

Vaksinering for forbedret immunitet og beskyttelse mot tenacibaculose hos atlantisk laks

Faglig sluttrapport FHF 901655



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

Rapportnummer: 16/2024	ISBN: 978-82-8296-787-7	ISSN: 1890-579X
Dato: 7. juni 2024	Antall sider + sider vedlegg: 18	Prosjektnummer: 13327
Tittel: Vaksinering for forbedret immunitet og beskyttelse mot tenacibaculose hos atlantisk laks (ResisT)		
Title: Vaccination against tenacibaculose in Atlantic salmon (ResisT)		
Forfatter(e): Lene Sveen, Sverre Bang Småge (Cermaq Group), Aleksei Krasnov, Vibeke Høst, Marius Karlsen (Pharmaq), Ane Sandtrø (Pharmaq), Bjørn Brudeseth (Pharmaq), Leif Are Klevan (Pharmaq), Henrik Duesund (Cermaq Group) og Christian René Karlsen.		
Avdeling: Fiskehelse		
Oppdragsgiver: Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfinansiering		
Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.: FHF 901655		
Stikkord: Tenacibaculose, vaksinering		
Sammendrag/anbefalinger: Sårutvikling forårsaket av bakterielle infeksjoner på laks i sjø representerer et vedvarende problem for norsk lakseoppdrett. Sårutbrudd assosiert med <i>Tenacibaculum finnmarkense</i> (tenacibaculose) kjennetegnes ved sår på hodet, kjeven, inkludert finne- og haleråte og kan gi akutt dødelighet. Tenacibaculose er spesielt problematisk for nylig overført smolt, og det er ingen effektiv vaksine tilgjengelig. Prosjektet hadde som mål å undersøke effekten av å bruke rekombinante proteiner fra <i>T. finnmarkense</i> for å indusere beskyttelse mot sykdommen. Resultatene viser at immunisering ved injeksjon, men ikke nese- eller badeksponering, økte antistoffresponsen hos fisken. Vi utførte også smitteforsøk som bekreftet en beskyttende effekt med redusert dødelighet hos immunisert fisk. Disse funnene viser at rekombinant proteinteknologi er en mulig strategi for å utvikle en vaksine mot tenacibaculose i laksefisk.		
English summary/recommendation: One of the major challenges for the Norwegian salmon industry is the development of ulcers due to bacterial infections in the marine environment. <i>Tenacibaculum finnmarkense</i> , the agent of tenacibaculosis, causes severe lesions on the head, jaw, including fin and tail rot, and can result in high mortality rates. Tenacibaculosis is especially problematic for newly transferred smolts, and there is no effective vaccine available. This project aimed to explore the effect of using recombinant proteins from <i>T. finnmarkense</i> to induce immunity against tenacibaculosis. The results show that immunization by injection, but not nasal or bath exposure, enhanced serum antibody responses in the fish. We also performed challenge experiments verifying protective effects reducing mortality in immunized fish. These findings show that recombinant protein technology is a potential strategy for developing a tenacibaculosis vaccine for salmonids.		

Forord

Dette prosjektet ble finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF) gjennom utlysning 20/00137 under delområde 3. «Prosjekter som omhandler kunnskap for tiltak og forebygging mot sårproblemer som er forårsaket av en eller flere bakterier eller parasitter».

Prosjektet ble finansiert med kr 3,26 mill. Prosjektet var todelt, der Del 2 som inneholdt et verifiserende vaksineforsøk skulle gjennomføres om første del av prosjektplanen innfridde. Første del gikk fra februar 2021 til august 2022, andre del av prosjektet gikk fra januar 2023 til desember 2023. Prosjektet var et forskerstyrt prosjekt ledet av Nofima, med Cermaq og Pharmaq som industripartnere.

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	2
3	Problemstilling og formål	4
4	Prosjektgjennomføring	5
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	8
6	Leveranser	17
7	Referanser	18

1 Sammendrag

Norsk sammendrag

Sårutvikling forårsaket av bakterielle infeksjoner på laks i sjø representerer et vedvarende problem for norsk lakseoppdrett. Sårutbrudd assosiert med bakteriene *Moritella viscosa* (vintersår) og *Tenacibaculum finnmarkense* (tenacibaculose) er den største årsaken til bekymring rundt bakterielle sår. Sykdommen tenacibaculose kjennetegnes ved hode, kjeveråte og/eller finne-, haleråte og kan gi akutt dødelighet. Tenacibaculose er et særlig problem på nyutsatt smolt, spesielt ved utsett på fallende temperaturer, men kan også føre til sykdom på stor fisk, da gjerne i sammenheng med skader på hudbarrieren. Det finnes ingen vaksine mot tenacibaculose, tidligere immuniseringsforsøk med inaktivert bakterie har ikke gitt beskyttelse mot sykdomsutvikling. Målet i dette prosjektet var derfor å undersøke om immunisering med antigener (rekombinante proteiner) fra *T. finnmarkense* kunne representere en strategi for å gi beskyttelse mot tenacibaculose.

Resultatene viser at immunisering ved stikkvaksinering, men ikke nasal og bad, fører til økte serumresponser i fisken. Smitteforsøk med immunisert fisk verifiserer antistoffresponser, samt viser til lavere dødelighet ved immunisering med rekombinant protein. Resultatene er lovende for et videre utviklingsforløp av en vaksine mot tenacibaculose i laksefisk.

English summary

One of the major challenges for the Norwegian salmon industry is the development of ulcers due to bacterial infections in the marine environment. The most common bacterial agents involved are *Moritella viscosa* (winter ulcer) and *Tenacibaculum finnmarkense* (tenacibaculosis). The latter causes severe lesions on the head, jaw, including fin and tail rot, and can result in high mortality rates. Tenacibaculosis is especially problematic for newly transferred smolts, especially under cold water conditions, but it can also affect larger fish, especially if they have skin injuries. There is no effective vaccine available against tenacibaculosis, and previous attempts to immunize fish with killed bacteria have failed to prevent the disease. Therefore, this project aimed to explore the possibility of using antigens (recombinant proteins) from *T. finnmarkense* as a way to induce immunity against tenacibaculosis.

The results show that immunization by injection, but not nasal or bath exposure, enhanced serum responses in the fish. We also performed challenge experiments verifying antibody responses and reduced mortality in immunized fish. These findings show that recombinant protein technology is a potential strategy for developing a tenacibaculosis vaccine for salmonids.

2 Innledning

Sårutvikling forårsaket av bakterieinfeksjoner i sjøen er en utfordring i norsk lakseoppdrett. Sårutbrudd assosiert med bakteriene *Moritella viscosa* (vintersår) og *Tenacibaculum* spp. (tenacibaculose) er den største årsaken til bekymring.

De siste årene har sårutbrudd forårsaket av *T. finnmarkense*, den etiologiske agensen for tenacibaculose (Småge et al., 2016a), gitt økende bekymring for oppdrettsnæringen i Nord-Norge. Utbrudd av tenacibaculose resulterer i tap, ofte ved overføring av smolt til sjøvann. *Tenacibaculum*-slekten har flere fiskepatogene arter av bakterier assosiert med både ville og oppdrettede fiskearter i marine miljøer over hele verden (Avendano-Herrera et al., 2006; Fernandez-Alvarez and Santos, 2018). I Norge ble den først isolert på slutten av 1980-tallet (Olsen et al., 2011) hvorav tre arter er assosiert med tenacibaculose i dagens norske akvakultur: *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum dicentrarchi* og *T. finnmarkense* (Habib et al., 2014; Småge et al., 2016a; Småge et al., 2016b; Klakegg et al., 2019).

Det finnes ingen effektiv vaksine mot tenacibaculose hos laksefisk, og vaksinestrategier med hel inaktivert bakterie har ikke gitt beskyttelse mot *T. finnmarkense* (Småge et al., 2018). Det finnes imidlertid flere ulike vaksinestrategier. Ved å bruke rekombinant-proteinteknologi er det mulig å produsere proteiner fra bakterien, for så å bruke proteinene som antigener i immunisering av verten. Fordelen med rekombinant-vaksineteknologi er at man ved immunisering ser for seg en mer presis immunrespons hos verten rettet mot proteinet (antigenet) av interesse. Rekombinant-vaksineteknologi baserer seg på kunnskap om proteiner i patogenet, genetisk informasjon, samt produksjon av proteiner i en vertscelle (f.eks. *E. coli*). Det finnes imidlertid flere ulike strategier for å redusere bakterielle infeksjoner. Et eksempel er på ulike måter å blokkere bakteriens virulensfaktorer, med den hensikt at bakteriene ikke kan ta seg inn i verten (Dehbanipour and Ghalavand, 2022). Et annet eksempel er anvendelse av probiotika for å gi økt beskyttelse mot patogener, enten gjennom å påvirke patogenet eller at det stimulerer effekter i verten (Simon et al., 2021).

I et tidligere FHF prosjekt (#901433, LimiT) ble det predikert (basert på helgenomiske analyser), ulike virulensgener med antatt relevans for interaksjonen mellom *T. finnmarkense* og laksens hud. I dette prosjektet (ResisT) har vi bygget videre på denne kunnskapen, med mål om å undersøke i hvilken grad immunisering med rekombinante-proteiner i laks induserer målbare serumresponser. Prosjektet var todelt.

I Del 1 ble det lagt ned arbeid for å karakterisere uttrykk av virulensproteinene i *Tenacibaculum* ssp., samt serumresponser i laks ved immunisering med rekombinante proteiner fra *T. finnmarkense*, ved bruk av tre ulike immuniseringsstrategier (bad, nasal eksponering og stikkvaksinering i underhuden). Del 2 av forsøket ble igangsatt basert på serumresponser detektert mot *T. finnmarkense*-proteiner i første del av prosjektet. I Del 2 ble det undersøkt om immunisering med stikkvaksinering i underhuden og administrering av probiotika resulterte i beskyttelse mot tenacibaculose. Da serumresponsene var undersøkt mot *T. finnmarkense*-proteiner ble det også anvendt en smittemodell med *T. finnmarkense*. Resultatene fra dette prosjektet viser at immunisering med rekombinante-proteiner er en lovende tilnærming for å begrense tencibaculose i oppdrett av atlantisk laks.

Prosjektets omfang

Dette prosjektet bestod av to deler. Prosjektets Del 1 baserte seg på deteksjon av predikerte antigener med molekylære analyser, samt immuniseringsstudier av laks med to rekombinante proteiner fra *T. finnmarkense*. Del 2 omfattet et smitteforsøk med *T. finnmarkense*, igangsatt på bakgrunn av positive resultater i innledende immuniseringsforsøk med *T. finnmarkense*-proteiner i Del 1.

Del 1

- AP1: Deteksjon av predikerte antigenene med molekylære metoder. Delmål i AP1 inkluderte antistoffproduksjon, immunhistokjemi på vevssnitt med *T. finnmarkense*, western blot av cellelysater fra *T. dicentrarchi*, *T. maritimum* og *T. finnmarkense* for verifisering av antigenene i ulike arter, og lokalisering i bakteriecellen med mikroskopiteknikker.
- AP2: Immuniseringsstudie med mål om å undersøke serumresponser i laks immunisert med to rekombinante proteinene fra *T. finnmarkense* via stikk og stikk-fri vaksinerings (bad, eller nasal eksponering).

Del 2

Andre del av prosjektet ble gjennomført da det ble detektert serumresponser mot rekombinante proteiner ved stikkvaksinerings i Del1 AP2. Målet med Del 2 av prosjektet var å undersøke om immunisering med rekombinante proteiner gir beskyttelse mot tenacibaculose i atlantisk laks. I Del 2 ble det gjennomført immunisering med rekombinante proteiner ved stikkvaksinerings, samt stimulering av fisk med «probiotika», etterfulgt av et smitteforsøk med *T. finnmarkense*.

Prosjektorganisering

Deltakerne i prosjektgruppen for prosjektets første del (Del 1) inkluderte forskningsmiljøer i Nofima (Christian Rene Karlsen, Lene Sveen, Vibeke Høst, Aleksei Krasnov) og Cermaq (Sverre B. Småge, og Henrik Duesund). I prosjektets andre del (Del 2) ble Pharmaq inkludert som prosjektdeltaker (Marius Karlsen, Ane Sandtrø, Bjørn Brudeseth, Leif Are Klevan). Forskningsoppgavene har blitt utført ved Nofima og smitteforsøk ved Veso AquaLab i regi av Cermaq og Pharmaq. Prosjektleder Karlsen var ansvarlig for AP2, Sveen var ansvarlig for AP1. Referansegruppe for prosjektet var Nils Steine (Pharmaq) og Øystein Markussen (Åkerblå). FHF ved Sven M. Jørgensen.

3 Problemstilling og formål

Intraperitoneal vaksinerings med inaktiverte bakterier har hittil ikke vist seg å gi beskyttelse mot utvikling av tenacibaculose. Lykkes det med vaksinasjon mot tenacibaculose vil dette kunne gi bedre fiskevelferd og lavere dødelighet i produksjon av laks i sjø.

Hovedmålet med prosjektet var å undersøke effekten av immunisering med antigenproteiner, eller i kombinasjon med probiotika vil forebygge tenacibaculose forårsaket av *T. finnmarkense*.

Spesifikke mål:

- Å utvide karakteriseringen av rekombinante proteiner og variasjonen av proteinuttrykk i *Tenacibaculum* spp.
- Å etablere beste modell for immunisering med rekombinante proteiner
- Å teste beste modell for immunisering med rekombinante proteiner og grad av beskyttelse mot tenacibaculose i smittemodell med *T. finnmarkense*.

4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet var todelt, Del 1 var ledet av Nofima, med Cermaq som industripartner. Del 2 var ledet av Nofima, med Cermaq og Pharmaq som industripartnere.

Del 1 - AP1 Deteksjon av antistoffer med molekylære metoder

Hensikten med arbeidspakke 1 var å karakterisere uttrykket av de predikerte antigenproteinene i ulike stammer av *Tenacibaculum*. Produksjon av antistoff mot antigenproteinene (polyklont antistoff kanin) ble utført hos ekstern leverandør (Vertebrate Antibodies). Istedenfor å immunisere med helprotein, ble det for hvert av de to predikerte antigenproteinene immunisert med tre ulike peptidsekvenser med antatt høy antigenkapasitet. Antigenkapasiteten ble predikert basert på aminosyresekvensene. Tanken bak immunisering med peptider fremfor helt protein var å fremprovosere en immunrespons mot en spesifikk epitop, uten å utløse reaksjoner mot antatte ikke-essensielle deler av proteinet. Før immunisering ble peptidsekvensene kryssjekket i en genomanalyse for å oppdage evt. uønskede kryssreaksjoner. Totalt fikk Nofima tilsendte seks ulike antistoff, et antistoff for hver av de immuniserte peptidsekvensene.

Western blot ble kjørt i flere runder. Western blot ble kjørt på cellelysat fra ulike bakteriekulturer (*T. finnmarkense* og tpeestammene av (*T. dicentrarchi* og *T. maritimum*) for å se på kryssreaksjon mellom stammene og for å se om dyrkingsforhold (temperatur) og eksponering mot slim (etterligne kontakt med verten), ville påvirke uttrykket av antigenproteiner. Det ble også inkludert positiv kontroll (renset protein), samt negativ kontroll i form av *T. maritimum*, da genene til proteinene av interesse ikke er til stede i denne stammen. Alle seks antistoff fraksjonene ble testet.

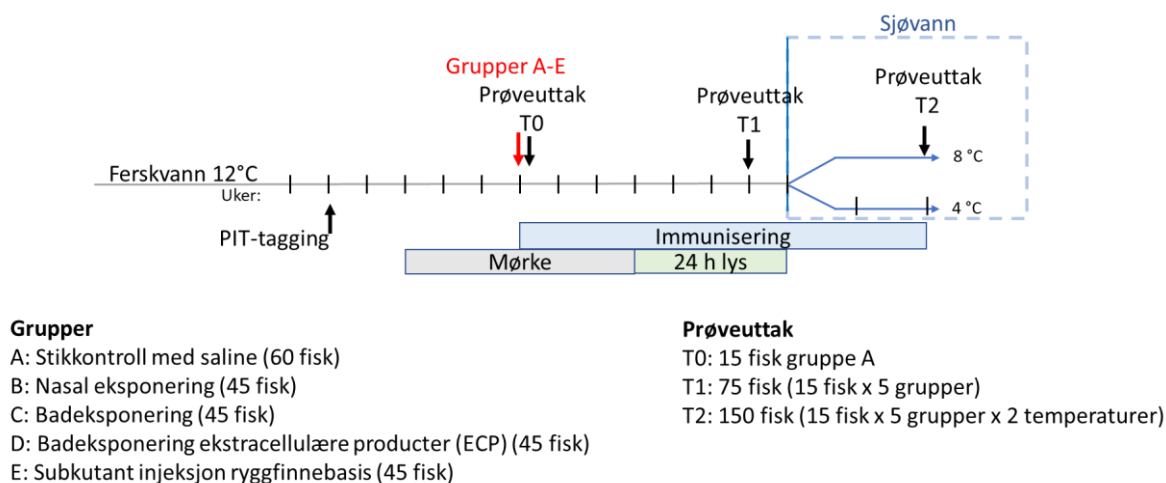
Immunohistokjemi ble utført på skinn fra fisk smittet med *T. finnmarkense*, og med positiv immunmerking mot *Tenacibaculum* ssp. Antistoffene ble testet på snitt fra tidligere verifisert smittet fisk, fra vev tatt fra ulike deler av kroppen med tegn på finne-, kjeveråte. Analysen inkluderte usmittet kontroll, med og uten demaskering (antigenretrieval / trypsinering).

Del 1 - AP2 Immuniseringsmodell med rekombinante proteiner

Immunisering av laks med rekombinante proteiner. Hensikten med immuniseringsmodellen var å undersøke om fisken responderer med immunresponser etter at den har vært eksponert mot rekombinante proteiner fra bakterien *T. finnmarkense*. Det ble testet tre ulike immuniseringsmodeller (bad, stikkvaksinerings, og nasal eksponering), samt effekt av temperatur (4 °C eller 8 °C).

Forsøket ble gjennomført på Nofimas Forskningsstasjon for bærekraftig akvakultur, Sunndalsøra og startet med 240 PIT-merket atlantisk laks (ca 30 g) i gjennomstrømning på 12 °C ferskvann (Figur 1). To uker etter merking ble fisken satt på mørke. Etter 3 uker i mørkeperioden ble fisken behandlet og eksponert mot proteiner fra *T. finnmarkense* på ulike måter som beskrevet under. Etter mørkeperioden ble fisken satt på 24 timers fotoperiode i fire uker og sjøvannstest ble brukt for å sikre at fisken var smoltifisert og klar for sjø. Fra behandling og frem til overføring sjøvann var det 552 døgngrader. Temperaturen ble senket gradvis og gruppene splittet i to ved overføring til sjøvann slik at gruppene gikk videre på to forskjellige temperaturer. Forsøket fortsatte i 2 uker til med temperaturer på 4 °C eller 8 °C. Behandlingen for de ulike gruppene ble gjennomført i triplikate kar med stopp i vannstrøm. Karene var oksygenert med senket vannvolum for å redusere mengde substrat. Fisken ble nettet fra opprinnelig tank og hver gruppe/behandling foregikk over 1 timer med påfølgende oppvåkning. Forsøket hadde 5 grupper, gruppe A-E. Gruppe A: Kontroll - Fisken ble fullbedøvet med MS -222 og injisert med en steril saltoppløsning. Gruppe B: Nasal eksponering – Fisken ble bedøvet med MS -222. Proteiner oppløst i vann (10 µl) ble injisert i åpningen av hvert nesebor. Gruppe C: Badeksponering - Fisken ble badeksponert i 1 time. Gruppe D: Badeksponering mot ekstracellulære produkter (ECP) av *T. finnmarkense* – ECP løst i vann tilsettes kar for badeksponering i 1 time. Gruppe E: Subkutant injeksjon

- Injisert med 20 µl proteiner oppløst i vann. Subkutan injeksjon (i hypodermis). Behandlingsgruppene bestod av 60 fisk i gruppe A (kontroll), og 45 fisk i hver av gruppene B-E.



Figur 1 Modell over forsøksgjennomføringen for å finne beste måte for immunisering.

Totalt var det 3 prøveuttak. Første prøveuttak (T0) benyttet 15 fisk fra kontrollgruppen ved eksponering. Andre prøveuttak (T1) benyttet 75 fisk (15 fisk x 5 grupper) like før overføring til saltvann. Tredje prøveuttak (T2) ble gjennomført 3 uker etter sjøvannsoverføring med 150 fisk (15 fisk x 5 grupper x 2 temperaturer). Vekt (g) og lengde (cm) ble målt og kondisjonsfaktor (CF) utregnet. Fiskene ble tappet for blod slik at serum ble sikret og fryst ved -20 °C inntil det ble analysert. Skinnmucus ble samlet inn fra fiskens hud og overført med pipette til rør som ble fryst med tørris og holdt på -80 °C. Nese med nesebor og neserosetten samt skinn i området fra ryggfinsens feste og nedover mot sidelinjen ble sikret på RNAlater.

Bio-plex immunoassay ble utviklet for å måle immuniseringsspesifikke og ikke-spesifikke antistoffnivåer fra serum- og skinnmucus-prøver fra immuniseringsforsøket. For påvisning av de immuniseringsspesifikke antistoffene ble de rekombinante proteinene, samt den ekstracellulære proteinfraksjonen av *T. finnmarkense* inkludert i multipleksanalysen. For påvisning av ikke-spesifikke antistoffer, ble dinitrofenylert-nøkkelhull-limpet-hemocyanin (DNP-KLH) brukt. Substrater ble koblet til MagPlex-C Microspheres med bruk av ulike regioner på kulene for å kunne anvende de samtidig i analysene. Brukskonsentrasjoner for kobling av substratet samt konsentrasjon av prøvemateriale til analysen ble optimalisert før serum- og hudslimprøver ble undersøkt i duplikater. Data ble analysert ved bruk av ikke-parametrisk Mann-Whitney-test ($p < 0,05$).

Transkriptomanalyser ble utført på prøver av hud og neserosetten ved bruk av Nofimas 15 k microarray-oligonukleotidprober som inneholder mange av de immunrelaterte genene i atlantisk laks. Analysen tok utgangspunkt i prøver fra de to temperaturene på henholdsvis 8 °C og 4 °C, i tillegg til behandlingsgruppene (stikk, bad og nasal eksponering). Sammenligning av neserosetten inkluderte 1) Effekt av neseeksponering på immunrespons i rosetten, 2) Effekt av temperatur på immunrespons i rosetten. For hudanalyse ble hver behandling, dvs. gruppe B-E, sammenlignet med kontroll (gruppe A) for å identifisere effekten av immunrespons. For å undersøke effekten av temperatur ble alle grupper ved enten 8 °C og 4 °C kombinert og sammenlignet med hverandre. For alle sammenligninger inkluderte analysen 8 prøver per gruppe A-E i analysen, totalt 24 for neserosetten og 56 for skinn. Nofimas bioinformatikk pipeline STARS ble brukt til databehandling. Ekspresjonsratioer (ER) for alle individuelle prøver ble utregnet ut ifra gjennomsnittsverdien av alle prøver. Differensiell forskjell i uttrykk av gener (DEG) er definert som: $\log_2\text{-ER} > |0.8|$ (1,74 ganger) og $p < 0,05$.

Del 2 - Vaksinasjon og smitte med *Tenacibaculum finnmarkense*

Nytt forsøk for vaksinasjon og smitte med *T. finnmarkense* ble gjennomført på Veso Aqualab (Namsos, Norge). I korte trekk ble forsøksfisken VIE-merket og fordelt etter 3 vaksinegrupper. De tre formulerte vaksinegruppene med adjuvans inneholder: 1. PBS (kontroll), rekombinant protein 1 (50 ug protein per fisk) og rekombinant protein 2 (50 ug protein per fisk). Totalt 120 fisk per vaksinegruppe ble brukt i smitteforsøket. Ønsket døgngrader ble oppnådd ved at vaksinert fisk gikk 4 uker på 12 °C (12 t lys/12 t mørke) og 6 uker på 12 °C med 24 t lys. Ved overføring til smittecelle ble 20 fisk per vaksinegruppe per tank brukt. Totalt 6 tanker a 60 fisk. Fisken ble akklimatisert til fullstyrke sjøvann på 8 C° og 2 kar badbehandlet med «probiotika mix» i en time. Probiotika mixen bestod av tre ulike typer laksebakterier isolert fra frisk laks. Tre dager etter behandlingen ble badsmitteforsøket gjennomført med *T. finnmarkense*.

Bakteriologi reisolerte *T. finnmarkense* fra anvendt smittekultur samt fra sårkant av smittet fisk ved utstryk på Marin Agar plater. Kolonier ble videre verifisert med analyser av 16S rRNA gensekvensering.

Bio-plex immunoassay for målinger av immuniseringsspesifikke og ikke-spesifikke antistoffnivåer fra serum, som beskrevet over, ble gjentatt. Data ble analysert ved bruk av ikke-parametrisk Kruskal-Wallis test og Mann-Whitney-test ved sammenligning av to grupper ($p < 0,05$).

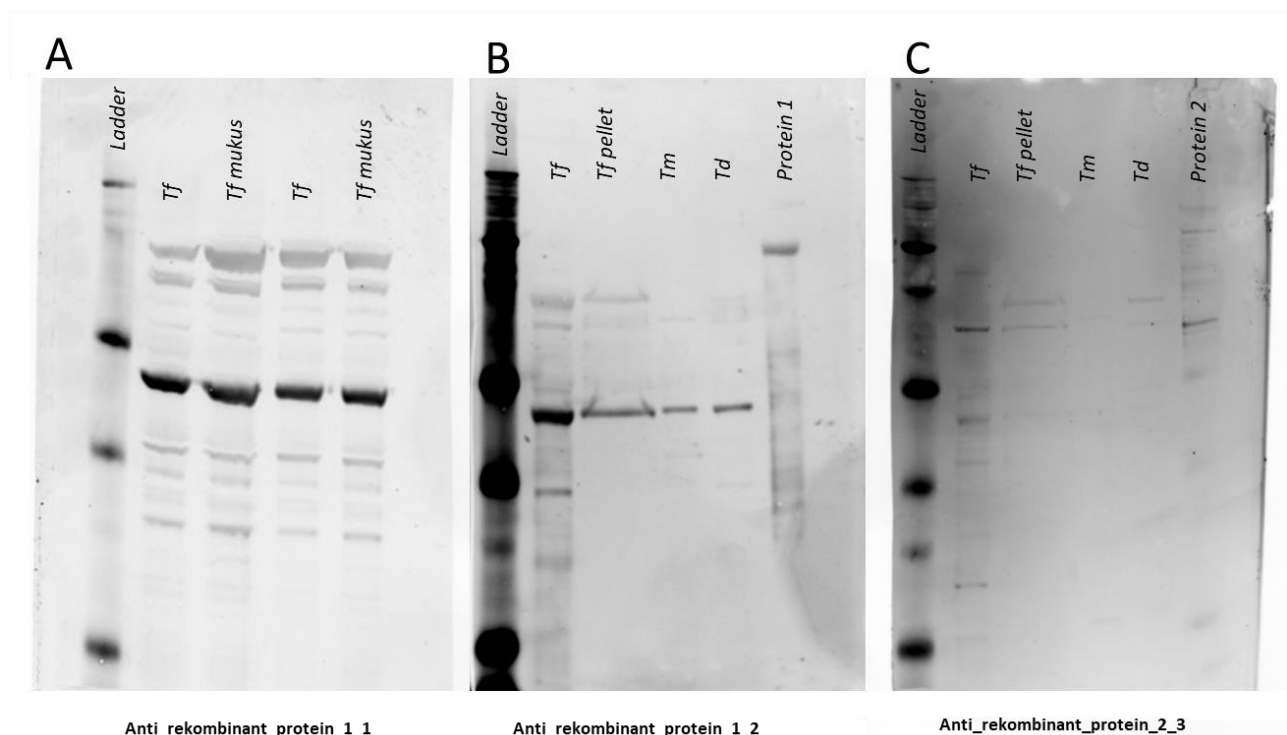
Histologiske analyser Prøver til histologiske analyser (formalin) ble tatt i det andre smitteforsøket. Det ble tatt prøver av død ($n = 5$) og døende fisk (human end points $n = 9$), dag 4 og dag 5 etter smitte. Prøver inkluderte gjelle, gjelleapparatet, skinn, kjeve, hodet og helkropp (kotelett). Prøvene ble sendt til Veterinærinstituttet i Harstad, og farget med AP/PAS og safran som farger generelle cellestrukturer og kollagen. Et utvalg av prøver ble merket med IHC for *Tenacibaculum* spp.

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Del 1

Western blot Cellelysate og pelletfraksjon fra *T. finnmarkense* og typestammene av *T. dicentrarchi* og *T. maritimum* er blitt applisert på gel før disse er blottet mot anti-epitopene. *T. finnmarkense* og typestammene av *T. dicentrarchi* var dyrket på 8°C mens *T. maritimum* var dyrket på 22°C. Bakteriene ble høstet i forskjellige faser av vekstfasen og eksponert for slim/mucus fra lakseskinn i kulturene for å se om uttrykket av proteinene endrer seg i kontakt med komponenter fra verten.

Enkelte av resultatene er vist i Figur 2. Fra bakteriekulturene var det ingen høymolekylære bånd slik som i proteinkontrollen, representert ved rensset rekombinant_protein_1. Det var imidlertid flere sterke lavmolekylære bånd. Dette kan tolkes slik at det rekombinant_protein_1 ikke er uttrykt som ett samlet protein, men prosesseres til to eller tre mindre proteiner i *T. finnmarkense*. Videre, anti_rekombinant_protein1_3 ga en annerledes profil enn de to andre antistoffene. Dette kan om mulig forklares ved at antistoffene binder ulike epitoper på proteinet, og at proteinet kan klyves. Eller at det av andre grunner er predikert feil i bioinformatiske analyser, feilkilder ved tillaging av antistoffene eller affiniteten til antistoffene.



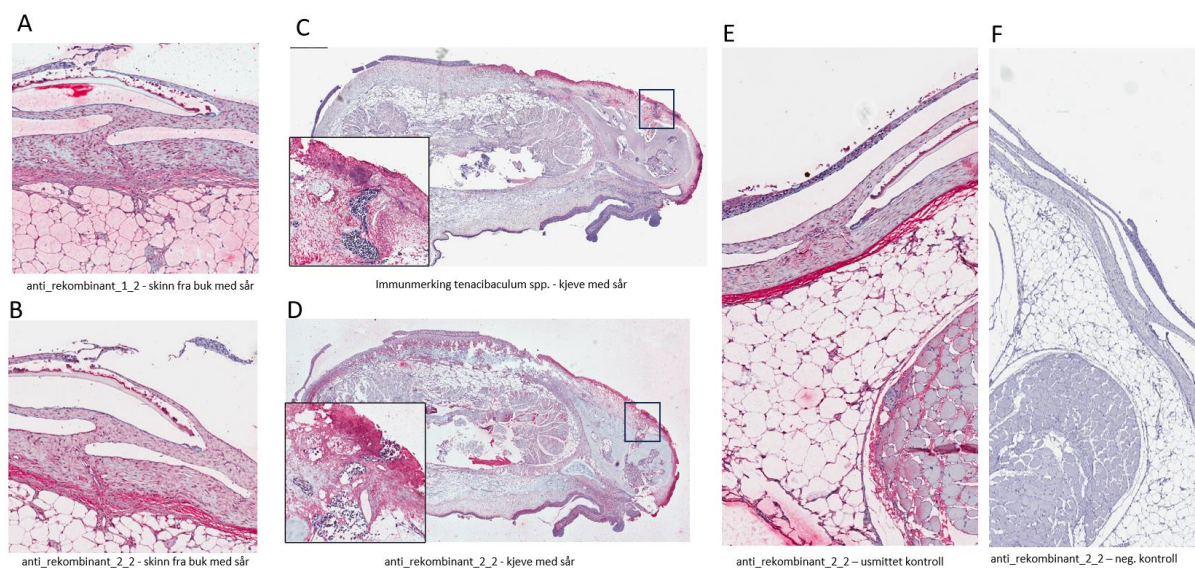
Figur 2 Western blot for deteksjon av protein_1 og protein_2. A. Anti_rekombinant_protein_1_1 på lysat av *T. finnmarkense* med og uten eksponering mot skinnmucus. B. Anti_rekombinant_protein_1_2 mot *T. finnmarkense* (Tf) lysat, *T. finnmarkense* pellet, *T. maritimum* (Tm), *T. dicentrarchi* (Td) og rensset protein_1. C. Anti_rekombinant_protein_2_3 mot *T. finnmarkense* (Tf) lysat, *T. finnmarkense* pellet, *T. maritimum* (Tm), *T. dicentrarchi* (Td) og rensset protein_2.

Resultatene for rekombinant_protein_1 viser også en kryssreaksjon mellom ulike stammer av *Tenacibaculum* spp. Videre så fant vi ingen forskjeller av bakterienes vekstfase, eller tilsetning av skinnmucus i vekstkulturen. *T. dicentrarchi* skal etter bioinformatisk analyse gi samme resultat som *T. finnmarkense*, mens *T. maritimum* er predikert til å ikke inneholde den aktuelle proteinsekvensen. *T. maritimum* skal etter prediksjon gi negativt resultat, men viser i våre analyser tegn til binding. Det kan imidlertid være at antistoffet binder seg til andre proteiner, selv om aminosyresekvensene ikke finnes igjen i *T. maritimum* genomet. Antistoffer kan vise kryssreaktivitet, noe som betyr at de kan binde seg til

lignende strukturer som deler en viss grad av likhet med målstrukturen. Omfanget av kryssreaktivitet avhenger av spesifisiteten til immunresponsen og likheten mellom andre strukturer og epitopen.

Anti_rekombinant_protein_2 viste lite reaksjon mot kontrollproteinene, representert ved rekombinant rensset protein_2. Imidlertid dannet det seg et likende mønster som observert ved anti_rekombinant_protein_1, men kryssreaksjon mellom ulike *Tenacibaculum* spp. synes å være lavere.

Immunohistokjemi Basert på resultatene i Western blot analysene ble det valgt ut to antistoff, anti_rekombinant_protein_1_2 og anti_rekombinant_protein_2_2 (Figur 3). Resultatene viste at anti_rekombinant_protein_2_2 ga positiv immunmerking i skinn fra laks som både var negativ og positiv for immunmerking for *Tenacibaculum* spp., mens det ble observert uspesifikk svak/uspesifikk innmerking for anti_rekombinant_protein_1_2.



Figur 3 Immunohistokjemi for deteksjon av predikerte proteiner. A. og B. Skinn fra buk med sår. C. kjeve med sår med immunmerking mot *Tenacibaculum* spp. D. Samme snitt som C., men merket mot protein 2. E. Usmittet kontroll. F. Negativ kontroll. Positiv immunmerking vises som rød farge. Type vevsnitt og immunmerking er beskrevet under hvert bilde.

Antistoffet anti_rekombinant_protein_2_2 ser ut til å binde kraftig og spesifikt til huden, primært i leukoforlaget i underhuden (Fig. 3 B), det er også noe merking i bindevevstrukturer rundt rød muskulatur i buk (Fig. 3 E). Det er derfor mye som kan tyde på at anti_rekombinant_protein_2_2 har uspesifikk binding mot leukoforstrukturer. I snitt farget med bindevevsfarging (trikrom), viser ikke leukoforstrukturene farge. Dette antyder tilstedeværelse av andre komponenter enn kollagen i dette laget, noe som kan forklare mangelen på generell farging for kollagen.

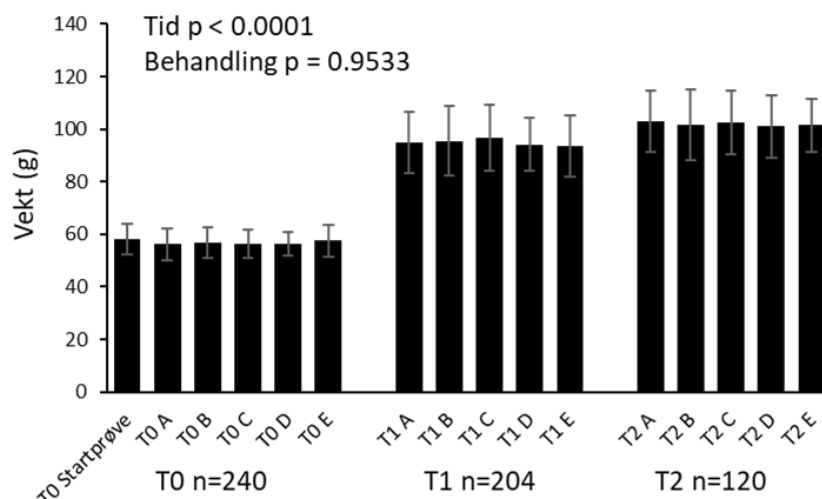
Videre finner vi igjen likende immunmerking for parallele snitt merket spesifikt for *Tenacibaculum* spp. (Fig. 3 C), som med antistoffet for anti_rekombinant_protein_2_2. Resultatene er utfordrende å tolke, men vi konkluderer med at det er en mulig sammenheng mellom hudinfeksjon med *Tenacibaculum* og immunmerking med anti_rekombinant_protein_2_2.

Immuniseringsmodell Det ble utført en immuniseringsstudie med mål om å undersøke serumresponser i laks immunisert med de to rekombinante proteinene via stikk og stikk fri vaksinerings (bad, eller nasal eksponering). Forsøket hadde 5 grupper (A – E). Gruppe A representerte kontrollfisk som var injisert med en steril saltoppløsning. Gruppe B: Nasal eksponering med rekombinante proteiner. Gruppe C: Badeksponering med rekombinante proteiner. Gruppe D: Badeksponering med ekstracellulære produkter (ECP) fra *T. finnmarkense*. Gruppe E: Subkutan injeksjon i hypodermis med rekombinante proteiner. Behandlingsgruppene bestod av 60 fisk i gruppe A (kontroll), og 45 fisk i gruppe

B - E. Prøveuttak ble gjennomført ved start (T0), før overgang til sjøvann (T1), og etter tre uker i sjøvann (T2). Smoltstatus ble sjekket før fisken ble satt på fullt sjøvann.

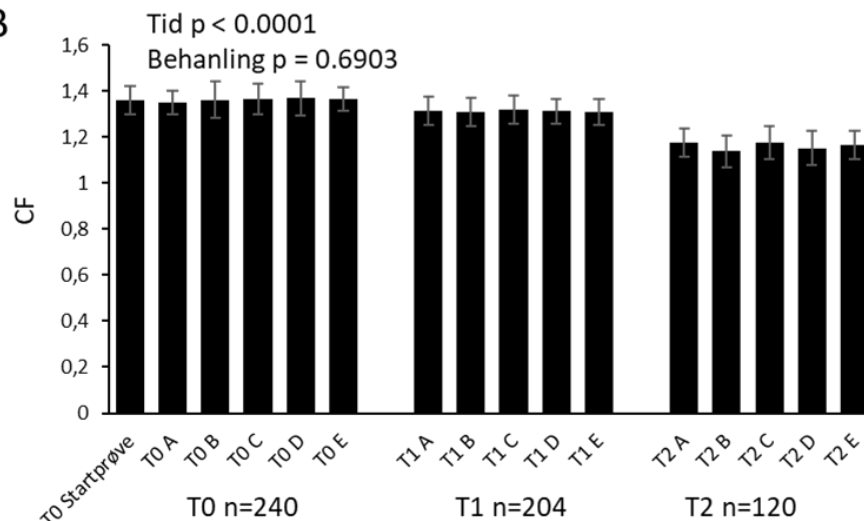
Resultatene fra forsøket viste ingen forskjeller i tilvekst eller sluttvekt mellom gruppene, men vekt og kondisjonsfaktor endret seg, som forventet, som en faktor av tid i sjø (Figur 4). Det ble heller ikke funnet forskjeller i vekt mellom grupper av fisk som stod på 4 °C vs 8 °C i sjøvannsfasen (resultater ikke vist). Det var ingen registrert dødelighet.

A



Level	Mean
T0 A A	56,09
T0 B A	56,71
T0 C A	56,38
T0 D A	56,42
T0 E A	57,44
T1 A B C D	94,92
T1 B B C D	95,44
T1 C B C D	96,62
T1 D B C	94,17
T1 E B	93,68
T2 A D	103,04
T2 B B C D	101,67
T2 C C D	102,58
T2 D B C D	101,13
T2 E B C D	101,54

B



Level	Mean
T0 D A	1,37
T0 C A	1,37
T0 E A B	1,37
T0 B A B	1,36
T0 A A B C	1,35
T1 C B C	1,32
T1 A C	1,31
T1 D C	1,31
T1 B C	1,31
T1 E C	1,31
T2 A D	1,18
T2 C D	1,18
T2 E D	1,17
T2 D D	1,15
T2 B D	1,14

Figur 4 Vekt (A) og kondisjonsfaktor (B) ved start (T0), like før overgang til sjøvann (T1), og etter tre uker i sjøvann (T2). Behandlingen er merket med gruppe A-E. Gruppe A: Kontroll – Fisk injisert med en steril saltoppløsning. Gruppe B: Nasal eksponering med proteinene. Gruppe C: Badeksponering med proteinene. Gruppe D: Badeksponering med ekstracellulære produkter (ECP). Gruppe E: Subkutant injeksjon i hypodermis med proteinene. P-verdier er gitt for toveis ANOVA. Tabellen til høyre angir forskjeller mellom gruppene basert på post hoc Tukeys HSD test.

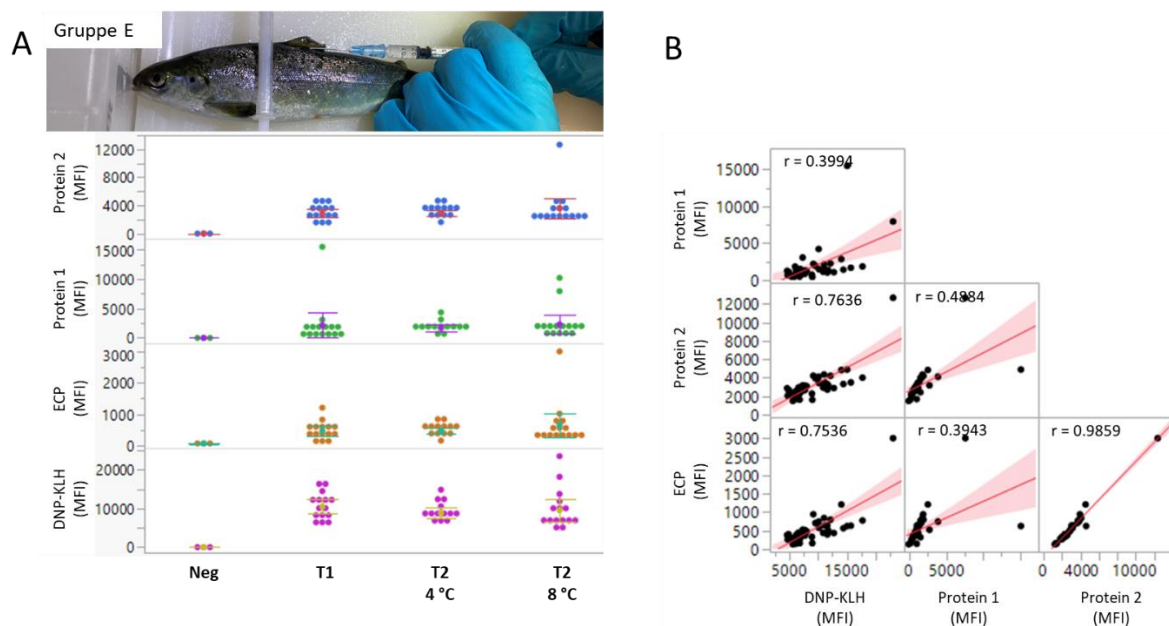
Serum antistoffnivåer

Serum og skinnmucus ble sammenlignet for nivåer av antistoffer mot rekombinant protein_1 og rekombinant protein_2, ekstracellulære produkter (ECP, *T. finnmarkense*), og ikke-spesifikke antistoffer (DNP-KLH), ved bruk av BioPlex assay.

Det ble ikke dokumentert økning i antistoffnivåer i skinnmucus fra fisk i sjø på 8 °C (tidspunkt T2). Det kan ikke utelukkes tekniske utfordringer da skinnmucus var vanskelig å få homogenisert og fortynnet, og det var aggregeringsutfordringer i assayet.

Et utvalg av serumprøver fra T2 viste heller ingen forskjell i antistoffnivåene mellom kontrollgruppen, og gruppene som ble nasal- eller bad-eksponert. Derimot, viste gruppen som fikk subkutan injeksjon økte nivåer av antistoff i serum. Subkutan injeksjon førte til høyere antistoff nivåer mot rekombinant protein 1, rekombinant protein 2, samt mot ECP.

På bakgrunn av disse resultatene ble serumprøver fra fisk immunisert med subkutan injeksjon analysert for T1. Her ble også nivåene av uspesifikke antistoff indikert ved DNP-KLH (Figur 5). Det ble ikke observert forskjeller i nivåer av målte antistoffer i subkutan injisert gruppe basert på tid eller sjøvannstemperatur. Ved å slå sammen tidsserien vises en positiv korrelasjon mellom nivåer av antistoffene.



Figur 5 Effekter av subkutan immunisering i laks gruppe E på nivåer av antistoffer målt med BioPlex. A) Nivåer av antistoffer som binder kuler linket med rekombinant protein_1 og protein_2, samt *T. finnmarkense* ekstracellulære produkter (ECP), og ikke-spesifikke antistoffer som binder til DNP-KLH. Nivåene vises som median fluorescens intensitet (MFI). To tidspunkt ble undersøkt. T1, like før overgang til sjø seks uker etter immunisering, og T2, 3 uker på 4 °C eller 8 °C sjøvann, 9 uker etter immunisering. B) Pearsons korrelasjonskoeffisienter mellom nivåer av de ulike antistoffene samlet for begge tidspunkt.

Generell stimulering av «immunrespons (DNP-KLH)» korrelerer med nivå av respons mot *Tenacibaculum* komponenter. Dette kan indikere triggering av responser fra immuniseringen utover den adaptive immunresponsen, eller at uspesifikke antistoffer også kan binde seg til *Tenacibaculum* proteiner. Sammenligningen viser også en høy korrelasjon mellom nivåer av antistoff mot rekombinant protein_2 og ECP som kan indikere at dette rekombinante proteinet er i ECP fraksjonen.

Grupper	Skinn	Nese
T2 A 8 °C	8	8
T2 B 8 °C		8
T2 C 8 °C	8	
T2 D 8 °C	8	
T2 E 8 °C	8	
T2 A 4 °C		
T2 B 4 °C		8
T2 C 4 °C	8	
T2 D 4 °C	8	
T2 E 4 °C	8	

Figur 6 Grupper og antall prøver fra skinn og nese brukt i sammenligningene av genekspresjon fra fisk i sjø (T2) på 4 °C eller 8 °C. Gruppe A-E; A) Kontroll, B) Nasal eksponering, C) Badeksponering, D) Badeksponering (ECP), E) Subkutan injeksjon.

Gener påvirket av immunisering og temperatur

Oversikt over grupper anvendt i sammenligning av ekspresjon av gener med microarray mellom behandlingsgrupper og antall prøver fra skinn og nese er vist i Figur 6.

Neserosetten

For neserosetten ble bare ett gen funnet forskjellig mellom kontroll og immunisering ved en nedregulering av genet sterile alpha motif domain-containing protein 9-like. Et større antall med 84 og 24 ble henholdsvis opp- og nedregulert med temperaturøkning fra 4 °C til 8 °C. Endringer relatert til immunsystemet var få med 10 immunrelaterte gener i tillegg til økt ekspresjon av åtte antivirale gener og ti hemoglobiner transkribert fra forskjellige loci. Dette kan indikere et høyere antall erytrocytter og forbedret blodsirkulasjon ved 8 °C.

Tabell 1 Differensiell ekspresjon av gener (DEG) i skinn mellom behandlingsgrupper. Det er gjort tre sammenligninger (Gruppe A mot Gruppe CDE) ved 8 °C. Immungener samt gener i to eller tre av tre grupper er inkludert.

Gruppe	Gen	8E-8A	8D-8A	8C-8A
Immune Antigen presentation	MHC class I antigen	<u>0,93</u>	0,25	0,23
Immune IFN-virus response	Tripartite motif-containing protein 25	0,49	<u>1,32</u>	<u>1,25</u>
Immune IFN-virus response	IFN-induced 44	<u>0,98</u>	0,50	0,73
Immune protease	Leukocyte elastase inhibitor	0,74	0,73	<u>1,35</u>
Immune regulator	Mitogen-activated protein kinase 5	-0,65	-0,21	<u>-0,84</u>
Immune T cell	TCR-gamma constant region 2	<u>0,99</u>	0,66	<u>1,08</u>
Metabolism RNA	Splicing factor, arginine/serine-rich 15	<u>0,98</u>	<u>1,19</u>	<u>1,15</u>
Metabolism Lipid	Phosphatidylcholine:ceramide transferase	-0,30	<u>-0,86</u>	<u>-0,87</u>
Metabolism RNA	Poly polymerase 10	<u>0,90</u>	0,33	<u>0,97</u>
Tissue Growth factor	Tyrosine-protein kinase receptor	<u>1,11</u>	<u>1,18</u>	1,11

Skinn

For skinn ble det gjennomført tre sammenligninger mellom behandlingsgrupper. Kontrollgruppen ble sammenlignet mot gruppen med badeksponering, gruppen med badeksponering (ECP), og mot gruppen med subkutan injeksjon. Antall gener som ble funnet forskjellig uttrykt var 23. Bare ett gen (splicing factor, arginine/serine-rich 15) ble oppregulert i alle grupper og fem gener endret uttrykk i to av tre gruppene (tabell 1). Det er imidlertid heller ikke forventet at de ulike eksponeringene skulle gi varige endringer i transkriptomet av immunresponser i skinn og nese, selv om intraperitoneal vaksinerings kan endre på responsen som detekteres i skinnen under en bakteriell infeksjon (Karlsen et al., 2023).

I sammenligningen mellom effekt av temperatur ble 32 individer på 8 °C sammenlignet med 24 individer på 4 °C. Bare 19 gener ble påvirket av temperaturforskjellene mellom 4 °C og 8 °C (Tabell 2). Den relativt høye andelen prøver vil redusere tilfeldige svingninger i transkriptomet. Samtidig er temperaturintervallet i forsøket på 8°- 4°C innenfor «normalsonen» til laksen, der evt endringer kompenseres med homeostatiske mekanismer slik at skinnvevet opprettholder en slags konstant. Det er mulig at uttrykksendringer finner sted under selve endringen av temperaturen, men disse forsvinner med tilpasning som i dette forsøket er under 3 uker.

Tabell 2 Differensiell ekspresjon av gener (DEG) i skinn mellom 4 °C og 8 °C etter overføring til sjøvann. Oppregulerte gener ved 8°C er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Gruppe	Gen	8 °C
Immune Lectin	Mannose-specific lectin precursor	0,82
Cell Folding, protein modification	Heat shock protein HSP 90-alpha	-1,15
Metabolism Inositol	Inositol-3-phosphate synthase A	-1,05
Cell Cytoskeleton microtubule	alpha-tubulin	-0,88
Cell Myofiber	myosin heavy chain	-1,32
Metabolism Lipid	Taurine transporter Taurine transporter	0,88
Cell Myofiber	Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	-0,82
Metabolism Sugar	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	-0,79
Tissue ECM mucus	GMP Giant mucus protein	1,27
Cell Myofiber	actin [Oncorhynchus keta]	-0,80
Cell Transcription	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	1,11
Cell Myofiber	myosin heavy chain	-1,13
Metabolism Lipid	Acyl-CoA synthetase family member 2_ mitochondrial	0,86
Cell Myofiber	creatine kinase-1	-0,95
Cell chromosome	High mobility group protein B3	-0,92
Immune	C1q-like adipose protein	0,84
Cell Cytoskeleton microtubule	Tubulin alpha-1A chain	1,46
Immune T cell	T-cell receptor alpha chain V region HPB-MLT precursor	0,82

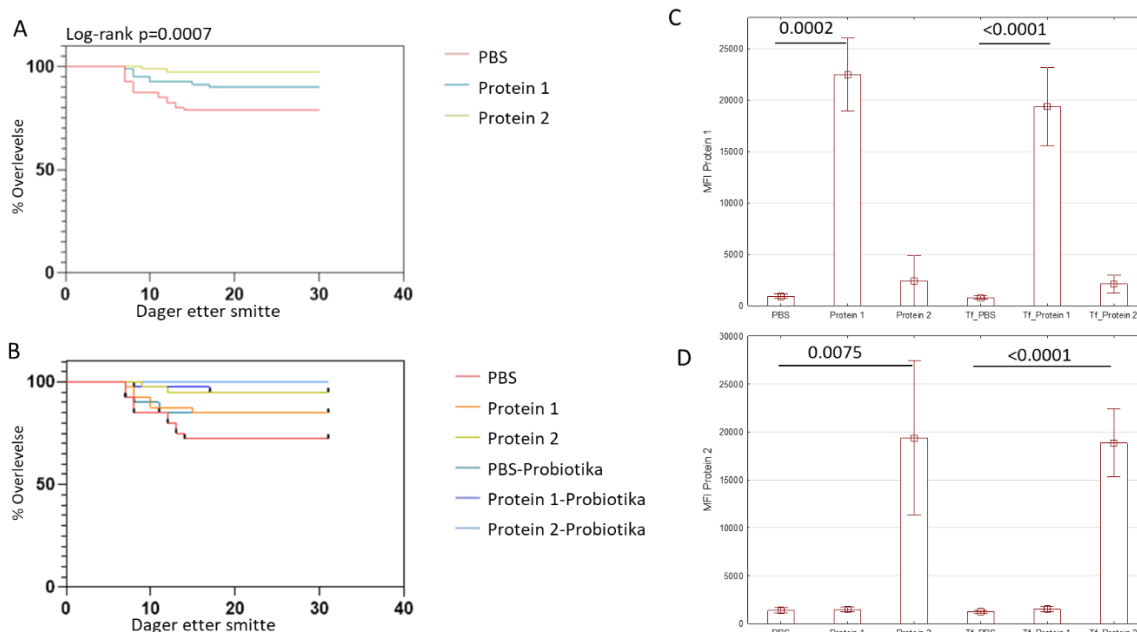
Del 2 - Vaksinasjon og smitte med *Tenacibaculum finnmarkense*

Formålet med forsøket var å undersøke om den tidligere dokumenterte responsen mot injiserte proteiner gav en beskyttende effekt i en smittemodell med *T. finnmarkense* ved 8 °C. Etter endt immuniseringsperiode ble fisken smittet med påfølgende sykdomsutvikling. Resultatene viser en forskjell i dødelighet mellom fisk som har fått PBS og fisk som er immunisert med rekombinante proteiner (Figur 7). I kontrollgruppen (PBS) døde 21.3 %, (17 av 80 fisk). I gruppen med protein 2 døde 2.5 % (2 av 80). Dette gir en relativ overlevelsesrate (RPS) på 88.2 %. Trend for grupper eksponert mot probiotika før smitte viser en numerisk lavere dødelighet for alle grupper. Ved å kombinere de tre gruppene

eksponert mot probiotika eller uten probiotikaeksponering, som gjennomsnitt av to tanker, har probiotikafisk en lavere dødelighet $p = 0.0286$ (log-rank test).

Serum ble sammenlignet for nivåer av antistoffer mot rekombinant protein_1 og rekombinant protein_2, ved bruk av BioPlex assay. Spesifikk antistoffrespons mot injisert protein ble igjen påvist for begge grupper både for fisk som var ueksponert mot smitte (kontroll) og fisk som ble prøvetatt etter smitte (Figur 7).

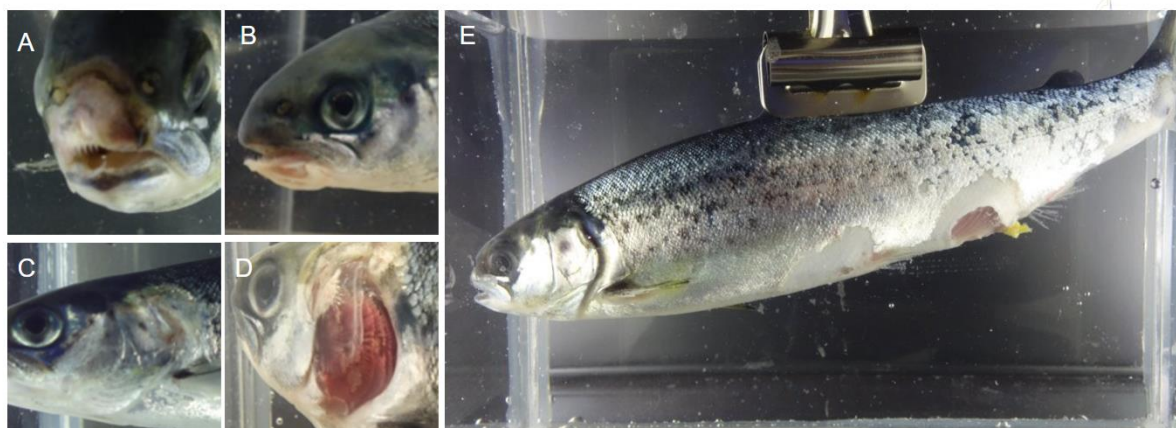
Resultatet indikerer et potensiale for bruk av rekombinant proteintechnologi til å redusere forekomsten av tenacibaculose hos laks etter sjøutsett.



Figur 7 Overlevelse etter smitte og nivåer av antistoffer mot Protein 1 og Protein 2 i serum fra atlantisk laks. A) % overlevelse som gjennomsnitt av fire tanker mellom immuniserte grupper vaksinert med enten PBS, Protein 1 eller Protein 2 var signifikant forskjellig ($p = 0,0007$: log-rank test). B) % overlevelse som gjennomsnitt av immuniserte grupper vaksinert med enten PBS, Protein 1 eller Protein 2 eksponert mot probiotika før smitte (2 tanker) eller uten probiotikaeksponering (2 tanker). C) Nivå av antistoff fra serum som binder seg til Bio-plex kuler kombinert med Protein 1. D) Nivå av antistoff fra serum som binder seg til Bio-plex kuler kombinert med Protein 2. Serum er hentet fra fisk injisert med PBS, Protein 1 eller Protein 2. $N = 8$ per gruppe for usmittet fisk, $n = 16$ per gruppe for smittet fisk (Tf_PBS, Tf_Protein 1, Tf_Protein 2). Data vises som gjennomsnitt av målt fluorescerende intensitet (MFI) med usikkerhetsstolper ± 95 % konfidensintervall. De respektive immuniserte gruppene var forskjellig for både Protein 1 og Protein 2. For enkelthet er bare sammenligning og signifikans vist mellom PBS og respektivt protein i usmittet og smittet grupper (Kruskal-Wallis test med Dunn's gruppesammenligninger).

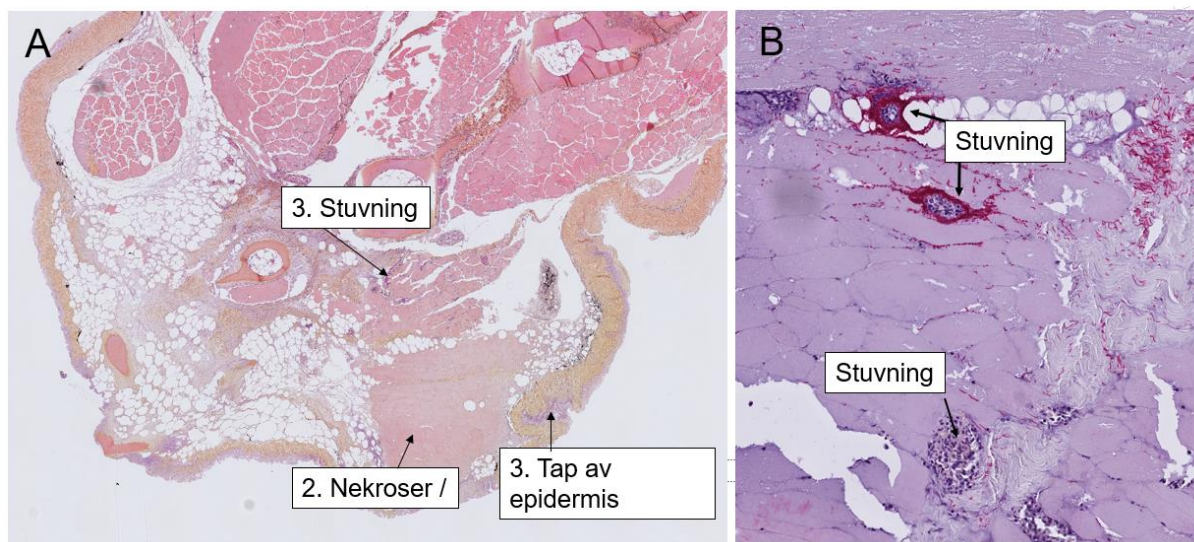
Makro – og histopatologiske analyser av fisk 4 og 5 dager etter smitte

Nylig død ($n = 5$) og døende fisk ($n = 9$) viste typiske tegn på tenacibaculose. Alle fiskene hadde ventrale sår i området rundt gattet (der de var merket med tag). Typiske hudlesjoner i ventralt hudområde med tap av skjell, og eller dype sår med en skjelløs randsone rundt eksponert muskelvev. *T. finnmarkense* ble reisolert på MA plater fra sårkant. Andre typiske funn var finneråte (frynsete finner, i noen tilfeller med eksponert benvev), lesjoner på kjeve og på gjellelokk. Vevsprøver ble tatt fra hud, gjelle, kjeve og kotelett av helkropp, samt lengdesnitt av hale.



Figur 8 Typiske makroskopiske lesjoner. A – B) Lesjon på kjeve / snute. C og D) Lesjoner på gjellelokk. E) Skjelltap langs buk, og sår ned til muskelen ved gatt.

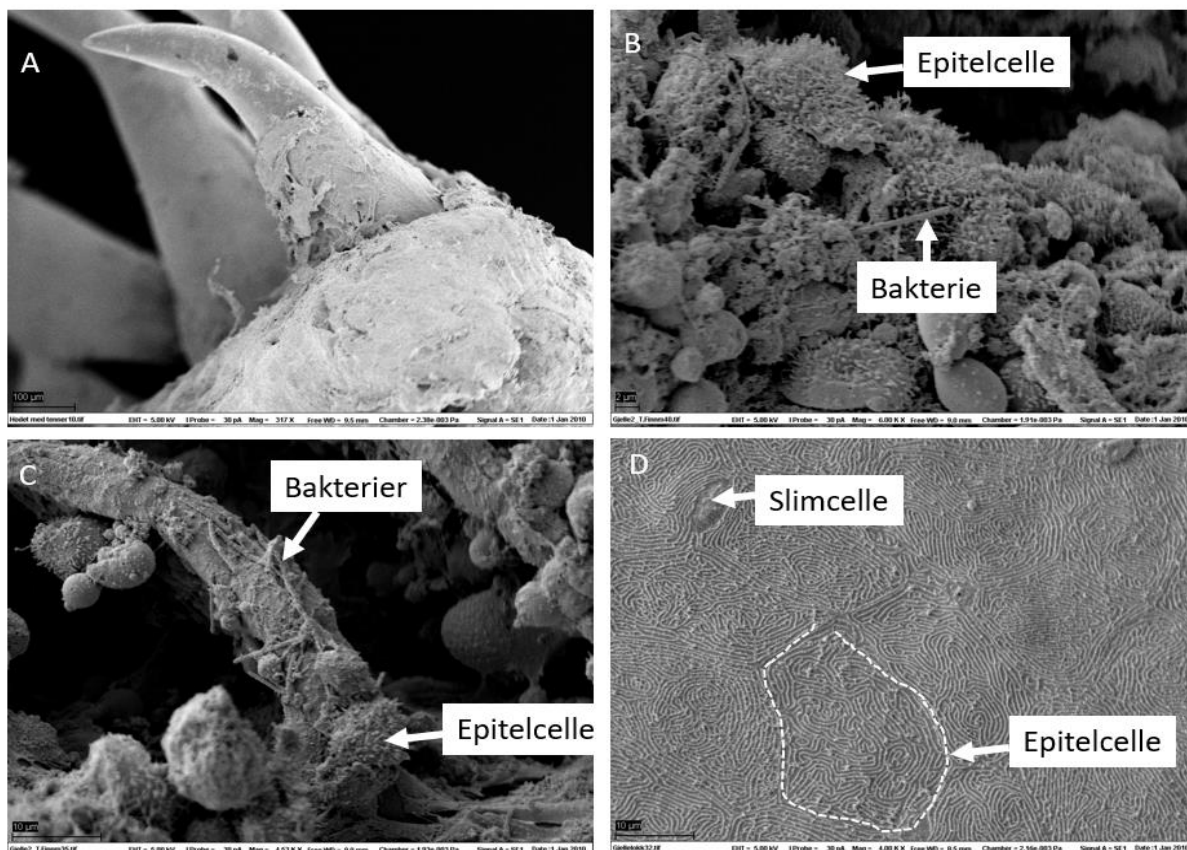
Typiske histopatologiske (Figur 9) lesjoner var i samsvar med en tidligere beskrivelse av *Tenacibaculum*-infeksjon hos atlantisk laks (Olsen et al., 2011). Lesjonene inkluderte tap av epidermis (nekroser og endret morfologi) og tap av dermis, med høy forekomst av filamentøse stavbakterier. I tillegg til tap av vev (epidermis og dermis), var det i alle prøver bakteriell tilstedeværelse i kollagenrikt vev (hud, myosept, og adventita (bindevevslaget rundt blodårer). Stuvning av små kapillærer og større blodårer var funn i samtlige prøver. Nekroser og hyalinisering av skjelettmuskulatur ble observert i kropp, i hodet (kjevemuskulatur), og muskler knyttet til gjelleapparatet, med fravær av betennelsesreaksjon. Tilstedeværelse av bakterien i fiskens kropp ble verifisert med immunmerking.



Figur 9 Vevssnitt fra laks (human end point) fire dager etter smitte med *T. finnmarkense*. A) Vevssnitt av skinn tatt fra gatt, med sår. Tap av epidermis, nekroser av skjelettmuskulatur, og stuvning av blodåre. Snittet er farget med HE og safran. Muskel farger rosa, kollagen farger gult. B) Vevssnitt av skinn fra laks med sår, +IHC for *Tenacibaculum* spp. med rød immunmerking.

SEM analyser av kjeve og gjelle (n = 2) viste filamentøse bakterier på overflaten av gjelle og hud. Epitelcellene i nærheten av bakterier viste varierende grad av endret morfologi (opprundet, og tap av kontakt med nabocellen). I en normal hud er epitelcellene flate, og koblet sammen i et sammenhengende lag med microridges (Figur 10 D). Videre viste SEM analyse av kjeve med eksponert

benstrukturer (ben og tenner) viser få funn av bakterier, dette kan tyde på at bakterien «forsviner» når kollagenfraksjonen er nedbrutt.



Figur 10 SEM bilder av hud fra laks. A) Tann fra laks, epitellaget er borte, ingen funn av bakterier i dette området. B) Bakterier og epitelceller på innsiden av gjellelokk. Epitelcellene endrer morfologi (opprundet form, med tap av struktur på microridges). C) Bakterier på gjellefilament. Samme struktur på epitelcellene som i B. D) SEM tatt av hud med intakte epitelceller.

Det kan videre være verdt å merke seg at histopatologiske undersøkelser av huden viste at dermis i mange tilfeller var intakt, mens det samtidig ble observert bakterier og nekroser i muskel. Ved makroskopiske undersøkelser av tilsvarende prøve fremstår skinn med intakt dermis som skjelltap. Videre er det ingen åpenbar sammenheng på størrelsen / dybden på hudsårene (observert makroskopisk), og dødelighet på fisken som er analysert 4-5 dager etter smitte.

Det er en generell oppfatning om at utbrudd med tenacibaculose kan knyttes til brudd i hudbarrieren, og det er et påfallende sammentreff i denne studien at samtlige fisk hadde sår i området rundt gatt, hvor alle fiskene var tagget.

Hovedfunn

- Stikkfri immunisering (badsmitte og nasal eksponering) med rekombinante proteiner førte ikke til detekterbare responser i skinnmukus eller serum i laks.
- Subkutan og intraperitoneal injisering med rekombinante proteiner gav antistoffresponser i serum mot de rekombinante proteinene og mot *T. finnmarkense* ekstracellulære produkter (ECP).
- Immunisering med rekombinante proteiner ga beskyttelse mot tenacibaculose i smittemodell med *T. finnmarkense*. Laveste dødelighet var 2.5 % mot 21.3 % i uvaksinert kontroll.

6 Leveranser

25.02.2021 Referat oppstartsmøte med prosjekt- og referansegruppe

30.06.2021 Statusrapport FHF

06.01.2022 Statusrapport FHF

07.02.2022 Referat fra prosjekt- og referansegruppemøte

01.06.2022 Abstracts fra presentasjoner foredrag/møter

30.10.2023 Animasjonsfilm

09.11.2023 Artikkel til et populærvitenskapelig medium og/eller Nofima sine nettsider

04.12.2023 Referat fra avsluttende prosjekt- og referansegruppemøte

29.04.2024 Rapportering gjennomgang utkast sluttrapport med referansegruppen

30.06.2024 Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

30.06.2024 Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

7 Referanser

- Avendano-Herrera, R., Toranzo, A.E., and Magarinos, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis Aquat Organ* 71(3), 255-266. doi: 10.3354/dao071255.
- Dehbanipour, R., and Ghalavand, Z. (2022). Anti-virulence therapeutic strategies against bacterial infections: recent advances. *Germs* 12(2), 262-275. doi: 10.18683/germs.2022.1328.
- Fernandez-Alvarez, C., and Santos, Y. (2018). Identification and typing of fish pathogenic species of the genus *Tenacibaculum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(23), 9973-9989. doi: 10.1007/s00253-018-9370-1.
- Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J.F., Olsen, A.B., Nilsen, H., et al. (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.
- Karlsen, C., Ytteborg, E., Furevik, A., Sveen, L., Tunheim, S., Afanasyev, S., et al. (2023). Early infection and transcriptional responses of intraperitoneal vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon. *Aquaculture* 572. doi: ARTN 739531
10.1016/j.aquaculture.2023.739531.
- Klakegg, O., Abayneh, T., Fauske, A.K., Fulberth, M., and Sorum, 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. doi: 10.1111/jfd.12982.
- Olsen, A.B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sørum, H., and Colquhoun, D.J. (2011). *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* 94(3), 189-199.
- Simon, R., Docando, F., Nunez-Ortiz, N., Tafalla, C., and Diaz-Rosales, P. (2021). Mechanisms Used by Probiotics to Confer Pathogen Resistance to Teleost Fish. *Front Immunol* 12, 653025. doi: 10.3389/fimmu.2021.653025.
- Småge, S., Brevik, Ø., Duesund, H., Ottem, K., Watanabe, K., and Nylund, A. (2016a). *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov., a fish pathogenic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from Atlantic salmon. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-13. doi: 10.1007/s10482-015-0630-0.
- Småge, S.B., Frisch, K., Brevik, Ø.J., Watanabe, K., and Nylund, A. (2016b). First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture* 464, 178-184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.030>.
- Småge, S.B., Frisch, K., Vold, V., Duesund, H., Brevik, Ø.J., Olsen, R.H., et al. (2018). Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. *Aquaculture* 495, 858-864. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.063>.