



FAGLIG SLUTTRAPPORTERING PROSJEKT 901434

TENACIBACULUM SPP. SOM EN ÅRSÅK TIL ATYPISK VINTERSÅR I NORSKE OPPDRETTLAKS

FINANSIERT AV FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS FORSKNINGSFINANSIERING - FHF

Dato: 14.01.2022

Forfattet av: Duncan Colquhoun, Bjørn Spilsberg, Anne-Berit Olsen, Hanne Nilsen, Saraya Tavoranpanich, Mona Dverdal Jansen, Hilde Sindre (alle VI) og Jan Anonsen (NORCE)

1. Sammendrag

Bakgrunnen for prosjektet var et økende antall *Tenacibaculum*-relaterte 'atypiske vintersår/tenacibaculose'-utbrudd med stygge hode- og finnelesjoner, som avviker fra det vanlige kliniske bildet som sees hos fisk med *Moritella viscosa*-assosierte vintersår. Det beskrevne prosjektet ble igangsatt til å nærmere identifisere og beskrive de *Tenacibaculum* variantene involvert, identifisere mulige underliggende produksjonsforhold og miljøfaktorer som bidrar til utbrudd av tenacibaculose og karakterisere toksinproduksjon og toksisk aktivitet, med tanke på mulig vaksine utvikling.

Molekylær- og produksjonsrelatert epidemiologi

Mellom januar og mai 2018 ble det sendt inn materiale fra 19 mistenkte tenacibaculose utbrudd fra Hordaland til Finnmark. Histopatologiske undersøkelser og dyrkning identifiserte *Tenacibaculum* spp. som den dominerende bidragsyter til de observerte lesjoner. For å sammenligne og validere slektskapsanalyser gjort på basis av 2018-undersøkelsene ble det også undersøkt *Tenacibaculum* isolater fra diagnostiske saker våren 2019. Helgenombaserte analyser bekreftet at *T. finnmarkense* genomovar (gv.) *finnmarkense* dominerte med en meget tett beslektet sub-gruppe av genomovaren identifisert som dominerende begge år. I løpet av prosjektet ble en ubeskrevet *Tenacibaculum* sp. isolert fra laks med sår, offisielt navngitt som *T. piscium*. Videre ble *T. finnmarkense* offisielt navngitt og videre fordelt i gv. *finnmarkense* og *ulcerans*. Det ble undersøkt om rognkjeks representerer et mulige smittekilde for laks. Mens *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* som påvist hos laks ble også påvist hos rognkjeks, de fleste rognkjeks isolater tilhørte

T. finnmarkense gv. *ulcerans* eller *T. dicentrarchi*. Slektskapsanalyse av norsk *T. maritimum* viste at flere genotyper eksisterer i Norge, og at man bør være forberedt på mulig økende problemer med den arten i fremtiden (oppvarming av havet).

Innhentede produksjonsdata fra 19 mistenkte lokaliteter og 6 kontroll-lokaliteter fra de involverte oppdrettsselskapene viste at vanntemperatur ved utsett virker å være en risikofaktor og tid mellom utsett og utvikling av tenacibaculose var betydelig redusert for utsett gjort ved sjøtemperaturer under 5°C sammenlignet med utsett gjort ved 5°C eller høyere.

Forbedret diagnostikk

Tenacibaculum spp. er tidkrevende å identifisere med standard biokjemiske testing. Prosjektet utviklet MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption time of flight mass spectromy) som en presis og rask diagnostisk metode for identifikasjon av *Tenacibaculum* spp.

Toksinkarakterisering

Protein uttrykket i ulike *Tenacibaculum* stammer ble karakterisert og kvantifisert. Proteomikk dataene identifiserte mange fellestrekk i protein uttrykk mellom stammene, men identifisert et klart skille mellom *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *finnmarkense* og *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *ulcerans*. Arbeid med identifisering av de spesifikke proteinene pågår fortsatt.

Ekstracellulære toksisitet

En *in vitro* modell for å måle toksisitet av cellefrie *Tenacibaculum* ekstracellulære produkter (ECP) ble utviklet. En nyetablert cellelinje fra hud hos Atlantisk laks ble eksponert for fortynningsrekker av ECP, og toksisitet av ECP ble påvist med flere metoder. Det ble påvist forskjeller i toksisiteten mellom forskjellige *Tenacibaculum* arter og genomovar, med *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* som den mest toksisk. Varmebehandling av ECP fjernet den toksisk aktivitet, noe som tyder på protein oppbygging av den toksisk faktor. Tilsetning av antisera laget mot *T. piscium* og *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* hadde ingen nøytraliserings effekt på toksisk aktivitet.

English summary

The project was initiated against a background of increasing outbreaks of 'atypical winter-ulcer/tenacibaculosis', amongst sea-farmed Atlantic salmon. The aims of the project were to identify and describe the *Tenacibaculum*-variants involved, identify possible underlying production and environmental factors that contribute to outbreak of tenacibaculosis, characterise toxin production and toxic activity, with a view to possible vaccine development.

Molecular- and production related- epidemiology

Between January and May 2018, samples were submitted from 19 suspected cases of tenacibaculosis. Histopathological investigations and culture identified *Tenacibaculum* spp. as the dominating contributor to the observed lesions. To compare and validate the phylogenetic analyses performed on 2018 isolates, a number of isolates retrieved during diagnostic investigations in 2019 were also investigated. Whole-genome based analyses conformed that *T. finnmarkense* genomovariant (gv.) *finnmarkense* dominated all outbreaks and that an extremely closely related cluster of isolates dominated further within this genomovar in both years. *Tenacibaculum* isolates retrieved from lumpfish were also investigated with a view to establish whether this fish species represent a possible source of tenacibaculum infection for salmon. While the same type of *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* dominating the disease situation in salmon was also identified in lumpfish, most lumpfish isolates belonged either to *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* or *T. dicentrarchi*. Phylogenetic analysis of *T. maritimum*, revealed that several genotypes of this bacterium exist in Norway and that the industry should be prepared for a possible increase in the impact of this pathogenic species in future years (warmer seas).

Production data gathered from 19 affected farming localities and 6 control sites revealed that water temperature on sea-transfer appears to be a risk factor and period between sea-transfer and development of tenacibaculosis was considerably reduced for fish transferred to sea at temperatures of less than 5°C compared to fish transferred to sea at temperatures of 5°C or higher.

Improved diagnostics

Tenacibaculum spp. are time-consuming to identify using standard biochemical tests. The project developed MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry) as a precise and rapid diagnostic method for identification of *Tenacibaculum* spp.

Toxin characterisation

Protein expression was characterised and quantified in different *Tenacibaculum* strains. Proteomic analyses revealed expression of many proteins to be common for all studied genotypes but found clear differences between *T. finnmarkense* and non-*T. finnmarkense* strains. The work of identification of the specific proteins is ongoing.

Extracellular toxicity

An *in vitro* model for estimation of toxicity of cell-free *Tenacibaculum* extracellular products (ECP) was developed. A newly established Atlantic salmon skin cell-line was exposed to serial dilutions of ECP and toxicity of the ECP for the cell-cultures analysed using different methodologies. Differences in toxicity were identified between different *Tenacibaculum* species and genomovars, with *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* identified as the most toxic. Heat treatment of ECP neutralised the toxic activity of ECP, which indicates proteinaceous construction of the toxic factor. Addition of antisera raised against *T. piscium* and *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* had no neutralising effect on the toxic activity.

2. Innledning

Faglig bakgrunn

Bakgrunnen for prosjektet var et økende antall *Tenacibaculum*-relaterte 'atypiske vintersår/tenacibaculose' utbrudd med stygge hode- og finnelesjoner, som avviker fra det vanlige kliniske bildet som sees hos fisk med *Moritella viscosa*-assosierte vintersår. Slike utbrudd er hyppigst i Nord-Norge, men forekommer langs hele kystlinjen og resultater ofte i høy dødelighet og store økonomiske tap og representerer et alvorlig velferdsproblem. Hvilke *Tenacibaculum*-arter/varianter som vanligvis er involvert og hvor stor betydning disse har, sett sammen med produksjonsforhold og miljøfaktorer som årsak til utbrudd av tenacibaculose, var imidlertid ukjent. Det beskrevne prosjektet ble igangsatt for å identifisere risikofaktorer, blant annet spesifikke genotyper av *Tenacibaculum* spp. av betydning for utbrudd av tenacibaculose og karakterisere toksinproduksjon og ekstracellulære toksisk aktivitet forbundet med utvalgt isolater.

Prosjektets omfang

Prosjektet ble delt opp i tre arbeidspakker:

Arbeidspakke 1a Produksjonsepidemiologi

I et longitudinelt case-control studium ble det tatt ut prøver av fisk fra 19 lokaliteter med mistenkt tenacibaculose-utbrudd i minst en merd, fra høst 2017 til vår 2018. Det ble mottatt prøver fra 5 fisk fra hver av disse lokalitetene. *Tenacibaculum* ble bekreftet gjennom dyrking og/eller via histopatologisk undersøkelser. Produksjonsdata ble samlet inn gjennom to kilder: 1; Havbruksdata som gir data fra alle aktive lokaliteter i Norge mhp. antall fisk, dødelighet, vekt, biomasse og fôrbruk. 2; Spesifikk anleggsdata med informasjon mhp. smoltopphav, tid for sjøsetting av smolt, diverse produksjons- og miljødata. I tillegg ble det ble 6 antatt negative kontroll-lokaliteter identifisert basert på fysisk nærhet til utbruddslokalitetene.

Deskriptive statistiske analyser ble gjort på lokalitets- og merd-nivå. Chi-kvadrat og t-test ble benyttet for å se om det var signifikant forskjeller for noen av de innsamlede variablene mellom positive og negative merder. Tiden fra utsett til utbrudd (risikoperioden) ved ulike sjøtemperatur ved utsett, ble analyser ved hjelp av overlevelsesanalyse. For å sammenligne dødelighetsforløp over tid på positive lokaliteter ble Dynamic Time Warping (DTW) brukt og presentert i Dendogram. For bedre å forstå sammenhengen mellom ulike risikofaktorer knyttet til drift, miljø og smittestoff (bakterier) som kan lede fram til eller disponere for klinisk tenacibaculose, ble det

laget et kausaldiagram basert på metoden rettet asyklisk graf (engelsk: directed acyclic graph, kalt DAG). Metoden er mye brukt i humanmedisin og er nylig også benyttet på kausalutredninger for noen dyresykdommer. Den er imidlertid lite benyttet på sykdommer hos akvatiske dyr til tross for at den burde være velegnet for å skaffe oversikt over årsaksinterferens for sykdommer i komplekse akvatisk miljø.

Arbeidspakke 1b

Denne arbeidspakken ble gjennomført som en epidemiologisk studie av 19 mistenkte tilfeller av tenacibaculose rapportert til prosjektet i 2018. Studien baserte seg på produksjonsdata innhentet fra deltakende oppdrettsselskaper, spørreundersøkelser og helgenom genotyping av involverte bakterier. Tilfellene dekket et stort geografisk område, fra Møre og Romsdal i sør til den russiske grense i nord, en avstand på >2000km. Prosjektet har tatt i bruk MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry) for identifikasjon av *Tenacibaculum* spp. på arts- og genomvar-nivå. MALDI-TOF bruker bakterienes proteinsammensetning som grunnlag for identifikasjon. Det ble også utført en histopatologisk studie av materiale innsendt fra hver sak og kliniske og histologiske forandringer forbundet med tenacibaculose ble beskrevet. I denne arbeidspakken ble det også generert genetiske data som, kombinert med fenotypisk karakterisering av utvalgte isolater, ga grunnlag for å beskrive 2 nye *Tenacibaculum* arter.

Arbeidspakke 2

I denne arbeidspakken ble protein uttrykket i 7 *Tenacibaculum* stammer, ved 4 ulike tidspunkter og 5 biologiske replikater over vekstperioden (2 tidlig, 2 sent) identifisert og kvantifisert. Stammene var utvalgt for å representere genetiske spredningen blant *Tenacibaculum* variantene isolert fra laks som potensielt viser ulik grad av toksisitet og slik identifiserte molekylære forskjeller kan ha relevans for toksisitet/patogenitet. Fordi gen/protein annoteringen av *Tenacibaculum* sp. stammer fremdeles er mangelfull ble det etablert et verktøy som kunne kombinere funksjonell annotering til translaterede gen sekvenser. Disse dataene gir ny kunnskap om skiftende metabolske prosesser i *Tenacibaculum* over vekstfasen. Samtidig gir protein dataene ett innblikk i forskjeller mellom ulike stammer og genomvarer og derfor kan vise til viktige molekylære årsaker til forskjeller i toksisitet mellom stammer/genomvarer. Dataene viste også at *Tenacibaculum* uttrykker ett protein glykosylerings system hvor det er klare forskjeller i strukturen mellom

stammene/genomovarene. Noe som potensielt kan utnyttes med tanke på diagnostikk eller som mulige vaksine kandidater.

Arbeidspakke 3

I denne arbeidspakken ble det etablert en *in vitro* cellebasert modell for å måle toksisitet av ekstracellulære *Tenacibaculum* spp. toksiner. Modellen ble brukt til å undersøke og delvis karakterisere toksisitet av utvalgte *Tenacibaculum*-isolater som ble samlet inn i arbeidspakke 1. Utvalget var basert på den genetiske kartleggingen. I tillegg ble modellen brukt til å måle effekten av antistoffbasert nøytralisering av *Tenacibaculum*-toksiner, med tanke på mulighet for bruk i vaksiner.

Prosjektorganisering

Prosjektgruppen

Duncan Colquhoun, forsker og prosjektleder, Veterinærinstituttet (VI)

Saraya Tavornpanich, forsker VI,

Mona Dverdal Jansen, forsker VI

Edgar Brun, avdelingsdirektør VI

Hilde Sindre, forsker VI

Hanne Nilsen, forsker VI

Anne Berit Olsen, forsker VI

Bjørn Spilsberg, forsker VI

Karin Lagesen, forsker VI

Snorre Gulla, forsker VI

Jan Haug Anonsen, forsker (NORCE) (overtok ansvar fra Fiona Provan/ Mari Mæland)

Styringsgruppen:

Per Anton Sæther, MarinHelse AS

Anne Tjessem, Grieg Seafood Finnmark AS

Karin Bloch-Hansen Lerøy Aurora AS ((overtok ansvar fra Eirik Monsen)

Henrik Duesund, Cermaq AS

FHF observatør

Sven Martin Jørgensen

3. Problemstilling og formål

'Atypisk vintersår' eller 'tenacibaculose' hos atlantisk laks i sjøoppdrett er hovedsakelig forbundet med alvorlig vevsnekrose i hode og/eller finnene til den berørte fisken. Tap knyttet til tenacibaculose er vanligvis akutte og kan være ekstremt høye. Forekomster av opptil 80% dødelighet kan forekomme og i mange tilfeller blir berørte bestander avlivet på grunn av velferdsbekymringer og for å unngå mulig smitteoverføring etter forsiktighetsprinsippet. Årsakene til at tenacibaculose de siste 5-10 årene har økt i omfang i norsk lakseoppdrett er uklare og det er store kunnskapshull knyttet til betydningen av *Tenacibaculum* spp. for manifestasjonen av denne sykdommen. Et mål med prosjektet var å identifisere risikofaktorer for utbrudd av tenacibaculose, blant annet identifisere produksjonsfaktorer forbundet med utbrudd, karakterisere *Tenacibaculum*-varianter særlig knyttet til utbrudd, karakterisere toksinproduksjon i diverse *Tenacibaculum*-varianter, og undersøke muligheten for antistoffbasert nøytralisering av toksisk aktivitet.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble utført som et samarbeidsprosjekt mellom Veterinærinstitutt og NORCE.

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

Arbeidspakke 1a (Produksjonsepidemiologi) ble ledet av Saraya Tavornpanich med støtte fra Mona Dverdal Jansen og Edgar Brun. Sub-taskene bakteriologi, patologi og utvikling av MALDI-TOF MS som et raskt og effektivt diagnostisk verktøy for *Tenacibaculum* spp. ble utført av Anne Berit Olsen og Hanne Nilsen. I denne arbeidspakke var det også utstrakt samarbeid med industri, både oppdrettsfirmaene og fiskehelsetjenester angående innsendelse av prøver og tilgang til produksjonsdata.

Arbeidspakke 1b Molekylærepidemiologi ble ledet og utført av Bjørn Spilsberg.

Arbeidspakke 2 Toksin produksjon ble ledet av Jann Aanonsen og utført ved NORCE.

Arbeidspakke 3 Cellekultur arbeid og mulighet for antistoff basert nøytralisering av toksisk aktivitet ble ledet av Hilde Sindre.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Delmål 1a: Produksjonsepidemiologi

Kausalanalyse

Tre hypoteser ble satt opp som ivaretar potensielle risikofaktorer fisken kan eksponeres for før, under og etter sjøsetting.

Hypotese 1: Her setter vi oppvekstforholdene i settefiskanlegg som et viktig startpunkt som kan disponere og gjøre settefisken ekstra utsatt for ulike eksponeringer senere i produksjonen fram til sjøsetting, hvor smolten til slutt eksponeres for aktuelle bakterier.

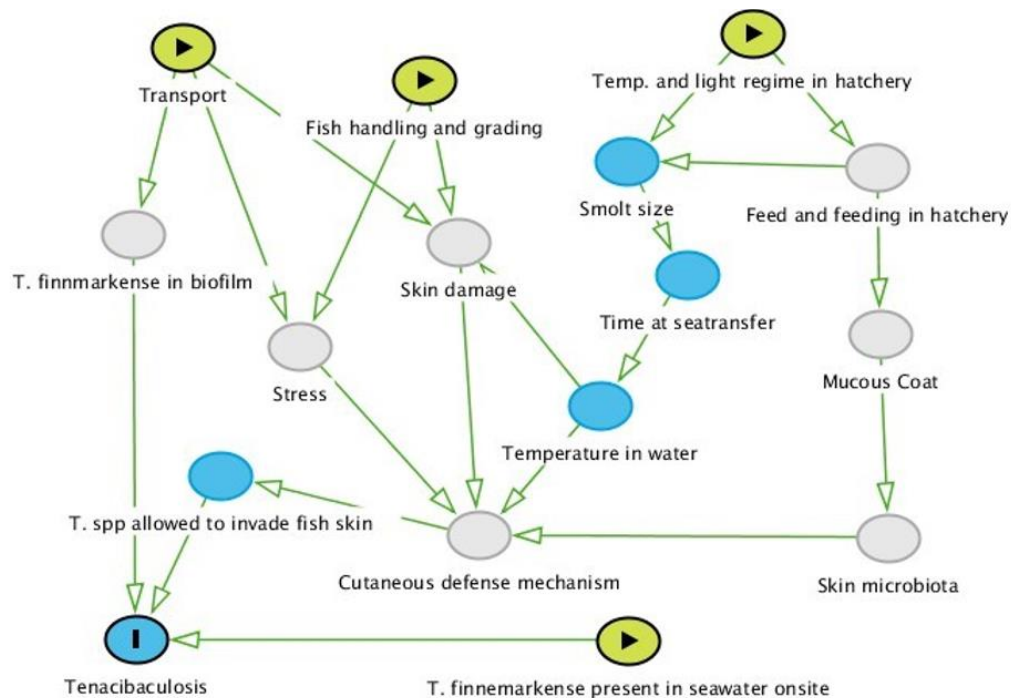
Hypotese 2; Her ser vi på hvordan selve transporten av smolt i brønnbåt fram til sjøanlegget kan skape et miljø som disponerer for utvikling av tenacibaculose.

Hypotese 3; Her ser vi på hvordan miljø og håndtering av fisken etter sjøsetting kan disponere for tenacibaculose.

Disse tre løpene satte vi så sammen til én kausal web hvor de definerte årsakssammenhengene blir sett under ett. Diagrammet viser en sammenheng mellom ulike disponerende faktorer og hvordan disse indikerer at tiltak på ulike nivå vil kunne bryte årsakskjeden eller moderere effekten av påfølgende faktorer. Vårt oppsett ender opp med kjente faktorer som temperatur ved sjøsetting, stress knyttet til sjøsetting, dårlig kvalitet på hudslim ved sjøsetting som utløsende faktorer for utbrudd. Dette er faktorer en direkte kan kontrollere/begrense betydningen evt. gjennom tiltak lengre opp i kjeden, for å redusere forekomsten av tenacibaculose.

Ved å bruke dette systemet kan en oppdretter/helsetjeneste «stykke opp» prosessen fram til et utbrudd og lettere kunne evaluere enkeltkomponentene for å se hvilke(n) faktor(er) som med størst sannsynlighet bidro til utbruddet. Dette vil øke kunnskapsbyggingen i forebyggende helsearbeid.

Systemet kan også kvantifiseres for å se på relativ betydning av de ulike faktorene. Imidlertid vil den praktiske nytten av en slik kvantifisering være mindre ettersom sannsynligheten knyttet til de ulike faktorene i kjeden vil kunne variere med enkelttilfellene.



Figur 1. Skisse av årsaksweb for utvikling av tenacibaculose.

Konklusjon:

Framtidige studier bør målrette datainnsamlingen i forhold til kausale hypoteser.

Vi har i dette studiet foreslått DAG som en generisk metode for å strukturere tenkning ved multifaktorielle, komplekse årsaker til utvikling av klinisk sykdom. Vi har benyttet tenacibaculose som case, og har satt sammen tre ulike arbeidshypoteser for utvikling av tenacibaculose etter sjøsetting.

Metoden er sentral for å skaffe bedre oversikt over årsaksforholdene til at vi får et sykdomsutbrudd, hvordan variablene kan virke sammen og hver for seg, identifisere konfoundere og hvordan vi kan målrette innsatsen i forebyggende øyemed. Metoden er velegnet for å skape bedre design på risikofaktor-studier ved at en kan utvikle konsensus om en antatt årsakskaskade og gjennom den identifisere de variablene en ønsker å fokusere på.

Ved kvantifisering av de ulike variablene kan en også score de ulike trinnene og derved se hvilke trinn og derved årsakslinjer som samlet sett har størst sannsynlighet for å opptre og hvor effekten av tiltak vil være størst.

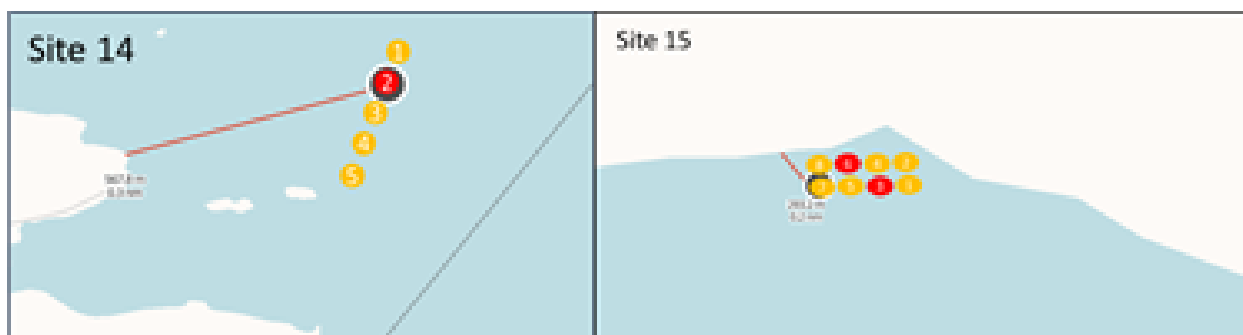
Epidemiologi er en disiplin som er avhengig av observasjonsstudier hvor en ofte bruker regresjonsanalyser for å konkludere på mulige korrelasjoner mellom variabler. Korrelasjon gir imidlertid ingen bevis på årsakssammenhenger og kan føre til falske konklusjoner og bias. Årsaksinterferens er en form for resonnement for å undersøke sammenhenger mellom variabler og hvordan de kan eller ikke kan resultere i et gitt utfall. Årsaksinterferens en måte å prøve å forstå årsakssammenheng når det ikke er mulig å gjennomføre et eksperiment. DAG er et kraftig verktøy for å hjelpe med å forstå kausale slutninger.

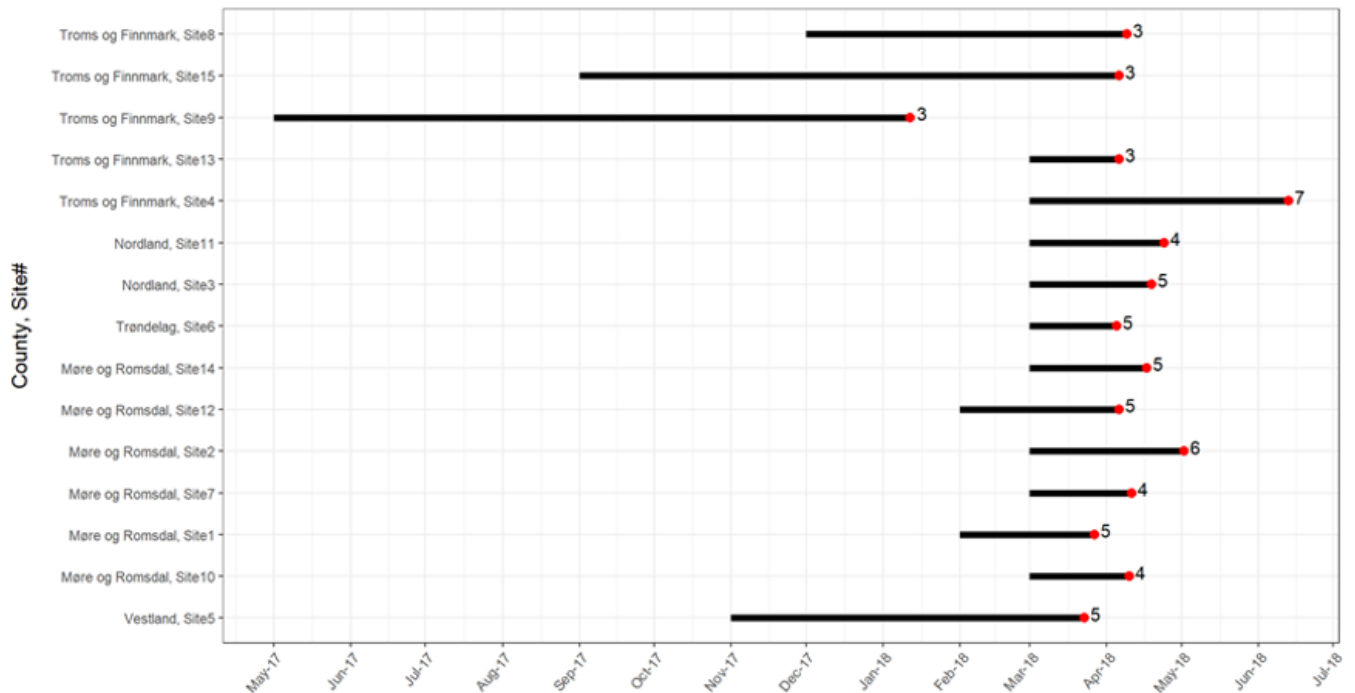
Deskriptive analyser ble gjort på lokalitets- og merd-nivå. Av de 19 tenacibaculum-mistenkte lokalitetene, var 15 positive. I alt ble data fra 37 merder benyttet fra 25 lokaliteter. Av de 37 merdene var 18 positive mhp tenacibaculose og 19 var negative. Chi-kvadrat and t-test ble benyttet for å se om det var signifikant forskjeller for noen av de innsamlede variablene mellom positive og negative merder.

Tid fra utsett til utbrudd (risikoperioden) for ulike sjøtemperatur ved utsett, ble analyser ved hjelp av overlevelsesanalyse.

Resultater

Prøver ble submittert fra bare en eller to merder på hver lokalitet. Dette gjør at merdspesifikke data er viktig for å kunne gjøre gode statistiske analyser. Eksempel gitt i Figur 2 under.



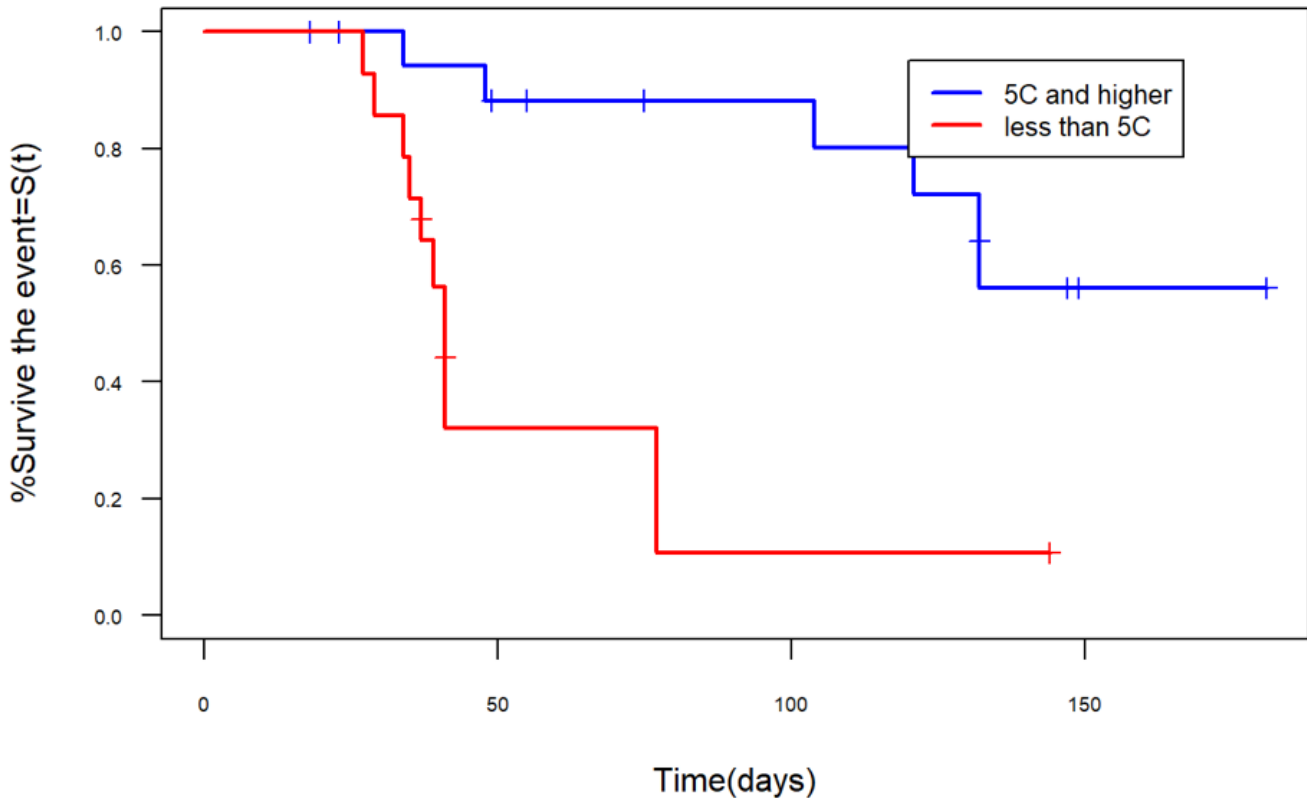


Figur 3 Tidslinje fra sjøsetting fram til registrert utbrudd samt sjøtemperatur ved utsett.

For flere av variablene var det for lite datagrunnlag til å gjøre statistiske analyser. Dessuten viser ulike plot av rådata som er en normal første rutinetilnærming til analysene, ingen tendenser til at noen av gruppene skilte seg ut som mulige statistisk forskjellige. Deskriptiv analyse viste altså ingen (sterke) assosiasjon mellom ulike forklaringsvariabler og tenacibaculose som utfall (responsvariabel). Disse variablene gir derfor ingen indikasjon på økt eller redusert sannsynlighet for å få tenacibaculose etter sjøsetting.

Når vi kategoriserte de positive merdene med hensyn på sjøtemperatur, viste overlevelsesanalysen en klar indikasjon på sjøtemperatur ved utsett kan være en risikofaktor. Tiden mellom utsett og påvist tenacibaculose ble betydelig redusert for utsett som var gjort ved sjøtemperatur lavere enn 5°C sammenlignet med utsett gjort ved 5°C eller høyere. I tillegg var andelen positive merder størst ved de laveste temperaturene.

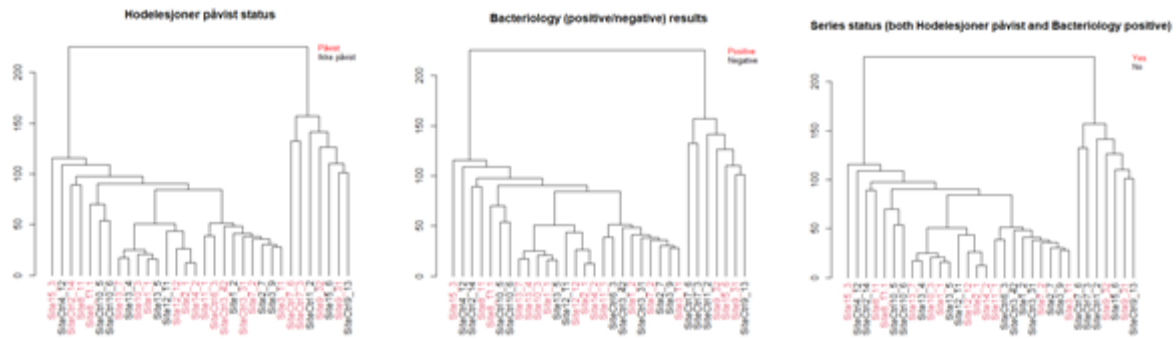
Probability of cage-level fish cohorts surviving Tenacibaculosis, grouped by sea temperature (C) at the time of smolt transfer



Dødelighetsmønster

Vi ønsket å undersøke om ulike kliniske sårskader og positive bakteriologifunn ga ulike dødelighetsforløp over tid. Dette gjorde vi ved å kategorisere merdene i ulike kategorier mhp kliniske funn.

For å sammenligne dødelighetsforløp over tid ble Dynamic time warping (DTW) brukt og presentert i dendogram (se figur 4). Disse viser forskjell eller likhet mellom ulike dødelighetsforløp tilsvarende fylogeni tre innen bakteriologi.



Figur 4 Dynamic Time Warping dendrogram

Lokalitetene fordeler seg i ulike kluster, men disse klustrene kan ikke bli forklart ut fra våre kliniske eller bakteriologiske funn.

Makro- og histopatologi

Fisk med hudskader fra 15 av de sakene hvor *Tenacibaculum* ble dyrket (78 i total) ble undersøkt histopatologisk. Gjelle, pseudobrank, indre organer, intakt hud og skjelettmuskulatur ble tatt fra alle fiskene. Det studerte materialet inkluderte 70 snitt fra hodesår og 34 fra flankesår.

Affisert fisk viste vanligvis skader omkring munnen med vevstap og eksponert kjeveben og underkjevebrusk (Figur 5)



Figur 5 Laks med snuteskade. Hemorragiske sår rundt munnen og vevstap på over- og underkjeve.

Hos noen individer ble det observert uni- og bilaterale okulære lesjoner, noen med perforert hornhinne. I de alvorligste tilfellene var store områder på hodet erodert og kraniet synlig. Noen fisk viste flankesår, vanligvis med en skjelløs randzone rundt eksponert muskelvev. Det ble også observert frynset halefinne.

De histopatologiske funnene var i samsvar med en tidligere beskrivelse av *Tenacibaculum*-infeksjon hos atlantisk laks (Olsen et al. 2011). Karakteristiske trekk ved både hode- og flankelesjoner inkluderte tap av epidermis og varierende, ofte høy, forekomst av filamentøse stavbakterier i nekrotisk dermis. Store mengder bakterier kunne bli observert i underliggende bindevev og bindevevsdrag, i bindevevshinnen omkring muskelceller (endomysium), så vel som i degenererte muskelceller. Det var ofte bare sparsom betennelsescelleinfiltrasjon (fig. 6a).

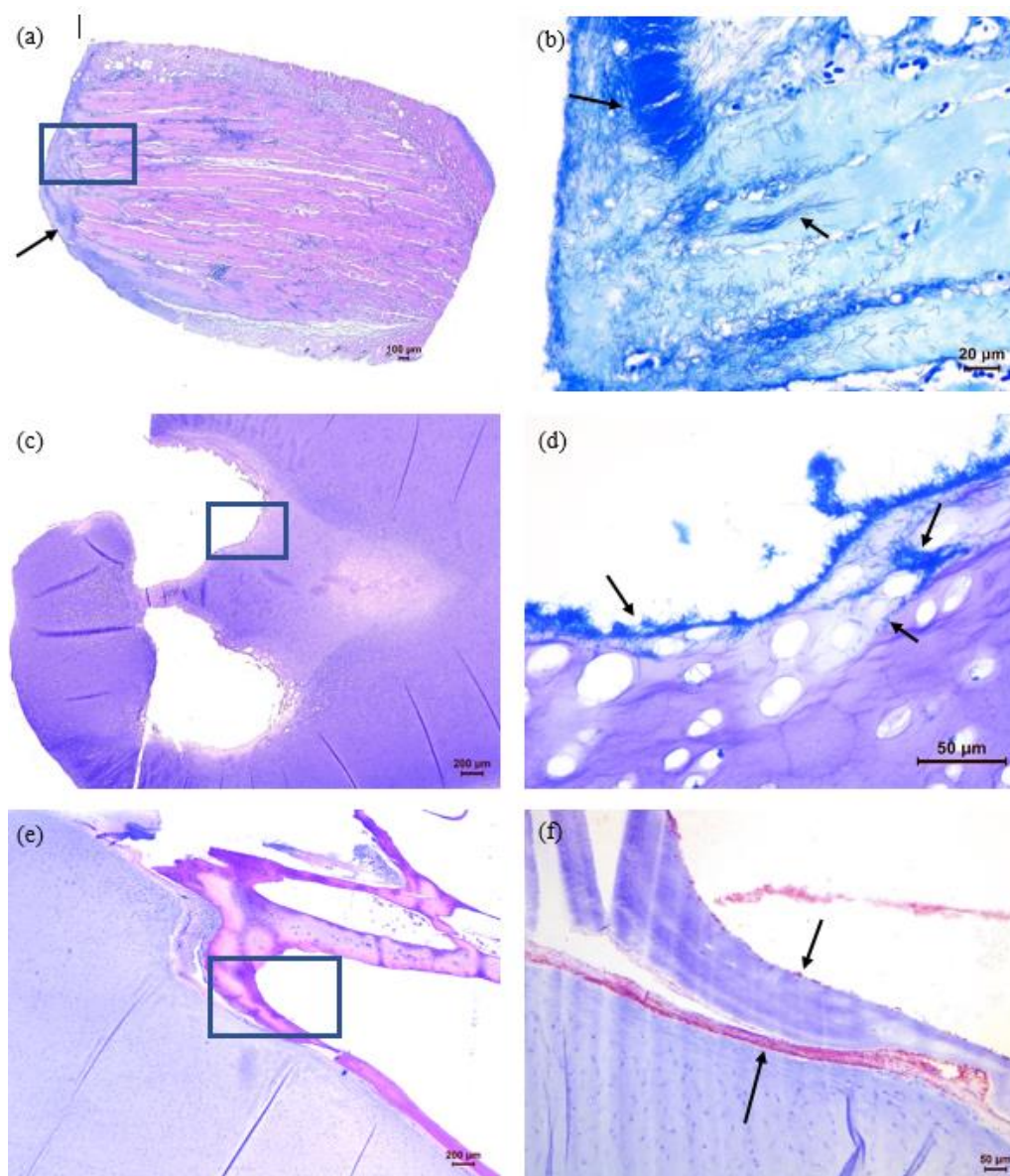


Figure 6. Histopatologi av hodesår (a, b) Underhud, muskelvev og stavbakterier. Bakteriene er mest tallrike på overflaten, men er også til stede i og mellom muskelcellene (piler). Det er fravær av betennelsesreaksjon . (a: H&E, b: MGG). (c, d) I mandibulær bruskk er det filamentøse stavbakterier på en ujevn overflate (lang pil). Bakterier er også til stede i bruskkvevet (korte piler). Det ses oppklaring (lysis) av bruskkvev, forstørrede lacunae og fravær av kondrocytter (asterisk). (c: H&E, d: MGG). (e, f) Tallrike filamentøse stavbakterier i bindevevet mellom den mandibulære brusken og tilgrensende beinvev. Bakterier ses også på overflaten av beinvevet, antakelig assosiert med bindevevshinnen som dekker beinet (e: H&E, f: IHC)

Ved kjevelesjoner var fullstendig tap av hudvev vanlig og tette lag med lange stavbakterier ble observert intimt forbundet med nekrotisk bruskk i underkjeven (figur 6b). Bindevev som dekker bein og som er til stede mellom bein og bruskk kunne være uttalt infiltrert med filamentøse stavbakterier (fig. 6c). Et typisk funn var sparsom forekomst til fullstendig fravær av inflammatoriske celler i vev med filamentøse bakterier, selv om leukocytter og blødninger til en viss grad kunne observeres i tilstøtende vev. En mer

tydelig inflammatorisk respons ble observert i få områder hvor det ble sett kortere bakterieceller (morfologi forenlig med *M. viscosa*/*A. wodanis*/*Vibrio* spp) sammen med lange, filamentøse staver. Eldre lesjoner under avheling med omfattende granulasjonsvevdannelse ble observert i noen få tilfeller. Bare mindre og uspesifikke histopatologiske funn ble påvist i gjelleog pseudobrank og det ble ikke gjort funn i indre organer som kunne knyttes til den omtalte patologien i huden hos noen av de prøvetatte fiskene. Immunhistokjemisk undersøkelse ved bruk av antiserum mot *T. finnmarkense* resulterte i positiv merking i alle testede sår. En positiv reaksjon med antiserum mot *M. viscosa* ble sett i noen få foci i 4/43 prøver (3/11 anlegg). Testing med antiserum mot *A. wodanis* ga ingen reaksjon (resultatene ikke vist).

Delmål 1b: Bakteriologi og molekylær epidemiologi

Ved dyrking var *Tenacibaculum* den dominerende bakterietypen i 15 av de 19 sakene (se figur 7), som ble sendt inn til prosjektet i 2018. Andre bakterier forbundet med vintersår dvs. *M. viscosa* og til dels *Vibrio wodanis*, ble isolert i bare noen få tilfeller, sammen med *Tenacibaculum*. *Tenacibaculum* ble nesten utelukkende isolert fra eksterne lesjoner og bare unntaksvis og sparsomt fra nyre.

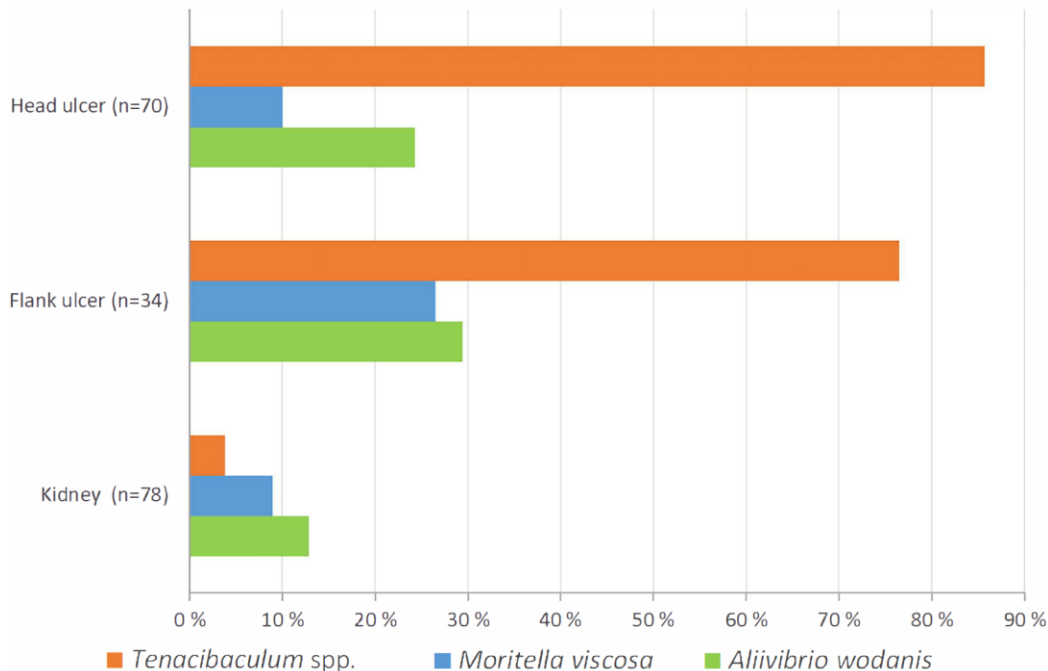
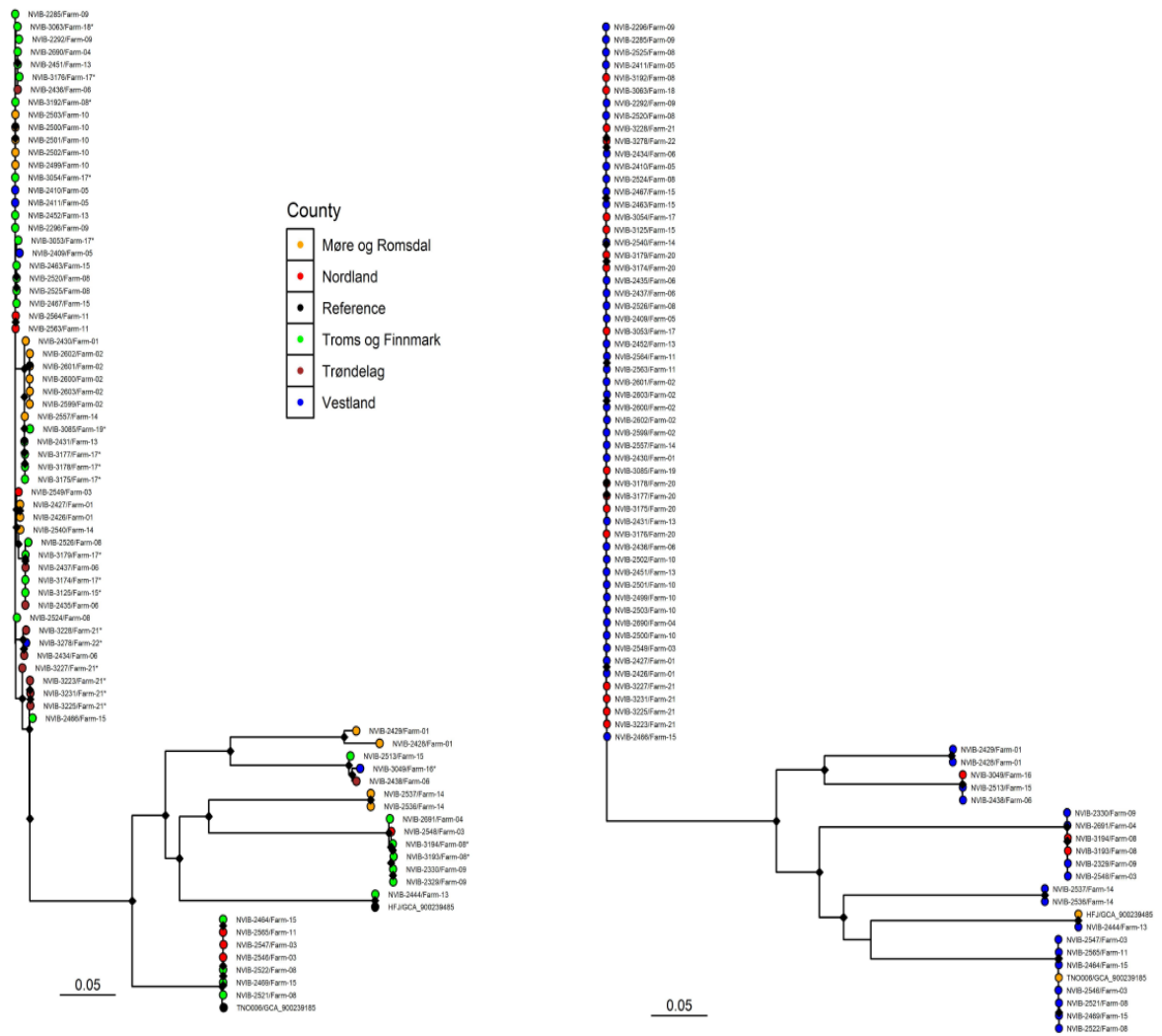


Figure 7. *Tenacibaculum* spp., *Moritella viscosa* og *Aliivibrio wodanis* dyrket fra hodesår, sidesår og nyre av 78 undersøkte fisk.

Helgenombasert epidemiologi

I løpet av prosjektet (2018) ble 107 isolater tilhørende genus *Tenacibaculum* nedfrosset. Av disse ble 3-7 isolater tilfeldig utvalgt fra hvert utbrudd til helgenomsekvensering med påfølgende analyser (76 totalt). Det ble gjennomført en rekke forskjellige analyser inkluderende ANI (Average Nucleotide Identity) som er en direkte mål av 'likhet' mellom to bakterie stammer og som er den ny 'gull standard' og grunnlag for 'offisielle' bestemmelse av arts tilhørighet. ANI fastslo at i forbindelse med utbrudd av atypisk vintersår i 2018/2019 ble det isolert tre arter av *Tenacibaculum* dvs *T. finnmarkense* og *T. dicentrarchi* og en tidligere ubeskrevet art som ble offisielt navngitt i nåværende prosjekt som *T. piscium* (Olsen et al. 2020).

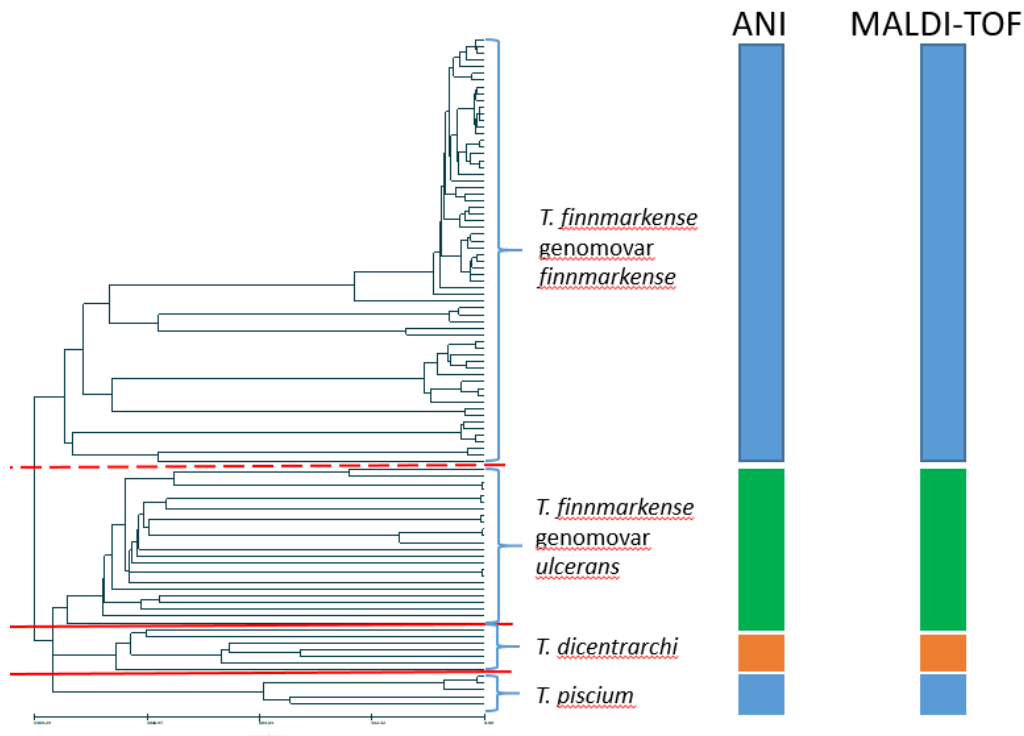
Av de 76 stammene undersøkt fra 2018 materialet, ble 74 identifisert som *T. finnmarkense* mens bare 2 ble identifisert som *T. dicentrarchi*. Når *T. dicentrarchi* ble heller ikke identifisert blant 2019 isolatene, indikerer dette at *T. dicentrarchi* ikke vanligvis er knyttet til utbrudd av atypisk vintersår i Norge, selv om den har blitt assosiert med hud infeksjoner i laks holdt i varmere sjøvann (Klakegg et al. 2019). *T. piscium* ble ikke identifisert i løpet av 2018 studiet, men ble påvist i noen få tilfeller fra 2019. Resultater generert i nåværende og tidligere prosjekter indikerer at *T. piscium* heller ikke er en av bakteriene som vanligvis kan knyttes til atypisk vintersår hos norsk laks. ANI analyse videre fastslo at det eksisterte 2 sub-grupper, så-kalt genomovar (gv.), innen arten *T. finnmarkense* (også beskrevet av Olsen et al. 2020). Både *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* og gv. *ulcerans* ble identifisert blant isolatene isolert i 2018/2019 samlingene. Gv. *finnmarkense* dominerte i begge år og utgjort 75% av alle stammene isolert i 2018. Videre, kunne både hel-genom basert Multi-Locus Sequence Typing (MLST) analyse og Single Nucleotide Polymorphism (SNP) baserte analyser identifisere en svært beslektet sub-gruppe av isolater innen gv. *finnmarkense*. Denne sub-gruppen ble identifisert i hele 13 av de 15 utbrudd undersøkt i 2018. Det som er mest oppsiktsvekkende er at selv om utbruddene hvor disse isolatene ble funnet ligger i noen tilfeller mer en 2000km fra hverandre, er isolatene så like at de er nesten identisk. Av 57 gv. *finnmarkense* isolert i forbindelse med 2018 studiet, tilhørte 39 den nesten identisk sub-gruppen. Likheten mellom medlemmer av denne svært beslektede gruppen *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* illustreres i figur 8 under. Analysen er begrenset til medlemmer av gv. *finnmarkense* for å få frem likheter og ulikheter innad i sub-gruppen. Dette er gjort for å synliggjøre de små forskjellene innad i denne genomovaren. Disse små forskjellene ville blitt lite synlige hvis de andre genotypene av *Tenacibaculum* hadde vært inkludert i figuren.



Figur 8. SNP analyse av *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* isolert fra atypisk vintersår våren 2018. Treet på venstre siden inkluderer genområder som vi har grunn til å tro er forbundet med rekombinasjon (genetisk områder som bytes mellom (gjærne) nærslektede bakterier). Treet på høyre siden ikke inkluderer putativ rekombinerte områder.

Forbedret bakteriediagnostikk

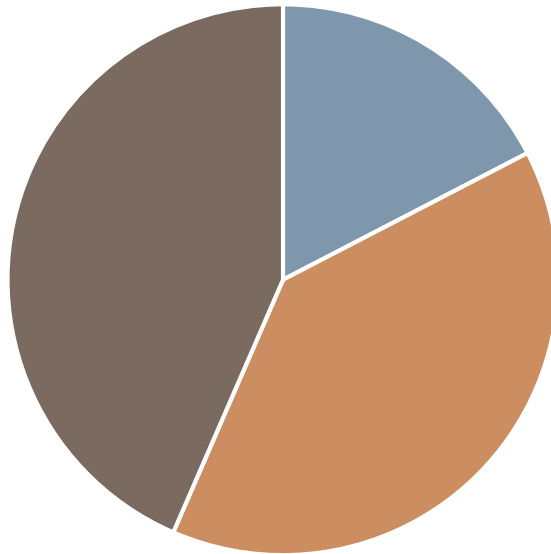
Alle 76 helgenomsekvensert isolatene fra 2018 del av studiet pluss referanse stammer ble analysert ved MALDI-TOF vha den kommersielt tilgjengelige databasen og “in house” genererte spektra. Det ble påvist 100% overenstemmelse mellom MALDI-TOF identifikasjonen og ANI analyse. Dette validerer MALDI-TOF som en raskt, trygt og billige metode for dyrkningsbasert diagnostikk av *Tenacibaculum* infeksjoner i norsk laks.



Figur 9. illustrerer 100% overenstemmelse mellom hel-genom basert ANI identifikasjon til art og genomvariant nivå og MALDI-TOF diagnostikk. Slektskap tre på venstre siden. Like farger = like identifikasjon ved ANI og MALDI-TOF.

Tenacibaculum spp. fra rognkjeks

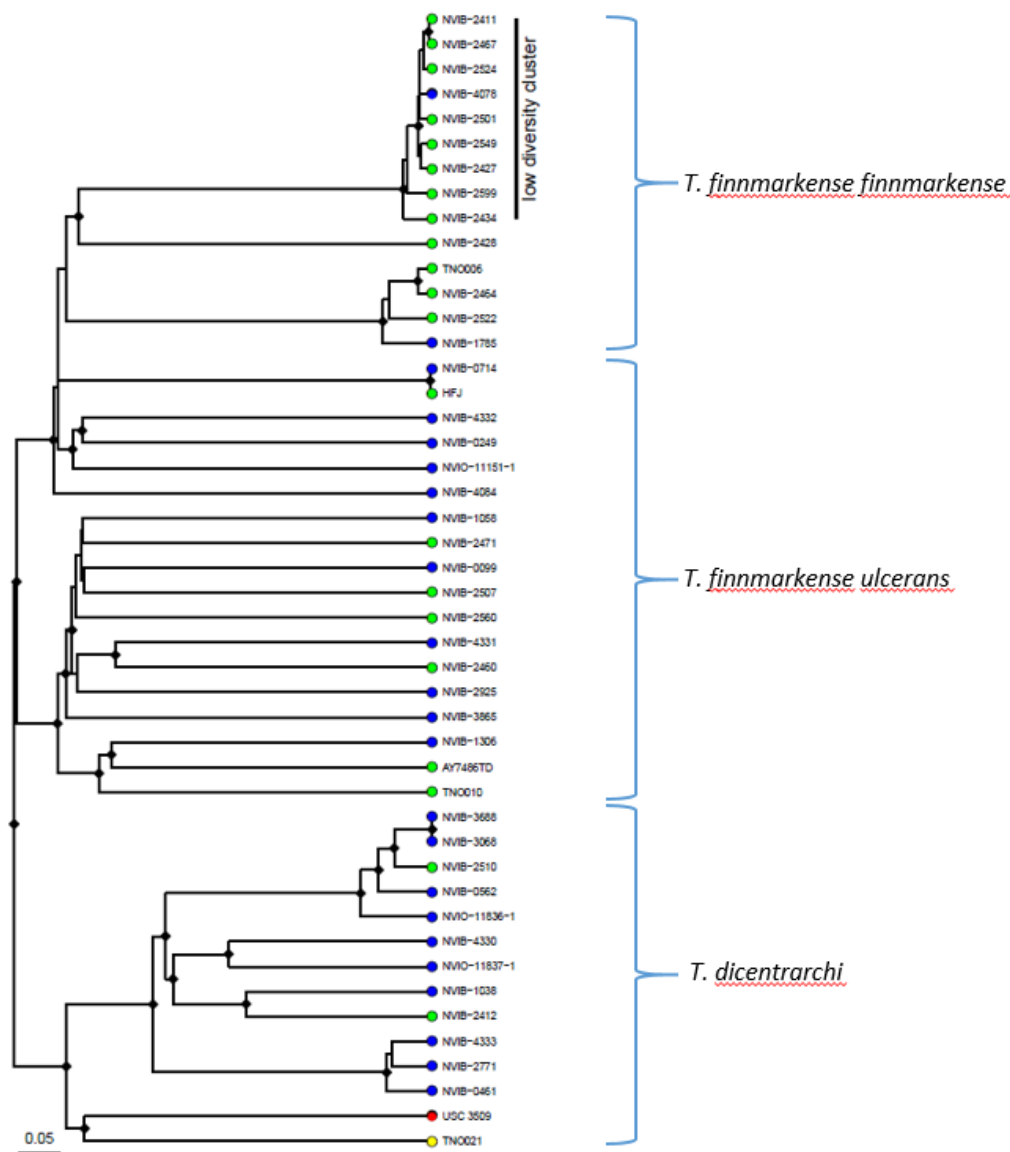
For å undersøke om rognkjeks brukt som rensefisk blir infisert av samme *Tenacibaculum* typene som laks og dermed representere en kilde til infeksjon hos laks, ble det gjennomført hel-genomsekvensering av 23 *Tenacibaculum* stammer isolert fra rognkjeks i årene 2012-2020. Isolatene ble identifisert til art og genomovar nivå ved ANI analyse (figur 10). CgMLST ble brukt til å analysere slektskap med høy oppløsning (figur 11). Denne analyse baserer seg ulike alleler i 1802 gener som er felles i alle genomene.



■ *T. finnmakense finnmakense* ■ *T. finnmakense ulcerans* ■ *T. dicentrarchi*

Figur 10. *Tenacibaculum* spp. isolert fra syke rognkjeks 2012-2020

Det viste seg at både *T. dicentrarchi*, *T. finnmakense gv. finnmakense* og *gv. ulcerans* påvises hos rognkjeks. Det er vanskelig å konkludere noe bastant basert på dette begrensede datagrunnlaget, men undersøkelsen kan indikere at *T. finnmakense gv. finnmakense* som er mest vanlig hos laks med tenacibaculose i forholdsvis kaldt sjøvann, ikke er like dominerende hos rognkjeks og bare et undersøkt isolat tilhørte den lav-diversitet klynge av *T. finnmakense gv. finnmakense* som dominerer i tenacibaculose hos laks. Resultatene kan også indikere at *T. dicentrarchi* kan være mer vanlig hos rognkjeks enn hos laks oppdrettet i kaldt sjøvann.

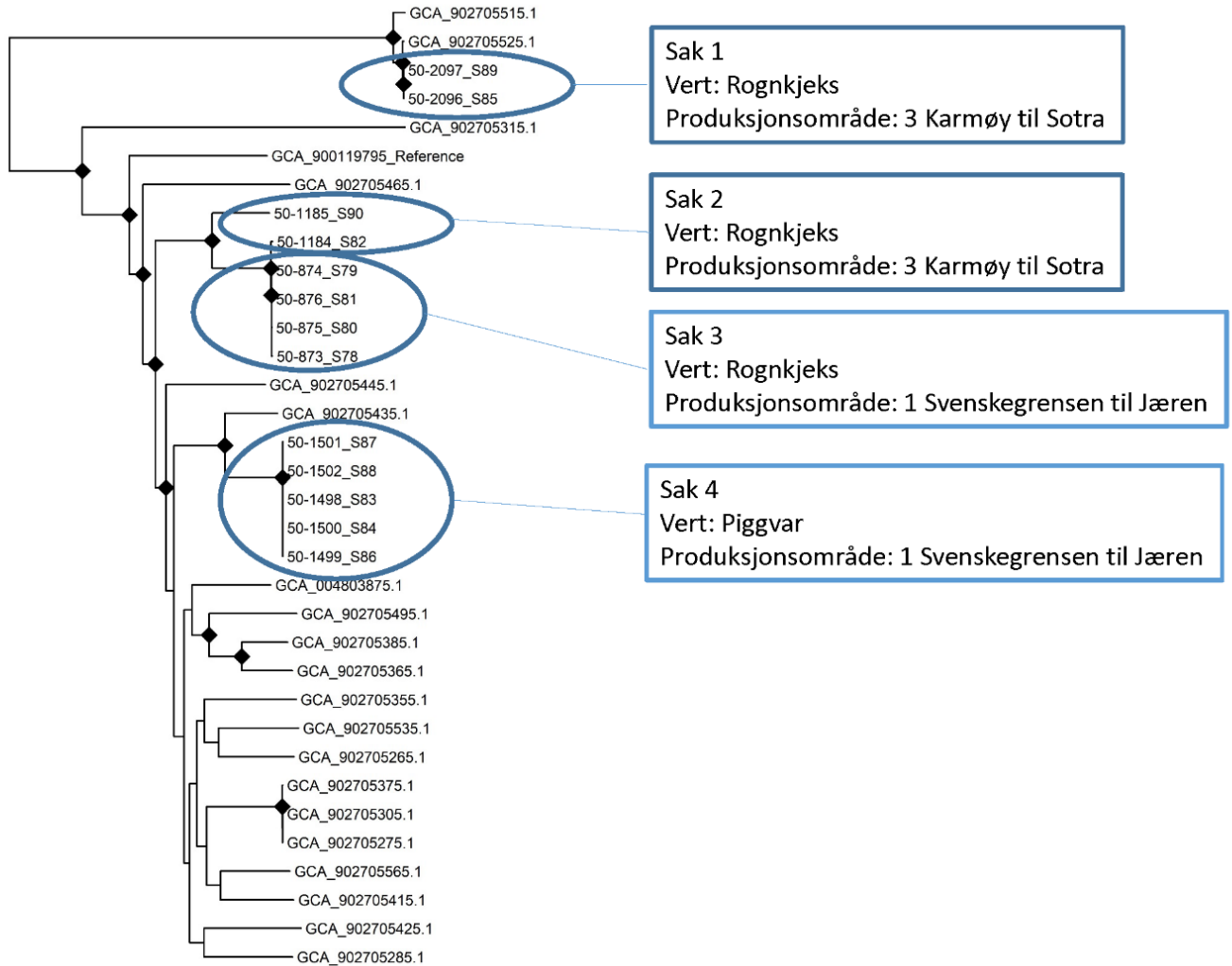


Figur 11. cgMLST plassering av 23 *Tenacibaculum* isolert fra oppdrettsrognkjeks (blå) i perioden 2012-2020, i forhold til utvalgt stammer fra oppdrettslaks (grønn), isolert hovedsakelig i perioden 2018-2019.

Molekylær epidemiologi av Norsk *T. maritimum* fra rognkjeks og piggvar

T. maritimum er assosiert med sår og munnråte i oppdrett av atlantisk laks på nordvestkysten av USA/Canada. I Norge er bakterien funnet som en sykdomsfremkallende art hos oppdretts rognkjeks og piggvar, i tillegg til at den ved PCR er koblet til gjellesykdom hos norsk laks. Det ble derfor bestemt å helgenomsekvensere de få norske isolatene som er tilgjengelig, for å skape kunnskap rundt en mulig 'emerging' infeksjon i Norge. Tretten isolater av *T. maritimum* isolert fra rognkjeks (8) og piggvar (5) ble sekvensert. Disse tretten isolatene kom fra tre diagnostiske saker i Agder og Vestland fylker. En

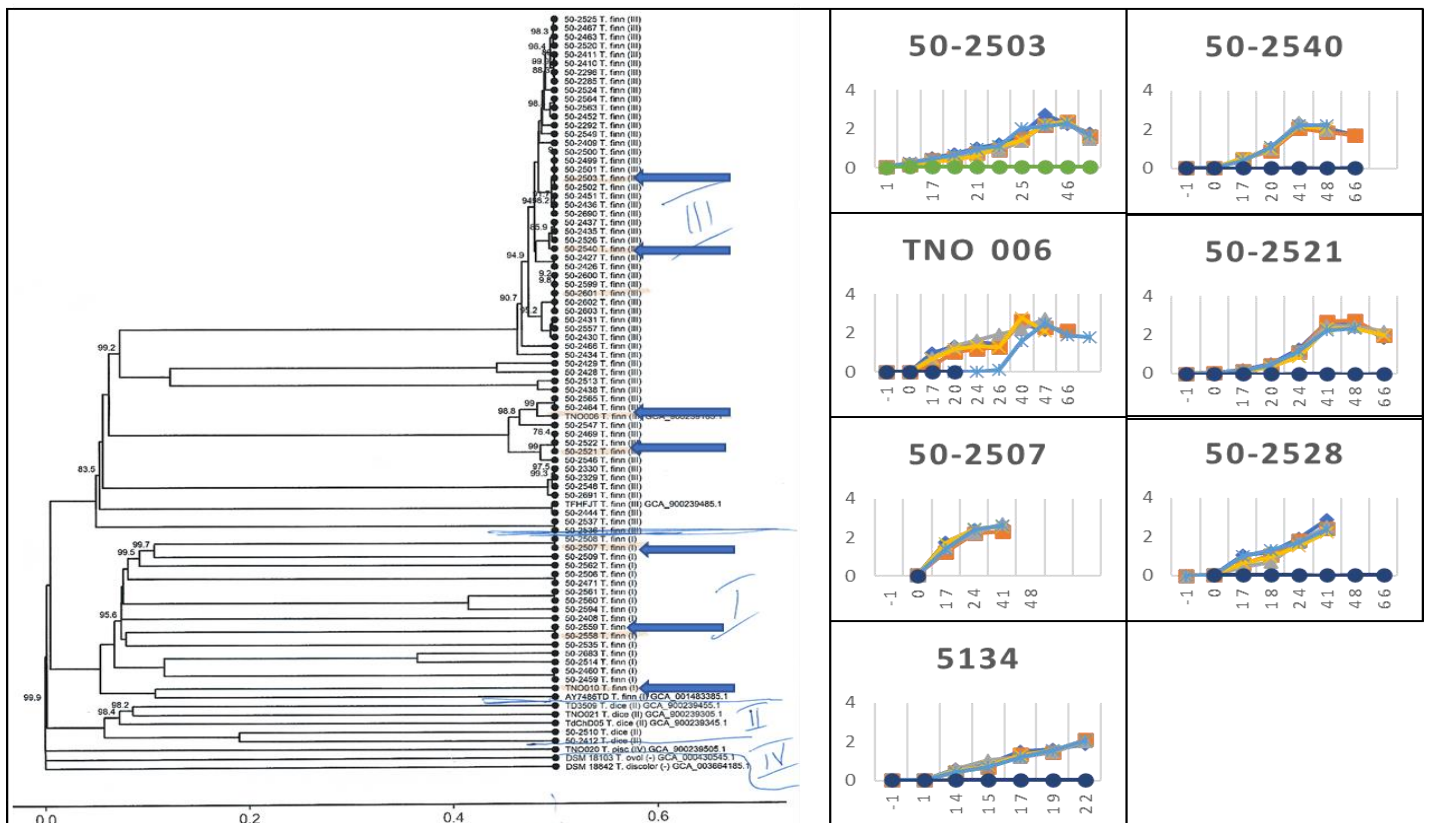
fylogenetisk analyse ble utført basert på mutasjoner i genomene og visualisert som et SNPtree i figur (Figur 12)



Figur 12. SNPtre med plassering av 13 *T. maritimum* isolert fra oppdrettsrognkjeks eller oppdrettspiggvar fra 4 ulike saker som vist i forklaringene. Tjuetre referanser fra genbank er inkludert.

Delmål 2: Toksinproduksjon/karakterisering

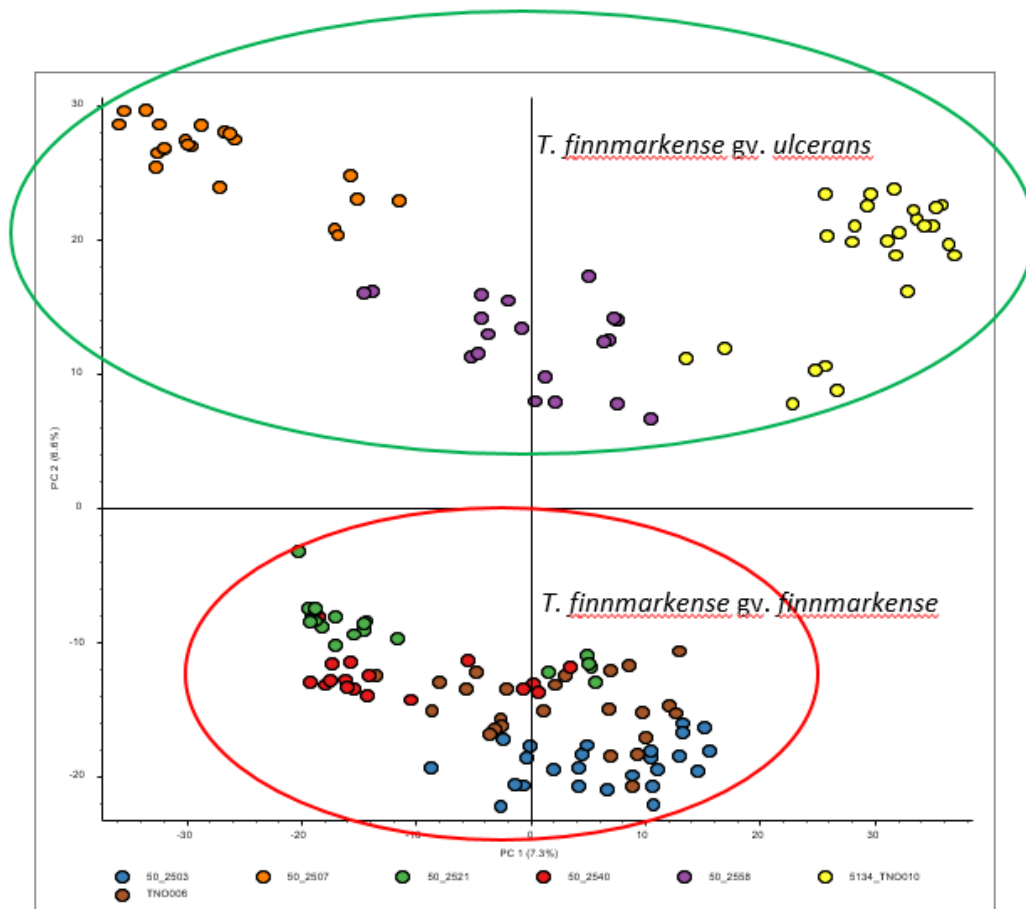
For å forsøke å identifisere potensielle toksin molekyler og forstå avgjørende molekyllære faktorer for toksisitet i *Tenacibaculum* sp. ble protein uttrykket i 7 stammer, ved 4 ulike tidspunkter og 5 biologiske replikater over vekstperioden (2 tidlig, 2 sent) identifisert og kvantifisert. Stammene var utvalgt for å representere genomiske spredningen av *Tenacibaculum* varianter og slik ha gode representanter for ulike genotyper/genomovarer som potensielt viser ulik grad av toksisitet. Identifiserte molekyllære forskjeller mellom stammer/genotyper/genomovarer kan derfor ha relevans for (bakteriens) toksisitet/patogenitet.



Figur 13 Selekterte *Tenacibaculum* stammer for proteomikk analyser. A) Blå piler viser de 7 selekterte stammene på slektskapstree og deres relasjon. De selekterte stammene er valgt for å representere genomiske variasjonen og spredning B) vekstkurve for de 7 utvalgte *Tenacibaculum* stammene og prøvetidspunkt. Y-aksen representerer O.D. 660. X-aksen representerer/denominerer timer.

Selv om den toksiske effekten kan repliseres i cellekulturer med celle-fri supernatant, noe som indikerer at toksin(er) kan være ekstracellulære (enten utskilt eller bundet til overflaten), er de spesifikke molekyllære årsakene til toksisitet i *Tenacibaculum* ikke identifisert. Interessant kan det se ut til at den toksiske effekten er ulik i forskjellige stammer/genomovarer, men hvilket type molekyl, eller

molekyler som er involvert, og om disse produseres likt over vekstfasen er ennå ukjent. Siden vekst buljongen er kompleks og inneholder en rekke ukjente molekyler som vanskeligjør identifisering av sekrede proteiner, valgte vi, siden ekstracellulære proteiner/molekyler produseres intracellulært, å fokusere analysen på hele intracellulære innhold. Foreløpig er mye av *Tenacibaculum* molekyllære prosesser og metabolisme under vekst ukjent. De proteomikk dataene vil gi ny innsikt i dette. Dessuten vil oppregulerte enzymatiske eller biokjemiske nettverk kunne indirekte indikere hvilke toksiner som blir produsert.

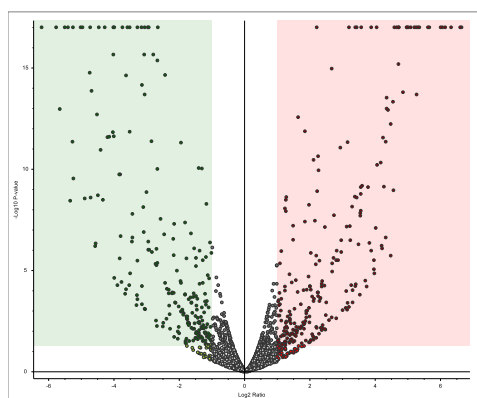


Figur 14. PCA plot av prøver fra 4(5) ulike tidspunkt over vekstkurven til 7 utvalgte *Tenacibaculum* stammer. Plottet viser likheter og forskjeller mellom det uttrykte proteomet til de ulike stammene. Spredning/gruppering over X-aksen forklarer/ gir noe mer forskjeller i proteomet (7.3%) enn spredning over y-aksen (6.6%).

Proteomikk dataene identifiserte 4837 proteiner og verifisert at disse predikerte genene faktisk blir uttrykt *Tenacibaculum*. PCA av de uttrykte proteomene fra de ulike stammene viste (figur 14), som forventet, at det overordnet var mange likheter mellom *Tenacibaculum* stammene undersøkt, men at det

allikevel er et klart grupperingsskille mellom de stammene som utgjør *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *finnmarkense* og *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *ulcerans*, hvilket indikerer forskjeller i det utrykte proteiner mellom disse gruppene, og at noe av forklaringer på ulikheter i toksisitet kanskje kan ligge i dette uttrykket.

Proteomikk dataene identifiserer ikke bare proteiner i prøvene, de genererte dataene gir og forskjeller i mengden proteiner og kan fortelle hvor stor og signifikant den forskjellen er mellom to (eller fler) prøver (figur 16). Dette gir derfor en oversikt ikke bare over identifiserte proteinene i prøven, men også viser mengden av disse proteinene og signifikante forandringer i protein uttrykket mellom prøver:



Figur 16 **Vulkan plot over forskjellen i protein uttrykk og signifikansen av den forskjellen mellom prøve 50_2503 t₃ og 50_2503 t₄.** x-aksen gir forskjellen i protein mengde i log₂ skala (i.e hver enhet gir dobbelt mengde protein). Y-aksen representerer signifikansen i -log₁₀ p-verdi av den forskjellen (høyere opp på y-aksen representerer derfor en lavere p verdi). Hvert punkt representerer ett identifisert protein. Punkter i rødt område representerer derfor proteiner som er signifikant (p>0.05) mer utrykt (mer enn dobbelt så mye) i prøve 50_2503 t₄ som i prøve 50_2503 t₃. Punkter i grønt område representerer proteiner som er signifikant mer utrykt (mer enn dobbelt) i prøve 50_2503 t₄ relativt til prøve 50_2503 t₃.

Siden dette prosjektet genomsekvenserte de isolerte *Tenacibaculum* stammene fra «vintersår» utbrudd og identifiserte nye genomvarer, manglet det funksjonell annotering av de identifiserte proteinene. Vi modifiserte derfor interproscan verktøyet fra EMBL-EBI slik at vi kunne annotere både funksjonelle, strukturelle og nettverk tilhørighet (metabolske/biokjemiske) for de identifiserte proteinene basert på likhet med kjente proteiner. Dette bioinformatiske verktøyet blir også tilgjengelig og vil kunne benyttes i studier av andre bakterie og organismer med lite annoterte proteomer.

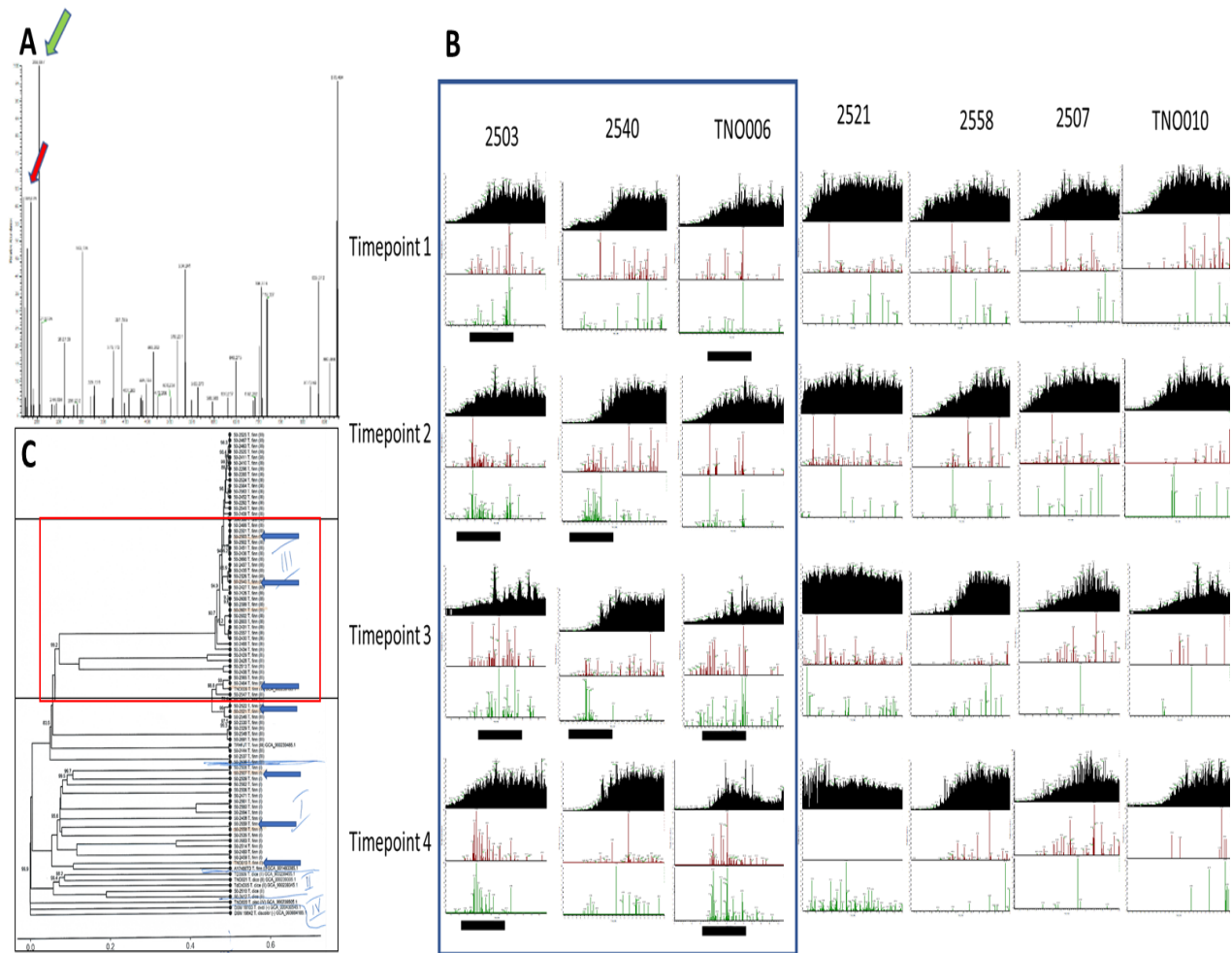
Tanken videre er derfor å organisere/sortere protein uttrykket langs flere parametere. Kombinere signifikant regulerte proteiner med informasjon om protein funksjon og biokjemisk nettverk for bedre å forstå forandringer i metabolske prosesser over livsløpet/vekstkurven til *Tenacibaculum*. Samtidig vet vi at det er forskjeller i toksisiteten mellom stammer/genomvarer. Derfor vil det å se på signifikante forskjeller i protein uttrykket mellom forskjellige stammer/genomvarer, spesielt om vi kombinerer dette med funksjonell informasjon om proteiner vi a-priori/allerede finner interessant, f.eks informasjon om proteinet har ett signalpeptid for cellulær eksport (signal-p) i kombinasjon med interessante predikerte protein domener (pfam) forbundet med (f.eks) toksisitet eller protease aktivitet, være veldig

interessant. Slike proteiner vil potensielt være medvirkende til den observerte ulikheten i toksisitet i stammene/genovarene og/eller være primære kandidater for toksiner. Arbeidet med å funksjonelt annotere proteinene og samordne funksjonelle protein grupper og biokjemiske nettverk er pågående.

I tillegg, proteomikk dataene viste at det er ett aktivt PTM/glykosyleringssystem i *Tenacibaculum* som dekorerer selektive proteiner med sukker strukturer. Dette kan sees i figur 17a hvor et peptid spekter viser ubestridelig nærvær av de to distinkte reporter ionene for N-acetyl Hexosamine. Videre undersøkte vi derfor om det fantes flere slike peptider ved å se på nærvær av disse to reporter ionene samtidig i peptid dataene. Vi fant dette mønsteret tilstedeværende i 3 stammer 50_2503, 50_2540 og TN0006 (alle *gv. finnmarkense*). Mengden av signal til stede i disse prøvene indikerer at dette er ett generelt protein glykosyleringssystem i disse stammene, som modifierer en rekke ulike proteiner. Interessant er også den observasjonen at mønsteret av HexNAc reporter ioner ikke er lik ved alle tidspunkt, dette er spesielt gjeldende for 50-2540 hvor både tidspunkt 1 og 4 (først og sist) viser fravær av store overlappende områder av reporter ioner i kromatogrammet (Fig. 17b). Denne forandringen kan bety at modifieringen forandres over vekstfasen, det kan modifierer nye proteiner, forandre struktur eller bli mer (eller mindre) tallrike på proteinene.

Det har tidligere vært beskrevet et O-linket glykosyleringssystem i Klasse Bacteroidetes (hvilket inkluderer *Tenacibaculum*) (Coyne et al. 2013), selv om *Tenacibaculum* var ikke inkludert i den nevnte studien er det sannsynlig at det eksisterer ett glykosyleringssystem i denne bakterien. Det interessante er at det er en klar forskjell i strukturen mellom de stammene som utgjør *Tenacibaculum finnmarkense* genovar *finnmarkense* og resten.

Forskjellen i glykan strukturer kan potensielt også benyttes i identifisering av nært beslektede arter og/eller kan unike glykostrukturer potensielt benyttes i produksjon av art/stamme spesifikke vaksiner (Nothaft et al. 2016).

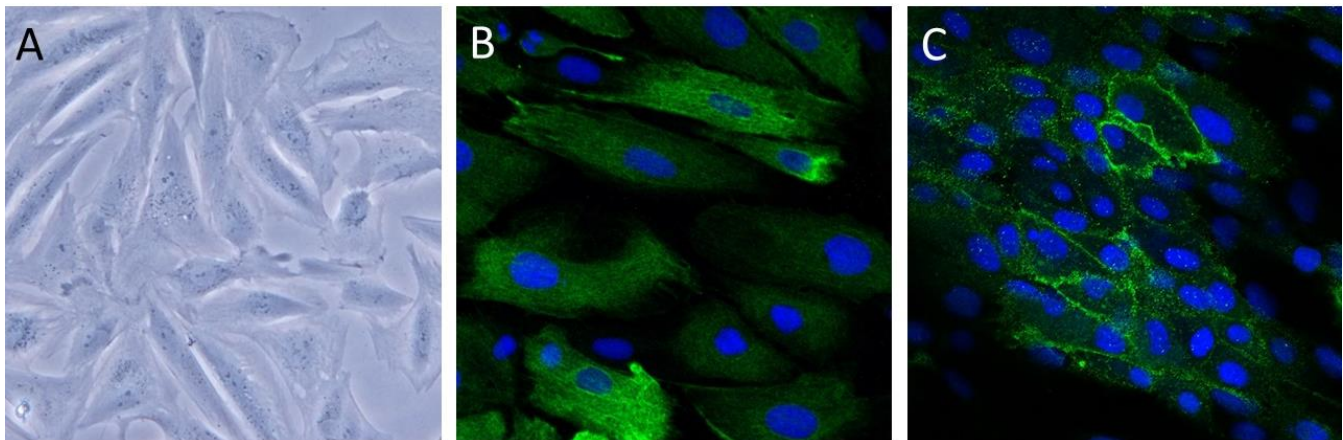


Figur 17. Tre beslektede *Tenacibaculum* stammer har proteiner modifisert med glykaner. A) et MS/MS spektrum av et peptid fra *Tenacibaculum* stamme 50-2503 som viser de to bestemmende reporter ionene for tilstedeværelse av N-acetyl Hexosamine (HexNAc) ved m/z 204.086 (markert med grønn pil) og m/z 186.076 (markert med rød pil). Begge disse reporter ionene må være tilstede samtidig for å bevise nærvær av HexNAc modifisering. B) Ekstrahert ionekromatogram for nærvær av de to reporter ionene for HexNAc, ved m/z 204.086 vist i grønne topper og m/z 186.076 vist i røde topper, i peptid dataene (MS/MS spektre). For at et peptid skal være positivt for modifisering av HexNAc må begge reporter ionene være tilstede. Derfor må mønstre i de røde toppene og grønne toppene matche nøyaktig. De tre stammene som viser likt og overlappende mønstre mellom røde og grønne topper er markert i blå boks og inkluderer 50_2503, 50_2540 og TNO006. De sorte strekene under kromatogrammene viser områder hvor det er stor grad av overlapp og likhet i de grønne og røde toppene og derfor viser til peptider som er modifisert med HexNAc i disse prøvene. (til note; tidspunkt 2 for TNO006 viser og HexNAc mønstre og skulle vært markert i sort) C) *Tenacibaculum* slektskapsstre. Den røde boksen viser de tre stammene som viser positivt for protein HexNAc modifisering og relasjon på treet.

Delmål 3: Cellekultur/toksin neutralisering

Etablering av cellelinje fra Atlantisk laks hud

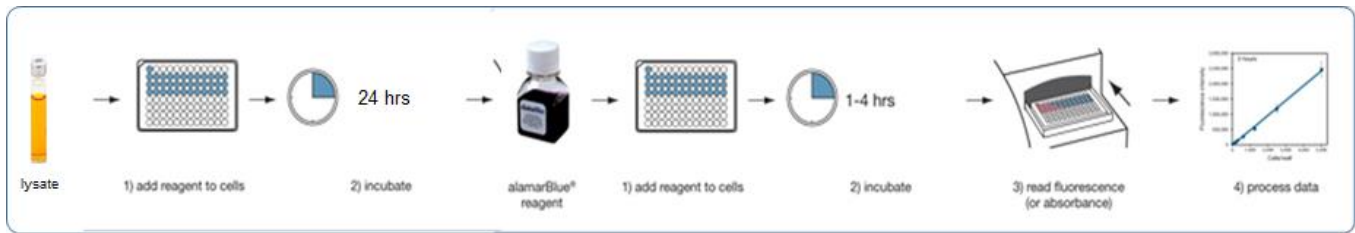
Skade i hudvev er et typisk karakteristika ved *Tenacibaculum*-infeksjoner. En modell for *in vitro* påvisning og eventuell kvantifisering av effekten av toksiner fra ulike bakterieisolater på hudepitel vil gi et nyttig redskap for karakterisering av toksisitet og effekt av behandling av bakterie ECP for å inhibere effekten. En cellelinje ble etablert fra hud hos Atlantisk laks, og er i dag vedlikeholdt i laboratoriet i over 30 passasjer. Cellene vokser på standard L15-medium med tilsats av 10% FBS og inkuberes ved 20 °C. Cellene er karakterisert som epitelceller gjennom positiv farging mot epitelcellespesifikke markører (cytokeratin og E-cadherin) Figur 18.



Figur 18: Hudceller fra laks, passasje 16. A) visualisering av cellene i vanlig lysmikroskop, B) farging med markør for cytokeratin (grønt), visualisert i konfokalmikroskop, C) Farging med markør for E-cadherin (grønt), visualisert i konfokalmikroskop. For B) og C) er kjerner farget med DAPI (blått)

Cellekultur assayene

En *in vitro* modell for måling av cytotoxisk effekt av bakterie ECP ble deretter etablert på disse cellene. Hovedmetoden som ble benyttet bygger på bruk av AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (cat nr: DAL1025, Thermofisher) og er tilpasset gjennom dette prosjektet til bruk på langsomtvoksende celler fra laks (Figur 19 modifisert fra Thermofishers brukermanual for AlamarBlue™). Dette er en enkelt ikke-toksisk metode og prinsippet bygger på at levende celler har en naturlig evne til å endre stoffet resazurin til et fluorescerende molekyl, resorufin. Lavere omdanning relateres til redusert indre metabolsk aktivitet hos skadde og døde celler sammenlignet med levende.



Figur 19: Prinsipp for AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (modifisert fra fabrikkens protokoll

I tillegg til AlamarBlue™, ble også CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega) for måling av cytotoxicitet over lengre tidsrom enn 24 timer utprøvd på et utvalg av stammer. Dessuten ble MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Invitrogen) benyttet for å måle effekten av bakterietoksiner på mitokondriefunksjon. Dette arbeidet pågår fortsatt og resultatene vil inkluderes i endelig rapport.

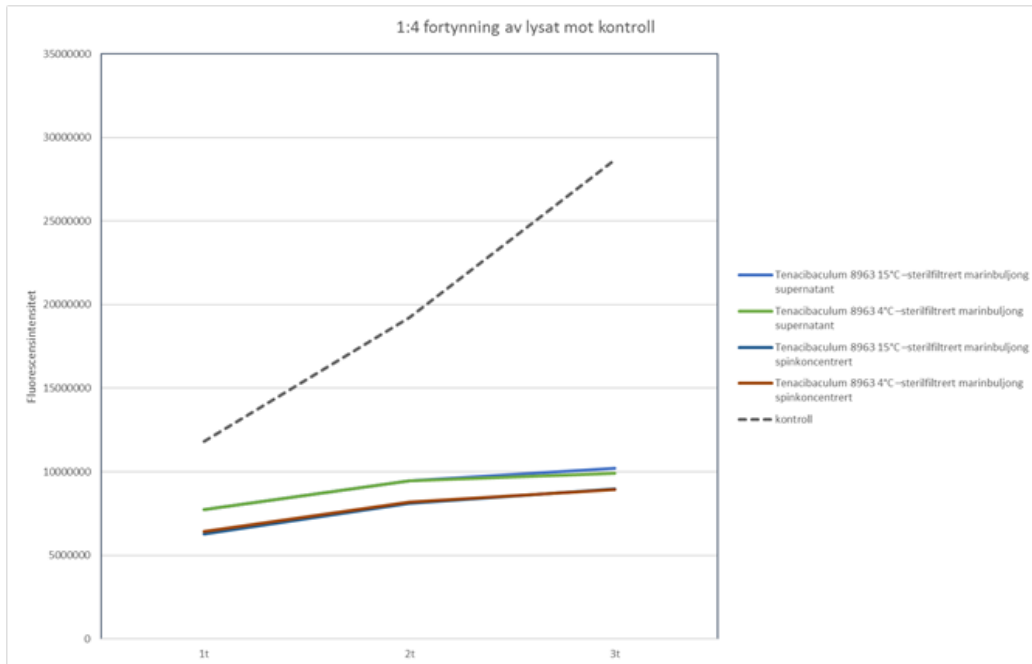
Produksjon av celle-fri supernatanter (ECP) til toksisitets-assays

Det ble laget celle-fri supernatanter etter dyrkning av utvalgt *Tenacibaculum* stammer i buljongkultur. I tidlig fase av prosjektet ble stammer utvalgt basert på tidligere kunnskap om genetisk likhet blant *Tenacibaculum* isolert fra syke fisk. Etter genomanalyse av stammene innhentet i 2018 og 2019, ble utvalgte representanter fra 2018/2019 utbruddene fra forskjellige klyngene valgt for analyse inkludert tidligere stammer med kjent cytotoxicitet fra etableringsfasen av assayene som positive kontroller. Bakteriene ble dyrket i marinbuljong, og under uttesting av AlamarBlue™ assayet ble det utført analyser på kulturer dyrket ved forskjellige temperaturer (4 og 15 °C) med høsting av supernatanter på forskjellige stadier av vekst og med og uten risting. Buljongkulturene ble sentrifugert og sterilfiltrert for å fjerne bakteriecellene før bruk i celle-kultur assayene. Supernatantene ble lagret kjølig i mørke inntil brukt. Toksisiteten av celle-fri supernatantene ble testet med eller uten varmebehandling (90 °C x 30 min). Det ble også testet om polyklonale kanin antisera laget mot to forskjellige *Tenacibaculum* genotyper hadde en effekt på cytotoxic aktivitet.

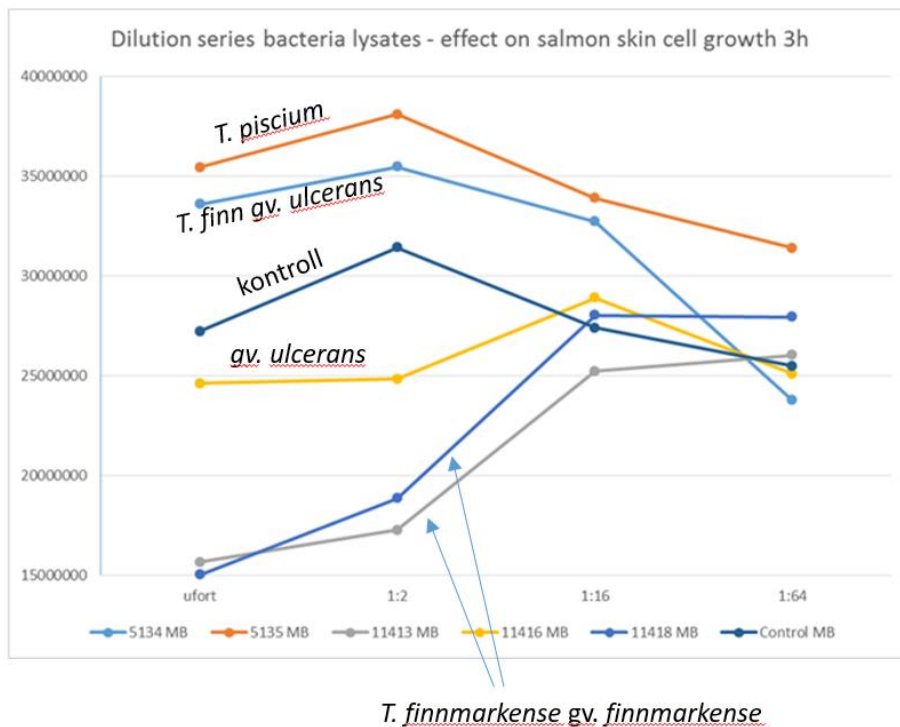
Resultater

Innledende testing av assayet på cellefritt lysat av en kjent virulent stamme av *Tenacibaculum* viste at hudcellene fungerte for påvisning av cytotoxicitet i kombinasjon med AlamarBlue™.

Undersøkelsene viste at størst forskjell mellom stammen og kontroll kunne påvises etter 3 timers inkubering med AlamarBlue™ og at det ikke var signifikante forskjeller på vekst ved 4 og 15 °C (Figur 20). Videre ble 4°C benyttet til dyrkning for videre studier (Figur 21)



Figur 20: Cytotoksisitet målt mot kontroll av en 1:4 fortytning av cellefritt lysat fra virulent stamme av *Tenacibaculum* fra felt (8963, samlet inn før prosjektets oppstart). Assayet ble deretter benyttet til å undersøke cytotoksisitet hos utvalgte bakteriestammer samlet inn gjennom prosjektet i 2018/2019. Resultatet vises i Figur Ø under.

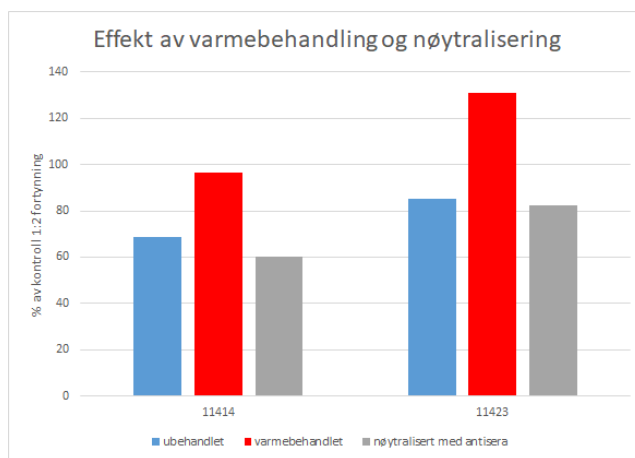


T. finnmarkense *gv. finnmarkense*

Figur 21: Resultater av fortytningsserie av cellefrie ECP fra 5 ulike bakteriestammer, 5134, 11416 (*T. finnmarkense* *gv. ulcerans*), 5135 (*T. piscium*), 11413 og 11418 (*T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*) sammenlignet med kontroll (Marinebuljong, MB).

Resultatene viser at de *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* isolatene undersøkt viser høyest cytotoksisk effekt sammenlignet med kontroll. For 2 av stammene som representerer henholdsvis en *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* og *T. piscium* (5134 og 5135) kunne ingen cytotoksisk aktivitet på hudceller påvises.

Det ble deretter gjort tester av effekten av varmeinaktivering av cellefrie lysater før påsett på cellene (Figur 22). Resultatene viste at for de lysater som hadde cytotoksisk effekt kunne denne reduseres/fjernes ved å varmeinaktivere prøvene forut for påsett på cellene. Dette kan tyde på at den cytotoksisk effekt sannsynligvis indikerer protein oppbygging ikke knyttet til Termolysinen *tenT* identifisert under det tidligere avsluttet FHF prosjekt 901433. Tilsetning av kanin antisera laget mot *T. piscium* og *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* hadde ingen effekt på den observerte toksisiteten, som kan indikere at den toksin er spesifikk for *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense*.



Figur 22: Effekt av varmeinaktivering og nøytralisering med antisera på observert toksisitet sammenlignet med marinebuljong kontroll.

Langtids-toksisitet av *Tenacibaculum* ECP på hudceller ble undersøkt med CellTox Green Cytotoxicity Assay (Promega). Resultatene viste økende toksisitet over tid (3-4 dager) sammenlignet med 1 dag (Alamar Blue), men lysatene med høyest målt toksisitet tidlig hadde fremdeles mest toksisitet også etter 3-4 dager. Trend knyttet til reduksjon av toksisitet ved varmebehandling kunne fremdeles observeres etter lengre inkubering, men noe økende toksisitet kunne måles også i varmeinaktiverte ECP etter 3 og 4 dager (data ikke vist). Ved behandling av celler med MitoSox Red mitochondrial superoxide indicator (ThermoFisher) etter inkubering med bakterie ECP, kunne økt positiv farging observeres i fluorescensmikroskop, noe som tyder på aktivering av superoxide, og at eksponering for *Tenacibaculum* ECP induserer oksidativt stress i hudcellene. Ytterligere analyser er nødvendige for å kunne kvantifisere denne effekten for de ulike ECP.

Diskusjon/konklusjon

Tenacibaculum-arter har i mange år vært assosiert med fiskesykdom og dødelighet i norsk havbruk (Olsen et al. 2011, 2017), men på grunn av diversitet og tilsynelatende mangel på vertsspesifisitet (Olsen et al. 2017; Olsen et al. 2020), har forståelsen av disse bakterienes rolle i patogenesen til vintersår/tenacibaculose vært uklar. Et av målene i denne studien var derfor å forklare etiologien bak ulcerøs hudsykdom i kjeve og hode hos atlantisk laks oppdrettet i sjøen som opptrer på slutten av vinteren og våren.

Selv om de fleste tilfellene som ble sendt inn hadde lignende kliniske historier, dvs. det var relativt liten fisk, som nylig ble overført til sjø ved (relativt) lave vanntemperaturer, involverte noen tilfeller større fisk, særlig fisk prøvetatt i 2019. Histopatologisk undersøkelse av fisk med kranielle lesjoner viste et veldig likt patologisk bilde i alle tilfeller, noe som tyder på en felles etiologi. Tilstedeværelse av mange bakterier, morfologisk forenlig med *Tenacibaculum*, i samme område som de beskrevne patologiske forandringene med nekrose, og i noen tilfeller betennelse og blødning, var påfallende. *Tenacibaculum*-arter som er patogene for fisk er antatt å ha en affinitet for vev som inneholder kollagen (Olsen et al. 2011). Tilstedeværelsen av *Tenacibaculum*-celler i det kollagenrike bindevevet i hode og kjever observert i denne studien, og påvisning av en putativ collagenase gen i prosjekt 901433, forsterker teorien om at invasjon av disse typer vev er viktig for patogenesen av tenacibaculosis. Det lave antallet *Tenacibaculum* dyrket fra intakt hud kontra åpne lesjoner kan understreke behov for en rift i hudbarrieren slik at kolonisering med påfølgende infeksjon i underliggende kollagenrike vevene kan skje. I hodet og kjeveområde er huden uten skjell og det er kort vei til underliggende brusk. Den faktiske mekanismen bak kolonisering av det underliggende vevet er ikke kartlagt.

Histopatologisk observasjon av bakterieceller forenlig med *Tenacibaculum*-arter i 18 av 19 undersøkte tilfeller pluss dyrkning av *Tenacibaculum* spp. som den dominerende bakteriefloraen i 15 tilfellene (i 2018) gir ytterligere støtte for å betrakte *Tenacibaculum* som de viktigste etiologiske agens i forbindelse med de observerte lesjonene. Selv om en blandet bakterieflora inkludert *Moritella viscosa* og *Aliivibrio wodanis* fra både nyre- og hudvev ble identifisert hos noen få fisk i noen få utbrudd, ble evt. bidrag av disse taksa ansett som liten.

100% korrelasjon mellom MALDI-TOF MS og ANI for identifikasjon av både arter og genomvar i dette studiet demonstrerte MALDI-TOF som en rask og pålitelig diagnostisk redskap for identifikasjon av *Tenacibaculum* aktuelle for den norske oppdrettsnæringen. Siden kaldtvanns *Tenacibaculum* vokser relativt sakte, har ofte meget lik kolonimorfologi og er relativt ikke-reaktive i mange fenotypiske tester, er

diagnostisk bekreftelse av deres identitet med klassiske metoder langvarig og kan være usikker, og ressurskrevende molekylærbiologiske metoder har til nå vært nødvendig for sikker artsbestemmelse. Denne studien bekrefter MALDI-TOF MS som et enkelt, raskt, kostnadseffektivt og presist verktøy i fremtidig *Tenacibaculum*-diagnostikk.

En rekke *Tenacibaculum* spp. har tidligere blitt isolert fra ulike syke fiskearter som er prøvetatt på forskjellige tider av året (Olsen et al. 2017). En mindre grad av diversitet ble identifisert i materialet mottatt til nåværende prosjekt, der prøvetaking var stort sett begrenset til senvinter og vår. Majoriteten av isolatene undersøkt fra både 2018 og 2019 ble identifisert som *T. finnmarkense*. Dette tyder sterkt på en sammenheng mellom denne arten og utvikling av klinisk tenacibaculose hos norsk oppdrettslaks. Kjerne-genom (dvs gener felles for alle studert isolatene, i dette tilfelle ca. 1800 gener) multi-locus sequence typing (MLST)-analyse avslørte veldig forskjellig populasjonsstrukturer blant de to genomovarene av *T. finnmarkense* isolert fra syke fisk. Mens alle *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* isolater grupperte i genetisk distinkte, konserverte sub-grupper, besto *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* av (forholdsvis) separate isolater (figur 3). Selv om en blandet *Tenacibaculum* flora ble identifisert innad i de fleste utbrudd, ble medlemmer av den dominerende gv. *finnmarkense* undergruppe identifisert i 13 av de 15 utbruddene (hvor *Tenacibaculum* ble dyrket) undersøkt i 2018. Ettersom isolater ble valgt tilfeldig for sekvensering, kan det ikke utelukkes at denne spesielle gv. *finnmarkense* –varianten også var tilstede i de to gjenværende utbruddene. Den høye graden av genetisk likhet identifisert ved cgMLST, ytterligere støttet av både SNP- og ANI -analyser, indikerer en tydelig klonal (isolater med felles opphav) populasjonsstruktur i denne klyngen. Forskjellene i protein utrykke identifisert gjennom proteomikk analysene og cytotoxiske celle- assayene også støtter hypotesen at *T. finnmarkense* og genomovar *finnmarkense* i særhet kan kobles til den observerte kliniske bildet.

Lite er kjent om demografien av *Tenacibaculum* spp. i miljøet utenfor fisken og alle isolatene som ble studert her ble isolert fra oppdrettsfisk. Vi har påvist den klonale kompleks over mer eller mindre helekystlinje (>2000km). Hvorvidt det klonale komplekset som dominerer blant syk fisk i denne studien, også dominerer i miljøet i norske kystfarvann er ukjent. Den brede geografiske spredningen kombinert med bakteriens klonale natur er i samsvar med 'purifying' evolusjonære krefter som begrenser genetisk endring og som favoriserer en bakterie som (også?) trives i hudlesjoner hos laks. *T. finnmarkense* har en bred geografisk spredning, etter å ha blitt identifisert både i Chile (gv. *ulcerans*; Bridel et al. 2018) og langs store deler av den norske kystlinjen i denne studien. Begge *T. finnmarkense*

genomovars ser videre ut til å ha et delt geografisk område i Norge, ettersom begge var isolert helt nord og langt sør innen studieområdet. Bakteriologisk svabring av tare og bergarter samlet fra de samme geografiske områdene, men langt fra berørte lakseoppdrett, på et noe selektiv medium (marin agar 5 ug/ml kanamycin (Frisch et al. 2018) identifiserte (MALDI-TOF MS) representanter av *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense*, *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* og *T. piscium* blant en ellers mangfoldig bakterieflora. Selv om dominansen av en klonal stamme av *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* i denne studien indikerer en tydelig etiologisk rolle for denne genomovar i "tenacibaculose", at vi også funnet andre mer diverse genotyper i samme utbruddene, kan indikere at kolonisering av individuell fisk direkte fra sjøvann kanskje er mer vanlig enn fisk overføring til fisk.

Mens *T. finnmarkense* var det viktigste bakteriologiske funn i denne studien, er det klart at andre *Tenacibaculum*-arter også kan være assosiert med sykdom hos atlantisk laks som er oppdrettet i sjøvann. Blant annet har *T. dicentrarchi* blitt beskrevet i forbindelse med hudskader hos sjøvannsdyrket atlantisk laks i både Chile (Avandaño-Herrera et al 2016) og Norge (Habib et al. 2014; Klakegg et al. 2019). Interessant nok ble det spekulert av Klakegg et al. (2019) at *T. dicentrarchi* også kan ha vært assosiert med en rekke utbrudd av tenacibaculose som skjedde i Nordvest-Norge i løpet av 2018, sammenfallende med prøveperioden for denne studien. Resultatene våre tyder imidlertid på at *T. dicentrarchi* sannsynligvis bare spiller en mindre rolle i tenacibaculosis hos norsk atlantisk laks som er oppdrettet i åpne merder når vanntemperaturen er lav. Det er bemerkelsesverdige forskjeller mellom enkeltutbruddene beskrevet av Avandaño-Herrera et al. (2016) og Klakegg et al. (2019), og de som ble undersøkt i denne studien. For det første, beskrev begge de tidligere studiene *T. dicentrarchi* som sykdomsfremkallende hos laks holdt i lukkede anlegg ved vanntemperaturer på henholdsvis 18°C og 12°C (dvs. forholdsvis høye temperaturer), mens utbrudd som ble undersøkt i den nåværende studien, involverte fisk som ble holdt i åpne merder ved vanntemperaturer på 4-6°C.

Videre har både Avandaño-Herrera et al. (2016) og Klakegg et al. (2019) beskrevet de kliniske funnene knyttet til *T. dicentrarchi*-infeksjon som sår dannelse på buken og finneråte, mens det i denne studien var nesten alle utbrudd dominert av lesjoner i hode/kjeve. *T. dicentrarchi* har også tidligere vært knyttet til sykdom hos leppefiskarter som brukes som renseskisk i norsk lakseoppdrett (Olsen et al. 2017). Ettersom leppefisk, vanligvis viltfanget, normalt blir satt ut i merd og overvåket ved relativt høye vanntemperaturer, er det fristende å spekulere i at tenacibaculose assosiert med *T. dicentrarchi* kan være knyttet til vanntemperaturer over de som er registrert i denne studien.

Flertallet av utbruddene som ble undersøkt under det pågående prosjektet var knyttet til populasjoner av nylig sjøsatt smolt i løpet av et relativt begrenset tidsvindu, preget av lave vanntemperaturer. Siden ingen av disse faktorene var forutsetninger for inkludering i studien, vil det virke høyst sannsynlig at de er av epidemiologisk betydning. Videre rammer sykdommen oftest bare et begrenset antall merder på hvert anlegg, noe som indikerer at batchspesifikke faktorer knyttet til den eksponerte laksebestanden kan ha betydning. Gjenskaping av tenacibaculose hos laks under kontrollerte laboratorieforhold har ikke vært lett, og har vært avhengig av langvarig eksponering for enten et stort antall bakterier eller skarifisering av fisken før smitte (Olsen et al. 2011; Småge et al. 2018). Selv om det ikke er undersøkt i denne undersøkelsen, indikerer anekdotiske rapporter at utbrudd av tenacibaculose noen ganger kan være forbundet med en panikkreaksjon blant fiskene ved sjøsetting. Fysisk skade på nese/kjeveområdet ved å gni mot nettveggene vil gi brudd i hudbarrieren og gi mulighet for *Tenacibaculum*-kolonisering. Totalt sett synes det sannsynlig at utvikling av tenacibaculosis hos nylig sjøoverført atlantisk laks er avhengig av en rekke faktorer, inkludert predisponerende tidligere tilstedeværelse av hudskade kombinert med eksponering for et stort smittepress av *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *finnmarkense*, ved lave vanntemperaturer. Hvorvidt lave temperaturer bidrar til situasjonen ved å utøve en immunsuppressiv effekt på laksen, ved å indusere økt virulens eller favorisere bestemte genetiske varianter av bakterien, og/eller ved en annen mekanisme, er ikke kjent.

Gjennom prosjektet ble det etablert en *in vitro* metode for påvisning av cytotoksisitet i cellefrie lysater fra *Tenacibaculum* stammer på hudceller fra laks. Ved undersøkelse av ulike stammer kunne cytotoksisitet påvises for en del stammer, men ikke alle. Den målt cytotoksisiteten kunne reduseres eller fjernes helt ved varmebehandling av lysatene, noe som tyder på at den er forbundet med en ekstracellulær faktor som er varme-sensitiv, sannsynligvis av protein oppbygging.

Avslutningsvis bekrefter vi her den dominerende tilstedeværelsen av *T. finnmarkense* i forbindelse med alvorlig utvikling av kranialskader i nylig sjøoverførte atlantiske laksesmolt, holdt i åpne merd over et bredt geografisk område i Norge på slutten av vinteren og våren 2018. Det svært konsistente kliniske, histopatologiske og bakteriologiske bildet, kombinert med den tette fysiske sammenhengen mellom bakterieceller og de observerte patologiske funnene, indikerer sterkt *T. finnmarkense* og spesielt gv *finnmarkense*, som den viktigste etiologiske årsaken i alle de undersøkte tilfellene.

Selv om identifisering av en bestemt etiologisk relevant bakterieart utvilsomt er et viktig skritt mot en eventuell vaksineutvikling, ga første utprøving av en *T. finnmarkense* -vaksine skuffende resultater (Småge et al. 2018). I tillegg til en vellykket vaksinasjonsstrategi, bør produksjonsrelaterte parametere, som smoltkvalitet og tidspunkt for sjøsetting i forhold til vanntemperatur og naturlig smittepress, samt å søke å unngå faktorer som skader fiskens hudbarriere, undersøkes som mulige tiltak for å forhindre tenacibaculosis relaterte tap.

6. Hovedfunn

- En ny *Tenacibaculum* art (*T. piscium*, NCBI taksonomi ID 1458515) ble offisielt beskrevet og navngitt ifølge 'Bacteriological Code'.
- *T. finnmarkense* ble offisielt beskrevet og navngitt ifølge 'Bacteriological Code'. *T. finnmarkense* ble videre fordelt i to genomvarer, *finnmarkense* (NCBI taksonomi ID 1458503) og *ulcerans* (NCBI taksonomi 2781388).
- Det svært konsistente kliniske, histopatologiske og bakteriologiske bildet, kombinert med den tette fysiske sammenhengen mellom bakterieceller og de observerte patologiske funnene bekrefter *Tenacibaculum* spp. som etiologisk agens i de undersøkte utbrudd.
- *T. finnmarkense*, særlig genomvar *finnmarkense* assosieres sterkt med alvorlig kranialskader i nylig sjøoverførte atlantiske laksesmolt.
- En stor gruppe tilnærmet klonale *T. finnmarkense* genomvar *finnmarkense* isolater ble funnet over hele det prøvetatte området (fra Vestland til Finnmark).
- Toksisiteten av *Tenacibaculum* spp. undersøkt er forbundet med en ekstracellulær faktor som er varme-sensitiv, sannsynligvis knyttet til proteinoppbygging. Av isolatene testet var *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* mest toksisk.
- Proteomikk studier indikerer forskjeller i protein uttrykk mellom *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* og *T. finnmarkense* gv. *ulcerans*.
- Det er ingen indikasjon at rognkjeks representerer en alvorlig trussel med tanke på overføring av tenacibaculose til oppdrettslaks holdt i samme merd.
- Temperatur ved sjøsetting ha betydning for utviklingen av tenacibaculose – med betydelig raskere utvikling i fiskegrupper satt ut ved sjøtemperatur lavere enn 5 grader enn grupper satt ut ved sjøtemperatur 5 grader eller høyere.

7. Leveranser

Møtoreferater og statusrapporter har blitt levert etter plan.

Vitenskapelig publikasjoner

Olsen, A. B., Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Lagesen, K., Gulla, S., Avendaño-Herrera, R. Irgang R., Duchaud E. and Colquhoun, D. J. (2020). *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6079-6090.

Spilsberg B., Nilsen H., Tavornpanich S., Gulla S., Jansen M.D., Lagesen K., Colquhoun D.J. and Olsen A.B. (2021), Tenacibaculosis in Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) cage-farmed in cold seawater is primarily associated with *Tenacibaculum finnmarkense* genomovar *finnmarkense*. *Journal of Fish Diseases*. DOI: 10.1111/jfd.13577

Bjørn Spilsberg, Hanne K. Nilsen, Snorre Gulla, Karin Lagesen, Anne Berit Olsen, Duncan J. Colquhoun (In review) Draft genome sequences of 23 *Tenacibaculum* spp. isolates from farmed Norwegian lumpfish, *Cyclopterus lumpus*. *Microbiology Resource Announcements*.

Bjørn Spilsberg, Hanne K. Nilsen, Snorre Gulla, Karin Lagesen, Anne Berit Olsen, Duncan J. Colquhoun (In review). Draft genome sequences of 13 *Tenacibaculum maritimum* isolates from farmed Norwegian lumpfish, *Cyclopterus lumpus* and turbot, *Scophthalmus maximus*. *Microbiology Resource Announcements*.

Foredrag

4-8 juni, 2018: *Tenacibaculosis in Norwegian farmed salmon.* [D. Colquhoun](#). First International Conference on marine Flavobacteria. Cargese, Corsica, France.

4-8 juni, 2018: *Triploid Atlantic salmon- susceptibility to Tenacibaculum.* [A. B. Olsen](#). First International Conference on marine Flavobacteria. Cargese, Corsica, France.

November 2018: *Tenacibaculum og atypisk vintersår.* [D. Colquhoun](#). Midtnorsk Fiskehelsenettverk, Sistranda, Frøya.

29. oktober 2019: *Tenacibaculosis in Norway: one disease or several?* [D. Colquhoun](#). *Tenacibaculum 2:* Current knowledge and future directions. Campbell River, BC, Canada.

Avlyst vår 2020: *Tenacibaculose hos norsk laks.* [D. Colquhoun](#). Havbrukskonferansen.

28. mai 2020: *Vintersår i Norge....ikke så enkelte.* [D. Colquhoun](#). NCE Aquaculture Matfisk Forum. Virtual.

26. august 2020: *Tenacibaculosis in Norway: Geography, agents, impact.* [D. Colquhoun](#) and A.B. Olsen. Seminario Tenacibaculosis. Puerto Varas/virtual.

10. mars 2021: *Sår og sår bakterier.* [D. Colquhoun](#). Fiskehelsesrapport lansering. Bergen

9. juni 2021: *Vintersår- en kompleks sykdom.* [D. Colquhoun](#), A.B. Olsen, H. Nilsen og S. Gulla. Lofotseminaret, Reine, Lofoten

26. august 2021: *Bakterier og sår hos laks.* [D. Colquhoun](#). PHARMAQademy 2021, Trondheim

21. september 2021: *Tenacibaculosis in recently sea-transferred Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) is primarily associated with *Tenacibaculum finnmarkense* gv. *finnmarkense*.* [A.B. Olsen](#), B. Spilsberg, H. Nilsen, S. Gulla, K. Lagesen, M. Dverdal Jansen, S. Tavornpanich, H. Sindre and D. Colquhoun. EAFF 2021 Virtual Conference

04. oktober 2021: *Bakterier og sår hos laks.* [S. Gulla](#). Sjømat Norge/NCE Aquaculture havbruksmøte, Bodø.

Fremtidig foredrag

20. Februar 2022: *Vintersår-en kompleks sykdom.* [D. Colquhoun](#). Aqkva 2022- Havbrukskonferanse. Bergen

Poster

18-20. mars 2019: *Tenacibaculum* spp. associated with necrotising skin infections in Norwegian sea-farmed Atlantic salmon. B. Spilsberg, K. Lagesen, H. Nilsen, A. B. Olsen, D. Colquhoun. 9th Gene Quantification Event qPCR dPCR & NGS. Technical University of Munich, Weihenstephan, Germany

8-12. September 2019: Tenacibaculosis in recently sea-transferred Norwegian Atlantic salmon is primarily associated with *Tenacibaculum finnmarkense* infection. Anne Berit Olsen, Bjørn Spilsberg, Hanne Katrine Nilsen, Saraya Tavoranpanich, Karin Lagesen, Duncan Colquhoun, EAFP conference, Porto, Portugal.

20-23. September 2021

Nilsen, Hanne Katrine; Gulla, Snorre; Spilsberg, Bjørn; Olsen, Anne Berit; Colquhoun, Duncan John. MALDI TOF MS - a useful tool in diagnostic fish bacteriology. EAFP 2021; 2021-09-20 - 2021-09-23

Populærvitenskapelig publikasjon

En publiseringen som oppsummerer de hovedfunn i prosjektet skal etter plan publiseres ved slutten av 2021/tidlig i 2022.

Referanser

Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Sandoval, C., Moreno-Lira, P., Houel, A., Duchaud, E., Poblete-Morales P, Nicolas P. & Ilardi, P. (2016). Isolation, characterization and virulence potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in salmonid cultures in Chile. *Transbound. Emerg. Dis.*, 63(2), 121-126.

<https://doi.org/10.1111/tbed.12464>

to single-cell sequencing. *J. Comp. Biol.*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Coyne, Michael J et al. "Phylum-wide general protein O-glycosylation system of the Bacteroidetes." *Molecular microbiology* vol. 88,4 (2013): 772-83. doi:10.1111/mmi.12220

Frisch, K., Småge, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Brevik, Ø. J., Klevan, A., Olsen R.H., Sjaatil S.T., Gauthier D., Brudeseth B. & Nylund, A. (2018). Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. *J. Fish Dis.*, 41(8), 1247-1258.

<https://doi.org/10.1111/jfd.12818>

Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J. F., Olsen, A. B., Nilsen, H., Toranzo A.E., Castro N., Nicolas P. and 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(17), 5503-5514.

Klakegg, Ø., Abayneh, T., Fauske, A. K., Fülberth, M., & Sørnum, H. (2019). An outbreak of acute disease and mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in Norway caused by *Tenacibaculum dicentrarchi*. *J. Fish Dis.*, 42(6), 789-807.

Nothaft, H., Davis, B., Lock, Y. et al. Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Sci Rep* 6, 26511 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep26511>

Olsen, A. B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sørnum, H., & Colquhoun, D. J. (2011). *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 94(3), 189-199. <https://doi.org/10.3354/dao02324>

Olsen, A. B., Gulla, S., Steinum, T., Colquhoun, D. J., Nilsen, H. K., & Duchaud, E. (2017). Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Vet. Microbiol.*, 205, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.028>

Olsen, A. B., Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Lagesen, K., Gulla, S., Avendaño-Herrera, R. Irgang R., Duchaud E. & Colquhoun, D. J. (2020). *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, 70(12), 6079-6090. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004501>

Småge, S. B., Frisch, K., Vold, V., Duesund, H., Brevik, Ø. J., Olsen, R. H., Sjaatil S.T., Klevan A., Brudeseth B., Watanabe K. & Nylund, A. (2018). Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. *Aquacult.*, 495, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.063>