefiskanlegg. Screening av miljø-DNA i anlegget viste tilstedeværelse av ikke-sykdomsfremkallende Y. ruckeri i avdeling for startfôring. Sykdomsfremkallende Y. ruckeri ble påvist i utløp fra veksthall 1 og 2, og i kar fra veksthall 2 og 3 i til dels store mengder. Det ble påvist forholdsvis små mengder sykdomsfremkallende Y. ruckeri i miljøet i RAS avdelingen.

ukentlig over 3 uker etter vaksinerings. Sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* ble ikke påvist i prøvene tatt før vaksinerings, men ble påvist i forholdsvis rikelig mengder fra karveggene i samtlige kar prøvetatt én og to uker etter vaksinerings. Etter tre uker ga noen få kar fortsatt svakt positivt utslag. Vaksinerester kan derfor være tilstede i miljøet i forholdsvis lang tid etter vaksinerings. Siden degradering av vaksinerester vil være avhengig av flere faktorer, kan det ikke utelukkes at vaksinerester også vil kunne gi positivt utslag etter lenger tid enn påvist her.

Både den spesifikke og den generelle PCR-metoden vi utviklet i prosjektene viste seg å være godt egnet til påvisning av hhv. sykdomsfremkallende og øvrige varianter av *Y. ruckeri* i miljøet. Den økende vaksineringsen mot yersiniose gjennom prosjektperioden, i kombinasjon med PCR-påvisning av vaksinerester, gjorde derimot at vi valgte å avslutte den videre screeningen av settefiskanlegg i Midt-Norge.

Vaksinert 1-4 uker før prøvetaking

Lokalitet	Juni-august 2019		September 2019				Oktober 2019					November 2019				Desember 2019				januar 2020			
	25-27	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	1	2	3	4
1								1 / 3															
2									8 / 20														
3														15 / 15									
4																10 / 13							
5																		3 / 20					
6																					2 / 20		
7								1 / 17															

Vaksinert mer enn 2 mnd før prøvetaking

8																							4 / 4
9																							7 / 16
10																							7 / 10

Ikke vaksinert

11																							3 / 20
12																							20 / 20
13																							20 / 20

■ vaksinerings

Spesifikk CC1-PCR:

- No Ct
- Ct 35-37
- Ct 30-35
- Ct < 30
- Øvrig *Y. ruckeri* (neg. CC1-PCR)

Figur 3. Tidspunkt for vaksinerings og prøvetaking av biofilm for miljø-DNA-analyse av Yersinia ruckeri i 13 settefiskanlegg. Boksene ved prøvetakingstidspunktene viser antall påvisninger av Y. ruckeri, i forhold til antall miljøprøver som er PCR-analysert.

Bærerfisk skiller ut *Y. ruckeri* ved termisk avlusning

Vi brukte miljø-DNA-verktøyet for å teste hypotesen om at den sykdomsfremkallende varianten av *Y. ruckeri* kan foreligge i form av en 'skjult' infeksjon hos klinisk frisk fisk i sjøfasen, dersom disse har blitt eksponert for bakterien i ferskvannfasen. Under termisk avlusning blir store mengder fisk behandlet i et begrenset vannvolum, og eventuelle smittsomme mikroorganismer som skiller ut fra fisken vil kunne oppkonsentreres. Med bakgrunn i dette, og for å unngå den store fortykningseffekten i åpent hav, valgte vi å analysere vannprøver fra behandlingskammeret under avlusning.

Vi fulgte klinisk frisk fisk fra fem uvaksinerte fiskegrupper. Den ene gruppen ble prøvetatt syv måneder etter sjøsetting og hadde vært eksponert for sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* i settefiskanlegget. Den andre gruppen hadde kjent eksponering fra en smittet nabomerd (utslaktet på prøvetakingstidspunktet). De resterende tre gruppene hadde ingen kjent yersiniose-historikk. Vannfiltreringsmetoden viste seg å fungere like godt i sjøvann som i ferskvann. Vannprøver ble tatt nedstrøms for merden før oppstart av behandling og fra behandlingskammeret før, under og etter behandling. Miljø-DNA-analyse viste at begge fiskegruppene med tidligere kjent eksponering for *Y. ruckeri* skilte ut betydelige mengder av bakterien underveis i varmtvannsbehandlingen, og mengden bakterier i vannet steg ettersom fisken ble behandlet. Det ble ikke påvist *Y. ruckeri* i vannet fra merdene eller behandlingskamrene før behandling. Bakterien ble heller ikke påvist i gruppene uten kjent yersiniose-historikk.

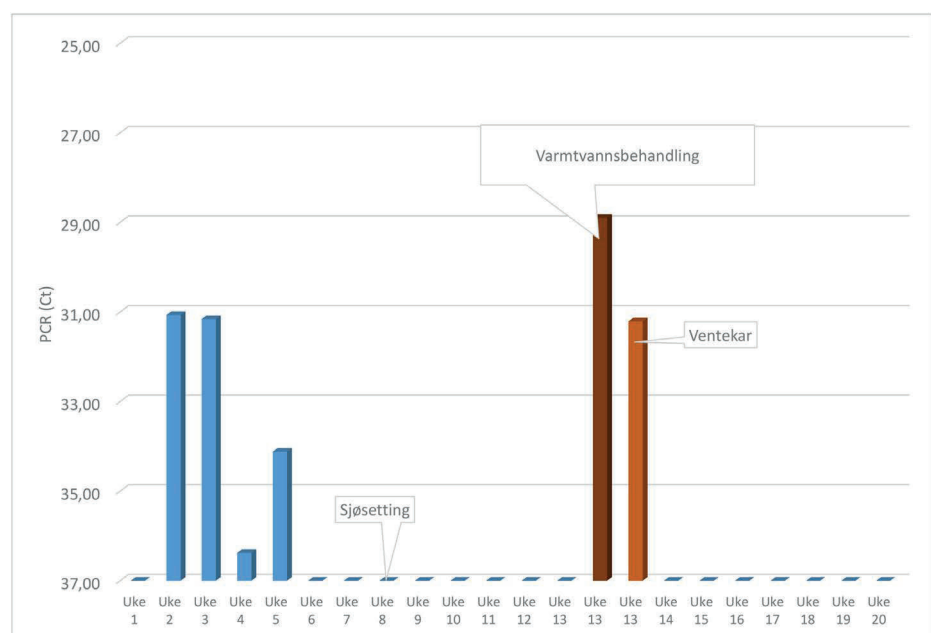
Resultatene viser at:

- 'Skjult' infisert laks skiller ut betydelig mengder *Y. ruckeri* under termisk avlusning.
 - Klinisk frisk laks kan bære med seg *Y. ruckeri* som 'skjult' infeksjon etter sjøsetting.
- I tillegg støtter resultatene fra gruppen som var eksponert for sjøsmitte via en nabomerd, tidligere antagelser om at yersiniose også kan smitte mellom nærliggende merder.

Laboratorieforsøk bekrefter at fisken skiller ut *Y. ruckeri* under håndtering

For å finne ut om stressende behandling forårsaker økt utskillelse av *Y. ruckeri* hos 'skjult' infisert fisk, designet vi et laboratorieforsøk som etterlignet termisk avlusning i felt. Pre-smolt i ferskvann ble først infisert med sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* via kohabitantsmitte. Overlevende fisk ble sjøsatt etter 8 uker, og deretter håvet fra kar og varmtvannsbehandlet (34 graders sjøvannsbad i 30 sekunder) fem uker etter sjøsetting. Utskillelsen av *Y. ruckeri* ble fulgt ved PCR-analyse av filtrerte vannprøver gjennom hele forsøket og under varmtvannsbehandlingen (biofilm utvikles over tid og var derfor lite egnet som prøvemateriale i dette smitteforsøket).

Y. ruckeri ble påvist med en nedadgående trend etter smitteeksponeringen, og etter 6 uker ble ikke lenger bakterien påvist i vannet (se figur 4). Under varmtvannsbehandlingen økte derimot bakteriemengden i vannet betraktelig, til et høyere nivå enn det som ble påvist under aktiv infeksjon. Forsøket bekrefter observasjonene fra felt som viser at *Y. ruckeri*-infeksjon kan ligge 'skjult' og at utskillelse av bakterien øker kraftig under stress/håndtering.



Figur 4. Diagrammet viser mengde *Y. ruckeri* (omvendt proporsjonalt med Ct-verdi) målt i miljø-DNA fra smitteforsøk. I forsøket ble det etablert 'skjult' *Y. ruckeri*-infeksjon i laks, som senere ble utsatt for simulert termisk avlusning (34°C i 30 sek).

Oppsummering

Resultatene våre støtter hypotesen om at yersiniose-utbrudd i sjøfasen kan forårsakes av aktivering av underliggende, 'skjult' *Y. ruckeri*-infeksjon med opprinnelse i ferskvann.

Arbeidet viser at miljø-DNA-prøver analysert med sensitiv og spesifikk PCR for både den sykdomsfremkallende CC1-varianten og øvrige *Y. ruckeri* er et nyttig verktøy for påvisning av 'skjult' *Y. ruckeri* infeksjon hos oppdrettslaks. Men, metoden er såpass sensitiv at den også vil påvise *Y. ruckeri*-DNA fra eventuelle vaksinerester i miljøet i settefiskanleggene, relativt lenge etter vaksinerings mot yersiniose.

I prosjektene har vi påvist både sykdomsfremkallende og ikke-sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* i settefiskanlegg. Dette viser at det er viktig å være bevisst på spesifisiteten til PCR-metoden som benyttes i forhold til hensikten med analysen. Dersom PCR-metoden ikke skiller sykdomsfremkallende *Y. ruckeri* fra de mange øvrige variantene som potensielt kan finnes naturlig i miljøet i settefiskanlegg, er den lite egnet til diagnostikk eller overvåkning.

Oppdrettslaks med 'skjult' *Y. ruckeri*-infeksjon skiller ut økt mengde av

bakterien under termisk avlusning. Det bør studeres nærmere om dette også kan være tilfelle ved andre stressende behandlinger og for andre sykdomsfremkallende agens. Miljø-DNA-metoden brukt i forbindelse med varmtvannsbehandling kan derfor også vise seg å være et godt redskap for screening av andre viktige sykdomsfremkallende agens.

Yersiniose er nå godt kontrollert innen norsk lakseoppdrett etter introduksjon av stikkvaksinerings, men det er usikkert om fisken fortsatt kan være bærer av *Y. ruckeri* selv om den er klinisk frisk. Videre i prosjektene vil vi gå nærmere inn på denne problemstillingen og benytte miljø-DNA-metoden for å undersøke om vaksinerings fisk allikevel kan være 'skjult' infisert og skille ut bakterien under termisk avlusning, og slik utgjøre en smitterisiko i sjøfasen.

Finansiering

Yersiniose i sjøen (2018-2021) er finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfinansiering (prosjekt FHF 901505) og Virulens- og molekylærbiologiske studier av *Yersinia ruckeri*; epidemiologi og effekt av vaksinerings (2018-2021) er finansiert av Vaxxinoa AS, Akvagen AS og Norges Forskningsråd (Prosjekt NFR 297312).