



Sårbakterier i sjøbasert lakseoppdrett – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbipasserende?

Faglig sluttrapport FHF-prosjekt 901838

RAPPORT 23/2026

Faglig sluttrapport FHF-prosjekt 901838

Sårbakterier i sjøbasert lakseoppdrett – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbipasserende?

Forfattere

Snorre Gulla, Hanne Nilsen, Karin Lagesen, Anne Berit Olsen, Bjørn Spilsberg, Ottavia Benedicenti, Saima Nasrin Mohammad, Faisal Suhel, Raoul Valentin Kupier, Maryam Saghafian, Magnus Nygård Osnes, Synne Aurora Pettersen-Dahl, Irene Roalkvam, Duncan Colquhoun (alle Veterinærinstituttet)

Redaktør

Snorre Gulla

Forslag til sitering

Gulla S, Nilsen H, Lagesen K, Olsen AB, Spilsberg B, Benedicenti O, Mohammad SN, Suhel F, Kuiper RV, Saghafian M, Osnes MN, Pettersen-Dahl SA, Roalkvam I, Colquhoun D. Sårbakterier i sjøbasert lakseoppdrett – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbipasserende? Sluttrapport FHF-901838, Veterinærinstituttets rapportserie 23-2026, Veterinærinstituttet 2026. © Veterinærinstituttet, kopi tillatt med henvisning.

Kvalitetssikret av

Ingunn Sommerset (Avdelingsdirektør, Veterinærinstituttet) og Trude Vrålstad (Seksjonsleder, Veterinærinstituttet)

Oppdragsgiver

FHF-Fiskeri og Havbruksnæringens Forskningsfinansiering: prosjekt FHF-901838



Publisert

2026 på www.vetinst.no

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)

© Veterinærinstituttet 2026

Kolofon

Forsidebilde: Arve Nilsen, Veterinærinstituttet

www.vetinst.no

Innhold

1	Sammendrag/Summary.....	3
	Norsk sammendrag.....	3
	English summary.....	4
2	Innledning.....	5
	Faglig bakgrunn.....	5
	Prosjektets omfang og organisering	6
3	Problemstilling og formål.....	7
4	Prosjektgjennomføring	8
	Vannprøver (AP1).....	8
	qPCR metodeutvikling (AP1).....	9
	Sårdiagnostikk (AP1).....	11
	<i>Moritella viscosa</i> helgenomsekvensering og bioinformatikk (AP2).....	11
	<i>Tenacibaculum finnmarkense</i> helgenomsekv. og bioinformatikk (AP2)	11
	<i>In situ</i> hybridisering (AP2).....	12
	<i>Aliivibrio wodanis</i> helgenomsekvensering og bioinformatikk (AP3).....	12
	<i>Aliivibrio wodanis</i> fenotypiske studier og hemningsforsøk (AP3).....	13
5	Oppnådde resultater og diskusjon.....	14
	Design og validering av spesifikke qPCR-metoder for sjøvannsprøver	14
	Overordnede funn fra qPCR-screening.....	14
	qPCR-resultater sett opp imot geografi, prøvetype og sesong.....	15
	qPCR-funn fra enkeltlokalteter	18
	Bakteriologiske funn fra sårdiagnostikk.....	21
	<i>Moritella viscosa</i> helgenomsekvensering og bioinformatikk.....	22
	Oppdatert kunnskap om <i>T. finnmarkense</i> 's populasjonsstruktur	24
	Mulige virulensdeterminanter i <i>Tenacibaculum finnmarkense</i>	26
	<i>In situ</i> hybridisering	27
	Beskrivelse av <i>A. wodanis</i> ' populasjonsstruktur og variant-forskjeller.....	28
	Avsluttende betraktninger	31
	Næringsnyttige læringspunkter	32
6	Hovedfunn og konklusjoner.....	33
7	Referanser.....	34
8	Faglige leveranser	36

1 Sammendrag/Summary

Norsk sammendrag

Med bakgrunn i eskalerende sårproblemer innen sjøbasert oppdrett av atlantisk laks i Norge ble dette prosjektet igangsatt, og strakk seg fra våren 2023 til våren 2026. Det var fra før kjent at bakteriene *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum finnmarkense*, og spesifikke varianter av disse, er viktige bidragsyttere til slik sårutvikling. Imidlertid forelå svært lite kunnskap om hvordan smittepresset fra disse bakteriegruppene, via sjøvann, arter seg gjennom året og langs norskekysten. Det var heller ikke kjent hvorfor de spesifikke variantene, som eksisterer mot en mangfoldig bakgrunn av andre og i mindre grad sår-assosierte varianter, er såpass dominerende. Samtidig isoleres også *Aliivibrio wodanis* ofte fra laks med sår i sjø, men man visste lite eller ingenting om populasjonsstrukturen til denne arten, og evt. eksistens av mer og mindre sår-assosierte varianter.

For å undersøke smittepress i sjøvann ble det utviklet et batteri bestående av syv qPCR-metoder spesifikke på ulike taksonomiske nivåer – tre for arten *M. viscosa* inkl. tilhørende varianter, og fire for slekten *Tenacibaculum* inkl. tilhørende arter og varianter. Over en periode på halvannet år ble ukentlig sjøvannsprøver samlet og filtrert fra totalt åtte oppdrettslokaliteter, fordelt på produksjonsområde 3, 6 og 12. Prøvene ble så analysert med de utviklede qPCR-metodene, hvorpå man påviste en klar kobling mellom kalde sjøtemperaturer og økt smittepress fra *M. viscosa*, *T. finnmarkense*, og varianter av disse. Selv om smittepresset jevnt over var høyere inne i merdene, viste begge artene seg å være naturlig prevalente også utenfor oppdrettsanleggene. På flere enkeltlokaliteter ble det videre påvist økt innslag av disse bakteriene, og/eller varianter av dem, i sjøvannet få uker før andelen dødfisk med sårregistrering også begynte å øke. Dette peker på qPCR-screening av sjøvann som et potensielt biosikkerhetsverktøy, f.eks. i planleggingen av operasjoner som kan medføre stress og mekanisk påkjenning for fisken.

Selv om en stor samling genomer fra isolater av *M. viscosa* og *T. finnmarkense* ble opparbeidet, lyktes vi ikke i å påvise noen sikre koblinger mellom genetiske elementer hos de nevnte variantene og deres evne til å gi sår hos laks. En rekke interessante kandidatgener av mulig betydning for interaksjon med omgivelsene, inkludert verten, ble likevel identifisert. Blant disse var genvarianter antatt knyttet til overflatestrukturer og membranprosesser hos laks-assosierte *M. viscosa*. I tillegg fant vi indikasjoner for et (foreløpig uidentifisert) mulig plasmid i *Tff-LDC* varianten av *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*, som fremdeles er den dominerende varianten hos norsk laks med tenacibaculose. Ytterligere studier er imidlertid nødvendig for å undersøke dette videre og evt. verifisere sammenhenger, men dersom slike finnes kan de være av mulig betydning bl.a. for vaksineutvikling. Utfordringer påstøtt under dette arbeidet gjenspeiler ellers et gjentakende problem ved analyse av genomer fra fiskepatogene bakterier, nemlig at disse og deres nære slekninger gjerne i svært liten grad er representert i eksisterende referanse-databaser med funksjonelt karakteriserte gener.

Gjennom helgenomsekvensering av en stor samling *A. wodanis* isolater ble populasjonsstrukturen til denne arten for første gang beskrevet. Dette viser en genetisk heterogen art, og at én av tre hoved-varianter dominerer hos norsk oppdrettslaks med sår, selv om alle tre er vidt utbredt langs hele norskekysten. Vi fant ikke grunnlag for å utpeke én av variantene som spesielt virulent, men observerte en rekke genetiske og fenotypiske forskjeller av potensiell relevans, både mellom og innad i variantene. Samtidige infeksjoner med ulike genetiske varianter av *A. wodanis* i samme fisk virker å være vanlig.

Det sistnevnte fenomenet, med multi-variant kolonisering av enkeltfisk, er også tidligere dokumentert både for *M. viscosa* og *T. finnmarkense*, selv om spesifikke varianter innad i hver av disse artene er overrepresentert fra laks med sår. I sum kan dette støtte oppunder oppfatningen av at de sårlidelsene man ser hos oppdrettslaks i sjø i Norge ofte ikke er av ren infeksjons karakter, men i omfattende grad også involverer produksjonsrelaterte elementer i forkant av infeksjonene. Dette vil kunne tilrettelegge for direkte kolonisering av skadet eller på annen måte svekket fisk fra et mangfoldig bakterioplankton, der flere varianter tilhørende samme bakterieart kan være tilstede samtidig, om enn med ulik kapasitet til å kolonisere laks og evt. forårsake eller forverre hudsår.

English summary

Based on escalating ulcer problems in sea-based Atlantic salmon farming in Norway, this project was initiated, running from spring 2023 to spring 2026. It was already known that the bacteria *Moritella viscosa* and *Tenacibaculum finnmarkense*, and specific variants of these, are key contributors to ulcer development. However, very little was known about how infection pressures from these bacterial groups, via seawater, varies throughout the year and along the Norwegian coastline. It was also unclear why certain variants, within a heterogeneous background of others less associated with ulcers, are so dominant. At the same time, *Aliivibrio wodanis* is also frequently isolated from sea-farmed salmon with ulcers, but little was known about its population structure or the existence of more or less ulcer-associated variants.

To investigate infection pressures in seawater, a panel of seven qPCR-assays targeting different taxonomic levels was developed – three for *M. viscosa* and associated variants, and four for the genus *Tenacibaculum* and associated species and variants. Over one and a half years, weekly seawater samples were collected and filtered from eight farming sites across production areas 3, 6, and 12. Sample analysis with the developed qPCR-assays revealed a clear association between low sea temperatures and increased infection pressures from *M. viscosa*, *T. finnmarkense*, and variants of these. Although levels were generally higher inside cages, both species were also naturally prevalent outside aquaculture facilities. At several sites increased detection of these bacteria, and/or variants thereof, was also registered in seawater a few weeks prior to a following rise in the proportion of fish mortalities observed with ulcers. This suggests that qPCR-screening of seawater may serve as a useful biosecurity tool, e.g. when planning operations that may cause stress or physical harm to the fish.

Although a large collection of genomes from *M. viscosa* and *T. finnmarkense* isolates was established, no clear links were ascertained between specific genetic elements and the ability of certain variants to cause ulcers in salmon. Still, several candidate genes of potential relevance for environmental and host interactions were identified. These included gene variants presumably related to surface structures and membrane processes in salmon-associated *M. viscosa*. In addition, a possible (yet unidentified) plasmid was indicated in the *Tff*-LDC variant of *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*, which continues to dominate among Norwegian salmon with tenacibaculosis. Further studies are however needed to further investigate and possibly verify any connections, but if such exist, they may be of potential relevance for vaccine development. This work also highlighted a recurring challenge when analysing genomes from fish-pathogenic bacteria, namely that these and their close relatives are often poorly represented in reference databases for functionally characterised genes.

Whole-genome sequencing of a large number of *A. wodanis* isolates allowed the population structure of this species to be described for the first time. The results show a genetically heterogeneous species, with one of three main variants dominating in Norwegian farmed salmon with ulcers, although all three are widely distributed along the coast. No single variant could be defined as particularly virulent, but several genetic and phenotypic differences of potential relevance were observed both between and within variants. Simultaneous infections with multiple genetic variants in the same fish appear to be common.

This phenomenon of multi-variant colonisation in individual fish has also been documented for *M. viscosa* and *T. finnmarkense*, although certain variants within each of these species are overrepresented in salmon with ulcers. Overall, this supports the view that ulcer conditions in Norwegian sea-farmed salmon are often not purely infectious, but may also commonly involve production-related factors preceding infection. This may facilitate colonisation of damaged or weakened fish from a diverse bacterioplankton community, where multiple variants of the same bacterial species can coexist, albeit with differing capacities to colonise salmon and in turn cause or exacerbate skin ulcers.

2 Innledning

Faglig bakgrunn

Sårtilstander i sjøfasen av norsk lakseoppdrett har i mange år medført betydelige helse- og velferdsproblemer, samt økonomiske tap. Ved prosjektets oppstart i 2023 hadde problemene gjennom foregående år vokst vesentlig i omfang, parallelt med økende bruk av ikke-medikamentell avlusning. I sammendraget til Veterinærinstituttets årlige fiskehelse rapport for 2022 ble derfor både sår og skader ved avlusningsoperasjoner trukket frem blant de tre viktigste helse relaterte utfordringene som næringen stod ovenfor (Sommerset, 2023). Her inngår både infeksjøs og ikke-infeksjøs sårlidelser, selv om disse ofte kan gli over i hverandre, og blant de infeksjøs forekommer både såkalt sommer- og vintersår, hvorav sistnevnte nok forårsaker de største problemene på landsbasis. Gjennom de påfølgende årene har bl.a. en ny vintersår-vaksine blitt lansert og tiltatt i bruk, noe som kan ha bidratt til å bedre situasjonen noe. Selv om sårproblemer samlet sett kanskje ikke har blitt verre siden 2023, så rangeres imidlertid utfordringer med både spesifikke og uspesifikke sårtilstander hos laks i matfiskfasen høyt også i fiskehelse rapporten for 2025, hvor spesielt betydningen for redusert velferd vektlegges tungt av fiskehelsepersonell i felt (Appendix B1; Moldal et al., 2026).

Det er ofte utfordrende å etablere en sikker etiologi for utviklingen av sårlidelser hos oppdrettslaks, som i mange tilfeller vil omfatte et komplekst samspill mellom vert, agens, og det miljøet disse sameksisterer i. En rekke mer og mindre velkjente marine bakteriearter kan ofte dyrkes samtidig fra slike sår, men flere av disse representerer sannsynligvis bare et øyeblikksbilde av mikrofloraen i sjøvannet som omgir laksen. Vekst fra indre organer, som nyre, kan styrke mistanken, men heller ikke dette trenger nødvendigvis å reflektere primærårsak til sykdom. Fisken kan av ulike årsaker ha vært svekket forut for infeksjonen, samtidig som noen sårpatogener primært forekommer som overfladiske infeksjoner. Likevel har kunnskapsbygging gjennom diagnostikk, smitteforsøk, og studier over tid tydeliggjort at bakterieartene *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum finnmarkense* kan opptre som primære årsaker til sår hos atlantisk laks, spesielt ved lave vanntemperaturer, og de forbindes gjerne hhv. med tilstandene 'klassisk' og 'ikke-klassisk' vintersår (eller tenacibaculose) (bl.a. Løvoll et al., 2009; Småge et al., 2018). Årlig påvises begge, enten alene eller i saminfeksjon, fra et stort antall oppdrettsanlegg langs hele norskekysten. Det samme gjelder også for *Aliivibrio wodanis* og noen andre arter innen *Tenacibaculum*-slekten, selv om disse har en mer uavklart rolle mtp. evne til å forårsake sårutvikling. Det er de tre bakterieartene nevnt over, alle knyttet til ulike former for vintersår, som har vært hovedfokus for denne studien.

Senere års forskning bl.a. ved Veterinærinstituttet har vist at det finnes mange genetiske varianter av både *M. viscosa* og *T. finnmarkense*, men at noen få av disse påvises spesielt ofte fra norsk oppdrettslaks med sår. For *M. viscosa* er det genotypene CC1 og CC3 som gjennom mange år har dominert hos laks, mens et stort antall øvrige genotyper hovedsakelig finnes fra andre fiskearter (Sørgaard et al., 2023). Et lite antall andre *Moritella*-arter er også beskrevet, men de fleste av disse antas å leve på store havdyp (Nogi, 2017). *T. finnmarkense* kan på sin side deles inn i to genomvarianter, hhv. *gv. finnmarkense* og *gv. ulcerans*. En variant av førstnevnte (*Tff-LDC*) var spesielt vanlig forekommende fra laks med sår i 2018 og 2019 (Spilsberg et al., 2022), hvor den ble påvist fra nær sagt alle undersøkte sårutbrudd, gjerne i saminfeksjon med andre genetiske varianter av både *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense* og *gv. ulcerans*. I tillegg til *T. finnmarkense* og varianter av denne, påvises også tidvis *T. dicentrarchi* og *T. piscium* fra laks med sår, mens over 30 andre *Tenacibaculum*-arter også er beskrevet fra diverse marine opphav, bl.a. langs norskekysten (Olsen et al., 2017, 2020; Småge et al., 2016).

Selv om et relativt tydelig bilde etter hvert har dannet seg mtp. hvilke genetiske varianter av *M. viscosa* og *T. finnmarkense* som er mest bidragsytende, eller i alle fall vanlige, ved sårproblematikk hos oppdrettslaks, så er bakgrunnen for dette uviss. F.eks. er det ukjent hvorvidt disse besitter spesielle sårfremmende egenskaper som ikke finnes hos andre varianter. Videre har kunnskapsnivået omkring disse bakterienes naturlige forekomst i sjøen også vært lavt, og hvilken biosikkerhetsrisiko det til enhver tid gjeldende smittepresset fra sjøvann kan utgjøre, har derfor i all vesentlighet vært ukjent. Når det gjelder *A. wodanis* så har det relativt lave antallet tidligere studier rundt denne arten som regel kun involvert én eller noe svært få bakteriestammer, og kunnskap om populasjonsstrukturen og evt. eksistens av spesielt sår-assosierte varianter har derfor vært mangelfull.

Prosjektets omfang og organisering

Prosjektet ble ledet av, og i hovedsak utført ved, Veterinærinstituttet (VI). Prosjektleder var Snorre Gulla (VI). Samarbeidspartnere var Lerøy Seafood Group, Grieg Seafood og Hardingsmolt. FHF-observatør var Morten Lund, og referansegruppen bestod av Monica Gausdal Tingbø (Pharmaq AS), Aslaug Ness (MSD Animal Health Innovation AS), Sverre Bang Småge (Cermaq Group AS), Ragnar Thorarinsson (tidl. Elanco Denmark ApS Norway Branch AS - Elanco Aqua, nå MSD Animal Health Innovation AS) og Asgeir Østvik (tidl. Åkerblå AS).

Prosjektet ble formelt inndelt i én administrativ arbeidspakke (AP0), tre faglige arbeidspakker (AP1-3) og én arbeidspakke for kommunikasjon (AP4). En kortfattet oppsummering om de tre faglige arbeidspakkene følger under, med nærmere beskrivelse av de konkrete aktivitetene i kapittel 4. I tillegg til de som er nevnt under hver arbeidspakke, bidro et stort antall personer til gjennomføringen av de ulike delene av prosjektet, både ved Veterinærinstituttet og ved de involverte oppdrettselskapene.

Arbeidspakke 1 (AP1)

- Arbeidstittel: Kartlegging av *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* smittepress i sjøvann
- Leder: Duncan Colquhoun (VI)
- Øvrige: Anne Berit Olsen, Hanne Nilsen, Ottavia Benedicenti, Bjørn Spilsberg, Saima Nasrin Mohammad, Faisal Suhel og Snorre Gulla (alle VI); Lerøy; Grieg; Hardingsmolt
- Aktiviteter:
- Utvikling av et panel spesifikke qPCR-metoder
 - Utvikling av prøvetakingsprotokoll og innsamling av sjøvannsprøver til qPCR screening
 - Utvidet mikrobiologisk sårdiagnostikk

Arbeidspakke 2 (AP2)

- Arbeidstittel: Identifikasjon av genetiske determinanter for sår- og vertsassosiasjon hos *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum finnmarkense*
- Leder: Karin Lagesen (VI)
- Øvrige: Anne Berit Olsen, Raoul Valentin Kuiper, Magnus Nygård Osnes, Maryam Saghafian og Snorre Gulla (alle VI)
- Aktiviteter:
- Helgenomsekvensering av utvalgte *M. viscosa* og *T. finnmarkense* isolater
 - Bioinformatiske analyser inkl. genome-wide association studies (GWAS)
 - Utvikling av *in situ* hybridiseringsmetodikk

Arbeidspakke 3 (AP3)

- Arbeidstittel: Fylogenetisk populasjonsstudie av *Aliivibrio wodanis* assosiert med sår hos oppdrettslaks
- Leder: Hanne Nilsen (VI)
- Øvrige: Duncan Colquhoun, Synne Aurora Pettersen-Dahl, Irene Roalkvam og Snorre Gulla (alle VI)
- Aktiviteter:
- Helgenomsekvensering av utvalgte *A. wodanis* isolater
 - Bioinformatiske analyser
 - Fenotypisk karakterisering inkl. hemningsforsøk

3 Problemstilling og formål

Med bakgrunn i en økende sårproblematikk innen norsk oppdrettsnæring ved prosjektets oppstart, var det overordnede målet å frembringe ny og oppdatert kunnskap som direkte eller indirekte kunne bidra med å avhjelpe denne situasjonen. Mer konkret ønsket vi å utvikle høypresisjons screening-verktøy for kartlegging av spesifikke sårbakteriers relative og totale tilstedeværelse i sjøvann, i og rundt oppdrettsanlegg, og relatere dette til bl.a. sesong, geografi og sårsituasjon. Parallelt med dette ville vi også øke forståelsen av populasjonsstrukturen, og evt. sårforekommende egenskaper, hos disse bakteriene, samt utvikle spesifikke diagnostiske verktøy.

I sum ville dette fylle flere store kunnskapshull omkring de sårproblemene som oppdrettsnæringen står ovenfor. Det ble ansett som sannsynlig at utviklede verktøy og funn fra prosjektet ville kunne få en praktisk nytteverdi bl.a. for valg av vaksinestrategier/-stammer og optimalisering av rutiner i forbindelse med håndterings-intense operasjoner som kan medføre stress og hudskader. Eksempelvis kan dette være å unngå utsett/håndtering ved påvisning av spesielt høyt naturlig smittepress i sjøen.

For å imøtegå dette ble hoved- og delmålene under formulert ved prosjektstart. Gjennom prosjektperioden ansees det at alle disse målene er besvart og/eller behørig adressert, med unntak av delmål 2 som ikke lot seg undersøke nøye pga. en relativt lav mengde prøver innkommet til sårdiagnostikk.

Hovedmål: Å generere kunnskap om hvorfor spesifikke varianter av *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum finnmarkense* er overrepresentert blant isolater dyrket fra oppdrettslaks i sjø med sår.

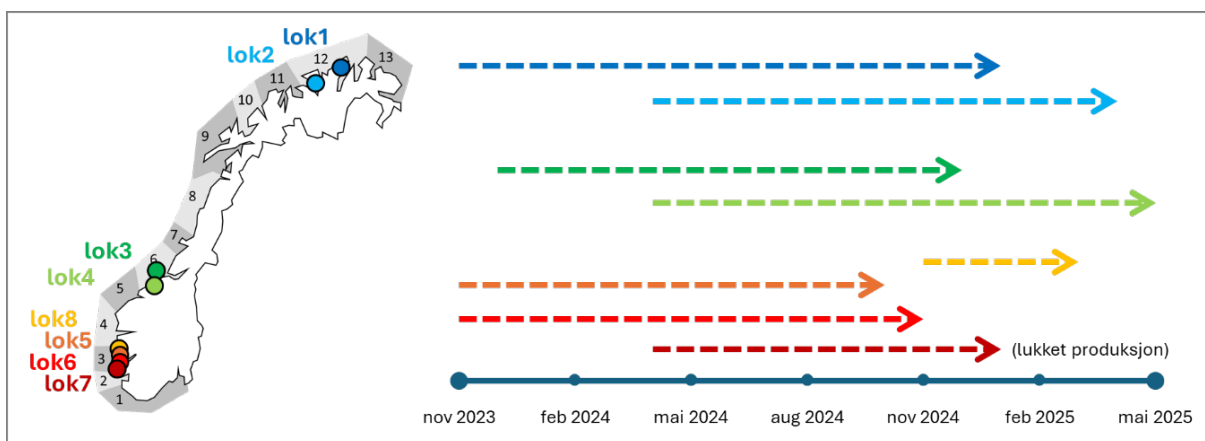
Delmål

1. Å kartlegge i hvilken grad de variantene av *T. finnmarkense* og *M. viscosa* som til enhver tid dominerer hos laks med sår gjenspeiler (og dermed styres av) bakteriepopulasjonenes relative og totale sammensetning i sjøvann, og om eventuelle svingninger kan knyttes til geografi og/eller sesong.
2. Å etablere hvorvidt enkelte *Tenacibaculum*- og/eller *M. viscosa*-varianter forekommer hyppigere i tidlige faser av sårutbrudd, mens andre mulig mindre virulente eller avirulente varianter følger etter i senere faser.
3. Å identifisere det genetiske grunnlaget for virulens/vertsspesifisitet hos sårassosierte varianter av *M. viscosa* og *T. finnmarkense*.
4. Å kartlegge genetisk diversitet blant *Aliivibrio wodanis* og hvorvidt spesifikke varianter fremstår som tettere assosiert med sår hos laks.

4 Prosjektgjennomføring

Vannprøver (AP1)

Basert på tilgjengelighet og planlagt utsett av fisk, og med en antagelse om at disse ville bli stående på anlegget gjennom prøvetakingsperioden, ble seks matfisk-lokaliteter (lok1-2 i PO12, lok3-4 i PO6 og lok5-6 i PO3) tilhørende Lerøy og Grieg utvalgt for deltagelse i prosjektet (Figur 4.1). Etter prosjektoppstart ble også en lokalitet (lok7) med lukket produksjon i PO3 fra Hardingsmolt innlemmet etter eget initiativ. En åttende lokalitet (lok8) ble lagt til mot slutten av perioden som erstatning for lok5, som av praktiske årsaker måtte avslutte prøvetakingen.

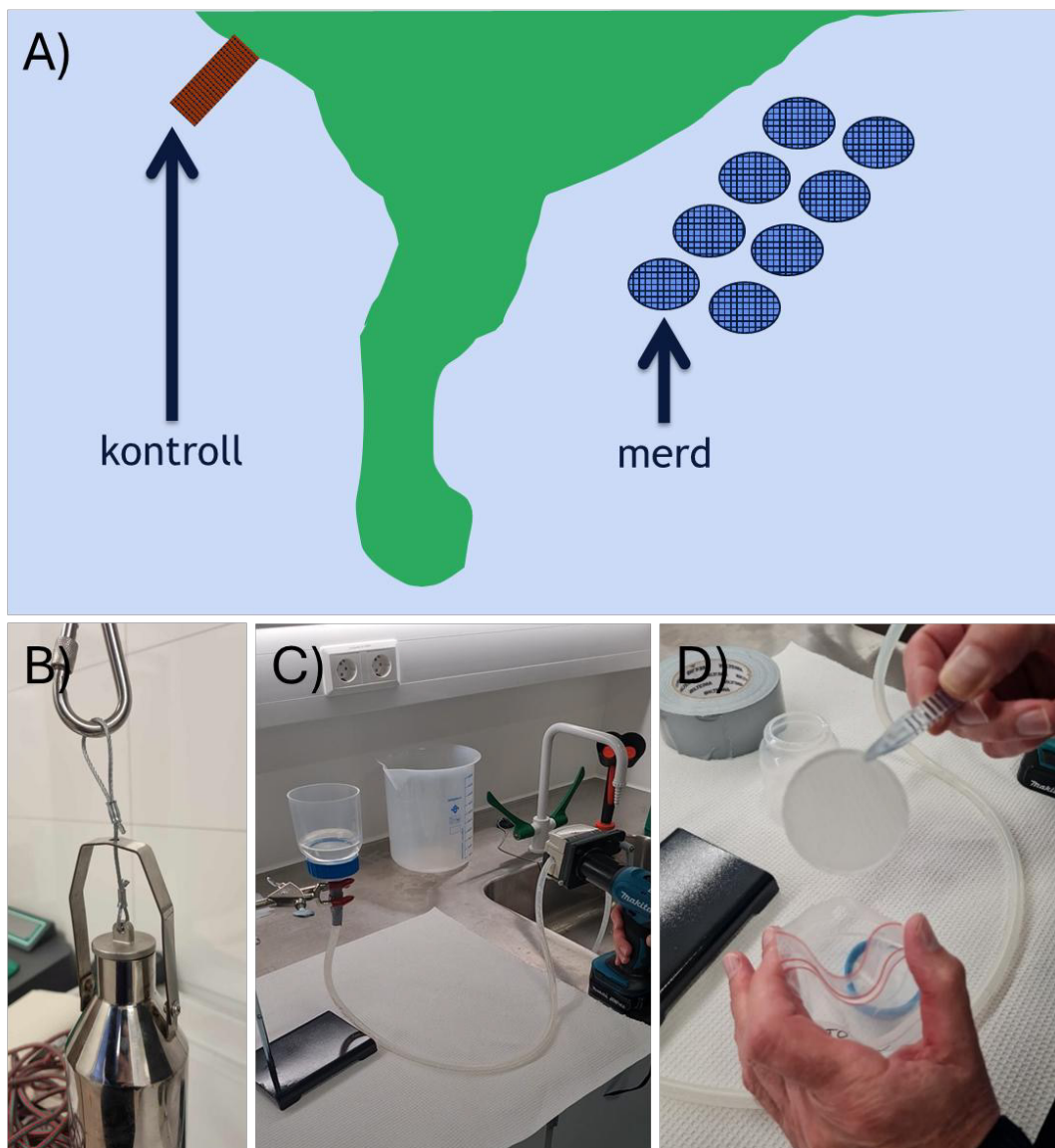


Figur 4.1. Geografisk lokalisering av de åtte involverte lokalitetene, samt tidsspenn for uttak av sjøvannsprøver til *M. viscosa* og *Tenacibaculum* qPCR-screening.

Forut for oppstart besøkte medlemmer av prosjektgruppen hver av de deltagende lokalitetene for opplæring og overlevering av nødvendig utstyr for prøvetakingen. Her ble det bestemt hvilken fiskegruppe/merd som skulle følges med prøvetaking, samt at et nærliggende kontrollpunkt ble valgt for representasjon av naturlig sjøvann i området (eksempellustrasjon i Figur 4.2A). Kriterier som ble hensyntatt ved valg av kontrollpunkt var nødvendigvis individuelle for hver lokalitet, men utover praktisk tilgjengelighet omfattet disse bl.a. fysisk avstand, barrierer i terrenget, og strømretning, slik at det skulle være minimalt utsatt for vanntilsg fra selve lokaliteten. Mulighet for påvirkning fra nærliggende vassdrag og/eller menneskelig aktivitet (kloakkutløp etc.) ble også tatt med i betraktningen. Fra lok7, med lukket produksjon, ble det også tatt prøver av inntaksvannet, som kom fra 40-45 m dyp.

Prøvetaking av vann ble utført med en spesialdesignet flaske (Figur 4.2B) som i tom og lukket tilstand ble heist ned til 7 m dyp, hvorpå korken ble dratt ut med et festet tau, slik at flasken fyltes opp først på dette dypet. Det ble på denne måten gjennomført (med noen avvik) ukentlig prøvetaking av tre biologiske replikater à 500 ml sjøvann fra merd og kontrollpunkt ved hver lokalitet gjennom de respektive prøvetakingsperiodene. Figur 4.1 viser tidslinjen for uttakene, selv om uforutsette hendelser iblant forårsaket korte oppbrudd i prøvetakingen på enkeltlokaliteter.

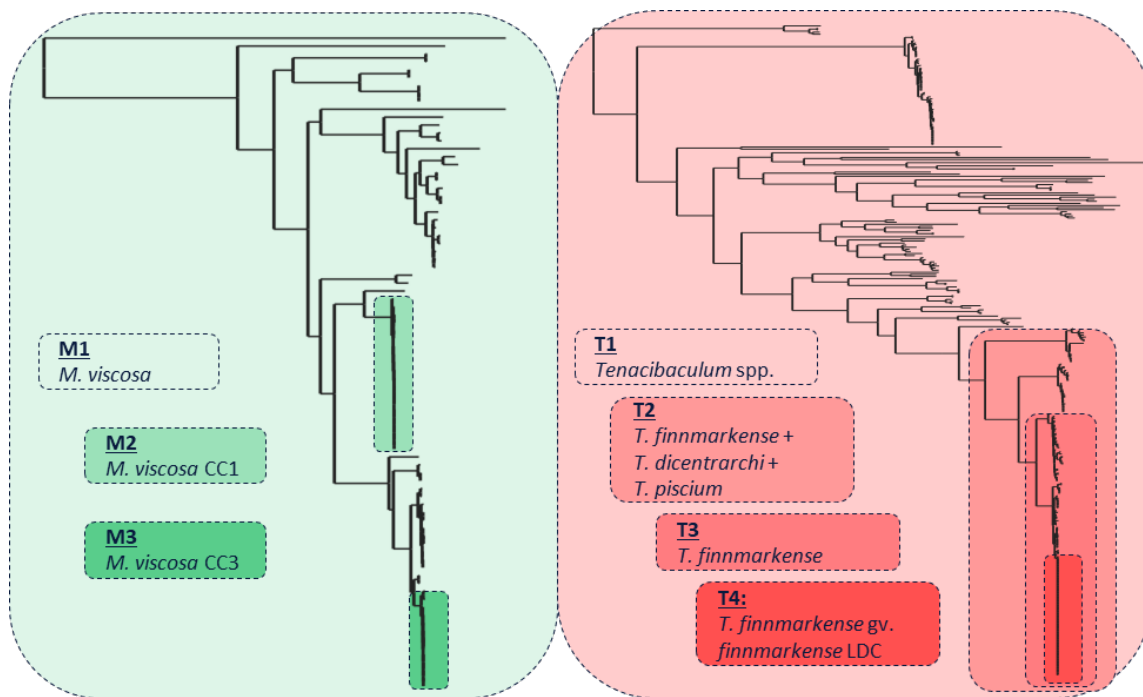
Kort tid etter innsamling ble sjøvannprøvene, på lokalitetene, filtrert vha. et drillpumpesystem og en protokoll tidligere brukt i FHF-prosjektene 901505 (Colquhoun et al., 2022) og 901680 (Colquhoun et al., 2024). Hver vannprøve ble pumpet gjennom et filter med 0.45 µm porer, dvs. små nok til å fange opp de aller fleste bakterieceller. Figur 4.2C viser drillpumpesystemet oppsatt, der én filterkopp ble brukt per vannprøve, og de sirkulære filtrene i bunn av denne (Figur 4.2D) etterpå ble lagret lukket og nedfrost i påvente av nedkjølt forsending til Veterinærinstituttet. Etter ankomst til laboratoriet, ble total-DNA ekstrahert fra to av de tre biologiske replikatene (filtrene) før qPCR-screening som beskrevet under.



Figur 4.2. En eksempelgrafikk (A) viser hvor kontrollpunkt for vannprøvetaking kunne legges for å minimere påvirkningen fra den aktuelle oppdrettslokaliteten. Bildene viser (B) en av flaskene brukt til prøvetakingen, (C) drillpumpesystemet for filtrering av vannprøvene, og (D) et filter tilsvarende de som ble benyttet og senere analysert med qPCR'er.

qPCR metodeutvikling ([AP1](#))

Vi utviklet syv spesifikke qPCR-metoder for påvisning av sår bakterier i sjøvann. Tre av disse er rettet mot *M. viscosa* – ett spesifikt for arten som helhet (M1); ett for CC1-varianten (M2); og ett for CC3-varianten (M3). De fire andre er rettet mot *Tenacibaculum* på ulike taksonomiske nivåer – ett spesifikt for slekten som helhet (T1); ett for de tre klinisk relevante (og nært beslektede) artene *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* og *T. piscium* (T2); ett for arten *T. finnmarkense* (T3); og ett for under-varianten *Tff-LDC* (T4). Se også Figur 4.3. Med denne tilnærmingen ville vi kunne undersøke evt. naturlige svingninger over tid og sted, innen og mellom lokaliteter, i sjøbårent smittepress fra de spesifikke variantene som er tettest assosiert med sår hos laks (CC1, CC3 og *Tff-LDC*). Imidlertid ville det samtidig tillate oss å sette disse funnene opp imot tilsvarende svingninger i tilstedeværelse av de aktuelle artene *M. viscosa* og *T. finnmarkense* som helhet, samt for sistnevnte ytterligere to taksonomiske nivåer opp.



Figur 4.3. Illustrasjonene gjengir sensitivitet og spesifisitet for de syv utviklede qPCR-metodene (M1-3 og T1-4). Bakenførliggende genom-baserte fylogener viser arten *M. viscosa* (venstre) og slekten *Tenacibaculum* (høyre). Hhv. grønne og røde fargetoner er brukt innenfor hver av de to gruppene for å vise metodenes økende spesifisitet nedover i de taksonomiske nivåene.

Metode M1, M2, M3, T3 og T4 ble basert på deteksjon med TaqMan-prober, mens metode T1 og T2 baserte seg på SYBR-Green teknologi. Metode T3 inneholdt i tillegg en SYBR-Green analog (BOXT0) for å muliggjøre smeltepunktanalyse. Identifikasjon av egnede primer- og probe-sekvenser baserte seg på tilgjengelige genomer av *M. viscosa* og *Tenacibaculum*, i stor grad generert ved Veterinærinstituttet gjennom dette og tidligere prosjekter, men også nedlastet fra databasen til NCBI GenBank. Et betydelig antall genomer fra nærliggende slektninger av disse bakteriegruppene ble på samme måte lastet ned for inklusjon i *in silico* spesifisitetstkontroll. Manuell kuratering av 'presence/absence'-matriser generert med Panaroo (Tonkin-Hill et al., 2020), som viser alle påviste gener i de undersøkte genomene samt hvilke som besitter dem, ble sentralt i dette arbeidet. For å teste metodenes sensitivitet og spesifisitet ble det, foruten *in silico* validering mot genomsekvensene, også anvendt et bredt panel av mål- og ikke-mål bakteriearter/-varianter for *in vitro* validering. Sensitiviteten ble også undersøkt ved at sterilt sjøvann tilsatt kjent mengde av målbakteriene ble filtrert og screenet.

Blant tre innsendte biologiske replikater fra hvert prøvetaksingssted og -tidspunkt, ble det ekstrahert DNA fra to for qPCR-screening. På bakgrunn av innledende funn ble det tidlig bestemt at det mest økonomisk hensiktsmessige for *M. viscosa* ville være å først screene på artsnivå (metode M1), for så å kun screene positive prøver derfra for de to variantene CC1 (metode M2) og CC3 (metode M3). For *Tenacibaculum* var imidlertid andelen positive prøver på de høyere taksonomiske nivåene såpass høy at det for denne gruppen ble bestemt at alle prøver skulle screenes for alle fire taksonomiske nivåer (metode T1-4). Data fra metodeoptimalisering og innledende analyser ga oss også grunnlag for å sette egnede grenseverdier for PCR-produktenes smeltepunkt (metode T2-3), samt Ct cutoff-verdier som ble satt til 36 for SYBR-Green metodene (T1-2), og til 40 for de resterende TaqMan-metodene (M1-3 og T3-4). Det ble for alle screenede prøver kjørt tekniske qPCR-replikater, og gjennomsnitt fra disse ble brukt som datagrunnlag for videre analyser. Kjøringene inkluderte også både negativkontroller og blank-kontroller fra DNA-ekstraksjon.

Sårdiagnostikk (AP1)

For å følge med på sårtilstanden ved de involverte lokalitetene ble en egen prosedyre etablert for prøveuttak til utvidet bakteriologisk sårdiagnostikk (denne kan oversendes på forespørsel). I tillegg til rutinemessige standardprøver fra fisk med sår, inkluderte prosedyren prøveuttak fra tilsynelatende frisk fisk og/eller intakte hudområder (hode og flanke), med mål om å få et bilde av den relative fordelingen av ulike bakteriearter/-varianter i hudområder hhv. med og uten sår. Registrering av anatomisk opphav for alle isolatene ga da grunnlag for vurdering av evt. systematiske tendenser, og et stort antall bakterieisolater fra hver sak og fisk ble lagret. Flere av isolatene utvalgt for helgenomsekvensering i andre arbeidspakker kom fra denne aktiviteten.

Moritella viscosa helgenomsekvensering og bioinformatikk (AP2)

For å undersøke om det finnes genomiske trekk hos *M. viscosa* som er assosiert med isolering fra laks, f.eks. gener av mulig betydning for vertsinteraksjon og som dermed også kan være relevante for sårassosiasjon hos denne verten, ble genomer fra 83 *M. viscosa* isolater enten sekvensert (Illumina-teknologi) i prosjektet eller lastet ned fra NCBI GenBank. I tillegg til nyere norske lakseisolater ønsket vi også å inkludere isolater til sekvensering fra andre arter enn laks, for å danne en tilstrekkelig bakgrunnskontekst for sammenligning gjennom såkalt genome-wide association study (GWAS). Isolater sekvensert i dette arbeidet stammet primært fra Veterinærinstituttets omfattende biobank, i tillegg til noen samlet inn gjennom sårdiagnostikken nevnt over. Ettersom isolatene både fra laks og andre arter i all hovedsak stammer fra sårtilfeller, må analysene forstås som en undersøkelse av vertsassosiert genomisk variasjon.

Det ble gjennomført en assosiasjonsanalyse basert på pan-genomet til *M. viscosa* (dvs. alt genetisk innhold på tvers av genomsamlingen) der tilstedeværelse og fravær av spesifikke DNA-sekvenser (Jaillard et al., 2018) ble testet opp imot hvorvidt isolatene kom fra laks eller andre verter. Hvilket genomisk område de assosierte sekvensene tilhørte ble deretter predikert vha. referansegenomer, med det eneste komplette *M. viscosa* genomet som per i dag er offentlig tilgjengelig (MVIS1; GCA_000953735.1) som primær referanse. Før GWAS-analysen ble slektskapsstrukturen i materialet undersøkt ved hjelp av et rekombinasjonsfiltrert kjernegenomtre, både for å beskrive hvordan isolatene er beslektet, og for å vurdere om materialet er egnet for en assosiasjonsanalyse.

Tenacibaculum finnmarkense helgenomsekv. og bioinformatikk (AP2)

For 195 *T. finnmarkense* isolater ble genomer enten sekvensert (Illumina-teknologi) i prosjektet eller lastet ned fra NCBI GenBank. Flertallet av disse var lagret i Veterinærinstituttets biobank og kom fra norsk oppdrettslaks med sår i senere år, da vi bl.a. ville kartlegge hvorvidt relativ dominans av *Tff*-LDC fremdeles hadde fortsatt i årene etter 2018/2019 (Spilsberg et al., 2022), og/eller om evt. nye varianter hadde tilkommet. Et mindre antall tilgjengelige isolater fra andre fiskearter eller marine miljøer ble også inkludert. Videre ble det kjørt fylogenetiske analyser vha. Panaroo (Tonkin-Hill et al., 2020) og IQTree (Minh et al., 2020), med visualisering i Microreact (Argimón et al., 2016).

En tilsvarende GWAS-analyse som for *M. viscosa* viste seg imidlertid ikke hensiktsmessig å gjennomføre for *T. finnmarkense* genomene. Dette var primært fordi de aller fleste isolatene vi hadde tilgjengelig kom fra laks med sår, og man dermed ikke kunne oppnå en tilstrekkelig stor bakgrunnskontekst (dvs. isolater som *ikke* kom fra laks med sår) til å muliggjøre identifikasjon av genetiske elementer med en statistisk signifikant assosiasjon opp mot kategorien 'laks med sår'. I stedet ble de 195 genomene screenet mot virulence factor database (VFDB) (Zhou et al., 2024) og FeGenie (Garber et al., 2020), som henholdsvis inneholder kjente virulensgener og systemer for jernbinding etc., der sistnevnte er relevant fordi tilgangen til jern ofte kan bli et sentralt konkurranseelement i vert-agens interaksjonen. Manuelt ble det også gjort BLAST-søk på bakgrunn av funn fra tidligere studier, samt tilsvarende kuratering av 'presence/absence'-matriser fra Panaroo som nevnt tidligere for qPCR-utviklingen.

In situ hybridisering (AP2)

Med mål om å spesifikt kunne både påvise og lokalisere *M. viscosa* CC1 og CC3 i vevssnitt fra infisert fisk, ble høyoppløselig *in situ* hybridisering, basert på BaseScope™, utviklet. BaseScope er en *in situ*-hybridiseringsmetode (ISH) basert på RNAscope®-plattformen, og kombinerer presisjon og høy romlig oppløsning. Den er designet for å påvise korte RNA-sekvenser (50–300 bp) i intakte celler og vev, men kan i visse tilfeller også brukes for å påvise (mindre tallrikt) DNA, grunnet dens kraftige amplifisering. BaseScope kan skille mellom svært like nukleotid-sekvenser og visualisere sekvenser innenfor vevets morfologiske struktur på cellenivå. BaseScope kan oppdage subtile genetiske variasjoner, inkludert punktmutasjoner og korte innsetninger/slettinger av DNA, som ofte overses av mer generelle metoder som er avhengige av lengre probesekvenser. Den kan også være et effektivt verktøy for å utforske taksonomiske implikasjoner basert på sekvenseringsresultater, som er spesielt nyttig gitt den lave sannsynligheten for å identifisere en tilstrekkelig unik sekvens innenfor minimumslengden på ca. 300 bp, som vanligvis kreves for en robust RNAscope-analyse.

BaseScope™ LS Reagent Kit ble benyttet for å sette opp og undersøke testpreparater på Leica BOND RXm-systemet i en fullautomatisert prosess. Til eksperimentene ble både positive (husholdningsgen peptidylprolyl isomerase B fra *Salmo salar* – SsaPPIB, og generell pan-bakteriell 16S rRNA), og negative (dihydrodipicolinate reductase fra *B. subtilis* - DapB) kontrollprober inkludert. BaseScope™ kontrollsnitt (positive, negative og 16S rRNA) ble brukt for å sette opp metoden på instrumentet. For å validere spesifikke mål-prober for hhv. *M. viscosa* CC1 og CC3, ble det brukt lungevev fra gris som etter disseksjon ble inokulert med enten et CC1- eller CC3-isolat. Prøvene (parafininnstøpte vevssnitt) kom fra 21 laks infisert med *M. viscosa*, og dette materialet ble da altså undersøkt for bakterier generelt (16S rRNA), og for *M. viscosa* CC1 og CC3 spesielt, de to sistnevnte vha. spesifikke DNA-prober designet på bakgrunn av sekvenserte *M. viscosa* genomer (lik tilnærming som under spesifikk qPCR-design). Disse probene fikk hhv. navnene BaseScope™ LS Probe BA-B-M.viscosa-mitA-1ZZ-st-sense (CC1-spesifikk) og BaseScope™ LS Probe – BA-B-M.viscosa-CC3-3ZZ-st (CC3-spesifikk).

Aliivibrio wodanis helgenomsekvensering og bioinformatikk (AP3)

For *A. wodanis* var det ved prosjektoppstart kun ett tidligere publisert genom tilgjengelig, og kunnskap om populasjonsstrukturen til denne bakterien var dermed svært begrenset. I inneværende prosjekt ble det samlet og systematisert metadata for en stor samling på flere hundre isolater av *A. wodanis* lagret i Veterinærinstituttets biobank. Dette danner grunnlag for utvelgelse av isolater til helgenom-sekvensering for belysning av genetisk diversitet innad i arten, samt evt. korrelasjon mellom spesifikke genetiske varianter og deres opphav mtp. vert, geografi, sesong, årstall, tilstedeværelse av andre vanlige forekommende sår bakterier, etc. Totalt ble det sekvensert (Illumina-teknologi) genomer fra 130 isolater identifisert som *A. wodanis* ved bruk av Maldi-TOF, som profilerer primært ribosomale proteiner, opp mot et internt utviklet referansespekter (Spilsberg et al., 2022). De fleste av disse isolatene hadde opphav fra norsk oppdrettslaks med sår i senere år (2020-2025), mens et mindre utvalg isolater fra tidligere år, andre fiskearter og/eller andre land også ble inkludert. I noen tilfeller ble flere isolater fra samme diagnostiske sak/fisk inkludert, for å kontrollere for evt. stammediversitet innad. Referansegenomer fra andre arter innen *Aliivibrio*-slekten (*A. finisterrensis*, *A. fischerii*, *A. salmonicida*, *A. sifiae* samt én hittil ubeskrevet) ble også inkludert for kontekst.

Fylogenetiske analyser ble igjen utført med Panaroo (Tonkin-Hill et al., 2020) og IQTree (Minh et al., 2020), med visualisering vha. Microreact (Argimón et al., 2016), og Average Nucleotide Identities (ANI) på tvers av genom-par ble evaluert med FastANI (Jain et al., 2018). Også for *A. wodanis* gjorde vi søk opp imot VFDB (Zhou et al., 2024), samt manuelle BLAST-søk rettet mot tidligere beskrevne gen-clustre fra *A. wodanis* av potensiell betydning for virulens, jern-akkvisisjon og konkurransevne mot andre bakterier.

Aliivibrio wodanis fenotypiske studier og hemningsforsøk (AP3)

I tillegg til de bioinformatiske analysene jobbet Synne Aurora Pettersen-Dahl (UiB) i sin masteroppgave bl.a. med kartlegging av fenotypiske egenskaper og vekst/overlevelse under ulike miljøforhold hos 12 *A. wodanis* isolater fordelt på de tre genetiske hovedvariantene identifisert i denne studien (se kap. 5). I tillegg til dette utførte hun også en serie forsøk for så se på *A. wodanis*' evne til å påvirke vekst av *M. viscosa* og *T. finnmarkense*, da denne formen for interaksjon har blitt dokumentert tidligere (Hjerde et al., 2015), men da uten foregående kunnskap om de ulike genetiske variantene av *A. wodanis*.

5 Oppnådde resultater og diskusjon

Design og validering av spesifikke qPCR-metoder for sjøvannsprøver

Et svært omfattende arbeid ble lagt ned for å få på plass alle de syv qPCR-metodene, og spesielt noen av *Tenacibaculum*-metodene viste seg utfordrende å etablere. Etter mange tekniske justeringer og re-design av primere og prober ble imidlertid alle metoder ferdigstilt og validert. Det bør her fremheves at alle disse er utviklet på bakgrunn av et solid kunnskapsgrunnlag i form av tilgjengelige genomer anvendt i designarbeidet (se Figur 4.3), og at dette langt overgår hva som vanligvis er tilgjengelig og forventet for utvikling av spesifikke qPCR-metoder. Imidlertid tilfører dette et ytterligere nivå av robusthet til de utviklede qPCR-metodene, i den forstand at man har fått vurdert både sensitivitet og spesifisitet opp imot et stort antall mål- og ikke-mål-genomer, på tvers av et bredt tids-, steds- og artsmessig opphav. Dette altså i tillegg til et bredt panel oppdyrkede bakterier som ble testet *in vitro*.

Det bør også påpekes at den generelle *Tenacibaculum*-metoden (T1) trolig ikke evner å påvise alle beskrevne og ubeskrevne arter innenfor denne svært heterogene og mangfoldige slekten, samtidig som det er en mulighet for at enkelte arter innen 'nabo-slektene' *Polaribacter* og *Lutibacter* også kan påvises. Imidlertid var hovedformålet med akkurat denne metoden å få et overordnet inntrykk av totalmengden *Tenacibaculum* i sjøvann, inkludert bl.a. *T. maritimum* og alle øvrige klinisk relevante arter innen slekten.

Overordnede funn fra qPCR-screening

Av totalt 1608 sjøvanns-filtre samlet inn i prosjektet fra de åtte involverte lokalitetene mellom november 2023 og mai 2025, ble det fra 1072 ekstrahert DNA og screenet med de utviklede qPCR-metodene. Dette gjaldt altså to av tre biologiske replikater, mens de siste 536 blant disse ble tatt ut som reserve. Disse filtrere forblir da lagret nedfryst på Veterinærinstituttet, hvor de utgjør en verdifull forskningsressurs som allerede har kommet i bruk gjennom det nyoppstartede FHF-prosjektet 910068 om piscirickettsiose ([PisciNOR](#)), og som med overveiende sannsynlighet også vil inngå i ytterligere prosjekter.

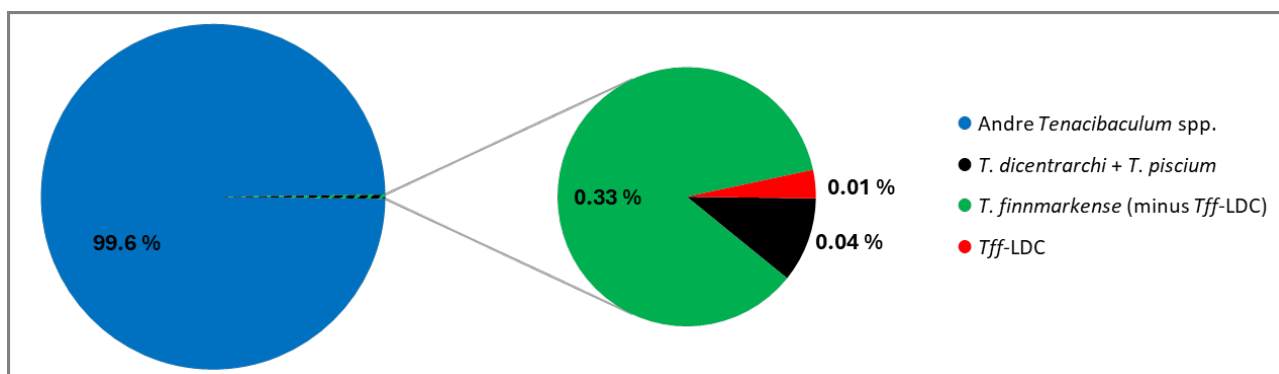
På tvers av alle prøve kategorier (årstid; merd/kontroll/inntak; lokalitet; produksjonsområde; produksjonsform) fordelte andelen positive prøver seg som følgende (metode-nr. i parentes):

<u><i>Moritella viscosa</i> (M1)</u>	36%
<u>CC1 (M2)</u>	21%
<u>CC3 (M3)</u>	12%
<u><i>Tenacibaculum</i> spp. (T1)</u>	>99%
<u><i>T. finnmarkense</i> + <i>T. dicentrarchi</i> + <i>T. piscium</i> (T2)</u>	68%
<u><i>T. finnmarkense</i> (T3)</u>	64%
<u>Tff-LDC (T4)</u>	36%

Fra denne overordnede innfallsvinkelen ser vi at alle de undersøkte bakteriegruppene forekommer i betydelig grad på tvers av prøvesamlingen, dog som forventet med ulike prosentvise andeler, som vi kommer tilbake til. Det er heller ikke overraskende at *Tenacibaculum* spp. tilsynelatende er universelt forekommende langs norskekysten, bl.a. tatt i betraktning en nylig 16S rRNA metabarcoding studie fra Barentshavet som fant at ordenen *Flavobacteriales*, der slekten *Tenacibaculum* m. fl. inngår, i gjennomsnitt utgjorde hele 35% av det det prokaryote mikrobefundet (Aalto et al., 2022).

Det blir som forventet observert gjennomgående lave Ct-verdier for T1 (*Tenacibaculum* spp.), med en median på tvers av hele datasettet på 24.7, som tilsvarer om lag 1-3 millioner bakterier per liter sjøvann. Dersom dette

sammenlignes med tilsvarende estimater for hver av tre øvrige *Tenacibaculum*-metodene (T2-4), hvor kun positive prøver inngår, fremkommer det at mindre enn 1% av den totale mengden *Tenacibaculum* i prøvene utgjøres av de tre artene som er av størst klinisk relevans for oppdrettsfisk i Norge (Figur 5.1). Blant disse tre representerer *T. finnmarkense* den klare majoriteten, mens *Tff*-LDC kun utgjør en liten fraksjon innenfor denne arten. Det må påpekes at disse estimatene er usikre og må tolkes med en viss forsiktighet, da det ikke er gjort en grundig kvantitativ validering mtp. bakterietall opp mot Ct-verdier på tvers av qPCR-metodene, men de burde likevel gi et adekvat grovinntrykk av den relative mengdefordelingen. Dette er relevant å fremheve fordi det med tydelighet illustrerer viktigheten av å ha kjennskap til påvisningsspekteret (spesifisiteten) for den PCR-metoden man tolker resultater fra. Eksempelvis vil en prøve kun klassifisert som '*Tenacibaculum*-positiv', uten nærmere informasjon om metode-spesifisitet etc., kun vitne om at denne kommer fra et marint opphav.

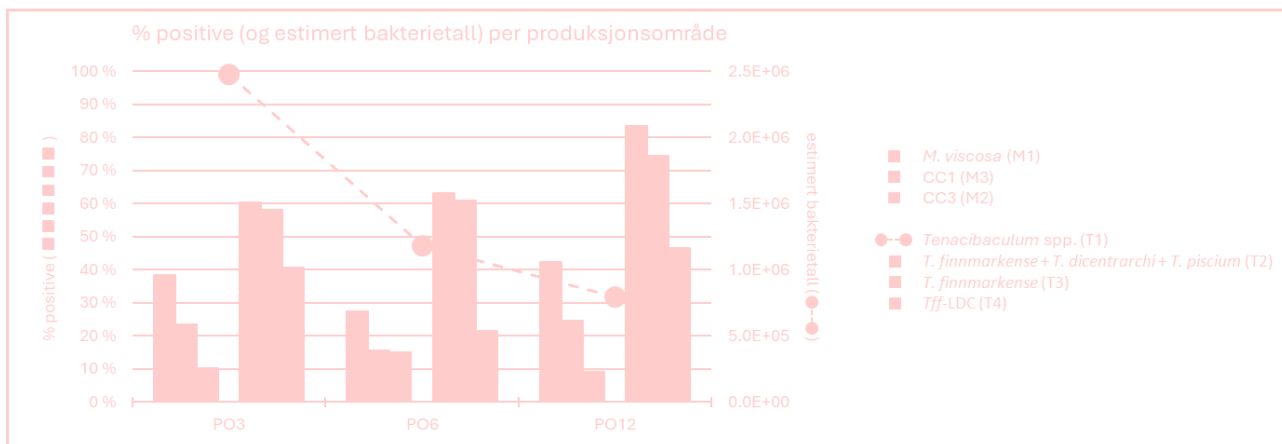


Figur 5.1. Relativ andel av ulike *Tenacibaculum* arter/varianter i filtrerte sjøvannsprøver, beregnet på bakgrunn av median Ct-verdier. Verdiene bør tolkes som grovestimater og ikke som nøyaktige målinger.

Pga. at >99% av alle prøvene var positive for *Tenacibaculum* spp. med assay T1 var det ikke hensiktsmessig å vurdere forskjeller i påvisningsmønstre hos denne på bakgrunn av andel positive prøver. Derfor ble bakterietall per liter sjøvann estimert på bakgrunn av median Ct-verdier benyttet for dette assayet spesifikt, men som nevnt må disse omregningene tolkes med forsiktighet.

qPCR-resultater sett opp imot geografi, prøvetype og sesong

Som tidligere nevnt omfattet studien vannprøver samlet fra totalt åtte oppdrettsanlegg fordelt på PO3, PO6 og PO12 (Figur 4.1). Det er kjent at *M. viscosa*-assosiert vintersår og *T. finnmarkense*-assosiert tenacibaculose opptrer langs hele kysten, men det var av interesse å finne ut om det forekom regionale forskjeller mtp. smittepress. Figur 5.2 viser, for perioden dekket av denne prøvesamlingen, en generelt noe høyere påvisningsrate av både *M. viscosa* og *T. finnmarkense* i PO12, hvor sjøtemperaturene ikke overraskende også var gjennomgående lavest. Slekten *Tenacibaculum* som helhet viser imidlertid en motsatt trend, med høyere estimerte bakterietall lengst sør i PO3, noe som kan henge sammen med næringstilgang i sjøen og det at de fleste artene i denne slekten trolig ikke har en tett økologisk tilknytning til laks (diskutert nærmere i senere avsnitt).



Figur 5.2. Bar-plotet viser, for seks av qPCR-metodene, andel positive prøver (v. vertikalakse) per produksjonsområde, mens kulepunkter med stiptet linje isteden viser estimerte bakterietall per liter sjøvann for den generelle *Tenacibaculum*-metoden (h. vertikalakse). Både kontroll- og merd-prøver er tatt med i beregningen.

Vi undersøkte også om det forelå systematiske forskjeller mellom prøver fra hhv. merd og kontrollpunkter (Figur 4.2A), og i så måte fant vi, på tvers av alle undersøkte bakteriegrupper, en markant høyere andel positive prøver fra merd (Figur 5.3). Ved videre granskning av de positive prøvene så vi også et vesentlig høyere smittepress (i form av estimerte bakteriemengder; i gjennomsnitt ca. en dobling) i merd- sammenlignet med kontrollprøver. Selv om dette ikke er overraskende, er det en tydelig illustrasjon på at man selv ved åpen produksjon vil kunne få en oppkonsentrering i merdene av disse sår-assosierte bakteriene når de er tilstede i miljøet. I denne sammenhengen er det interessant å observere at blant alle kontrollprøvene var hele 27% og 63% positive for hhv. *M. viscosa* og *T. finnmarkense*, som indikerer at disse bakteriene ofte vil inngå som en naturlig del av det marine bakterioplanktonet, også når det ikke foreligger en åpenbar påvirkning fra nærliggende oppdrettsaktivitet. Av praktiske årsaker var det imidlertid ikke mulig å innlemme hyppig prøvetaking av kontrollpunkter som lå slik til at denne typen påvirkning kategorisk kunne utelukkes, og det hadde derfor vært interessant å også undersøke prøver hentet fra fjordsystemer med lite eller helt uten oppdrettsaktivitet, eller offshore.

Figur 5.3. Til venstre sees et bar-plot tilsvarende det i Figur 5.2, men isteden adskilt på prøvetype (kontroll og merd). Øverst til høyre illustreres hvordan positive prøver fra merd fordeler seg relativt til kontrollprøver mtp. estimerte bakterietall (basert på median Ct-verdier per kategori).

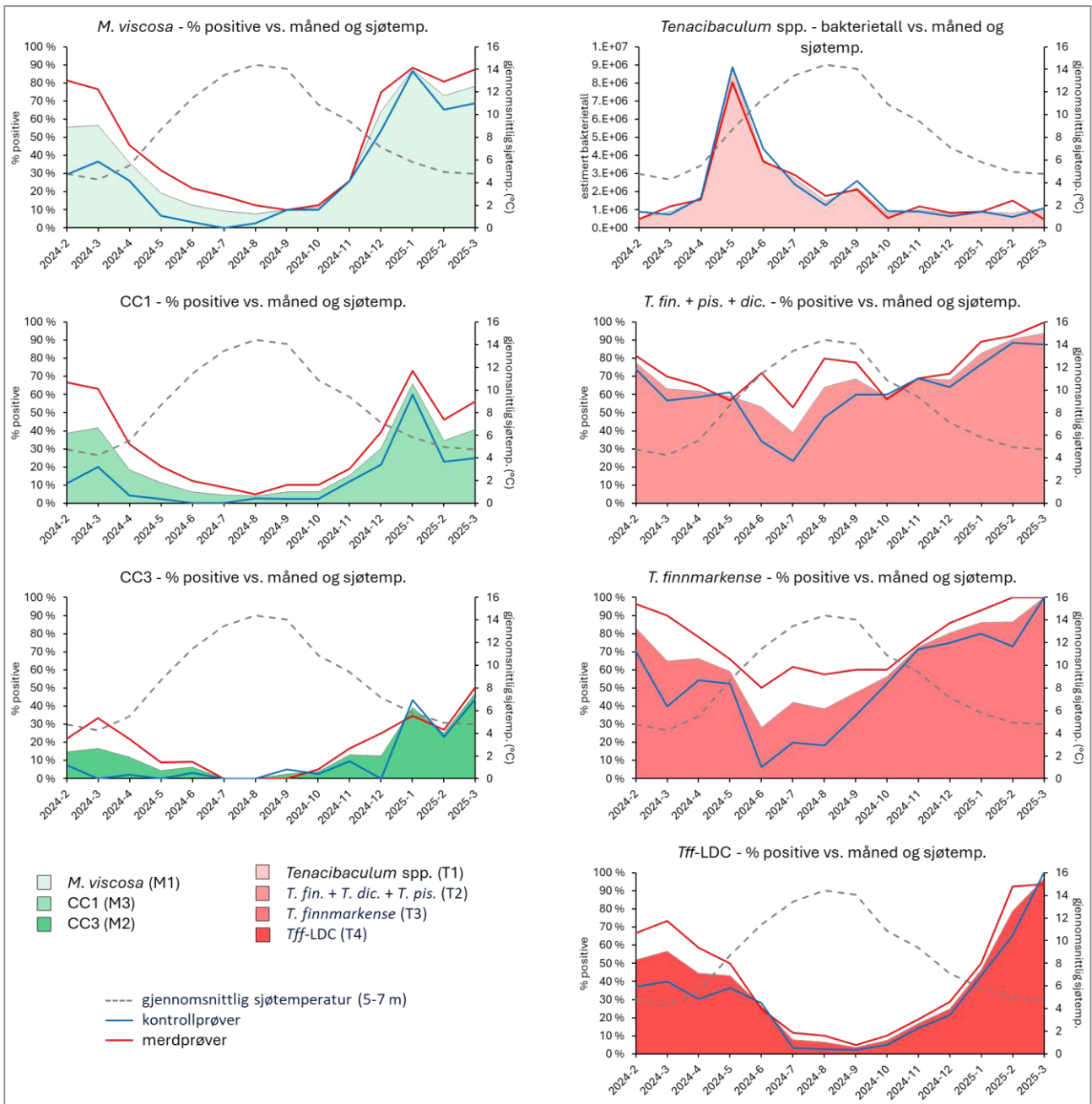
For lok7 spesifikt, som har lukket produksjon, var antallet prøver innsamlet noe lavt, samtidig som de tre ulike prøvetypene (kontroll, inntak og merd) ikke nødvendigvis var innsamlet på samme dato. Selv om dette vanskeliggjorde direkte sammenligning på tvers av disse, var det også herfra en større andel positive merdprøver,

mens kontroll- og inntaksprøvene jevnt over lå på nokså like nivåer. Blant de positive prøvene var imidlertid de estimerte bakterietallene for *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* og *T. piscium* ca. 20-30 ganger høyere i merdprøver sammenlignet med kontroll og inntak, mens tilsvarende ikke ble sett for *M. viscosa*. Muligens kan dette reflektere tidligere *Tenacibaculum*-introduksjoner via inntaksvann som over tid har fått muligheten til å oppkonsentreres inne i den lukkede merda, noe som kan illustrere en potensiell utfordring ved lukket produksjon. Det skal imidlertid bemerkes at det ikke ble rapportert om sårutbrudd på lokaliteten ila. prøvetakingsperioden.

Selv om *M. viscosa*- og *T. finnmarkense*-assosiert sårproblematikk hos oppdrettslaks lenge har vært kjent primært som et kaldtvannsproblem, så har det oss bekjent ikke tidligere blitt dokumentert grundig hvorvidt, og evt. hvordan, smittepresset fra sjøvann kan relateres til sesong og/eller temperatur. En kartlegging av dette vises derfor i Figur 5.4 for en periode på litt over ett år (februar 2024 – mars 2025), hvor hver måned er representert med minst 52 screenede merd- og kontrollprøver fordelt på de syv åpne lokalitetene, og der alle tre produksjonsområdene er representert for hver måned. Gjennomsnittlige sjøtemperaturer er basert på løpende rutinemessige registreringer gjort på 5-7 m dyp.

Det er umiddelbart tydelig at både *M. viscosa* og *T. finnmarkense* ikke overraskende har høyest tilstedeværelse ved lave sjøtemperaturer, og mens denne tendensen er mest markant for førstnevnte, blir den omtrent like sterk også for sistnevnte dersom man kun ser på den mest sårassosierte varianten (*Tff*-LDC). Det er videre relevant å bemerke at mens både *M. viscosa* og *Tff*-LDC nesten er fraværende fra kontrollpunktene i det varmeste månedene, så vedvarer de i større grad inne i merdene. Den relative nedgangen i sommermånedene er også langt svakere i merd sammenlignet med kontroll for *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* og *T. piscium*. En slik vedlikeholdelse av smittepresset i merdene gjennom sommeren kan tenkes å forsterke risikoen for, eller fremskynde, evt. sårproblematikk når temperaturene igjen begynner å synke. Se for øvrig også videre diskusjon i senere avsnitt.

Det er også interessant å observere den svært høye toppen som inntraff i mai 2024 mtp. estimert bakterietall for *Tenacibaculum*-slekten som helhet. Denne toppen baserte seg på 88 screenede prøver, og samme tendens ble sett på tvers av alle de tre involverte produksjonsområdene, selv om endringen var mest uttalt i PO3. Ved den ene lokaliteten (lok4 i PO6) som fremdeles samlet inn prøver i mai 2025, ser videre det ut til at en tilsvarende topp for *Tenacibaculum* spp. også inntraff dette året. Én nærliggende forklaring på disse funnene kan være at dette representerer en naturlig 'våroppblomstring' for flere arter i denne planktonisk tallrike og mangfoldige bakterieslekten, der ulike næringsstoffer akkumulert i sjøen gjennom vinteren tas i bruk straks stigende vanntemperaturer når gitte terskelverdier. Det er også viktig å påpeke at man for *Tenacibaculum* spp. ikke ser noen markant forskjell mellom hhv. merd- og kontrollprøver, noe som kan reflektere at majoriteten av de artene som utgjør denne slekten, med unntak av noen svært få, innehar økologiske nisjer som i liten grad er koblet til laksens nærvær. Hvorvidt disse har noen direkte relevans for laksens helse, er uvisst.



Figur 5.4. Grafer som sammenfatter qPCR screening-resultater (v. vertikalakse), over 14 måneder, fra de syv åpne lokalitetene. Hvert av de syv diagrammene representerer videre én qPCR-metode. Fargede felter representerer andelen positive prøver (eller for *Tenacibaculum* spp., estimerte bakterietall) målt per måned gjennom perioden, mens blå og røde linjer fordeler disse målingene på hhv. kontroll- og merdprøver. Stiplet grå linje over hvert diagram angir gjennomsnittlige sjøtemperaturer målt gjennom året (h. vertikalakse).

qPCR-funn fra enkeltlokaliteter

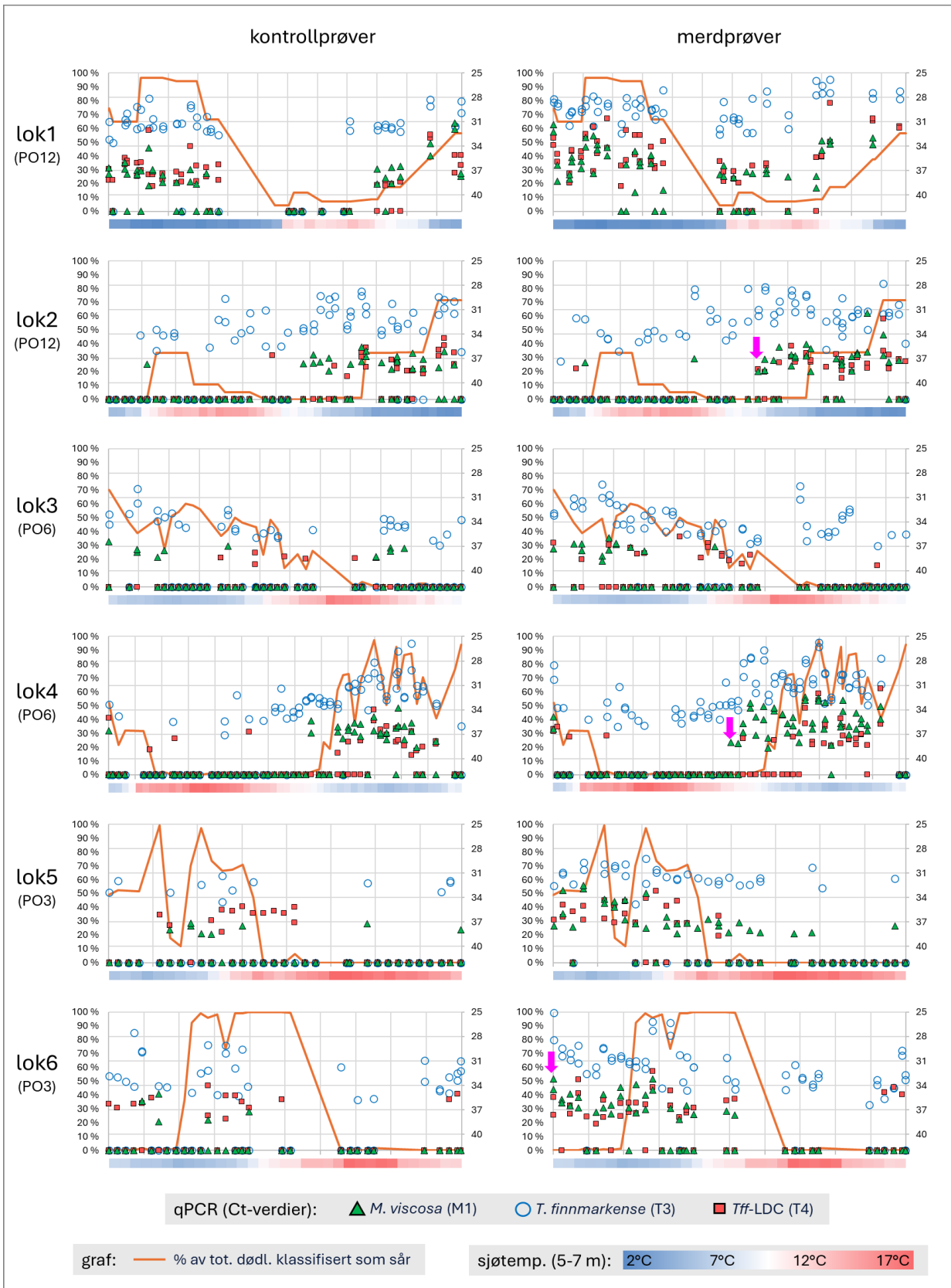
Et annet sentralt aspekt vi ønsket å undersøke var hvordan screening-resultater fra enkeltlokaliteter forløp i forhold til den kliniske helsestatusen hos fisken. I denne sammenhengen viste det seg at den mest hensiktsmessige parameteren å stille opp imot qPCR-resultatene var andelen av den totale dødelighet som var klassifisert som sårrelatert, da slike registreringer var tilgjengelig for det meste av prøvetakingsperioden fra alle de involverte lokalitetene. I Figur 5.5 vises dette, per lokalitet gjennom prøvetakingen, opp imot qPCR-resultater for *M. viscosa* (M1), *T. finnmarkense* (T3) og *Tff-LDC* (T4). Det er kun de åpne lokalitetene 1-6 (se Figur 4.1) som er tatt med, da det var her prøvetakingen pågikk lengst, og kontroll- og merdprøver vises adskilt. Det er viktig å

understreke at denne figuren ikke sier noe om hvor høy den totale dødeligheten ved lokalitetene var i de tidsrommene som dekkes, eller om de svært mange andre faktorene som også kan ha bidratt til sårutvikling, enten som primær- eller sekundærårsaker. Det den imidlertid sier noe om er hvordan tilstedeværelsen av de tre bakteriegruppene forløper i forhold til den registrerte sårtilstanden, uavhengig av underliggende etiologi.

Først og fremst bekrefter Figur 5.5 en tydelig korrelasjon mellom økninger i andel dødfisk registrert med sår, og påvisning av *M. viscosa* og *Tff-LDC* i sjøvann, spesielt fra merd. Faktisk viser disse to bakteriegruppene en viss tilstedeværelse gjennom alle 'sårtoppene' som fremkommer på tvers av de seks lokalitetene, med unntak av én (lok2; første topp) som da også inntraff mens sjøtemperaturen var markant høyere enn gjennom de øvrige toppene. Videre viser figuren også, fra en litt annen innfallsvinkel enn i Figur 5.4, at *M. viscosa* og *Tff-LDC* på generell basis forekommer både oftere og i større mengder ved lave (vs. høye) sjøtemperaturer og fra merd- (vs. kontroll-) prøver. Tilsvarende korrelasjoner gjelder også for arten *T. finnmarkense* som helhet, men tendensene er ikke like sterke hverken når det gjelder sårtilstanden, temperatur eller prøvetype.

For flere av de nevnte 'sårtoppene' observeres det også, noen få uker eller måneder forut for starten på disse, en fremvekst av *M. viscosa* og *Tff-LDC* i merdvannet (indikert med rosa piler i Figur 5.5), og til dels også i kontrollpunktene. Spesifikt for lok2 og lok4 så var disse bakteriegruppene nær fullstendig fraværende fra både kontroll- og merdprøvene i flere måneder, før påvisningsfrekvensen gikk markant opp omtrent 6-8 uker før det også tilkom en markant økning i andelen dødfisk med sårregistrering. Noe tilsvarende kan også ha inntruffet i forbindelse med økt sårrate på lok6, men her foreligger ikke en tilstrekkelig lang prøvetakingsperiode i forkant til å kunne tidfeste den eventuelle økningen i bakteriemengden. På lok1 ser man videre et eksempel på at *M. viscosa* og *Tff-LDC* kan forbli værende i merdvannet også gjennom de varmere månedene, selv om de i denne perioden ikke påvises i kontrollprøvene. Som tidligere nevnt kan dette tenkes å legge til rette for en tidligere inntreffende ny sårøkning i påfølgende sesong, når temperaturene igjen begynner å synke.

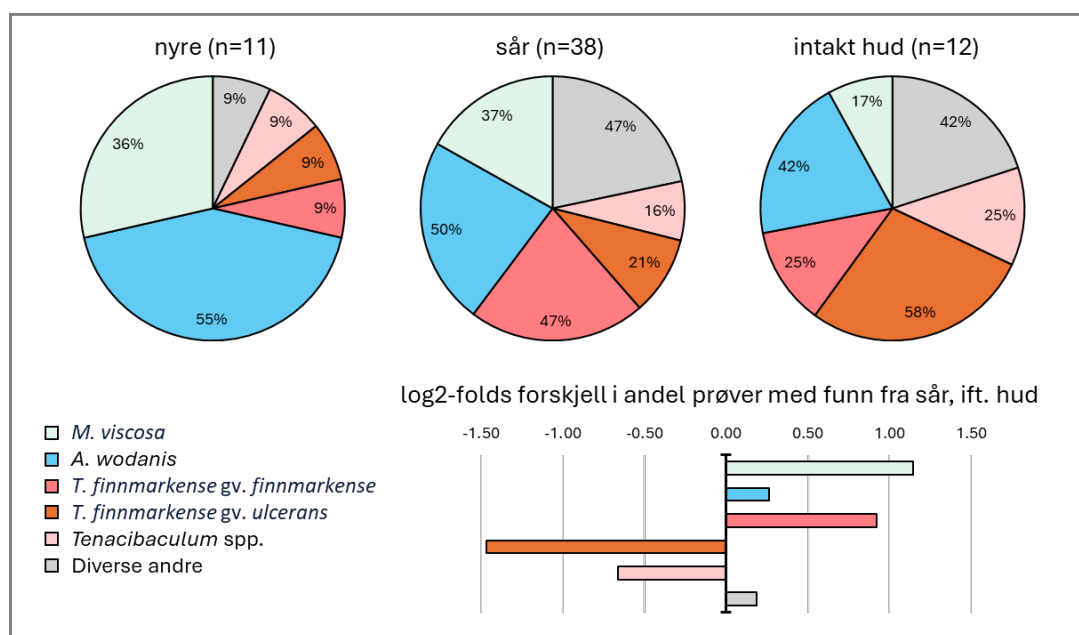
Oppsummert bekrefter disse funnene en nær korrelasjon spesielt mellom *M. viscosa* og *Tff-LDC* i sjøvann og økt registrering av laks med sår. Det er i denne sammenhengen relevant å påpeke at kontrollprøvene i utgangspunktet ikke burde være sterkt påvirket av sårtilstanden ved lokalitetene. Flere eksempler på økt påvisningsfrekvens av begge disse bakteriegruppene i sjøen 1-2 måneder forut for at andelen sårregistreringer også begynner å stige, kan peke på rutinemessig screening av sjøvann for *M. viscosa* og *Tff-LDC* som et nyttig biosikkerhetsverktøy mtp. planlegging av risikofylte operasjoner. I perioder med økt smittepress vil man da eksempelvis kunne unngå slike aktiviteter eller tilpasse disse.



Figur 5.5. For lokalitet 1-6 vises qPCR-resultater (Ct-verdier; h. vertikalakse) gjennom de respektive prøvetakingsperiodene opp imot prosentvis andel (v. vertikalakse) av total dødelighet som ble klassifisert som sårrelatert. Av visualiseringshensyn er kun tre av metodene (M1/*M. viscosa*, T3/*T. finnmarkense* og T4/*Tff-LDC*) tatt med. For hver lokalitet er kontroll- og merdprøver vist side om side, og farge-skalaer under hvert diagram angir lokalitetens gjennomsnittlige sjøtemperaturmålinger. Vertikale støttelinjer er separert med 30 dagers mellomrom. Rosa piler markerer *M. viscosa* og *Tff-LDC* fremvekst i merdvann i forkant av økt sårpåvisning (se tekst). Se forøvrig også forklaringsbokser nederst i figuren.

Bakteriologiske funn fra sårdiagnostikk

Dessverre fikk vi noe færre innsendinger av diagnostisk prøvemateriale med fokus på mikrobiologisk sårutredning til prosjektet enn forventet, og totalt ble det mottatt seks slike fordelt på tre lokaliteter, én fra hver av de involverte produksjonsområdene. Det ble rendyrket 157 bakterieisolater fra disse sakene, og ikke overraskende var det de tre artene studert i prosjektet som dominerte, med 24 isolater av *M. viscosa*, 51 av *T. finnmarkense*, 43 av *A. wodanis* og 39 øvrige (*Tenacibaculum* spp., *Vibrio* spp. etc.). Fra noen enkeltsaker og enkeltfisk ble det tatt vare på flere bakterieisolater av samme art for helgenomsekvensering, omtalt senere. De samlede isolatene fordelte seg på totalt 40 individuelle fisk, hvorav 32 og 8 var kategorisert som hhv. med og uten sår, selv om dyrkning fra friske hudpartier også for det meste var blitt gjort fra førstnevnte gruppe. Den oppsummerte fordelingen mtp. andel av hver prøvetype (nyre, sår og intakt hud) med påvisning av de respektive bakteriegruppene vises i Figur 5.6.



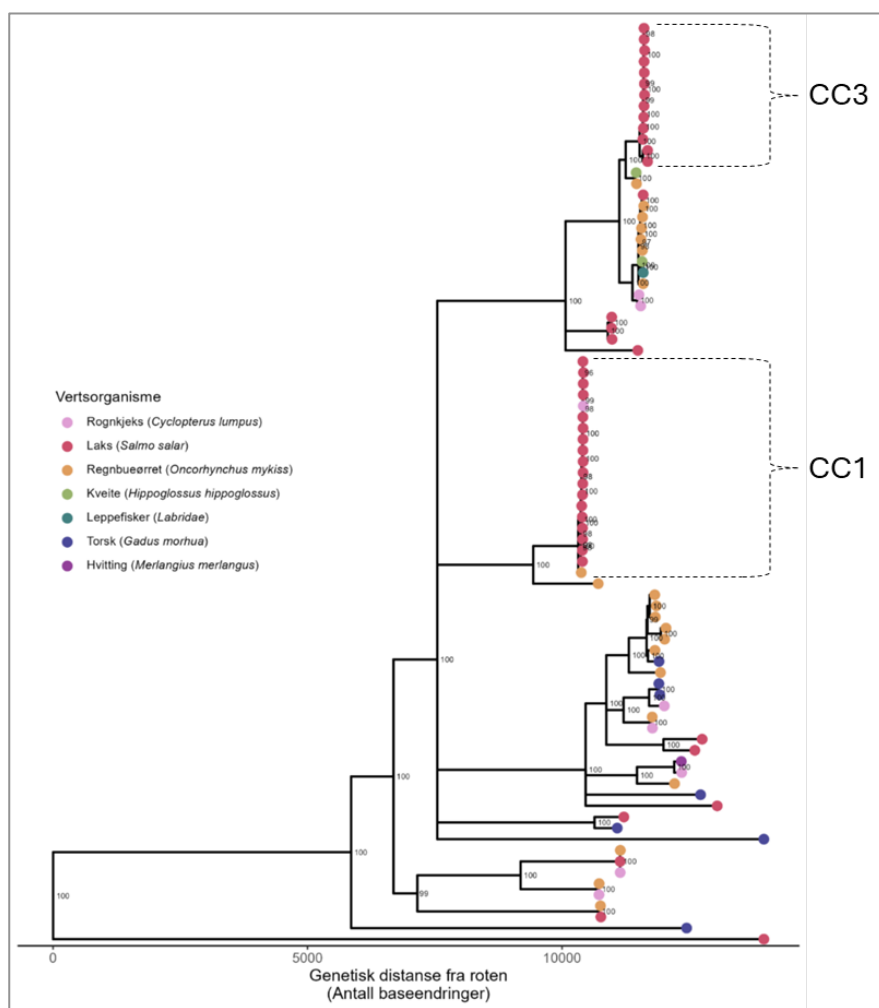
Figur 5.6. Kakediagrammene viser, for prøver med bakteriepåvisning fra hhv. nyre, sår og (tilsynelatende) intakt hud, andel av disse med dyrkning av ulike kategorier bakterier. I og med at hver prøve kan ha påvisning av mer enn én bakteriekategori, blir den oppsummerte verdien for hvert diagram over 100%. For å visualisere relative forskjeller mellom sår og intakt hud, vises også andelen sårprøver med funn i relasjon til tilsvarende andel hudprøver med funn.

Fra nyre var det *M. viscosa* og *A. wodanis* som dominerte blant fremdyrkede isolater, noe som stemmer godt overens med tidligere erfaringer med at *Tenacibaculum*-infeksjoner kun i liten grad utvikler seg til å bli systemiske, og disse begrenset seg også i denne studien hovedsakelig til overfladiske infeksjoner. Imidlertid sees noen forskjeller mtp. hvilke underkategorier av *Tenacibaculum* som påvises hvor, og spesifikt ble det funnet en relativt større andel ikke-artsbestemte *Tenacibaculum* og *T. finnmarkense* gv. *ulcerans* fra tilsynelatende intakte hudpartier, mens *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* isteden viste en relativ dominans i sår. Samtidig som dette støtter opp under antagelsen om at gv. *finnmarkense* er den blant disse to som i hovedsak er ansvarlig for sårutvikling i oppdrett (Spilsberg et al., 2022), så kan det også tyde på en økologisk kobling mellom gv. *ulcerans* og atlantisk laks, men at denne relasjonen da trolig er noe mindre patogen av natur. Også *M. viscosa*, samt i noe grad *A. wodanis*, forekom relativt sett oftere i sår sammenlignet med intakt hud.

Disse resultatene bør imidlertid, gitt den relativt lave totale prøvemengde, tolkes med forsiktighet, og datagrunnlaget var ikke stort nok til å vurdere forskjeller i påvisningsmønstre mtp. anatomisk plassering av sårene (hode, flanke etc.).

Moritella viscosa helgenomsekvensering og bioinformatikk

Fylogenetisk analyse viste en tydelig slektskapsstruktur mellom isolatene, som bl.a. avgrensner de lakse-assosierte variantene CC1 og CC3 til egne slektslinjer (Figur 5.7). Lakseisolatene er mao. ikke kun samlet i én enkelt gruppe, men isteden fordelt på flere deler av treet. Dette tyder på at vertsassosiasjon i materialet ikke bare følger ett felles opphav, men forekommer på tvers av ulike genetiske bakgrunner.

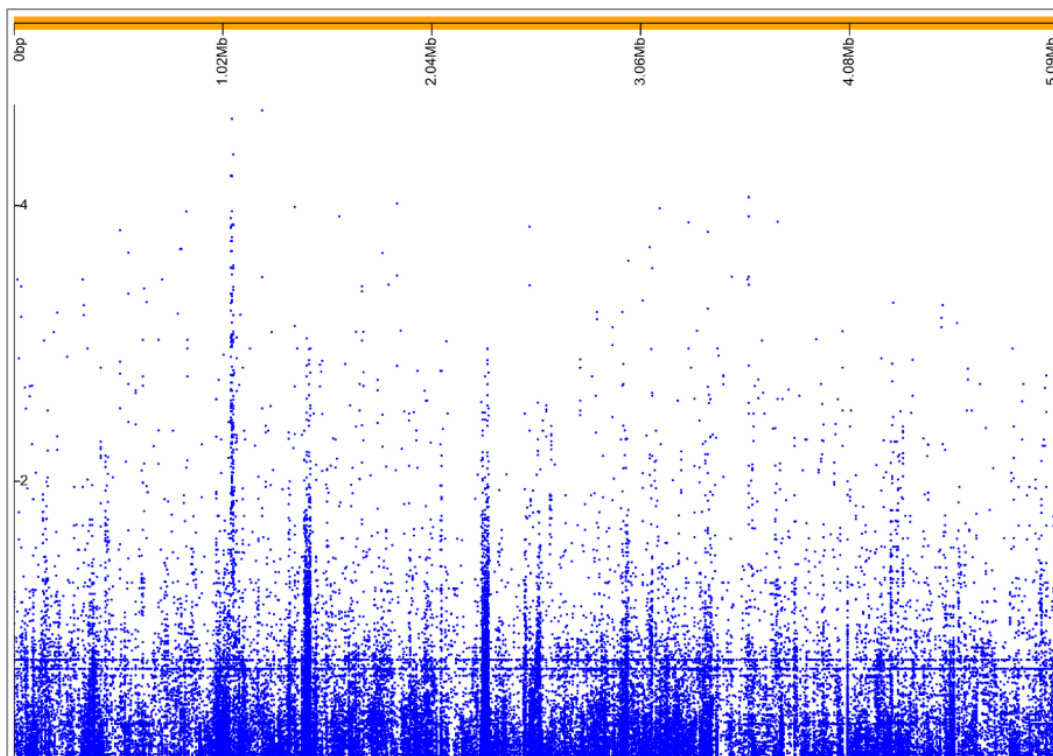


Figur 5.7. Rekombinasjonsfiltrert kjernegenomtre for *M. viscosa*-isolatene brukt i analysen. Figuren viser slektskapsstrukturen i materialet og hvordan isolater fra ulike verter er fordelt mellom genetiske slektslinjer, hvorav to representerer variantene CC1 og CC3. Denne strukturen er viktig både for å beskrive slektskapet mellom genomene og for å vurdere hvor egnet materialet er for GWAS. Den genetiske avstanden mellom isolatene ble brukt i GWAS-analysen for å kontrollere for slektskapsstruktur og redusere risikoen for konfunderende effekter.

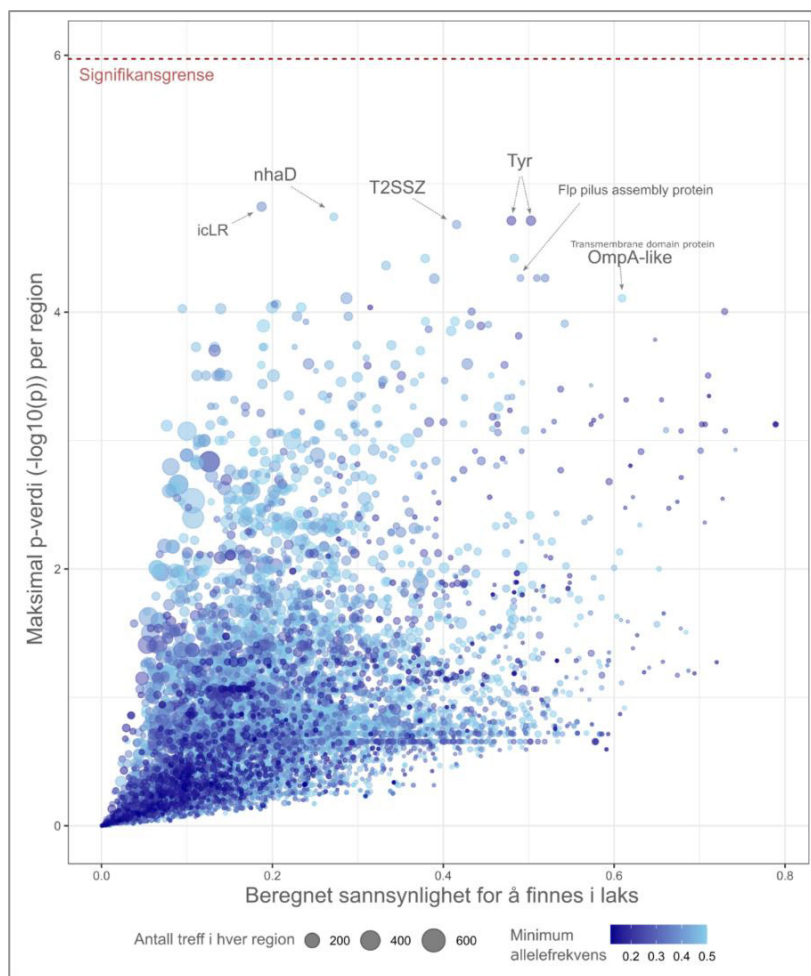
Slektskapet er viktig for tolkningen av GWAS-resultatene. Dersom alle lakseisolatene hadde ligget samlet i én snever gren av treet, ville det vært vanskelig å skille mellom signaler som skyldes felles opphav og signaler som faktisk er knyttet til vertsassosiasjonen. For dette materialet var det fortsatt nødvendig å ta hensyn til slektskap, men fordelingen av isolater gjorde likevel datasettet relevant for GWAS. For å redusere risikoen for falske sammenhenger som følge av slektskapsstruktur, ble det derfor brukt en lineær mixed modell i pyseer (Lees et al., 2018), med en fylogeni-basert relasjonsmatrise estimert fra treet.

Manhattan plottet i Figur 5.8 viser at ingen av de spesifikke DNA-sekvensene (i denne sammenhengen kalt unitigs) som ble funnet passerte signifikansgrensen etter korreksjon for multipl testing (Bonferroni), og det er derfor ikke grunnlag for å hevde sikre assosiasjoner mellom de testede genetiske variantene og isolering fra laks i dette materialet. Samtidig var flere av de høyest rangerte signalene lokalisert til genomregioner med annoteringer som er biologisk plausible i en verts- og sårassosiert sammenheng (Figur 5.9). Dette gjelder særlig gener og regioner knyttet til overflatestrukturer, sekresjon og regulering, blant annet *CpaD* (Flp pilus assembly protein), Type II sekresjonssystemer, en *OmpA*-lignende transmembran proteinregion, *IcIR*-familie transkripsjonsregulator og *NhaD*-antiporter. Disse strukturene kan tenkes å ha en funksjon som påvirker festeevne, overflateinteraksjoner, kolonisering, effektorsekresjon og/eller fysiologisk verts-/miljøtilpasning. Andre toppannotasjoner, som tyrosin-rekombinase-domeneholdig protein, *YicC* og et hypotetisk protein, er mer usikre å tolke funksjonelt i denne sammenhengen, og bør derfor omtales som foreløpige kandidater snarere enn som spesifikke mekanistiske forklaringer.

Oppsummert gir denne GWAS-analysen, på dette datasettet, altså ikke støtte for signifikante assosiasjoner mellom enkeltsignaler i pan-genomet og isolering fra laks, og resultatene bør derfor tolkes konservativt. Likevel fremstår flere av de annoterte toppsignalene som biologisk plausible kandidater, særlig fordi mange av dem er antatt tilknyttet funksjoner som overflatestrukturer, sekresjon, membraninteraksjon og regulering. Funnene kan derfor sees som et første samlet bilde av genomiske regioner som bør undersøkes videre, og som kan være av potensiell relevans for bl.a. vertssinteraksjon hos *M. viscosa*. En evt. senere verifisering av ekstracellulært eksponerte og antigene virulensdeterminanter som eksisterer på tvers av genetiske varianter av bakterien, og isteden er koblet til vertsspekter, kan f.eks. danne grunnlag for sub-unit vaksiner som også beskytter på tvers av disse.



Figur 5.8. Manhattan plot over unitig-assosiasjoner med laks i *M. viscosa*, som viser $-\log_{10}(p\text{-verdi})$ for unitigs mapnet til MVIS1-referansen. Vi beregnet signifikansgrensen til å være 5.97, som ligger et stykke over de høyeste verdiene i dette plottet, og er derfor ikke vist. Selv om ingen enkelt-unitigs passerte terskelen, ses flere genomregioner med markant forhøyede signaler.

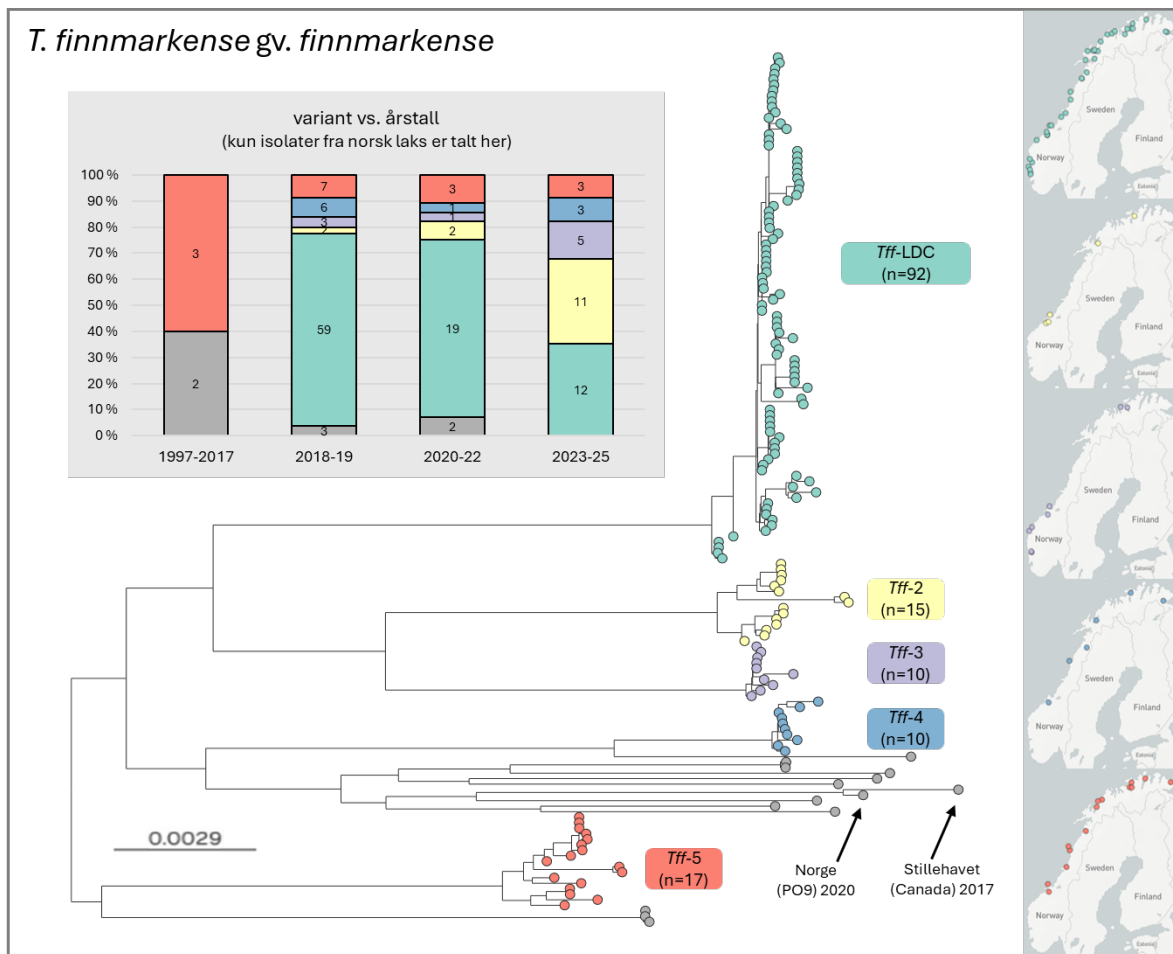


Figur 5.9. Annoterte genomregioner med unitigs assosiert med lakseisolater av *M. viscosa*. Størrelsen på prikkene viser antall tilordnede unitigs per region, horisontalaksen viser estimert effektstørrelse, og vertikalaksen viser høyeste observerte $-\log_{10}(p\text{-verdi})$ blant unitigene i regionen. Høye treff til høyre i plottet representerer de sterkeste kandidatene.

Oppdatert kunnskap om *T. finnmarkense's* populasjonsstruktur

Fylogien som resulterte fra analyse av de 158 *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense* genomene var basert på 1950 identifiserte kjernegener, og fordelte isolatene på en rekke dype slektslinjer, hvorav fem slike utkrystalliserte seg ved at de omfatter ≥ 10 isolater hver (Figur 5.10). Den største av disse er ikke overraskende den tidligere beskrevne *Tff-LDC*, som dominerte fra sårutbrudd hos laks i Norge i 2018-2019 (Spilsberg et al., 2022). Ved å her utvide genom-samlingen til også å omfatte et vesentlig antall isolater fra påfølgende år, ser vi at selv om *Tff-LDC* fortsetter å dominere, så er ikke denne tendensen lenger like sterk, spesielt etter 2022. Samtidig er det tydelig at alle de fem fremhevede variantene forekommer langs store deler av norskekysten.

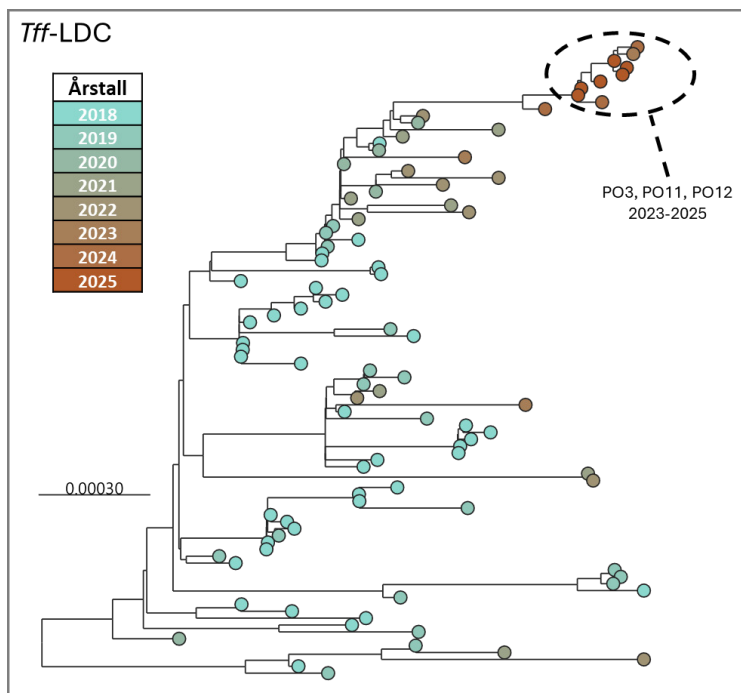
Kun to isolater fra utenfor Norge er representert med genom innad i *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*, og begge disse kommer fra atlantisk laks i British Columbia, vest-Canada, hhv. fra 2017 og 2020 (NCBI GenBank IDs: GCA_028010105.1 og GCA_028010205.1). I tillegg til å bekrefte at denne genomovar'en ikke kun er begrenset til Atlanterhavet, er det også interessant å observere at det canadiske isolatet fra 2017 er relativt nært beslektet med et norsk isolat fra 2020 (Figur 5.10). Noe tilsvarende kan også sees for sekvenserte isolater av *T. finnmarkense* *gv. ulcerans* fra Norge, Chile og Canada (ikke vist her), og det er i denne sammenhengen relevant å påpeke at havstrømmen gjennom Nordvestpassasjen generelt går fra vest (Stillehavet) mot øst (Atlanterhavet) (McLaughlin et al., 2004).



Figur 5.10. Fylogeni basert på 158 *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* genomer, med de fem mest tallrike slektslinjene fargekodet (*Tff*-LDC, *Tff*-2, *Tff*-3, *Tff*-4 og *Tff*-5), og mindre slektslinjer i gråtone, samt to nærbeslektede isolater fra hhv. Norge og Stillehavet indikert med piler. Øverst til venstre sees et bar-plot som viser relativ fordeling av sekvenserte isolater på varianter og isoleringsår (kun isolater fra norsk laks medregnet her). Til høyre sees miniatyrkart som viser geografisk opphav for sekvenserte isolater fra hver av de fem variantene.

En separat fylogeni, basert på 2398 identifiserte kjernegener, ble generert for de 92 isolatene tilhørende *Tff*-LDC, som så langt kun er dokumentert fra Norge (Figur 5.11). Pga. relativt lav genetisk diversitet innad i denne varianten, vil trolig ikke alle forgreiningene i treet være 'korrekt' plassert mtp. det nøyaktige evolusjonære forløpet, men den relative tendensen med at eldre og nyere isolater legger seg hhv. mot venstre og høyre side av treet er logisk iht. hva man skulle kunne forvente. Som en videreføring av diskusjonen over, hvori *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense* isolater fra Norge og Stillehavet viser relativt nært genetisk slektskap, er det da interessant å se at selv på denne 'høyere forstørrelsen' (dvs. innad i *Tff*-LDC) påvises en svært nærbeslektet undergruppe med norske isolater som i dette tilfellet strekker seg fra PO3 i sør til PO12 i nord.

Overordnet underbygger alt dette at *T. finnmarkense* trolig er utbredt i marine miljøer verden over, med en populasjonsstruktur bygget opp av et stort antall varianter/slektslinjer som kan ha spesialisert seg på ulike mikro-nisjer i det marine miljøet. Én slik nisje kan være kolonisering av atlantisk laks, men hvorvidt de fem variantene fremhevet her innehar en slik spesialisering er fremdeles uklart, selv om det ikke fremstår som usannsynlig gitt gjentakende funn fra laks med sår på tvers av tid og sted. Det ser videre ut til at ulike varianter ikke nødvendigvis er sterkt stedbundne, og det er mulig at miljømessige hindringer (nærings-/vertstilgang, temperatur etc.) kan være av vel så stor betydning som geografisk avstand mtp. hvilke av disse som sprer seg hvor. Om så er tilfelle, vil evt. nyoppståtte varianter med en affinitet for laks trolig raskt kunne spre seg til nye kyst- og havområder.



Figur 5.11. Fylogeni basert på 92 *Tff*-LDC genomer, farget iht. årstall for isolering. En mindre gruppe svært nært beslektede isolater fra 2023-2025, og isolert fra nord til sør i Norge, er indikert.

Mulige virulensdeterminanter i *Tenacibaculum finnmarkense*

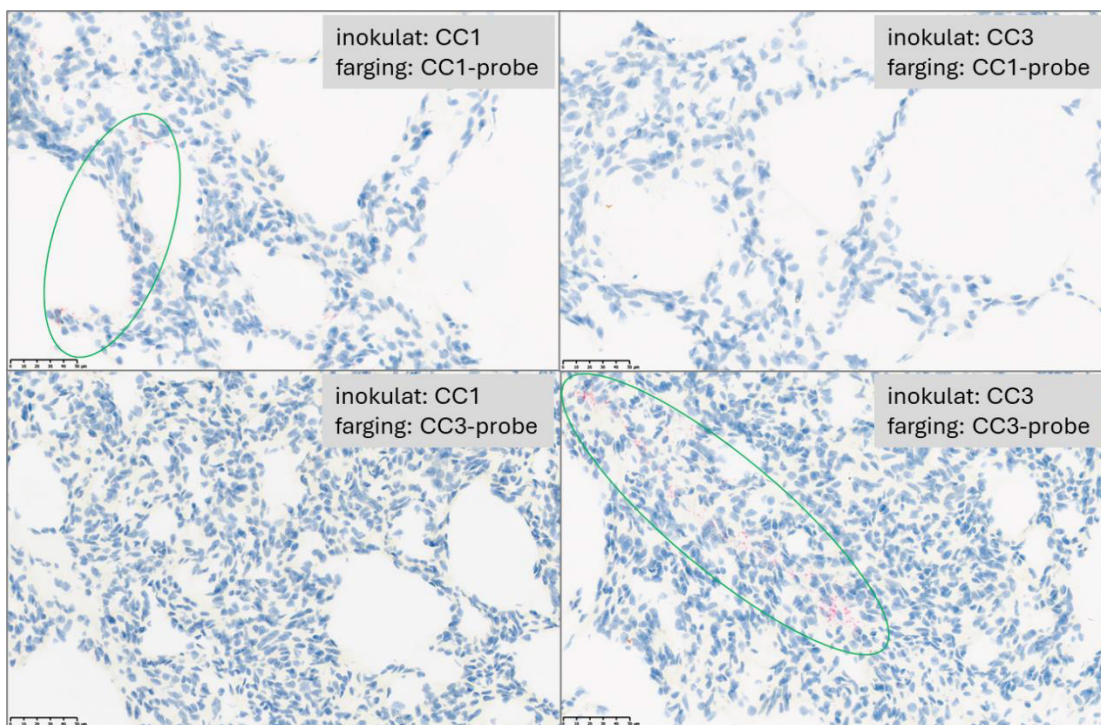
Selv om en GWAS-analyse tilsvarende den gjort for *M. viscosa* som tidligere nevnt ikke lot seg gjennomføre for *T. finnmarkense*, ble det på tvers av alle de 195 genomene gjort søk etter genetiske elementer av mulig betydning for virulens vha. flere ulike tilnærminger. Det ble slik påvist gener potensielt tilknyttet både Type I, VI og IX sekresjonssystemer nokså bredt utbredt innen hele arten, som hver for seg trolig kan være involvert i ekstracellulær transport av proteiner (Type I), 'injeksjon' av toksiner inn i vertsceller (Type VI) og glidende motilitet kjent fra flere arter innen slekten (Type IX) (Green & Mecsas, 2016; Rocha et al., 2024). Videre fremkom relativt få treff mot virulensgen-databasen VFDB (Zhou et al., 2024), med kun 5-9 treff per genom innenfor de anvendte terskelverdiene, og det var ingen enkeltgener som stakk seg ut som spesielt bemerkelsesverdige. Én interessant observasjon kan imidlertid sees for *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*, der de 144 genomene tilhørende de fem tidligere nevnte 'hoved-variantene' assosiert med laks (Figur 5.10) jevnt over produserer flere treff enn de 14 øvrige genomene (gjennomsnitt 7.9 mot 6.2). Fra alle *T. finnmarkense* genomene ble det videre, ved søk med FeGenie (Garber et al., 2020), påvist en rekke treff for gener relatert til akkvisisjon av jern fra omgivelsene, og spesielt mange relatert til jern-chelaterende sideroforer, men det fremkom ingen spesielt påfallende forskjeller på tvers av varianter/slektslinjer. Oppsummert ble altså ingen kjente virulensdeterminanter påvist som unikt forekommende hos *Tff*-LDC. Dersom denne varianten innehar spesielle 'sår fremmede' egenskaper kan disse imidlertid også være tilknyttet gener som finnes på tvers av arten, men der *Tff*-LDC har ervervet spesifikke mutasjoner, og slike vil i så fall kunne være vanskeligere å identifisere.

Utover virulensdeterminant-søkene nevnt over er det også verdt å bemerke at genom-størrelsen til isolater av *Tff*-LDC spenner mellom 3.07-3.27 (gjennomsnitt 3.12) Mbp, som er noe større enn for de øvrige medlemmene av *T. finnmarkense* *gv. finnmarkense*, på 2.76-3.10 (gjennomsnitt 2.98) Mbp. Det vil altså si en gjennomsnittlig forskjell på ca. 140 kbp, som kan tilsvare lengden på et stort plasmid. Der to tidligere studier ikke greide å påvise plasmider i undersøkte *T. finnmarkense* genomer generert med Illumina-teknologi (Avendaño-Herrera & Saldarriaga-Córdoba, 2025; Bridel et al., 2018), fant en nylig studie flere plasmider hos de to tidligere nevnte canadiske genomene som isteden var sekvensert med Oxford Nanopore-teknologi (Sies et al., 2025). Det største av disse var på 131 kbp (GCA_028010105.1), og inneholdt bl.a. gener for et Type VI sekresjonssystem, men vi

kunne kun gjenfinne mindre komponenter av dette plasmidet på tvers av de øvrige *T. finnmarkense* genomene. Det er altså en mulighet for at *Tff*-LDC genomene også kan være i besittelse av et tilsvarende stort men distinkt oppbygd plasmid, uten at vi har greid å avgrense dette fra genomene undersøkt her, som altså ble sekvensert med Illumina-teknologi. Dessverre rakk vi ikke å supplere med Nanopore-sekvensering, noe som ville gitt oss lengre rå-sekvenser og dermed grunnlag for en mer komplett sammenstilling av genomene, og i neste omgang identifikasjon av evt. plasmider i disse. Dette kan imidlertid være verdt å undersøke videre.

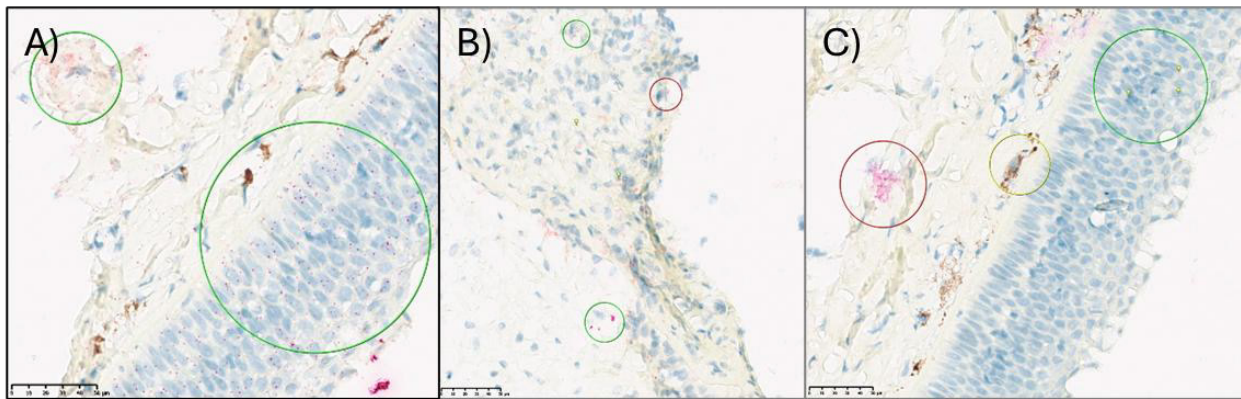
In situ hybridisering

En metode for spesifikk lokalisering av hhv. *M. viscosa* CC1 og CC3 i vevssnitt ville bl.a. kunne legge grunnlag for en bedre forståelse av den underliggende patogenesen, og hvilken rolle de ulike variantene spiller. Under testoppsettet fremkom signal fra positive kontroll-prober (salmonid husholdningsgen og 16S rRNA pan-bakteriell) i forventede celletyper og vevsregioner, mens negative kontroller (DapB) ikke viste signal. Lungevev fra gris inokulert med renkultur av *M. viscosa* CC1 viste signal med CC1-probe men ikke med CC3-probe, mens vev inokulert med *M. viscosa* CC3 viste motsatt resultat (Figur 5.12). Samlet sett bekrefter disse resultatene at metoden fungerer, og at probene kan brukes for spesifikk påvisning av hhv. *M. viscosa* CC1 og CC3 i vev.



Figur 5.12. Bildene viser snitt fra grisevev inokulert med hhv. *M. viscosa* CC1 (venstre) eller CC3 (høyre), og farget med prober spesifikke for CC1 (øverst) eller CC3 nederst. Signal (eks. grønne ovaler) sees kun i snitt med matchende inokulat og probe.

I selve eksperimentet ble BaseScope-analysen vellykket gjennomført på de utvalgte vevsprøvene, og resultatene viste forventede signalmønstre i samsvar med Ct-verdier. Signaler fra CC1 og CC3 ble sett i ulike vev, som nyreepitel, milt, hjerte, lever og sår (Figur 5.13), som bekrefter både probe-spesifisitet og metodens integritet. Kontrollsignalene var også som forventet (punktformede for positive, og fraværende for negative). Samtidig ble det også registrert enkelte ikke-spesifikke signaler som påvirket tolkningen. Disse artefaktene ble hovedsakelige observert i forbindelse med vevsrester og skader på snittene. Prøvetaking og histologisk behandling av hud, særlig når den allerede er skadet, kan være vanskelig.



Figur 5.13. Bildene viser utsnitt av den samme sårprøven fra laks, men farget med ulike prober. A) viser farging med 16S rRNA (pan-bakteriell) probe, og reelt signal og artefakt indikert med hhv. stor og liten sirkel. B) og C) viser farging med hhv. CC1- og CC3-probene, med sirkler som indikerer reelle signaler (grønt), melanin (gult) og artefakt (rød).

En ytterligere utfordring var tilgang til nok egnede prøver med bekreftet tilstedeværelse av målbakteriene, som bl.a. hadde sammenheng med at færre prøver enn forventet ble sendt inn fra deltakende oppdrettsanlegg gjennom prosjektperioden. Analyse av flere vevsprøver der det er kjent om *M. viscosa* CC1 og CC3 er tilstede eller ikke, vil bidra til å validere metoden ytterligere. Forslag til forbedringer inkluderer også analyse av genuttrykk med fokus på tentative virulensfaktorer. Generelt vil sikring av RNA/DNA-integritet ved prøvetaking, implementering av strengere vasketrinn, bedre kontroll på fikseringstid, og RNase-dekontaminering av mikrotom og annet utstyr, kunne bidra til økt pålitelighet (i vårt tilfelle primært mtp. kontrollene).

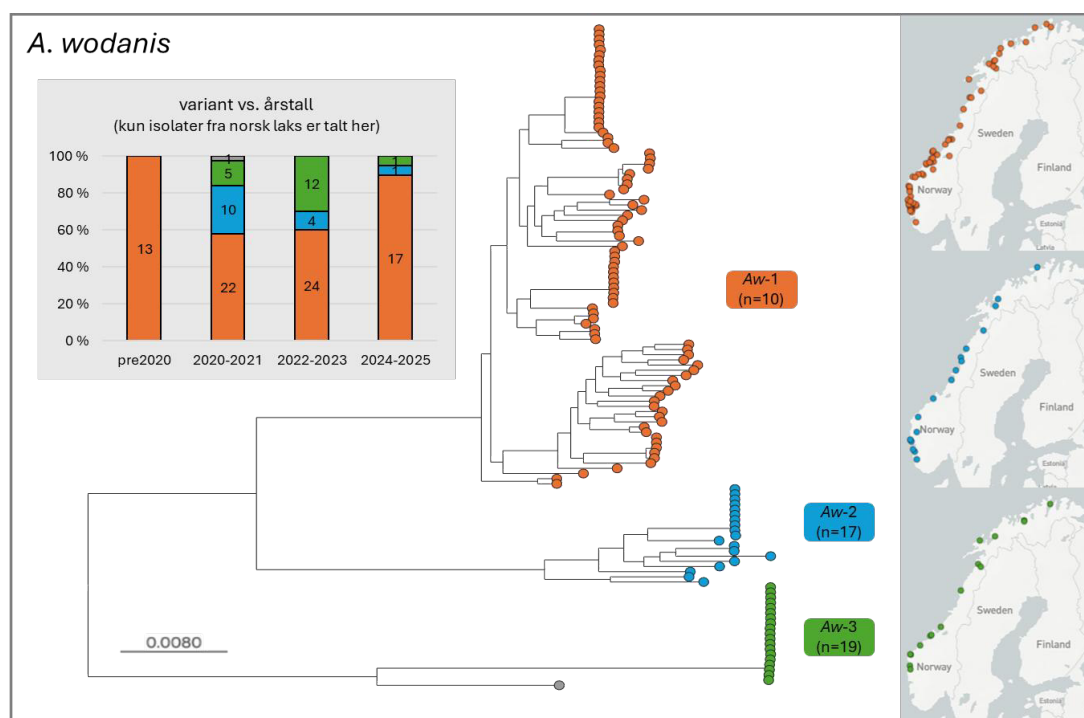
På grunn av disse nevnte utfordringene med å finne nok materiale til utprøving av *M. viscosa*-prober innfor den tilgjengelige tidsrammen ble det besluttet å ikke også gå videre med design og anskaffelse av prober mot *T. finnmarkense*. Likevel er dette et lovende konsept som fortjener å bli vurdert igjen etter hvert som vi har fått mer erfaring med de per nå tilgjengelige probene utviklet spesielt for *M. viscosa* CC1 og CC3. Retrospektivt vurderes det at etablering av en god prøveinnsamlingsprotokoll, samt sikring av et tilstrekkelig volum av verifiserte prøver, burde vært prioritert høyere fra starten av. Prøver fra kontrollerte smitteforsøk kunne vært interessante i så måte. Disse aspektene bør hensyntas i eventuelle fremtidige prosjekter som ønsker å videreføre utviklingen og optimaliseringen av metodene som ble påbegynt her.

Beskrivelse av *A. wodanis*' populasjonsstruktur og variant-forskjeller

Blant de 130 presumptive *A. wodanis* genomene inkludert i studien indikerte fylogenetisk analyse at 128 av dem reelt tilhører denne arten, mens de resterende to isteden tilhører en nærliggende og hittil ubeskrevet art. Dette ble bekreftet gjennom ANI-sammenligning mellom de 128 *A. wodanis* genomene og genomer tilhørende de øvrige *Aliivibrio* artene, som lå mellom 82.0-89.5%, mens tilsvarende verdier innad i *A. wodanis* var $\geq 95.6\%$. Disse verdiene er altså hhv. under og over den generelt aksepterte ANI-terskelen på 95% for artsavgrensning (Richter & Rosselló-Móra, 2009). Dette bekrefter dermed at den internt etablerte Maldi-TOF protokollen for *A. wodanis* identifikasjon ved Veterinærinstituttet har nokså god treffsikkerhet.

En separat fylogenetisk analyse som kun inkluderte de 128 bekreftede *A. wodanis* genomene viser videre en klar inndeling i tre genetiske hoved-slektslinjer, her navngitt Aw-1, Aw-2 og Aw-3, i tillegg til en fjerde som kun utgjøres av ett enkeltisolat. Blant disse er det Aw-1 som er den klart mest tallrike (Figur 5.14), og denne omfatter både typestammen av *A. wodanis*, alle isolater fra før 2013, og alle de fire isolatene fra andre land enn Norge (Færøyene og Irland; 2011-2014). På tross av å være påvist innenfor et relativt kort tidsrom inkluderer imidlertid også Aw-2 og Aw-3 isolater fra store deler av norskekysten, noe som i kombinasjon med det relativt lave antallet isolater undersøkt fra før 2020 sannsynliggjør at også disse to variantene kan ha eksistert i Norge forut for dette.

Blant de tre, utmerker Aw-3 seg som den varianten med klart lavest grad av genetisk diversitet innad, noe som reflekteres tydelig i Figur 5.14. Imidlertid sees det også to konserverte ‘under-variantene’ i Aw-1, og én i Aw-2, hver bestående av 10-20 isolater, som viser omtrent tilsvarende grad av genetisk homogenitet som Aw-3. Det er i denne sammenhengen interessant å observere at alle disse genetisk svært konserverte under-variantene, samt Aw-3, hver for seg er blitt påvist på tvers av 3-9 produksjonsområder, og over tidsspenn på 4-38 år. På den annen side ble det fra én enkeltsak i PO6 (lok4 i denne studien) påvist samtidig infeksjon med genetisk ulike *A. wodanis* isolater hos fire av fem undersøkte fisk, mens det fra ytterligere fem av 12 saker hvorfra to eller flere isolater var med i studien, ble påvist tilsvarende samtidig tilstedeværelse av mer enn én genetisk variant. Samlet kan dette reflektere spesialiserte varianter av *A. wodanis* som vedvarer over tid og sted, men der ulike varianter også gjerne sameksisterer, og trolig fyller ulike mikroniser i et felles miljø. Det bemerkes at dette også er til forveksling likt de generelle observasjonene nevnt tidligere vedrørende populasjonsstrukturen til *T. finnmarkense* gv. *finnmarkense*.



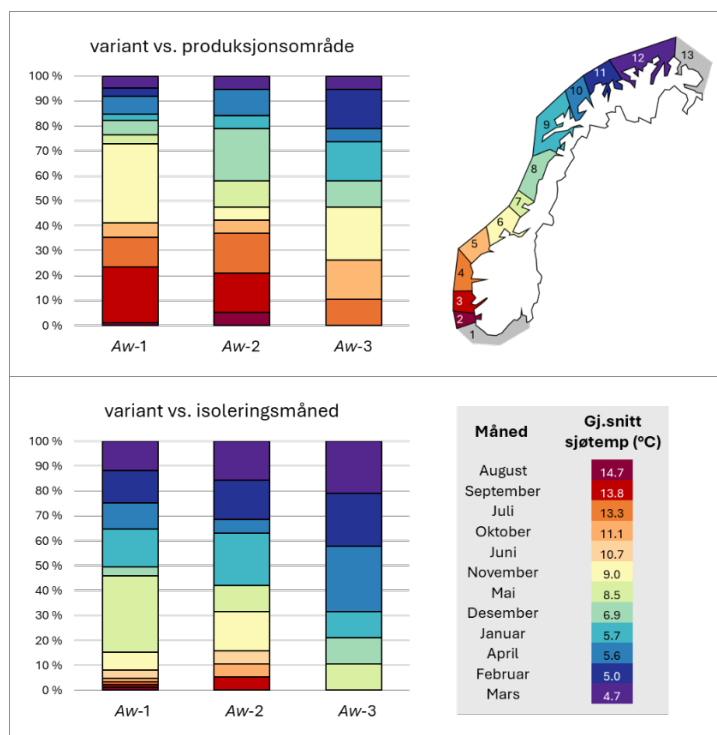
Figur 5.14. Fylogeni basert på 128 *A. wodanis* genomer, med de tre hovedvariantene fargekodet (Aw-1, Aw-2 og Aw-3), og den fjerde ‘singleton’-slektslinja i gråtone. Øverst til venstre sees et bar-plot som viser relativ fordeling av sekvenserte isolater på varianter og isoleringsår (kun isolater fra norsk laks medregnet her). Til høyre sees miniatyrkart som viser geografisk opphav for sekvenserte isolater fra hver av de tre variantene.

Angående eventuelle miljøpreferanser, så fremkommer det noen interessante forskjeller ved nærmere undersøkelse av den relative geografiske fordelingen av de tre variantene. Selv om alle tre som nevnt fremstår vidt utbredt langs norskekysten, så var det kun Aw-1 og Aw-2 som ble påvist så langt sør som i PO2, mens Aw-3 ikke ble påvist sør for PO4. Innenfor den studerte isolat-samlingen fremkommer det videre at Aw-3 også har en generelt høyere påvisingsrate i nordlige landsdeler, og det sees også en klar tendens til at denne varianten, relativt sett, oftere isoleres i kaldere måneder av året, da den i motsetning til de to andre ikke ble dokumentert mellom juni og november (Figur 5.15). Det kan derfor fremstå som om Aw-3 har en relativ preferanse både for kaldere årstider og nordlige kystområder, sammenlignet med Aw-1 og Aw-2.

Selv om et mindre antall tidligere smitteforsøk med *A. wodanis* har blitt gjennomført, så har alle disse (så vidt vi kan se) involvert én enkeltstamme tilhørende Aw-1 (Karlsen et al., 2014), og forsøkene har så langt ikke funnet at denne alene forårsaker sykdom hos atlantisk laks, selv om et mulig samspill med *M. viscosa* er hypotetisert. Blant

de undersøkte *A. wodanis* isolatene i denne studien kom majoriteten (74%) fra tilfeller med samtidig påvisning av *M. viscosa* og/eller *Tenacibaculum* spp. (på saksnivå). Dette gjaldt imidlertid en relativt sett lavere andel (40%) av Aw-2 isolatene, som mulig kan peke i retning av at denne varianten besitter et større potensiale til å opptre som primærpatogen hos laks. Eventuell videre undersøkelse av dette vil imidlertid kreve smittforsøk.

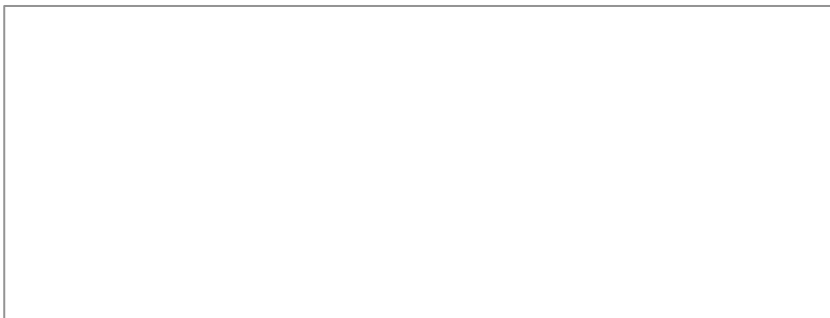
Gjennom mastergradsarbeidet til Synne Aurora Pettersen-Dahl fremkom en viss grad av fenotypisk variasjon mellom de tre variantene, selv om det også var noe variasjon innad mellom de fire isolatene som ble testet innunder hver variant. Blant parameterne som varierte var veksthastighet og hemolyse, som begge ble observert å generelt være raskere for Aw-1 og Aw-2, sammenlignet med Aw-3, under inkubasjon på blodagar med 2% NaCl ved 15 og 22 °C. Ettersom alle isolater utviklet hemolyse-soner i agaren ved forlenget inkubasjon, er det er imidlertid vanskelig å si om observasjonene reelt sett reflekterer lavere hemolyse-kapasitet hos Aw-3, eller om det kan forklares av andre miljøpreferanser mtp. temperatur e.l. hos denne varianten. Videre ble det funnet at kun isolater tilhørende Aw-2 har urease-aktivitet, noe som trolig kan forklares med funn fra VFDB-screeningen, der *ureB*-genet, som koder for en viktig komponent i urease-enzymet, ble funnet å være eksklusivt tilstede i Aw-2 genomene.



Figur 5.15. For hver av de tre identifiserte hovedvariantene av *A. wodanis* vises den relative geografiske (øverst) og sesongmessige (nederst) fordelingen av undersøkte isolater fra Norge. 'Varm-til-kald' fargeskalaen reflekterer, for geografi, PO2-12 fra sør mot nord, mens den for sesong reflekterer en (ikke-kronologisk) sortering av årets måneder iht. gjennomsnittlige sjøtemperaturer. Sistnevnte ble utregnet på bakgrunn av de ukentlige temperaturregistreringene samlet på tvers av de syv åpne lokalitetene involvert i AP1.

Det ble også påvist til dels store forskjeller mtp. variantenes (og enkeltisolaters) tilsynelatende evne til å hemme vekst av *M. viscosa* og *T. finnmarkense* (Figur 5.16). Her ble et noe større antall isolater fra Aw-1 testet, og det kanskje mest fremtredende funnet fra disse dyrkningsforsøkene er den at gjennomsnittlige hemnings-soner (mot både *M. viscosa* og *T. finnmarkense*) var noe høyere for en spesifikk under-gruppe på seks Aw-1 isolater som viser seg å inneha et plasmid-båret gen-cluster antatt å stå for produksjon og sekresjon av et bacteriocin (Hjerde et al., 2015). Bacteriociner er proteinholdige molekyler som bl.a. kan hemme vekst av, eller ha toksisk virkning mot, andre bakterier. BLAST-søk mot alle de 128 *A. wodanis* genomene viser at både dette gen-clusteret (på 6.4 kbp) og plasmidet det befinner seg på (på 92 kbp) kun er tilstede i 12 isolater, alle tilhørende Aw-1. Oppsummert støtter dette den tidligere lanserte hypotesen om at tilgang til et slikt bacteriocin-apparat kan være medvirkende

til noen *A. wodanis*-stammers dokumenterte evne til å hemme vekst av *M. viscosa* (Hjerde et al., 2015), samtidig som det også åpner for en tilsvarende interaksjon i nærvær av *T. finnmarkense*.



Figur 5.16. Observerte gjennomsnittlige hemningssoner for *M. viscosa* og *T. finnmarkense* når disse dyrkes på agarskål i nærvær av de ulike *A. wodanis* variantene. Resultater fra *Aw-1* isolater hhv. med og uten et bacteriocin gen-cluster er vist hver for seg.

I tillegg til bacteriocin-genene identifiserte studien til Hjerde et al. (2015) også to gen-clustre som ble antatt å være involvert i siderofor-aktivitet, og begge disse systemene viser seg å være tilstede på tvers av alle de 128 *A. wodanis* genomene undersøkt her. Videre har gen-clustre for hele tre Type VI sekresjonssystemer (T6SS1, T6SS2 og T6SS3) tidligere blitt beskrevet fra *A. wodanis* (Maharajan et al., 2022), hvorav to av disse (T6SS1 og T6SS3) ble funnet i alle 128 undersøkte genomer, mens T6SS2 (på 26.5 kbp) kun viste seg å være tilstede hos 13 isolater. Av disse tilhørte 12 *Aw-1* og én *Aw-2*, og de førstnevnte fordelte seg videre på flere under-varianter innad i *Aw-1*, noe som trolig reflekterer at T6SS2 har vært involvert i flere historiske tilfeller av genetisk rekombinasjon innen *A. wodanis*.

Oppsummert så har arbeidet med *A. wodanis* eksponert denne som en genetisk heterogen art, med tre hovedvarianter (*Aw-1*, *Aw-2* og *Aw-3*) som i dag infiserer norsk laks i oppdrett, hvorav alle tre forekommer langs store deler av kysten (Figur 5.14). Selv om *Aw-1* er den tallmessig dominerende, så er ikke denne alltid tilstede, og det er heller ingen spesifikke funn som peker mot at isolater tilhørende denne varianten, på generell basis, skal være mer virulente enn de andre to. Det er imidlertid interessant å observere at mens genetisk svært konserverte under-varianter av *A. wodanis* kan persistere på tvers av tid og sted, så kan enkeltfisk også være samtidig bærer av flere genetiske varianter. Når det gjelder noen aspekter så sees det en viss grad av variasjon på tvers av *Aw-1*, *Aw-2* og *Aw-3*, og blant disse er det at *Aw-3* muligens kan ha en preferanse for kaldere landsdeler og årstider (Figur 5.15), mens *Aw-2* i noe mindre grad enn de andre to er funnet i saminfeksjon med *M. viscosa* og/eller *T. finnmarkense*. Videre ble noen gener- og gen-clustre av potensiell betydning for virulens og konkurransevne i nærvær av andre bakterier, kun påvist i et mindre antall enkeltstammer av *A. wodanis*. Betydningen av dette er fremdeles uklar, men det peker i alle fall mot genetisk rekombinasjon som en vesentlig evolusjonær bidragsyter hos bakteriearten.

Avsluttende betraktninger

En gjentakende utfordring ved søk etter funksjonelle gener, plasmider e.l. blant genomer fra fiskeassosierte bakterier er at tilgjengelige referansedatabaser gjerne er tungt dominerte av bakterier assosiert med mennesker og/eller pattedyr. Alle de tre genusene *Moritella*, *Tenacibaculum* og *Aliivibrio* er så vidt man vet begrenset til akvatiske (og primært marine) miljøer, og de har dermed ingen spesielt nærliggende slektninger blant de tungt studerte bakterieartene av relevans for humanmedisin. Dermed vil 'spesialtilpassede' virulensgener, som trolig kan ha vokst frem gjennom millioner av år med evolusjonær tilpasning hos ulike laksepatoogene bakterier, ofte kunne gå 'under radaren'. Dette fordi de kanskje ikke lenger deler tilstrekkelig sekvenslikhet med kjente og

velkarakteriserte virulensfaktorer fra humane studier, og fra database-søkene vil disse da isteden kun rapporteres som 'hypotetiske proteiner'.

Avslutningsvis er det videre relevant å minne om at selv om fokus i dette prosjektet primært var rettet mot de sår-assosierte bakteriene, så vil infeksjons sykdom kun oppstå når komponentene i den epidemiologiske triaden, dvs. vert, agens og miljø, overlapper på en måte som tillater dette. Spesielt relevant er dette fordi de sårlidelsene man ser i dagens lakseoppdrett gjerne fremstår komplekse og multifaktorielle, med produksjonsrelaterte elementer som også ofte kan spille en stor rolle. Gjennom de tre øvrige FHF-prosjektene igangsatt parallelt med inneværende prosjekt ([RiskIdent](#), [ReduSår](#) og [iFelt](#)) ble i tillegg aspektene miljø og vert behørig adressert, og den potensielle nytteverdien for oppdrettsnæringen forventes derfor å bli størst dersom alle disse fire prosjektene sees i sammenheng.

Næringsnyttige læringspunkter

Flere av prosjektresultatene vil først og fremst fungere som viktige byggeklosser til å fremme den helhetlige forståelsen av de mekanismene som ligger bak disse komplekse sårlidelsene. Dette vil tilrettelegge for videre forskning og en gradvis mer kunnskapsbasert tilnærming til utfordringene. Imidlertid er det også flere funn og læringspunkter fra prosjektet som kan komme direkte til nytte i næringens kontinuerlig løpende biosikkerhetsarbeid. De kanskje mest sentrale av disse er oppsummert under.

- 'Tilfeldig forbigående': Bakterieslekten *Tenacibaculum* finnes 'alltid' tilstede i sjøvann, men kun en svært liten andel av totalmengden utgjøres av sår-assosierte arter og varianter. De aller fleste medlemmene av denne slekten har sannsynligvis liten innflytelse på fiskens helse, og fyller isteden andre nisjer i det marine miljøet. Disse 'tilfeldig forbigående' *Tenacibaculum*-artene ser ut til å være spesielt tallrike sent på våren (mai). For tolkning av *Tenacibaculum*-påvisninger er det derfor viktig å kjenne metodens spesifisitet, dvs. om denne er rettet spesifikt mot sår-assosierte arter/varianter, eller om arter som antas å være rene miljøbakterier også omfattes.
- 'Spesialiserte inntrengere': Noen få varianter av artene *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum finnmarkense* er trolig de som i størst grad bidrar til sårutvikling hos laks, dvs. 'spesialiserte inntrengere'. Disse viser en helt annen dynamikk enn den som er nevnt i forrige punkt mtp. tilstedeværelse i sjøen, da de er mest tallrike ved lave sjøtemperaturer og perioder med mye sår.
 - Ved flere oppdrettslokalteter kunne de sår-assosierte bakteriene påvises i sjøvann ca. 6-8 uker før det også tilkom en markant økning i andelen dødfisk med sår. Slik overvåking av smittepress vha. av de utviklede qPCR-metodene kan dermed gi en tidlig indikator på kommende sårrisiko, og muliggjøre preventive tiltak for å minimere stress og hudskader i denne sårbare perioden (reduert håndtering etc.).
 - Mens det gjennom sommermånedene ble påvist svært lite sår-assosierte bakterier utenfor oppdrettslokalitetene, så vi at smittepresset i noen grad kunne opprettholdes inne i merdene. Dette kan trolig fremskynde eller forverre sårproblemene i påfølgende vintersesong. Overvåking med de nevnte qPCR'ene ved utgangen av perioder med mye sår, og gjennom varme måneder, kan brukes til å vurdere hvorvidt dette er et problem.
- Vi gjorde hyppige funn av multi-variant infeksjoner hos enkeltfisk med sår, dvs. at én og samme fisk var samtidig infisert med mange ulike genetiske varianter av samme sårbakterie. Dette indikerer at selv om noen få varianter trolig er de som fortrinnsvis bidrar til (eller initierer) sårutviklingen, så vil opportunistisk smitte direkte fra en mangfoldig mikroflora i sjøen også kunne spille en vesentlig rolle. Robuste fiskegrupper uten skader i huden vil etter all sannsynlighet ha økt motstandsdyktighet mot slike infeksjoner.

6 Hovedfunn og konklusjoner

- Det ble utviklet syv qPCR-metoder for spesifikk deteksjon av *Moritella viscosa*, *Tencibaculum finnmarkense*, og tilhørende varianter eller beslektede arter av disse, i sjøvann. Flere av disse metodene vil kunne utgjøre nyttige fremtidige verktøy for spesifikk overvåking av sår bakterier, og assosiert sår risiko, i sjø.
- Det påvises en klar kobling mellom kalde sjøtemperaturer og økt smittepress fra *Moritella viscosa* og én spesifikk variant av *Tencibaculum finnmarkense*. Selv om det observeres et jevnt over høyere smittepress inne i merdene, viser begge disse seg å være naturlig prevalente også utenfor oppdrettsanleggene. Vi dokumenterer videre flere tilfeller på enkeltlokaliteter der påvisning av disse bakteriene i sjøvannet starter noen få uker før innslag av sår hos dødfisken øker.
- Det ble ikke påvist noen sikre koblinger mellom variant-spesifikke genetiske elementer og evnen til å infisere laks hos hverken *Moritella viscosa* eller *Tencibaculum finnmarkense*. En rekke interessante kandidater av mulig betydning for interaksjon med omgivelsene, inkludert verten, ble likevel identifisert, men ytterligere studier vil kreves for å undersøke og evt. verifisere sammenhenger.
- Populasjonsstrukturen til *Aliivibrio wodanis* blir for første gang beskrevet, og viser en genetisk heterogen art, hvorav én blant tre utbredte hoved-varianter dominerer hos norsk oppdrettslaks med sår. Vi fant ikke grunnlag for å utpeke én av variantene som spesielt virulent, men flere genetiske og fenotypiske forskjeller av potensiell relevans observeres både på tvers av, og innad i, disse. Likt det som tidligere er vist for både *Moritella viscosa* og *Tencibaculum finnmarkense*, fremstår samtidige infeksjoner med ulike varianter av *A. wodanis* som vanlig.

7 Referanser

- Aalto, N. J., Schweitzer, H. D., Krsmanovic, S., Campbell, K., & Bernstein, H. C. (2022). Diversity and Selection of Surface Marine Microbiomes in the Atlantic-Influenced Arctic. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 892634. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892634>
- Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J. E., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., Feil, E. J., Holden, M. T. G., Yeats, C. A., Grundmann, H., Spratt, B. G., & Aanensen, D. M. (2016). Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*, *2*(11), e000093. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000093>
- Avendaño-Herrera, R., & Saldarriaga-Córdoba, M. (2025). Draft genome sequences of *Tenacibaculum finnmarkense* isolates from diseased Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chilean farms. *Microbiology Resource Announcements*, *14*(8). <https://doi.org/10.1128/mra.00385-25>
- Bridel, S., Olsen, A. B., Nilsen, H., Bernardet, J. F., Achaz, G., Avendaño-Herrera, R., & Duchaud, E. (2018). Comparative Genomics of *Tenacibaculum dicentrarchi* and “*Tenacibaculum finnmarkense*” Highlights Intricate Evolution of Fish-Pathogenic Species. *Genome Biology and Evolution*, *10*(2), 452–457. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy020>
- Colquhoun, D., Nilsen, H., Olsen, A. B., Patel, S., Strand, D., Loncarevic, S., Stige, L. C., Spilsberg, B., De Oliveira, V., Ness, A., Wiik-Nielsen, J., Langhelle, B., Roalkvam, I., Husby, A., & Gulla, S. (2024). *Faglig sluttrapportering prosjekt FHF-901680: Pasteurellose hos norsk laks*. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901680/>
- Colquhoun, D., Riborg, A., Rønneseth, A., Fiskebeck, E., Wiik-Nielsen, J., Nilsen, H., Gu, J., Strand, D., & Gulla, S. (2022). *Faglig sluttrapportering prosjekt FHF-901505: Yersiniose - utredning av økende forekomst hos norsk oppdrettslaks i sjøfasen*. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901505/>
- Garber, A. I., Neelson, K. H., Okamoto, A., McAllister, S. M., Chan, C. S., Barco, R. A., & Merino, N. (2020). FeGenie: A Comprehensive Tool for the Identification of Iron Genes and Iron Gene Neighborhoods in Genome and Metagenome Assemblies. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 499513. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00037>
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology Spectrum*, *4*(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015>
- Hjerde, E., Karlsen, C., Sørum, H., Parkhill, J., Willassen, N. P., & Thomson, N. R. (2015). Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1669-z>
- Jaillard, M., Lima, L., Tournoud, M., Mahé, P., van Belkum, A., Lacroix, V., & Jacob, L. (2018). A fast and agnostic method for bacterial genome-wide association studies: Bridging the gap between k-mers and genetic events. *PLOS Genetics*, *14*(11), e1007758. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007758>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, *9*(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Karlsen, C., Vanberg, C., Mikkelsen, H., & Sørum, H. (2014). Co-infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*), by *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.011>
- Lees, J. A., Galardini, M., Bentley, S. D., Weiser, J. N., & Corander, J. (2018). pyseer: a comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies. *Bioinformatics*, *34*(24), 4310–4312. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty539>
- Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C. R., Tunsjø, H. S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H., & Grove, S. (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* - Pathogen invasion and host response. *Fish and Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.019>
- Maharajan, A. D., Hjerde, E., Hansen, H., & Willassen, N. P. (2022). Quorum Sensing Controls the CRISPR and Type VI Secretion Systems in *Aliivibrio wodanis* 06/09/139. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 799414. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.799414>
- Mclaughlin, F., Carmack, E., Ingram, R., Williams, W., & Michel, C. (2004). *Oceanography of the Northwest Passage*.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Moldal, T., Wiik-Nielsen, J., de Oliveira, V., Svendsen, J., Haukaas, A., & Sommerset, I. (2026). *Fiskehelse rapporten 2025*.

- Nogi, Y. (2017). Microbial Life in the Deep Sea: Psychropiezophiles. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition*, 133–152. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_7
- 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. *Veterinary Microbiology*, 205(3), 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, ijsem004501. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004501>
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Rocha, S. T., Shah, D. D., & Shrivastava, A. (2024). Ecological, beneficial, and pathogenic functions of the Type 9 Secretion System. *Microbial Biotechnology*, 17(6), e14516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14516>
- Sies, A. N., Nowlan, J. P., Schnell, L. J., Lumsden, J. S., Russell, S., & Cameron, A. D. S. (2025). Discovery and assembly of plasmids in the fish pathogen *Tenacibaculum*. *Plasmid*, 134, 102753. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2025.102753>
- Småge, S. B., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016). 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. <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., 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. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.063>
- Sommerset, I. (redaktør). (2023). Fiskehelse rapporten 2022. In *Veterinærinstituttets rapportserie: 5a/2023*.
- Sørgaard, M., Sveinsson, K., Patel, S., Nilsen, H. K., Olsen, A. B., Vaagnes, Ø., Colquhoun, D. J., & Gulla, S. (2023). MLVA genotyping of *Moritella viscosa* reveals serial emergence of novel, host-specific clonal complexes in Norwegian salmon farming. *Journal of Fish Diseases*, 46(5), 535–543. <https://doi.org/10.1111/JFD.13766>
- Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Tavornpanich, S., Gulla, S., Jansen, M. D., Lagesen, K., Colquhoun, D. J., & Olsen, A. B. (2022). Tenacibaculosis in Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) cage-farmed in cold sea water is primarily associated with *Tenacibaculum finnmarkense* genomovar *finnmarkense*. *Journal of Fish Diseases*, 45(4), 523–534. <https://doi.org/10.1111/jfd.13577>
- Tonkin-Hill, G., MacAlasdair, N., Ruis, C., Weimann, A., Horesh, G., Lees, J. A., Gladstone, R. A., Lo, S., Beaudoin, C., Floto, R. A., Frost, S. D. W., Corander, J., Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2020). Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biology*, 21(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02090-4>
- Zhou, S., Liu, B., Zheng, D., Chen, L., & Yang, J. (2024). VFDB 2025: an integrated resource for exploring anti-virulence compounds. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D871. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae968>

8 Faglige leveranser

År/mnd.	Kategori	Forum	Rekkevidde	Tittel eller beskrivelse
2023/02	Nyhetsoppslag (x2)	Vetinst.no + Kyst.no	Nasjonal	Søker svar om laksesår i sjøvann og i bakterienes gener
2023/09	Muntlig presentasjon	EAFP XXI, Aberdeen, Skottland	Internasjonal	The culprits behind bacterial ulcers in sea-farmed Atlantic salmon in Norway
2023/11	Pop.vitenskapelig artikkel	Norsk Fiskeoppdrett 11/23	Nasjonal	Sår bakterier hos laks – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbigående
2023/11	Muntlig presentasjon (x2)	Akvahub-seminar + NCE-webinar	Nasjonal	Sår bakterier hos laks – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbigående
2024/10	Muntlig presentasjon	Havbruk 2024, Tromsø	Nasjonal	Populasjonsstudie av <i>Aliivibrio wodanis</i> fra laks med sår
2024/11	Muntlig presentasjon	NCE-webinar	Nasjonal	Foreløpige resultater fra FHF-prosjekt om kartlegging av sår bakterier i sjøbasert oppdrett
2025/03	Muntlig presentasjon	Frisk Fisk 2025, Tromsø	Nasjonal	<i>Moritella viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> qPCR'er for måling av smittepress i sjøvann: Utvikling og preliminnære resultater
2025/04	Muntlig presentasjon	Sår-konferanse, Kalvåg	Nasjonal	Diversitet blant sår bakterier
2025/08	Muntlig presentasjon	AquaNor 2025, Trondheim	Nasjonal	Overvåking av sår bakterier i sjøvann
2025/09	Poster	EAFP XXII, Heraklion, Hellas	Internasjonal	<i>Aliivibrio wodanis</i> strain diversity and interaction with other ulcer-bacteria
2025/09	Poster	EAFP XXII, Heraklion, Hellas	Internasjonal	<i>Moritella viscosa</i> and <i>Tenacibaculum</i> spp. infection pressure in seawater
2025/10	Nyhetsoppslag	Vetinst.no	Nasjonal	Annonsering av webinar samt tilgjengeliggjøring av qPCR-metoder
2025/11	Webinar	Veterinærinstituttet, NCE m.fl.	Nasjonal	Webinar om sårproblematikk hos laks
2025/11	Muntlig presentasjon (x2)	Overnevnte webinar + Åkerblå-webinar	Nasjonal	Overvåking av sår bakterier i sjøvann
2025/11	Masteroppgave, Synne Aurora Pettersen-Dahl	Universitetet i Bergen	Nasjonal	Fenotypisk og genomisk diversitet hos <i>Aliivibrio wodanis</i> , med fokus på bakteriell interaksjon med <i>Moritella viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> spp.
2026/02	Muntlig presentasjon	Patogen-konferanse, Oban, Skottland	Internasjonal	Changing infection pressures from ulcer-associated bacteria in seawater
2026/03	Muntlig presentasjon	FVS-konferanse, Edinburgh, Skottland	Internasjonal	Changing infection pressures from ulcer-associated bacteria in seawater
2026/04	Faglig og administrativ sluttrapport	FHF, Veterinærinstituttet	Nasjonal	Faglig og administrativ sluttrapportering FHF-prosjekt 901838: Sår bakterier i sjøbasert lakseoppdrett – spesialiserte inntrengere eller tilfeldig forbigående?
2026/05	Nyhetsoppslag (under arbeid)	Vetinst.no	Nasjonal	Annonsering av faglig sluttrapport samt sammenfatning av de viktigste funnene
2026/09	Muntlig presentasjon (under arbeid)	ISAAH 2026, Bodø	Internasjonal	Seasonal and geographic fluctuations in <i>Moritella viscosa</i> and <i>Tenacibaculum</i> spp. infection pressures in and around salmon sea-farms in Norway
2026	Pop.vitenskapelig artikkel (under arbeid)	Norsk Fiskeoppdrett	Nasjonal	<i>Moritella viscosa</i> og <i>Tenacibaculum</i> i sjøvann – skiftende smittepress over tid og sted
2026	Vitenskapelig artikkel (under arbeid)	Frontiers in Microbiology e.l.	Internasjonal	A population study of ulcer-associated <i>Aliivibrio wodanis</i> from farmed Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)
2026	Vitenskapelig artikkel (under arbeid)	Microbial Genomics e.l.	Internasjonal	Host-associated genomic variation linked to wound formation in <i>Moritella viscosa</i> isolates from Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)
2026	Vitenskapelig artikkel (under arbeid)	Aquaculture e.l. (trolig todelt publikasjon)	Internasjonal	Seasonal and geographic fluctuations in <i>Moritella viscosa</i> and <i>Tenacibaculum</i> spp. infection pressures in and around salmon sea-farms in Norway

Frisk fisk
Sunne dyr
Trygg mat



Veterinærinstituttet

Ås ▪ Sandnes ▪ Bergen ▪ Trondheim ▪ Harstad ▪ Tromsø

postmottak@vetinst.no

vetinst.no