



FAGLIG SLUTTRAPPORTERING FHF PROSJEKT 901119:

YERSINIOSE I RESIRKULERINGSANLEGG FOR LAKS: SMITTESPORING, BIOFILM-EGENSKAPER OG SANERING

1. Sammendrag

Prosjektet ble satt i gang på bakgrunn av et økende antall yersinioseutbrudd i norsk lakseoppdrett. Norske utbrudd er hovedsakelig assosiert med *Yersinia ruckeri* serotype 01, men også serotype 02 identifiseres i noen utbrudd hvert år. Ved prosjektstart eksisterte det ingen molekylær påvisningsmetode som med sikkerhet kunne skille mellom ulike serotyper av *Y. ruckeri*, det forelå lite eller ingen kunnskap om populasjonsstrukturen hos norske *Y. ruckeri* stammer, og bakteriens evne til biofilmdannelse var ikke kartlagt.

I løpet av prosjektet ble det derfor utviklet spesifikke qPCR-analyser for påvisning av både *Y. ruckeri* serotype 01 og serotype 02. Ved screening av 24 geografisk adskilte ferskvannanlegg ble *Y. ruckeri* serotype 01 identifisert i 9 anlegg og serotype 02 i ett. I ett anlegg ble det identifisert *Y. ruckeri* som hverken tilhørte serotype 01 eller 02 (påvist med artsspesifikk qPCR). Kun et fåtall av påvisningene ble gjort i anlegg med kjent yersiniosehistorikk, og de fleste positive prøvene var assosiert med biofilm og ikke fisk. Resultatene indikerer en bred tilstedeværelse av *Y. ruckeri* i norske ferskvannsanlegg for laks. Den lave assosiasjonen mellom påvisning av *Y. ruckeri* og tidligere yersiniose-utbrudd kan også tyde på tilstedeværelse av mindre virulente eller 'avirulente' 'miljøstammer' (en hypotese som MLVA studier også støtter, se under).

En 'Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis', eller MLVA, ble utviklet for genotyping av *Y. ruckeri*. Denne analysen skiller stammer basert på variasjon i antall små repeterende DNA sekvenser spredt gjennom genomet. Den viste seg å representere en svært sensitiv, robust, rask og relativt billig metode som skiller både norske og internasjonale isolater av *Y. ruckeri* i 'klynger'

(klonale komplekser) av beslektede stammer. Av hovedrelevans for prosjektet skilte MLVA norske *Y. ruckeri* inn i flere forskjellige klonale komplekser, hvorav primært ett var knyttet til klinisk sykdom hos norsk laks. Resultatet tyder på spredning av en antatt virulent stamme i norsk lakseoppdrett over de siste 20+ årene. MLVA identifiserte også tilstedeværelse av diverse stammer i norsk akvakultur som ikke kunne knyttes til klinisk sykdom. Disse isolatene ble dyrket fra f.eks. rognvæske fra klinisk frisk stamfisk og fra miljø (biofilm) i ferskvannsanlegg.

Evnen hos norske *Y. ruckeri* stammer til å danne biofilm ble også undersøkt i prosjektet, og en modell for komparativ måling av biofilmdannelse og testing av saneringstiltak ble etablert. Sjøvann ble identifisert som den eneste biofilm 'triggeren', og det ble påvist en økende grad av biofilmdannelse med økende salinitet (inntil 3,5% salinitet). Vanlig saltvann (NaCl) trigget ikke biofilmdannelse. *Y. ruckeri* danner biofilm på overflater i overgangen mellom luft og væske. Det ble påvist god vekst i sjøvann på alle temperaturer fra 4 til 37°C, og omtrent like mye biofilmdannelse fra 12 til 37°C, men det ble ikke påvist biofilmdannelse ved 4°C. Alle *Y. ruckeri* stammene som ble testet, både norske og utenlandske, viste mer eller mindre samme evne til å danne biofilm. Testing av 3 kommersielt tilgjengelige desinfeksjonsmidler (Kickstart, DM CID, Virocid) indikerer at *Y. ruckeri* i biofilm ikke er særlig motstandsdyktig mot disse midlene, og at bakterien blir drept ved konsentrasjoner og eksponeringstider langt under de som er anbefalt av produsentene.

Oppsummert har det nåværende prosjektet gitt oss en langt dypere forståelse av yersiniose i norsk akvakultur. Biofilmarbeidet og felt-screening ved qPCR bekreftet overlevelses evnen til *Y. ruckeri* i de undersøkte produksjonsmiljøene, fortrinnsvis i biofilm. Siden prosjektets oppstart har flere anlegg utført vellykket sanering mot *Y. ruckeri*. Andre anlegg som ikke har ønsket eller hatt mulighet til å tømme for fisk under sanering har 'akseptert' situasjonen. De spesifikke qPCR'ene som ble utviklet under prosjektet gir mulighet for økt presisjon ved *Y. ruckeri* påvisning, men i lys av MLVA resultatene er det et klart behov for utvikling av en qPCR som er spesifikk for det ene klonale komplekset av *Y. ruckeri* serotype O1 som forårsaker yersiniose-utbrudd hos norsk laks i dag (klonalkompleks 1). MLVA belyste også den global populasjonstrukturen til *Y. ruckeri*, og arbeidet representerer en milepæl i *Y. ruckeri* forskning. Utover de direkte bidragene til det nåværende prosjektet er det sannsynlig at MLVA-resultatene også vil resultere i introduksjon av forvaltningstiltak for å hindre import av spesifikke *Y. ruckeri* kloner fra regnbueørret fra utlandet.

Summary

The project was instigated against a background of increasing numbers of yersiniosis outbreaks in Norwegian salmon farming. Norwegian outbreaks are associated mainly with *Yersinia ruckeri* serotype O1 although serotype O2 isolates are associated with a small number of outbreaks annually. At the start of the project no molecular methodology existed for secure differentiation of the different *Y. ruckeri* serotypes, there was no knowledge at all of the genetic population structure of Norwegian *Y. ruckeri* strains, and little or no knowledge existed of their biofilm forming abilities.

In the course of the project, two specific qPCR assays were developed for detection of *Y. ruckeri* serotype O1 and serotype O2 respectively. These qPCR assays were used to screen 24 geographically spread freshwater salmon farming sites for the presence of this bacterium. *Y. ruckeri* serotype O1 was identified in 9 sites, serotype O2 in one site, and a non-O1, non-O2 *Y. ruckeri* was identified in a single site (using a species specific qPCR). Only a small proportion of the positive samples could be associated with historic yersiniosis outbreaks, and most positive samples were associated with biofilm and not fish. The results indicate the broad presence of *Y. ruckeri* in Norwegian freshwater Atlantic salmon farming sites. The low association between the presence of *Y. ruckeri* and previous yersiniosis outbreaks may also indicate the existence of 'avirulent' or less virulent 'environmental' strains of *Y. ruckeri* (a hypothesis supported by the MLVA study, see below).

A 'Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis', or MLVA, was developed for genotyping of *Y. ruckeri*. This analysis, which distinguishes isolates based on variation in the number of small repeated DNA sequences within the genome, was found to be an extremely sensitive, robust, fast and relatively cheap typing method. MLVA displayed the ability to separate Norwegian and international isolates into several clonal complexes, of which primarily one clonal complex of *Y. ruckeri* serotype O1 could be associated with clinical disease in Norwegian salmon farms. The results indicate that a virulent clone of *Y. ruckeri* has been spread around Norway over the last 20+ years or so. MLVA also identified the presence of diverse strains of *Y. ruckeri* in Norwegian aquaculture which cannot easily be related to clinical disease, e.g. strains cultured from egg fluid of clinically healthy broodstock salmon, and the few environmental isolates which have been successfully cultured from biofilm during the study.

The ability of Norwegian *Y. ruckeri* strains to form biofilm was also investigated in the current project and a model for comparison of biofilm forming ability in individual strains was established. Seawater (natural or artificial) was the only biofilm 'trigger' identified, and a direct relationship between salinity (0 to 3.5%) and biofilm formation was found. Normal saline (NaCl) solutions did not trigger biofilm formation. *Y. ruckeri* biofilm was identified on solid surfaces in the air/liquid interphase. Good growth was identified in seawater at all temperatures between 4 – 37°C, but biofilm formation was not identified at 4°C. All *Y. ruckeri* strains tested, both Norwegian and international, displayed similar levels of biofilm formation. Testing of 3 commercially available disinfectants (Kickstart, DM CID, Virocid) indicate that *Y. ruckeri* in biofilm is not particularly resistant to these substances, as the bacterium was killed at concentrations and exposure times far below those recommended by the manufacturers.

In conclusion, the present study has led to a far greater understanding of the *Y. ruckeri* problem in Norwegian aquaculture. The biofilm work (and field PCR screening) also confirmed the ability of *Y. ruckeri* to survive in biofilm in production environments. Since initiation of the project, many farms have successfully eradicated *Y. ruckeri* through thorough disinfection, while other farms unwilling or unable to close sites completely have accepted the presence of *Y. ruckeri* during the freshwater phase of culture. The specific PCRs developed during the present project have improved the precision of detection, but in the light of the MLVA results, there is an obvious need for development of a further PCR assay specific for *Y. ruckeri* serotype O1 clonal complex 1, which is responsible for almost all modern yersiniosis outbreaks in Norway. The MLVA analysis shed light on the previously unknown global population structure of *Y. ruckeri*, and results generated during the project are likely to lead to future Norwegian legislation related to minimising the risk of import of rainbow trout specific clones from abroad.

2. Innledning

Faglig bakgrunn

Yersiniose skyldes infeksjon med bakterien *Yersinia ruckeri*. Internasjonalt forårsaker *Y. ruckeri* økt dødelighet hos laksefisk, særlig regnbueørret, mens den i Norge nærmest utelukkende er forbundet med sykdom hos Atlantisk laks. Yersiniose er per i dag ikke meldepliktig i Norge, og er av den grunn sannsynligvis underrapportert. Affisert fisk antas å smittes hovedsakelig i ferskvann, men sykdomsutbrudd kan også forekomme etter sjøsetting. Ved prosjektets oppstart var sykdommen hovedsakelig knyttet til gjentagende og til dels akutte utbrudd med svært høy dødelighet i resirkulerings (RAS)-anlegg i ferskvann.

Prosjektets omfang

Prosjektet ble delt opp i tre arbeidspakker som fokuserte på:

1. Utvikling av qPCR-analyser for spesifikk deteksjon og kvantifisering av *Y. ruckeri* serotype O1 og O2, og bruk av disse til å undersøke prevalensen av *Y. ruckeri* i norske settefiskanlegg for laks.
2. Utvikling av et Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA)-assay for en epidemiologisk studie av norske og internasjonale stammer av *Y. ruckeri*.
3. Karakterisering av biofilm-egenskapene til *Y. ruckeri* og effekt av sanering mot *Y. ruckeri* i biofilm.

Prosjektorganisering

Prosjektgruppen, alle Veterinærinstituttet (VI):

Duncan Colquhoun, forsker og prosjektleder

Snorre Gulla, forsker

Jannicke Wiik-Nielsen, forsker

Live Nesse, forsker

Karen Solheim, ingeniør

Lene Vestby, forsker (2016)

Silje Ramstad (2016)

Styringsgruppen:

Arne Guttvik, Salmar AS

Berit Seljestokken, Grieg AS

Hege Sjøvik, Laksefjord AS

Lisbeth Løvmo Martinsen, Marine Harvest AS

Referansegruppen

Magnus Devold, Patogen AS

FHF observatør

Sven Martin Jørgensen

3. Problemstilling og formål

Yersiniose er en alvorlig og 're-emerging' sykdom i norsk lakseoppdrett. I forkant av prosjektet eksisterte ingen måte å skille utbrudd forårsaket av serotype O1 og O2 av *Y. ruckeri* som ikke involverte dyrkning av bakterien med påfølgende serotyping. Siden serotype O2 virker å være mindre virulent, var det ønskelig med utvikling av qPCR-analyser som spesifikt kunne identifisere hver serotype. Dette for å gi et bedre grunnlag for håndtering av evt. utbrudd/påvisninger. Spesifikke qPCR-analyser mot både serotype O1 og serotype O2 ble derfor utviklet og brukt til å screene fisk og biofilm-substrater fra et geografisk bredt utvalg ferskvannsanlegg for laks. Ved prosjektets oppstart hadde vi ingen innsikt i diversiteten av sub-serotyper blant *Y. ruckeri* stammer som var involvert i norske utbrudd. Det var derfor ønskelig med utvikling av et raskt, praktisk og kostnadseffektivt molekylært typingsystem for *Y. ruckeri* som kunne brukes til epidemiologisk arbeid, dvs. sporing av infeksjon. Til dette formålet ble det utviklet en 'Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis' (MLVA) for *Y. ruckeri*. Med bakgrunn i gjentagende utbrudd i flere anlegg og overrepresentasjon av resirkuleringsanlegg i yersiniose-statistikken var det også behov for en studie av egenskaper for biofilmdannelse hos *Y. ruckeri*. Det ble derfor utviklet en robust biofilm-modell for karakterisering av *Y. ruckeri* stammer med hensyn til biofilmdannelse og testing av saneringstiltak mot bakterien i biofilm. Resultatene fra prosjektet er beskrevet i detalj under pkt. 5, men det kan oppsummeres at alle delmål ble oppnådd, og selv om det gjenstår mange utfordringer i forhold til

håndtering av yersiniose i norsk oppdrett, så står næringen i etterkant av prosjektet mye bedre rustet til å forstå og takle problemet.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble utført i sin helhet ved Veterinærinstitutt, Forskningsgruppe for Fiskehelse og Seksjon for bakteriologi, med unntak av primerdesign for spesifikke qPCR-analyser, som ble utført i samarbeid med Patogen AS.

Prosjektet ble ledet av Duncan J. Colquhoun (VI).

Serotypespesifikke qPCR-analyser ble utviklet av Snorre Gulla (VI) i samarbeid med Magnus Devold (Patogen AS). Feltutprøving/screening-arbeid benyttet til testing av qPCR-analysene ble organisert av Jannicke Wiik-Nielsen (VI).

MLVA-analysen ble utviklet av Snorre Gulla (VI).

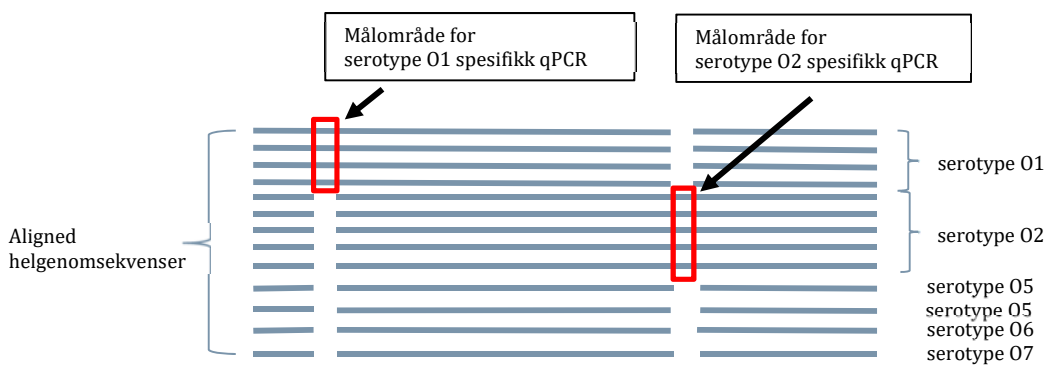
Biofilmarbeidet ble først (2016) ledet av Lene Vestby (VI). Live Nesse (VI) overtok ledelsen av denne arbeidspakken etter Lene Vestby sluttet ved Veterinærinstituttet sent 2016.

Veterinærinstituttets bakteriestammesamling med omtrent 1000 *Yersinia ruckeri* stammer har utgjort en sentral del av prosjektet.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

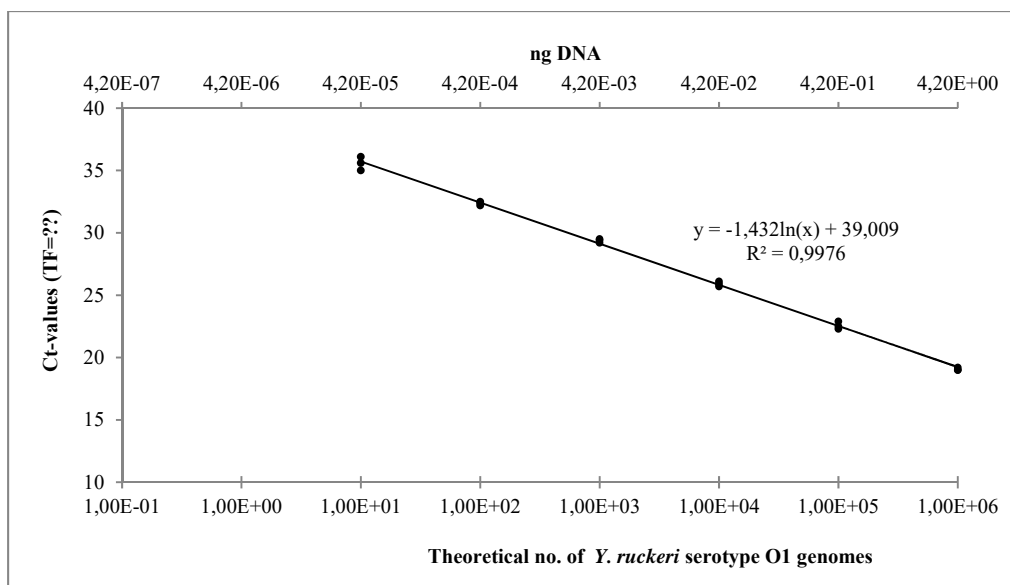
Delmål 1: Utvikling av spesifikk qPCR mot *Yersinia ruckeri* serotype 01 og 02

Til dette arbeidet ble det benyttet helgenomsekvenser fra 48 *Yersinia ruckeri* stammer som representerte et bredt utvalg av norske og utenlandske kliniske isolater av serotype 01 og 02, samt referansestammer av serotypene 01, 02, 05, 06 og 07. Helgenomsekvenseringen ble finansiert av Veterinærinstituttet. Utvikling av serotype 01 og 02 spesifikke qPCR-analyser var avhengig av identifisering av genetiske (DNA) områder som bare var tilstede i 01 (eller 02) stammer, og ikke i andre serotyper eller andre bakterier. Tilgjengelige helgenomsekvenser ble derfor sammenstilt ('aligned') og sammenlignet. Figur 1 illustrerer skjematisk resultatene av sammenligningen ('alignment') og valg av genetiske områder for utvikling av qPCR-analysene.

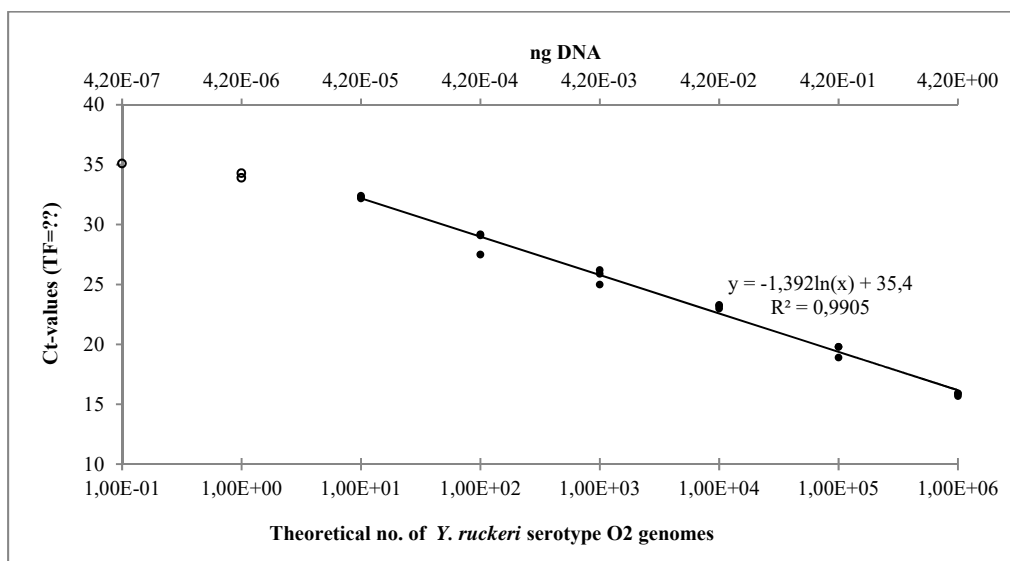


Figur 1. Skjematisk illustrasjon av fremgangsmåten for identifisering av genetiske områder egnet for utvikling av *Y. ruckeri* serotypespesifikk qPCR.

Spesifisiteten til de utvalgte qPCR-primere ble testet *in vitro* både mot et bredt panel av *Y. ruckeri* stammer av diverse serotyper, og mot et bredt taksonomisk panel av andre bakteriearter fra fisk og miljø. *In silico* spesifisitet ble testet ved sammenligning av primersekvensene mot beslektede sekvenser i tilgjengelige databaser ved BLASTn analyse. Det ble ikke påvist kryssreaksjon mot andre bakterietyper. qPCR efficiency og sensitivitet (figur 2 og 3) ble også testet mot seriefortynninger av mål-DNA- og mot mål-DNA i en matrise av lakse-DNA. Begge qPCR-analysene oppfylte krav til spesifisitet og sensitivitet. Tilstedeværelse av høye konsentrasjoner av lakse-DNA ga ingen inhibering av analysene. Deteksjonsgrensene for rent bakterie-DNA lå på ca. 10 genomkopier *Y. ruckeri* 01/02.



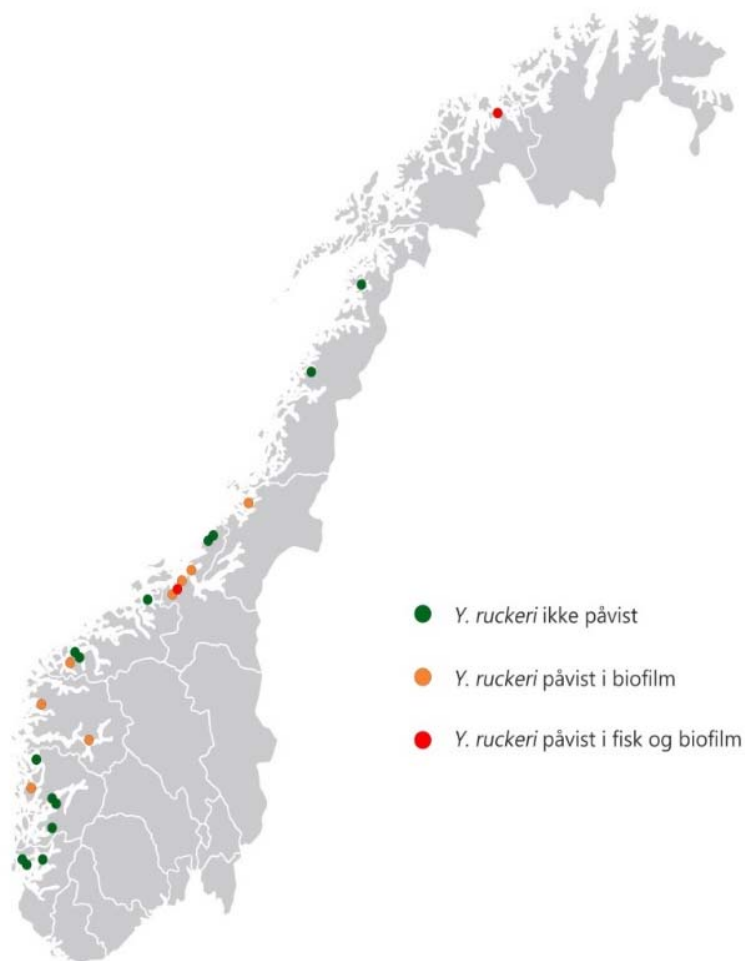
Figur 2. Efficiency og sensitivitet av *Y. ruckeri* serotype O1 qPCR



Figur 3. Efficiency og sensitivitet av *Y. ruckeri* serotype O2 qPCR

Delmål 1: Bruk av spesifikk qPCR mot *Yersinia ruckeri* serotype O1 og O2

Spesifikke qPCR'er utviklet mot *Y. ruckeri* serotype O1 og O2 samt en artsspesifikk qPCR (Patogen AS) ble benyttet for å undersøke prevalens av *Y. ruckeri* i norske ferskvannsanlegg for laks. Både settefiskanlegg og stamfiskanlegg ble undersøkt. Fra 24 anlegg (figur 4) ble det tatt prøver fra 325 fisk (nyre og evt. tarm) og 226 prøver fra biofilm (kar og rør) og slam.



Figur 4. Geografisk spredning av anlegg undersøkt for forekomst av *Y. ruckeri* (alle serotyper), *Y. ruckeri* serotype O1 og *Y. ruckeri* serotype O2 i fisk (nyre og evt. tarm), biofilm og slam. Resultatene fra qPCR-undersøkelsene er oppgitt i Tabell 1. Fra anlegg hvor det ble påvist *Y. ruckeri* i biofilm vha qPCR ble det tatt nye prøver fra biofilm for dyrkning.

Resultater av qPCR screening og dyrkning

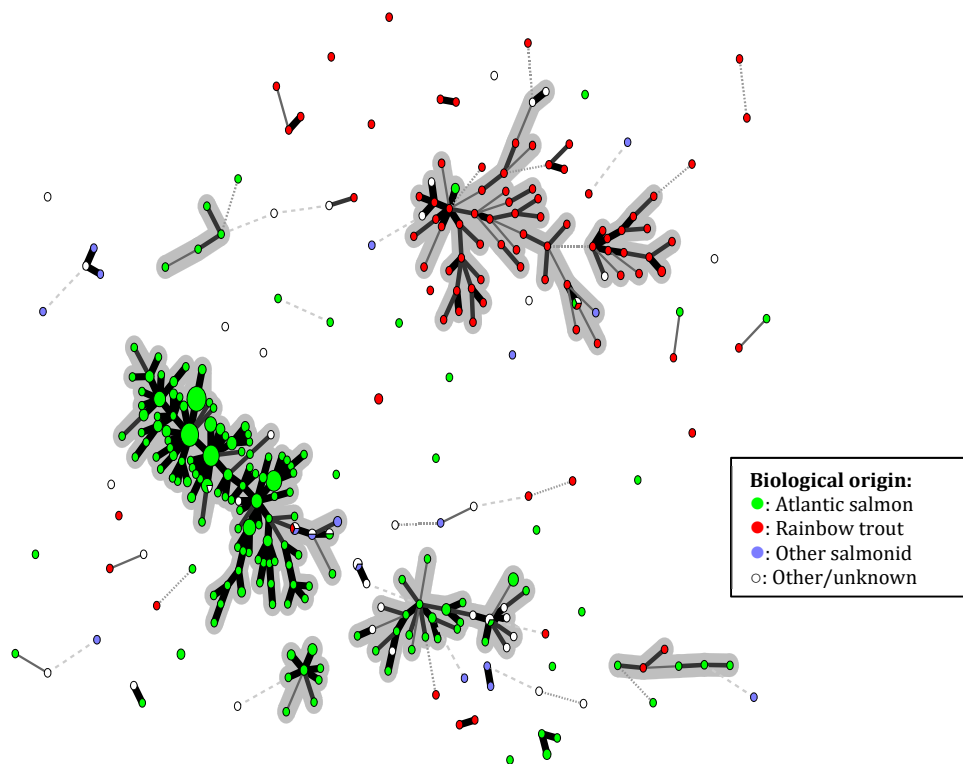
Det ble sendt forespørsel om deltagelse til 36 anlegg totalt, hvorav 24 valgte å delta i studien. Utvalget av anlegg til prøvetaking ble basert på et ønske om å hente inn prøver fra et så spredt geografisk område som mulig og for å forenkle organiseringen av prøveinnsamlingen ble det valgt å forholde seg til noen få større selskaper. Av de 24 prøvetatte anleggene fant vi *Yersinia ruckeri* i 10 anlegg, da hovedsakelig i biofilm (10/10) og slam (3/7), men også i fisk fra to av disse anleggene. Bare ett av anleggene har tidligere kjent yersiniose-historikk de siste ti årene. qPCR-resultatene (Ct-verdiene) indikerer at det finnes til dels store mengder *Y. ruckeri* i biofilm i 42% av alle de testede anleggene, men siden biofilm-prøvene var små og tatt tilfeldig, representerer denne prevalensen sannsynligvis et underestimat. qPCR-påvisning av *Y. ruckeri* korrelerte ikke med tidligere forekomst av kliniske yersinioseutbrudd i anleggene. Disse resultatene er forenlig med og støtter resultatene fra MLVA typingen (se arbeidspakke 2) som indikerer at det eksisterer mindre virulente, eller 'avirulente', stammer av *Y. ruckeri* i norsk akvakultur. qPCR-resultatene indikerer at 'miljø'-assosierte stammer av *Y. ruckeri* i norske ferskvannsanlegg for lakseproduksjon domineres av isolater tilhørende serotype O1. Både de 'miljø'-assosierte stammene og de virulente stammene vil påvises ved qPCR-analysene som er utviklet i dette prosjekt til diagnostikk, noe som indikerer at vi bør utvikle en spesifikk qPCR mot det 'virulente' klonalkomplekset av *Y. ruckeri* serotype O1 som har forårsaket nærmest alle kliniske yersinioseutbrudd i norsk lakseoppdrett. Utbredelsen av 'avirulente' og/eller mindre virulente stammer kan være større enn MLVA-studiet gir inntrykk av, da stammer til MLVA-typing i all hovedsak er isolert fra kliniske yersinioseutbrudd. Studiet har vist tilstedeværelse av *Y. ruckeri* i langt flere lakseanlegg enn tidligere antatt, og også i anlegg uten tidligere kjent historikk eller nylig utbrudd av yersiniose.

Delmål 2: Utvikling av en Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Yersinia ruckeri*

MLVA går ut på identifisering av stammelikheter og -forskjeller i antall repeterende DNA sekvenser (såkalte variable number of tandem repeats eller VNTR sekvenser) i visse områder av genomsekvensen. VNTR-sekvenser er påvist i de fleste bakterietyper, men funksjonen er stort sett ukjent. Noen kan være knyttet til bakteriens forsvarsmekanismer mot virusangrep (CRISPR system).

Utvikling:

Helgenomsekvenser fra en rekke *Y. ruckeri* isolater fra diverse fisketyper, land og isoleringstidspunkt ble sammenlignet, og flere VNTR-områder ble identifisert og undersøkt med preliminære PCR primersett. Ti slike områder som viste en høy grad av variabilitet blant undersøkte isolater ble valgt for endelig metodeutvikling. Primerpar ble designet for hvert VNTR-område, og det ble etablert to multipleks PCR-reaksjoner, hver bestående av 5 primerpar. Hvert primerpar ble merket med en fluoriserende markør for å muliggjøre spesifikk størrelsesbestemmelse ved kapillærelektroforese av resulterende PCR-fragmenter. Antall repetisjoner i hver VNTR kalkuleres så på bakgrunn av fragmentlengdene og resulterer i en 10-talls MLVA-profil for hvert isolat. Graden av likhet mellom ulike isolaters MLVA-profiler kan så analyseres ved 'Minimum Spanning Tree' analyse (MST), som gir en visuelt intuitiv representasjon av slektskap mellom isolatene. Stammer med identiske MLVA-profiler blir inkludert i samme 'enhet' (Figur 5) mens 'enheter' med forskjellige grader av variasjon mellom profilene blir koblet sammen gjennom forgreininger av forskjellig tykkelse (jo tykkere grein, jo nærmere slektskap). For svært ulike MLVA-profiler (predefinert grenseverdi) vises ingen forgreining, og stammer uten noen nære slektninger i materialet vil derfor vises som 'singletons' uten tilknytning til andre stammer.



Figur 5. MST presentasjon av MLVA analyse av 480 *Y. ruckeri* isolater fra diverse fiskearter.

Bruk og resultater:

Totalt ble 480 isolater av *Y. ruckeri* fra over 15 land, mellom 1959 og 2017, analysert ved MLVA. Referanseisolater tidligere analysert med andre molekylærbiologiske typing-metoder ble inkludert for å kunne sammenligne resolusjonen fra disse metodene med den oppnådd ved MLVA. MLVA-metoden utviklet under prosjektet ble vurdert som tilfredsstillende for analyse av både norske og internasjonale stammer av *Y. ruckeri*. Bare 4 isolater (av 480 analysert) manglet 1-3 VNTR loci. Slektskapsmønster identifisert med MLVA var forenlig med for eksempel Multi-Locus Sequence Typing (MLST), men viste en langt høyere resolusjon (se under). MLVA-analysen fordelte en verdensomspennende samling av *Y. ruckeri* på inntil seks hovedklynger (klonale komplekser) av svært nærbeslektede isolater, samt noen mindre grupper og såkalte 'singletons'. MLST representerer en slags 'gullstandard' for typing av mange forskjellige bakteriearter, og to studier har tidligere brukt MLST til å beskrive stammeheterogenitet blant *Y. ruckeri* fra rundt om i verden. Vi kjørte MLVA på en rekke stammer som tidligere hadde blitt analysert med MLST og genererte også selv en del nye MLST profiler for både norske isolater og internasjonale referansestammer. Mens MLST kunne skille 136 undersøkte isolater i 47 forskjellige MLST genotyper, ble det samme materialet ved MLVA skilt i 125 forskjellige MLVA-typer. Med andre ord gir MLVA en betydelig høyere resolusjon enn MLST. I motsetning til MLST og pulsfelt gel-elektroforese (PFGE) er MLVA billig og meget raskt å gjennomføre. Mange stammer kan analyseres i løpet av en dag.

Umiddelbart tydelige epidemiologiske sammenhenger i gruppering på bakgrunn av vert, serotype og geografi kunne raskt identifiseres i det fullstendige MLVA-materialet (eksempelet for vert illustreres i figur 5). Resultatene støtter tidligere utenlandske studier som har spekulert i at det eksisterer en grad av vertsspesifisitet blant forskjellige grupper av *Y. ruckeri* serotype O1. MLVA kunne videre med klarhet vise hvordan klonalkompleks 2 (regnbueørret-varianten) har spredd seg med transport av regnbueørret fra USA til Storbritannia, Sør-Amerika og fastlands-Europa. *Y. ruckeri* isolater fra Atlantisk laks fordelte seg mellom adskilte klonalkomplekser på bakgrunn geografisk opphav og/eller serotype.

Dette studiet hadde hovedfokus på kliniske stammer av *Y. ruckeri* og populasjonsbildet fra MLVA-arbeidet preges av det. Alle indisier fra MLVA i arbeidspakke 2 og PCR-screeningen i arbeidspakke 1 tilsier imidlertid at *Y. ruckeri* også opptrer som en miljøbakterie, og at et lite antall virulente stammer av *Y. ruckeri* sannsynligvis har sitt utspring fra et nokså vidt spekter av miljø-assosierte stammer.

MLVA-arbeidet indikerer videre at yersiniose-situasjonen i Norge i de senere år, hvor to geografisk adskilte områder affiseres tyngst (Midt- og Nord-Norge), trolig har oppstått som følge av spredning av en virulent *Y. ruckeri* stamme gjennom menneskelig transport av infisert rogn, fisk eller lignende aktivitet.

En forutsetning for at MLVA-analysen skal ha informativ verdi for epidemiologisk tolkning er at forandringene i antall repetisjoner i VNTR-områdene over generasjonene skjer i et passende 'tempo' (dvs. ikke for fort og ikke for sakte). De VNTRene som er brukt i studiet virker å representere et spekter av variabilitet og viser mellom 9-32 unike alleler blant de 480 undersøkte *Y. ruckeri* isolatene. En begrenset forandring i MLVA-profil gjennom seriekulturer i laboratoriet, og innen utbrudd, indikerer en grunnleggende stabilitet.

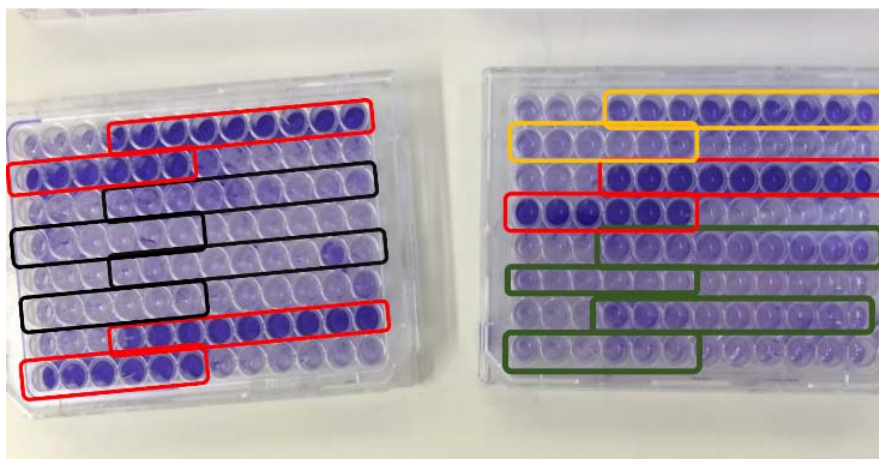
Oppsummert kan det konkluderes at MLVA-metoden utviklet i dette prosjektet utgjør et raskt og effektivt verktøy for genotyping av *Y. ruckeri*. Isolater tilhørende det dominerende *Y. ruckeri* MLVA klonalkomplekset i Norge, som er ansvarlig for nærmest alle utbrudd i norsk laks i de senere årene, er svært nært beslektet. Dette vanskeliggjør tolkning av slektskap disse isolatene imellom, men det jobbes videre med en statistisk tilnærming for med større sikkerhet å kunne benytte MLVA resultater til 'finskala' epidemiologisk tolkning.

Delmål 3: Biofilm-studier

Gitt overrepresentasjonen av RAS-anlegg i yersiniose-statistikken ved prosjektets oppstart var det naturlig å undersøke norske *Y. ruckeri* isolaters evne til å danne og overleve i biofilm.

Utvikling:

For å kunne karakterisere biofilm-dannelse og effekten av evt. saneringstiltak var det nødvendig å etablere en laboratoriebaseret biofilm-modell for *Y. ruckeri*. Fem isolater av bakterien som representanter for diverse genotyper ble derfor undersøkt under forskjellige vekstforhold i multi-brønn bio-assay brett (Figur 6). Bakteriene ble dyrket over natt i heart infusion broth (HIB) medium ved 22°C. Bakterienes evne til å danne biofilm ble testet ved å tilsette en liten mengde (25 µl) bakteriekultur i forskjellige typer medier ved forskjellige temperaturer og inkubasjonstider. Mediene som ble testet var ferskvann, saltvann (3,5% NaCl), sjøvann (kunstig og naturlig) og rikt medium med og uten tilsetning av glukose (kjent for å 'trigge' biofilmdannelse hos noen typer bakterier). Bakterien vokste i alle mediene som ble testet men det ble kun observert vesentlig biofilmdannelse etter inkubasjon i kunstig eller naturlig sjøvann (Figur 6). Det ble ikke påvist dannelse av biofilm i ferskvann eller vesentlig dannelse i 3,5% NaCl, dvs. samme totale saltkonsentrasjon som sjøvann.



Figur 6. Multi-brønn biofilm-modell. Biofilmen er tilsatt farge og fremstår som blå i brønnene. Brønner med sjøvann (røddramme) og ulike vekstmedier/vannkvaliteter (andre farger). Bruk og resultater:

Effekten av sjøvannskonsentrasjon på biofilm-dannelse ble undersøkt i flere dose:respons undersøkelser ved forskjellige fortyninger av kunstig sjøvann fra 35 promille og nedover. Det ble påvist en direkte assosiasjon, dvs. økende biofilm-dannelse ved økende saltinnhold og en indirekte assosiasjon mellom vekst og saltinnhold dvs. lavere vekst ved økende saltinnhold. Bakterien vokste ved alle temperaturene som ble testet (4, 12, 15, 22, 30 37°C) og biofilm ble dannet ved alle temperaturer fra 12-37°C, men ikke ved 4°C. En standard modell for videre testing av biofilm-dannelse ble deretter basert på inkubering ved 12°C/35 promille sjøvann i fem dager. Alle oppsett ble utført som triplikater. Under etablering av biofilm-modellen ble det klart at *Y. ruckeri* danner biofilm på brønnveggen i interfasen mellom luft og vann, noe som etter hvert tillot målrettede qPCR-undersøkelser av biofilm fra vannspeilet under feltscreeningen i arbeidspakke 1.

Variasjon i evnen til å danne biofilm ble undersøkt i en fylogenetisk bred samling av 50 *Y. ruckeri* stammer dominert av norske isolater. En finsk referansestamme av biotype 2 (ubevegelig) ble benyttet for å undersøke effekten av manglende bevegelse på biofilm-dannelse. Alle testede isolater viste omtrent samme evne til dannelse av biofilm, og signifikante forskjeller i evnen til å danne biofilm ble ikke påvist.

Saneringseffekten av tre kommersielt tilgjengelige desinfeksjonsmidler ble testet i biofilm-modellen. *Y. ruckeri* biofilm ble eksponert for seriefortynninger av midlene i 15 minutter. Midlene ble deretter nøytralisert, vasket bort, og fersk vekstmedium ble tilsatt brønnene før ny inkubering. Evt. vekst etter den siste inkuberingen tydet på at saneringen i den aktuelle brønnen ikke var vellykket. Det viste seg at konsentrasjoner og eksponeringstider langt under de som er anbefalt av produsentene dreper *Y. ruckeri* i biofilm.

Diskusjon/konklusjon

Prosjektet har utvilsomt bidratt til en økning i kunnskapen om yersiniose i norsk akvakultur. Samtidig har prosjektet også belyst et behov for ytterligere forskning på temaet. Vi vet nå at yersiniose i norsk laks (alle affiserte geografiske områder) i all hovedsak forårsakes av en meget nærbeslektet gruppe *Y. ruckeri* isolater av serotype O1 som mest sannsynlig har blitt spredt rundt omkring i landet gjennom transport av fisk, rogn eller ved annen menneskelig aktivitet. Vi vet videre at denne virulente *Y. ruckeri* stammen kun utgjør én av forholdsvis mange forskjellige typer av *Y. ruckeri* som forekommer i norske ferskvannsanlegg for lakseoppdrett, hovedsakelig i biofilm. De fleste stammene, både virulente og antatt 'avirulente', tilhører serotype O1 og er derfor vanskelig å skille fra hverandre uten bruk av molekylærbiologiske redskaper. Dette betyr at de spesifikke qPCR'ene som ble utviklet under arbeidspakke 1 i prosjektet ikke skiller 'miljø'-'/avirulent' serotype O1 fra virulent serotype O1. Siden vi nå har god grunn til å tro at mange miljøstammer av *Y. ruckeri* i Norge tilhører serotype O1, er det åpenbart et behov for videre utvikling av en spesifikk qPCR rettet mot virulent serotype O1. Dette bør forholdsvis lett kunne la seg gjøre (gitt finansiering), siden vi allerede har identifisert grunnleggende forskjeller på helgenom-nivå mellom de forskjellige MLVA klonalkompleksene.

MLVA-studien utført under prosjektet representerer et banebrytende arbeid som har belyst den underliggende populasjonsstrukturen hos *Y. ruckeri* både i Norge og internasjonalt. MLVA skiller ikke bare antatt virulente/'avirulente' stammer i Norge men har blant annet også klart å skille virulente serotype O1 isolater i to klonalkomplekser som virker å være spesifikke for henholdsvis laks og regnbueørret. Dette er særlig vesentlig for Norge. Internasjonalt er *Y. ruckeri* en svært alvorlig patogen for regnbueørret, men tross betydelig oppdrett av regnbueørret i Norge har klinisk yersiniose så vidt vi vet aldri blitt påvist i denne fiskearten her til lands. MLVA representerer en ypperlig metode for kontroll av mulige fremtidige yersiniose-utbrudd i norsk regnbueørret slik at en eventuell introduksjon av regnbueørret varianten fra utlandet kan bekjempes med målrettede tiltak. MLVA-arbeidet har videre tiltrukket interesse fra diverse forskningsmiljøer med aktivitet på *Yersinia ruckeri* rundt om i verden, som så har bidratt med internasjonale stammer til studiet.

qPCR screening arbeidet som ble utført i prosjektet viste at *Y. ruckeri* er utbredt i naturlig biofilm i ferskvann. Under utvikling av biofilm-modellen var det derfor overraskende at sjøvann var den eneste 'triggeren' som ble identifisert og at ingen biofilm av betydning ble dannet i næringsfattig ferskvann.

Årsaken til biofilmdannelsen i sjøvann er antagelig knyttet til at bakterien oppfatter sjømiljøet som ugunstig og går over i en overlevelsesmodus. Det var også overraskende at samme effekt ikke ble observert i vanlig saltvann (NaCl) eller vanlig saltvann tilsatt magnesium chloride (annet hovedmineral som er tilstede i sjøvann). Ulik evne til biofilmdannelse i 'kunstig' og 'naturlig' miljø kan henge sammen med at biofilmen som dannes naturlig i ferskvanns-anleggene ikke består av *Y. ruckeri* i renkultur, men av et komplekst samfunn (konsortia) av diverse bakterietyper.

Multi-brett biofilm-modellen for *Y. ruckeri* som ble utviklet i prosjektet ble benyttet til screening av diverse stammer for evne til å danne biofilm og til å undersøke effektiviteten av diverse desinfiserende midler. Resultatene peker i retning av at alle de tre testede midlene dreper *Y. ruckeri* ved konsentrasjoner og eksponeringstider langt under anbefalt dosering. Det bør imidlertid tas med i beregningen at biofilmen som ble testet i dette assayet er utviklet av, og inneholder, *Y. ruckeri* i renkultur, noe som representerer en unaturlig situasjon. En naturlig miljø-biofilm i et oppdrettsanlegg vil bestå av en kompleks biofilm-matrix produsert av et mangfoldig bakteriesamfunn og med en betydelig organisk belastning. Dette vil trolig ha innflytelse på saneringseffekten. I løpet av prosjektet har vi fått tilbakemeldinger fra felt om at flere anlegg har klart å sanere bort yersiniose-problemer. Vi vet nå (gjennom qPCR-screening) at det finnes betydelige mengder av *Y. ruckeri* i biofilm i mange norske ferskvanns-anlegg for lakseoppdrett. I noen anlegg (uten klinisk yersiniose) var det såpass mye at det lot seg gjøre å dyrke frem *Y. ruckeri* i renkultur fra biofilm-prøver. Dersom det er behov for ytterligere forskning rundt sanering mot *Y. ruckeri* vil slike anlegg kunne representere ideelle 'feltlaboratorier' for slike studier. Biofilm-assayet som er utviklet under det nåværende prosjektet kan også utgjøre en potensiell modell for fremtidige forskningsprosjekter rundt f.eks. antibiotikaresistens og persistens av *Y. ruckeri* i biofilm.

6. Hovedfunn

- *Yersinia ruckeri* er mer utbredt i norsk akvakultur enn tidligere antatt
- *Y. ruckeri* serotype O1 i Norge består av flere adskilte grupper, og de fleste gruppene representerer antatt lav eller ikke-virulente typer.
- Sykdom hos laks i Norge er forbundet med én tettbeslektet gruppe (klonal-kompleks 1) av serotype O1 stammer.
- Norsk *Y. ruckeri* danner biofilm både under laboratorie- og feltforhold.

- Norske *Y. ruckeri* stammer er ikke særlig motstandsdyktige mot desinfiserende midler under laboratoriebetingelser.

Mulig videre arbeid

Siden oppstart av prosjektet har næringens fokus når det gjelder yersiniose skiftet fra sykdomssituasjon i ferskvann til sykdom i sjøen, særlig lenge etter sjøsetting. Mye av metodologien som er utviklet under det nåværende prosjektet, herunder MLVA'en, vil også egne seg for forskning rundt dette problemet. Vi har ervervet mye erfaring i vårt arbeid med *Y. ruckeri*, og har tilgang på en unik og oppdatert samling av omtrent 1000 norske og internasjonale isolater. Basert på våre erfaringer anbefaler vi videre forskning rettet mot påvisning av skjulte infiserte populasjoner og generering av kunnskap om smittedynamikk/-persistens i både ferskvann og sjøvann.

7. Leveranser

Diverse møter, møterefater og statusrapporter har blitt levert med unntak av en uteglemt statusrapport som skulle vært levert 01.11.2017. Publikasjoner med resultater fra prosjektet har leveransedato 31.12.17, men er dessverre forsinket. Alle publikasjonene er derimot påbegynt og leveres innen 2. kvartal 2018.

Populærvitenskapelig publikasjon delmål 1, 2 og 3

Denne publiseringen er avtalt publisert i Norsk Fiskeoppdrett (utgave mars 2018) med leveringsfrist for manuskript 25.02.18. Utkast til manuskript sendes styregruppen innen fredag 09.02.18.

Vitenskapelig publikasjon delmål 1 (PCR utvikling og felt screening)

Development of qPCR for specific detection of *Yersinia ruckeri* serotypes O1 and O2

Gulla S.¹, Welch T.², Devold M.³, Ramsvik L.T.³, Barnes A.⁴, Wiik- Nielsen J.¹, Colquhoun D. J.¹

¹Norwegian Veterinary Institute ²United States Department of Agriculture ³Patogen AS ⁴University of Queensland, Brisbane, Australia

Resultatene er bearbeidet og manuskriptet delvis skrevet. Manuskriptet er forventet ferdig skrevet og submittert (Journal of Fish Diseases) i løpet av første kvartal 2018.

Vitenskapelig publikasjon delmål 2 (MLVA)

[Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis of *Yersinia ruckeri*](#)

Gulla S.¹, Barnes A.², Welch T.³, Romalde J.⁴, Carson J.⁵, Lagesen K.¹, Ormsby M.J.⁶, Verner-Jeffreys D.⁷
Davies R.L.⁶ Colquhoun D. J. ¹

¹Norwegian Veterinary Institute ²University of Queensland, Australia ³United States Department of Agriculture ⁴Universidad de Santiago de Compostela, Spain, ⁵University of Tasmania ⁶University of Glasgow, Scotland ⁷CEFAS, Weymouth, England

Resultatene er bearbeidet og manuskriptet ferdigskrevet. Det gjenstår kun 'kvalitetssikring/siste gjennomgang' av skrivearbeidet og endelig godkjenning fra alle medforfattere. Manuskriptet er forventet ferdig skrevet og submittert (Applied and Environmental Microbiology) i løpet av første kvartal 2018.

Vitenskapelig publikasjon delmål 3 (Biofilm)

[A 96-well microplate model for study of biofilm development in *Yersinia ruckeri*](#)

Duncan J. Colquhoun¹, Ramstad S.¹, Karlsen E.², Soleim K.¹, Wergeland H.² og Rønneseth A.²

¹Norwegian Veterinary Institute, ²University of Bergen, Norway

Resultatene er under bearbeidelse og manuskriptet delvis skrevet. Manuskriptet er forventet ferdig skrevet og submittert (Journal of Fish Diseases) innen andre kvartal 2018.