

KUNNSKAP OM FISKEHELSE

I denne spalten vil Veterinærinstituttet i hvert nummer bidra med oppdatert kunnskap om fiskehelse. Ansvarlig for spalten er forsker Mona Gjessing mona.gjessing@vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Ny kunnskap om tenacibaculose hos laks

Ny kunnskap om risikofaktorer for utvikling av tenacibaculose, gir viktige bidrag til å kunne iverksette bedre overvåking og biosikkerhetstiltak mot sår sykdom i laksenæringen.

Bjørn Spilsberg, Anne-Berit Olsen, Hilde Sindre, Snorre Gulla, Jan Haug Anonsen, Hanne Nilsen og Duncan Colquhoun



Figur 1. Laks med tenacibaculose. Bilde Anne Tjessem

Tenacibaculose er en alvorlig 'kjøttspisende' infeksjon hos oppdrettslaks i kaldt sjøvann hvor hodet og finnene vanligvis blir hardest angrepet (figur 1). Sykdommen er ikke meldepliktig og er forholdsvis lett å diagnostisere i felt. Direkte mikroskopi fra hudsår viser lange trådlignende bakterier karakteristisk for *Tenacibaculum*-artene. Bakterien vokser på agar med sjøsalter, med karakteristiske gule kolonier. Selv om antall utbrudd sannsynligvis er underrapportert, indikerer Veterinærinstituttets årlige spørreskjema til fiskehelsepersonell landet rundt, at tenacibaculose har vært et økende problem i norsk lakseoppdrett de siste årene og en av de viktigste årsakene til dårlig velferd og dødelighet i matfiskfasen.

Mange arter i *Tenacibaculum*-slekten finnes i rikelige mengder i det marine miljøet hvor de gjør en viktig jobb med degradering av dødt organisk materiale. Tidligere forskning ved Veterinærinstituttet har vist at flere forskjellige arter og genotyper finnes i sår hos laks. Det er ikke usannsynlig at evnen til å bryte ned organisk materiale i miljøet også spiller en rolle for utvikling av sår hos laks. Sykdommen har ikke vært lett å gjenskape i smitteforsøk og vi mangler fortsatt en god forståelse av hvilken rolle de forskjellige variantene av *Tenacibaculum* spp. har i sårutvikling.

Flere fiskepatogene bakteriearter er egentlig 'miljøbakterier' hvor de fleste lever et harmløst liv 'ute i det fri', mens bare noen få varianter innenfor artene (genotyper) har blitt spesialiserte

Vitenskapet

sykdomsfremkallende bakterier for fisk. Dette er bl.a. tilfellet for anerkjente sykdomsfremkallende bakterier som *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* og *Moritella viscosa*. Det er derfor ikke usannsynlig at en tilsvarende situasjon foreligger blant *Tenacibaculum* og utvikling av sår hos laks. Det kan bl.a. ikke utelukkes at noen *Tenacibaculum*-arter er tett knyttet til sårutvikling, mens andre nær beslektede typer kun relateres til 'passiv' kolonisering av et allerede etablert og åpent sår. En slik hypotese støttes av at flere forskjellige typer av *Tenacibaculum* ofte påvises fra samme fisk i samme utbrudd og at sykdommen ikke spres lett horisontalt fra merd til merd.

Identifisering av sykdomsfremkallende varianter av hvilken som helst bakterie, virus eller parasitt er et viktig steg mot utvikling av bekjempelsesstrategier og/eller vaksineutvikling. Tidligere forskning på diversitet blant *Tenacibaculum* knyttet til tenacibaculose hos norsk oppdrettsfisk har ikke gitt klare svar på hvilke genotyper som eventuelt er mer sykdomsfremkallende enn andre. For å skaffe oversikt omkring dagens situasjon igangsatte vi derfor i 2018-2019 en landsdekkende undersøkelse av tenacibaculoseutbrudd hos oppdrettslaks. Vi gjennomførte blant annet en undersøkelse av diversiteten blant bakteriene som var involvert, for om mulig å identifisere én eller flere spesifikke typer som særlig kunne knyttes til utvikling av sykdommen. I studien ble et stort antall isolater dyrket fra 15 utbrudd fra Hordaland i sør til Finnmark i nord, helgenomsekvensert og analysert. Hurtig og robust MALDI-TOF-basert diagnostikk ble også utviklet. De forskjellige typer *Tenacibaculum*s evne til å drepe laksehudceller ble studert i en laboratoriestudie. Resultatene peker mot at tenacibaculose hos norsk oppdrettslaks i kaldt sjøvann hovedsakelig er assosiert med arten *Tenacibaculum finnmarkense* og at en variant av *T. finnmarkense* genomvariant (gv.) finnmarkense kan settes i forbindelse med de fleste utbrudd.

Utvikling av rask og robust diagnostikk

Siden forskjellige *Tenacibaculum*-varianter vokser forholdsvis sakte, med

FHF-prosjekt 901434

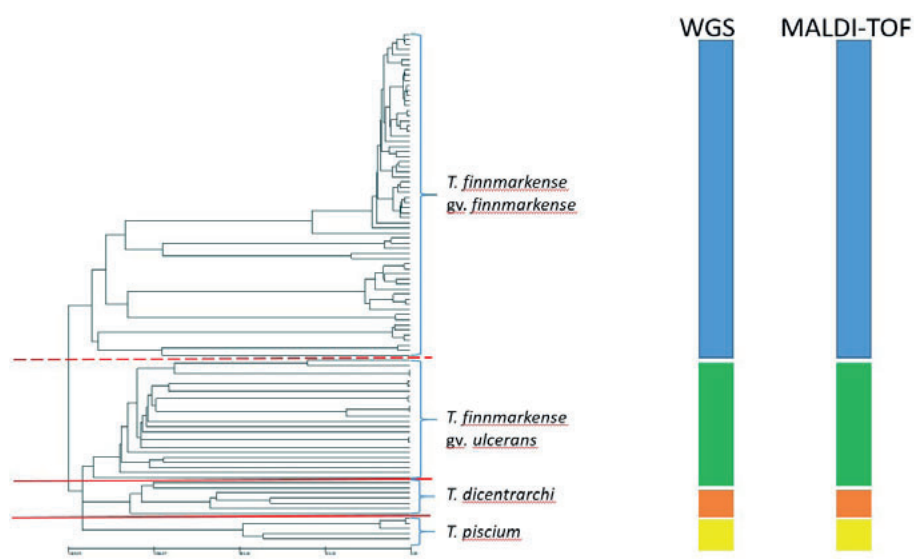
- Prosjekttittel: "*Tenacibaculum* spp. som årsak til atypisk vintersår på norsk oppdrettslaks"
- Bakgrunn: Tenacibakulose har forholdsvis nylig vokst frem som en alvorlig trussel for norsk oppdrettslaks. Det relative bidraget fra selve bakterien, produksjonsforhold og miljøfaktorer til utbrudd av tenacibakulose, er imidlertid ukjent. Det beskrevne prosjektet har blitt igangsatt for å identifisere risikofaktorer av betydning for utbrudd av tenacibakulose, identifisere og karakterisere toksiner som forårsaker kliniske symptomer, og for å teste om antistoffer mot toksinene kan beskytte mot sykdommen.
- Varighet: 1. oktober 2017-31. desember 2021
- Budsjett: 6 millioner kroner
- Ansvarlig organisasjon: Veterinærinstituttet

svært like kolonier som er veldig lite biokjemisk reaktive, er identifisering til arts- eller underartsnivå både tidkrevende og kostbart og stopper ofte opp med identifikasjon som *Tenacibaculum* sp. Veterinærinstituttet har i senere år tatt i bruk MALDI-TOF MS som et diagnostisk verktøy. Denne metodikken, basert på profilering av bakteriens proteininnhold, har blitt utviklet (og validert vha. helgenomsekvensering) til en robust, rask og billig måte for identifisering av *Tenacibaculum* til art og underart (se figur 2).

Genetiske forskjeller hos *Tenacibaculum* fra sår

76 isolater fra 15 utbrudd i 2018 og 25 isolater fra 2019 hvor *Tenacibaculum* sp. var det dominerende bakteriologiske funn

ble helgenomsekvensert og analysert. Fire forskjellige anerkjente 'varianter' av *Tenacibaculum*, ble indentifisert. Alle utbruddene var dominert av én art, *Tenacibaculum finnmarkense*. Videre kunne denne arten skilles, basert på genetiske forskjeller, i to grupperinger kjent som genomvarianter. Ser man på slektskapstreet (figur 2), fremstår genomvar *ulcerans* som ganske genetisk divers (jfr. lang horisontal avstand mellom enkeltisolater), mens gv. *finnmarkense* fremstår som en rekke forholdsvis tettbeslektede undergrupper (korte horisontale avstander mellom enkeltisolater). Det ble videre identifisert én svært nærbeslektet undergruppe blant disse (øverst i treet) som ble funnet i nesten alle utbrudd, noe som knytter denne varianten av bakterien til sykdommen og muligens indirekte til en 'primær' rolle i utvikling av sår.



Figur 2. Viser 100% overenstemmelse mellom hel-genom basert (ANI) identifikasjon til art og genomvariant nivå og MALDI-TOF diagnostikk. Slektskapstre på venstre siden. Like farger = like identifikasjon ved ANI og MALDI-TOF.

Forskjeller i toksisitet

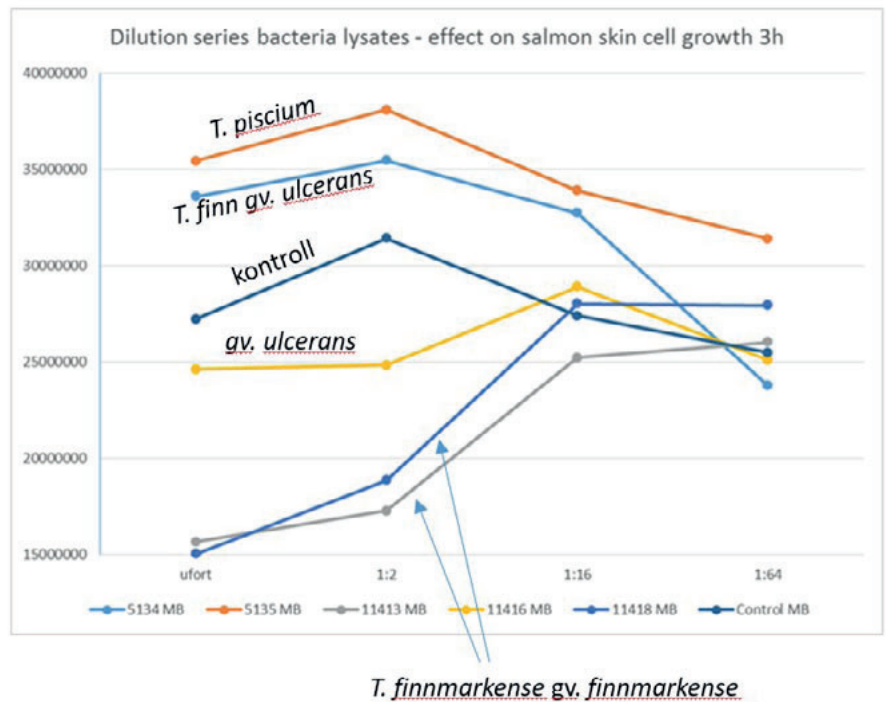
Mange bakterier skiller ut stoffer til miljøet som på en eller annen måte gjør tilgjengelig eller 'fordøyer' næringsstoffer, men disse kan også ha en skadelig virkning på levende organismer/celler. En mulig rolle for *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* som en av hovedårsakene til sårutvikling hos laks, støttes av en rekke eksperimenter hvor vi testet toksisitet av bakteriefri vekstbuljong for laksehudceller i cellekultur. Laksecellene ble eksponert for buljong hvor forskjellige typer *Tenacibaculum* hadde blitt dyrket og så fjernet, og kjemiske analyser ble så brukt til å måle grad av celle-drap. En betydelig forskjell i evne til å drepe hudceller ble identifisert i dyrkingsbuljong fra de forskjellige *Tenacibaculum* gruppene, men *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* var den klart mest toksiske (figur 3).

Forskjeller i protein uttrykk

Analysen av proteinene bakterien produserte viste at det var klare forskjeller i proteinuttrykk mellom *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* stammer og andre *Tenacibaculum* typer (figur 4). Kanskje mest interessant, identifiserte vi et protein-modifikasjons-system (såkalt PTM system, hvor proteiner er modifisert ved å bli påsatt sukker molekyler) hos de *Tenacibaculum* stammer som vi studerte. Slike systemer er kjent fra litteraturen og har ofte stor innvirkning på både proteinfunksjon og organismens evne til å overleve. Undersøkelsene indikerer at PTM-sukker-strukturene var annerledes hos *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* enn hos andre *Tenacibaculum* stammer, noe som kan være viktig for evt. vaksine utvikling.

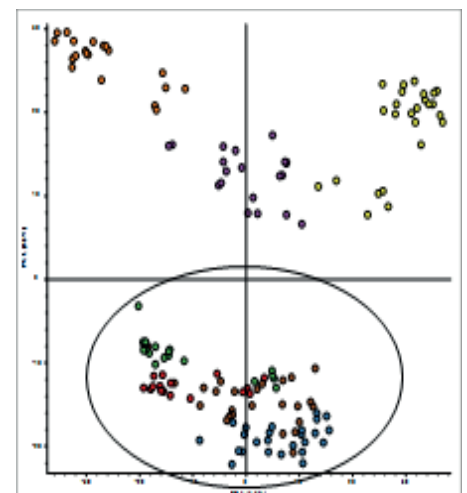
Konklusjoner

Etter avslutning av prosjektet kan vi konkludere med at det svært konsistente kliniske, histopatologiske og bakteriologiske bildet som ble observert (ikke presentert her), kombinert med den tette fysiske sammenhengen mellom bakterieceller og observert patologi, gir sterk støtte til at *Tenacibaculum* spp. er årsak til sykdommen. Videre ble én stor gruppe med tilnærmet identiske *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense* isolater identifisert i forbindelse med



Figur 3. Forskjeller i toksisitet for laksens hudceller dyrket i laboratoriet. Linjene representerer toksisitet av en fortynnings serie av buljong etter vekst av forskjellige *Tenacibaculum* varianter. Lavere verdi = større toksisitet.

sykdommen langs hele kysten, fra Vestland til Finnmark. Toksiteteten av *Tenacibaculum* spp. er forbundet med ekstracellulære stoffer, hvor *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* var mest toksisk blant isolatene som ble testet. Resultatene indikerer at et fremtidig forskningsfokus på smittebegrensende tiltak og evt. vaksineutviklingsansynligvis bør rettes mot *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense*.



Figur 4. PCA plot viser graden av likhet i prøvematerialet. Jo nærmere hverandre datapunkt ligger, jo mer samsvarende er de. Punktene i plotten representerer noen tusen proteiner prøvetatt på forskjellige tidspunkter under dyrkning av forskjellige *Tenacibaculum* typer. Punktene innen sorte ringen representerer *T. finnmarkense* genomovar *finnmarkense*.