

Ny analysemetode opnar for meir målretta førebygging av vintersår

I motsetnad til andre bakterielle agens som inngår i multivalente registrerte laksefiskvaksiner, så har ikkje vaksinerings løyst problemet med vintersår forårsaka av *Moritella viscosa*. Kva er årsaka til denne ufullstendige vaksinebeskyttingen mot denne bakterien? I denne artikkelen kommer forfattaren med ei klår anbefaling om i større grad å bruke variantspesifikk vaksinerings. Det betyr at isolat av *M. viscosa* innsamla frå feltutbrot lokalt og regionalt blir nytta som vaksineagens for fisk som setjast ut på same lokalitetar neste gang.

Øyvind Vågnes, leiar for Diagnostikk, Blue Analytics AS
oyvind.vagnes@blueanalytics.no

Innledning

Vintersår er ein sjukdom og ein miljørelatert skade som fører til betydelege dyrevelferdsmessige problem og økonomiske tap for havbruksnæringa.

Vintersår representerer også eit aukande omdømmemessig problem for næringa med stadig fleire negative presseoppslag relatert til denne tilstanden. *Moritella viscosa* er bakterien som er rekna som hovudagens for vintersår på laksefisk i oppdrett. I årets Fiskehelse rapport er *M. viscosa* klassifisert som tredje viktigaste helseproblem. *M. viscosa* har inngått som komponent i multivalente oljeadjuvansvaksiner sidan slutten av 1990-talet. I motsetnad til andre bakterielle agens som inngår i multivalente registrerte laksefiskvaksiner, så har ikkje vaksinerings løyst sjukdomsproblem. Eit viktig spørsmål blir då; kva er årsaka til ufullstendig vaksinebeskytting mot denne bakterien?

Moritella viscosa er meir kompleks enn tidlegare antatt

Moritella viscosa var i utgangspunktet sett på som ein homogen bakterie. Forsking har over tid avdekkja at dette ikkje er tilfelle. Grove *et al.* (2010) viste at *M. viscosa* kunne delast inn i to grupper ved bruk av gensekvensen til gyrase B (gyrB). Denne inndeling blei bekrefta av Karlsen *et al.* (2014). Bruken av begrepa «typisk» og «variant» blei tatt i bruk for å kunne gruppere *M. viscosa* som sjukdomsagens. Typisk *M. viscosa* blei først brukt om laksespesifikke variantar av bakterien. Variant blei brukt om stammer isolert frå andre artar som regnbogeaure. Komplexiteten til *M. viscosa* blei vidare

avdekkja med arbeidet til Karlsen *et al.* (2017). I dette arbeidet blei heile arvestoffet til eit mindre antal *M. viscosa* sekvensert (fullgenomsekvensering) og brukt til å avdekkja variasjon mellom dei undersøkte bakteriellammene. Resultata deira viste ein høgare grad av kompleksitet enn det som tidlegare var kjent med fire ulike bakteriellammer eller clader (**figur 1**). Laksespesifikke *M. viscosa* blei delt inn i tre grupper og bakteriar frå andre artar plassert i ei eiga gruppe.

Dette arbeidet viste variasjon også for laksespesifikke *M. viscosa*, som tidlegare hadde framstått som ei homogen gruppe. Fullgenomsekvensering med påfølgande dataprosessering er ein arbeidsintensiv og kostbar arbeidsmåte.

Ein alternativ metode som har stått fram som hensiktsmessig for typing av slektskapsmessig nærstående bakteriar er MLVA (Multi Locus V(variable number of tandem repeats) Analyse).

Sørgård *et al.* publiserte i 2023 eit arbeid der MLVA blei brukt til å type eit stort antal *M. viscosa* stammer. Her blir begrepet klonalkompleks innført. Dei fleste laksevariantar av *M. viscosa* fell innanfor tre klonalkompleks der «typiske» isolat blir gruppert som klonalkompleks 1 (KK1) (**Figur 2**). Arbeidet viste også at kva klonalkompleks som har dominert som sjukdomsagens for laks har variert over tid.

Ny analysemetode avdekkjer ulike variantar av *Moritella viscosa* hurtigare

MLVA som metode bygger på ei kartlegging av spesielle delar av bakterie DNA. Dette er delar som ikkje kodar for spesielle gen,

men som inneheld korte repeterande sekvensar som vist i **Figur 3**. Denne typen DNA område blir gjerne kalla VNTR der VNTR står for Variable Number of Tandem Repeats. Kombinasjonen av ikkje-kodande område og repeterande element gjer at ein VNTR endrar seg raskare enn arvestoffet generelt. Undersøking av VNTR eignar seg difor for kartlegging av slektskap mellom nærstående artar. Endring i VNTR skjer i form av endring av antalet repeterande element. Om fleire VNTR blir undersøkt og kombinert i ei slektskapsundersøking, får vi eit verktøy med høg oppløysing for bakterietyping

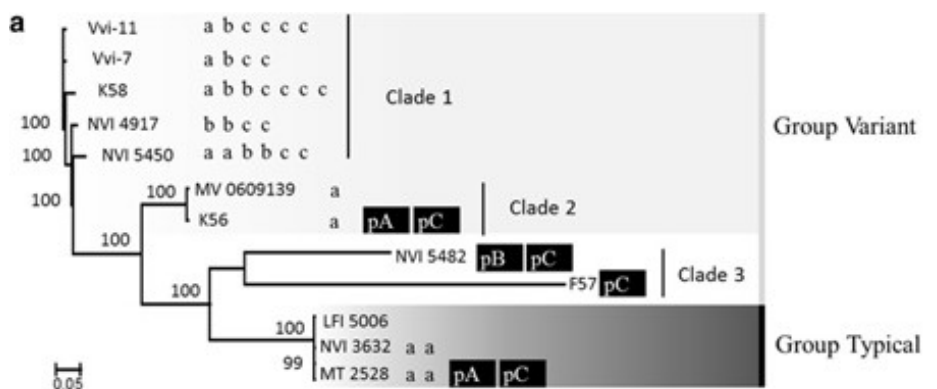
Typing med fullgenomsekvensering vil vere ein «gullstandard». Samanliknar ein MLVA resultatata til Sørgaard med resultatata for fullgenomtypinga til Karlsen så viser desse metodane samanfallande resultat. KK1 tilsvarer «typiske» *M. viscosa*, KK2 tilsvarer clade 2 og KK3 tilsvarer clade 1. Stammene som blir gruppert som clade 3 av Karlsen *et al.* fell utanfor dei tre klonalkompleksa og blir klassifisert som «andre» i arbeidet til Sørgaard. Fordelen med MLVA samanlikna med fullgenomsekvensering er at den som metode er langt mindre ressurskrevjande både arbeidsmessig og kostnadmessig, og opnar for rutinemessig typing av *M. viscosa* stammer.

Ufullstendig vaksinebeskytting i registrerte vaksiner?

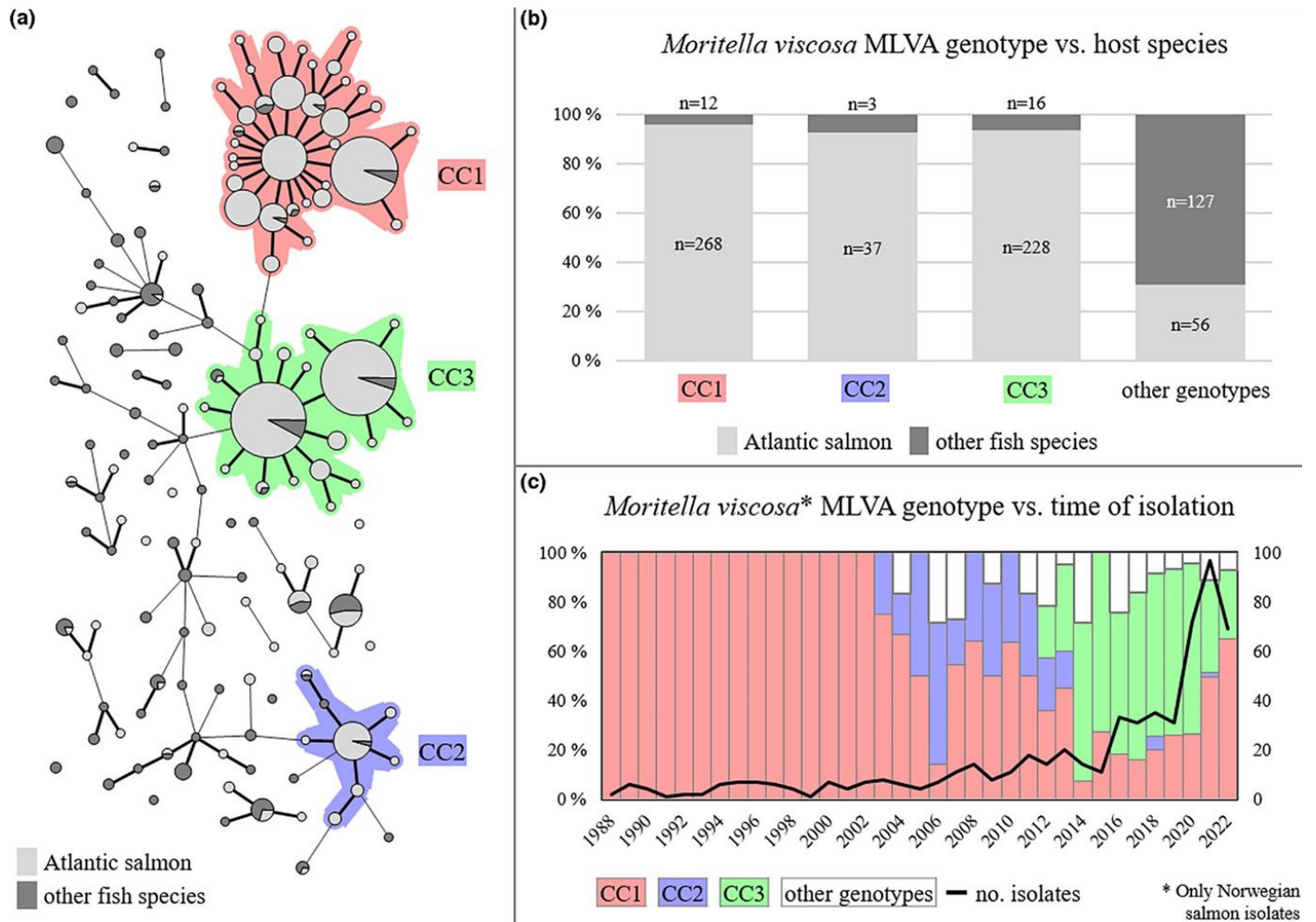
MLVA resultatata til Sørgaard *et al.* viste altså at *M. viscosa* relatert til sjukdom på laks er ei heterogen gruppe (**Figur 2**). Kva klonalkompleks som har dominert som sjukdomsagens har vore skiftande over tid. *M. viscosa* varianten brukt i registrerte vaksiner har imidlertid vore den same, og har for alle vaksineprodusentar vore KK1 isolat frå tidleg 1990-tal. Ny kunnskap indikerer manglande kryssbeskytting mellom ulike klonalkompleks av *M. viscosa*. Dette kan vere ei forklaring på ei tilsynelatande ufullstendig vaksinebeskytting, til tross for gjennomvaksinering av oppdrettslaks med multivalente vaksiner som har *M. viscosa* som antigen. Gjennomgang av historisk materiale viste at fram til 2002 var lakserelaterte *M. viscosa* dominert av KK1. Frå 2002 til 2012 er det eit stort innslag av KK2. Frå 2014-2020 er KK3



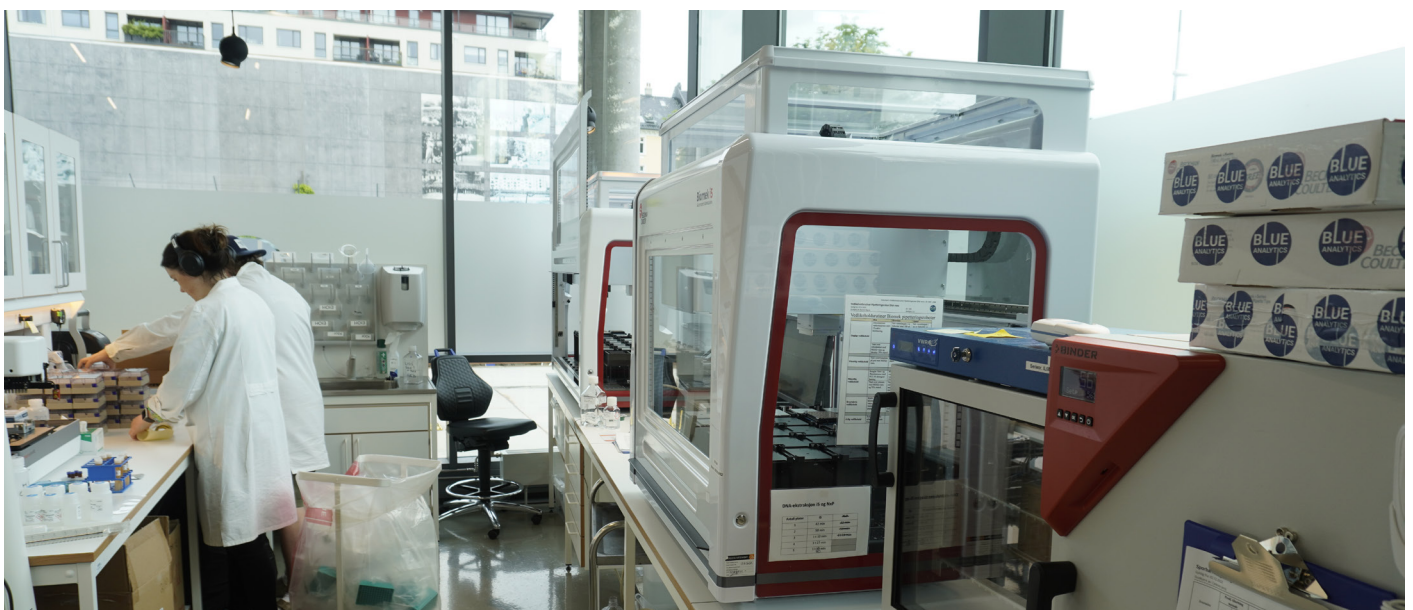
Fullgenomsekvensering med påfølgande dataprosessering er ein arbeidsintensiv og kostbar arbeidsmåte. Ein alternativ metode som har stått fram som hensiktsmessig for typing av slektskapsmessig nærstående bakteriar er MLVA (Multi Lokus V(variable number of tandem repeats) Analyse). Fordelen med MLVA samanlikna med fullgenomsekvensering er at den som metode er langt mindre ressurskrevjande både arbeidsmessig og kostnadmessig, og opnar for rutinemessig typing av *M. viscosa* stammer. Foto. Blue Analytics



Figur 1: Figuren er henta frå Karlsen *et al* 2017 og viser gruppering av *M. viscosa* basert på fullgenom sekvensering. Resultatet viser fire grupper eller clader.



Figur 1: er henta frå Sørgaard et al. 2023 og viser gruppering av *M. viscosa* basert på MLVA typing. A «Minimum spanning» tre som viser slektskap mellom stammer som inngår i arbeidet. Samlinga av stammer kalt klonalkompleks (KK)1, 2 og 3 er avmerka. B Relativ andel av laksestammer som inngår i dei ulike klonalkompleksa. C Relativ prosentvis andel av dei ulike klonalkompleksa for kvart år (venstre x-akse) og antalet isolat undersøkt (høgre x-akse).



Selskapet Blue Analytics har kontor og laboratorier på Marineholmen I Bergen. Her har dei opparbeid seg ein betydelig kompetanse på sekvensering av bl.a *Moritella viscosa*. Foto: Ole Andreas Drønen.

den dominerende varianten. Frå 2020 er det igjen KK1 som er stadig meir dominerande. KK1 ser imidlertid no ut til å ha endra seg, og er i stadig større grad ikkje-viskøs (ikkje- trådtrekkande).

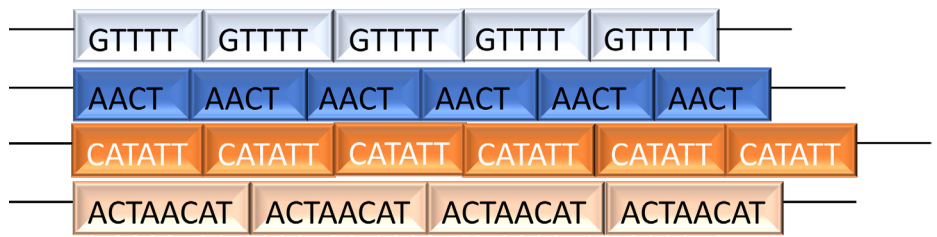
Med bakgrunn i resultatata presentert i arbeidet til Sørgaard *et al.*, har Blue Analytics tatt i bruk MLVA analyser for typing av *M. viscosa* og tilbyr no dette som ein av våre tenester. Resultat frå materialet vi har typa så lang viser at bruk av gyrB sekvensering for typing av *M. viscosa* gjev ein svært ufullstendig informasjon om bakterietypen. Tabell 1 viser eksempel på typing av *M. viscosa* isolat frå ei innsending av lakseisolat. Isolata er alle undersøkt med gyrB sekvensering og typa som «variant». Ved bruk av MLVA typing ser vi at det her dreier seg om fire forskjellige variantar av *M. viscosa* og ikkje berre ein variant som ein kan få inntrykk av med gyrB tilnærminga. Spørsmålet blir då kva dette betyr i praksis.

Ved å bruke ein annan laboratorieteknikk får vi ein indikasjon på at det er ein samanheng mellom ulike MLVA relaterte *M. viscosa* grupperingar og immungjenkjenning. Immunblot er ein teknikk der ein brukar antistoff til å gjenkjenne protein. Vi har brukt antiserum frå kanin som er immunisert med ein *M. viscosa* KK1 stamme og testa dette mot ei gruppe av *M. viscosa* mottatt for MLVA analyse. MLVA typinga er vist i tabell 2. Alle isolat er henta frå laks med vintersår. Resultatet for immunblot er vist i figur 4.

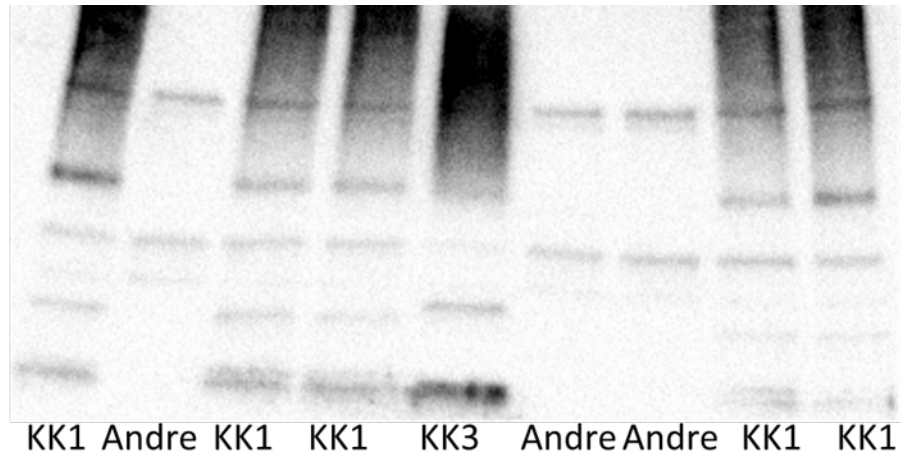
Det er her forskjell i immungjenkjenninga for dei ulike *M. viscosa* variantane. Ein kan ikkje utan vidare overføre dette resultatet til grad av vaksinebeskytting. Resultatet viser likevel at det er forskjell på immungjenkjenning av dei ulike *M. viscosa* variantane.

Kryssbeskytting mellom vaksine- og feltisolat bør kartleggast

Ein publikasjon av Furevik *et al.* (2023) viser at det er manglande kryssbeskytting mellom det dei kallar «klassisk» *M. viscosa* og «variant» *M. viscosa*. I dette arbeidet er det brukt gyrB sekvensering for å gruppere bakterievariantane og «klassisk» *M. viscosa* er KK1. Arbeidet viser at det er manglande kryssbeskytting mellom «klassisk» *M. viscosa* og «variant». Som vi har vist



Figur 3: Variable Number of Tandem Repeats (VNTR). Figuren viser fire av VNTR som inngår i *M. viscosa* MLVA undersøkinga. Ved å telle antal repeterande element i kvar VNTR kan dette brukast til å kartlegge slektskapen mellom ulike *M.viscosa* stammer.



Figur 4: Immunblot med kanin anti KK1 serum mot lakseisolat av *M. viscosa* typa med MLVA (tabell 2). Resultatet viser klonalkompleksavhengig immunologisk gjenkjenning av *M. viscosa*

The advertisement features the Scotland logo at the top. The main text reads: "Meet us at the Scottish Pavilion Stand D-334 | Aqua Nor 2023 Trondheim 22-24 August". Below this is the hashtag "#ScotlandAtAquaNor". At the bottom, there is a QR code with the text "Scan to see our events programme". The background of the advertisement shows a scenic view of a coastal area with aquaculture cages in the water.

Tabell 1: *M. viscosa* lakseisolat mottatt for MLVA typing. Alle isolat var gyrB typa som "variant". MLVA resultatane viste fire forskjellige variantar.

Lakseisolat	gyrB-typing	MLVA-typing
1	Variant	KK2
2	Variant	KK3
3	Variant	KK3
4	Variant	KK3
5	Variant	KK3
6	Variant	Andre 1
7	Variant	Andre 2

Tabell 2: Lakseisolat av *M. viscosa* mottatt for MLVA typing. Isolata var typa med gyrB sekvensering. Isolata blei vidareundersøkt med immunblot.

Lakseisolat	gyrB-typing	MLVA-typing
8	Typisk	KK1
9	Variant	Andre
10	Typisk	KK1
11	Typisk	KK1
12	Variant	KK3
13	Variant	Andre
14	Variant	Andre
15	Typisk	KK1
16	Typisk	KK1

er «variant» ei heterogen gruppe. Dette gjenspeglar seg også i den immunologiske gjenkjenninga av denne gruppa som vist i figur 4. Resultat frå laboratoriearbeid kombinert med erfaring frå felt indikerer at graden av kryssbeskytting mellom ulike *M. viscosa* variantar er usikker og bør kartleggast. Det er også usikkert om dei gamle KK1 variantane gjev tilstrekkeleg vaksinebeskytting mot nye KK1 variantar.

MLVA resultatane vi har viser ei drift i nyare KK1 *M. viscosa* samanlikna med eldre KK1 bruk i registrerte vaksineprodukt.

Inntil kryssbeskytting mellom ulike *M. viscosa* i vaksine er kartlagt anbefaler vi difor i større grad å bruke variantspesifikk vaksinerings.

Det betyr at isolat av *M. viscosa* innsamla frå feltutbrot lokalt og regionalt blir nytta som vaksineagens for fisk som setjast ut på same lokalitetar neste gang •

Referansar

Grove S, Wiik-Nielsen CR, Lunder T, Tunsjø HS, Tandstad NM, Reitan LJ, Marthinussen A, Sørgaard M, Olsen AB, Colquhoun DJ. *Previously unrecognised division within Moritella viscosa isolated from fish farmed in the North Atlantic*. Dis Aquat Organ. 2010 Dec 7;93(1):51-61. doi: 10.3354/dao02271. PMID: 21290896.

Karlsen C, Ellingsen AB, Wiik-Nielsen C, Winther-Larsen HC, Colquhoun DJ, Sørsum H. *Host specificity and clade dependent distribution of putative virulence genes in Moritella viscosa*. Microb Pathog. 2014 Dec;77:53-65. doi: 10.1016/j.micpath.2014.09.014. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25277600.

Karlsen C, Hjerde E, Klemetsen T, Willassen NP. *Pan genome and CRISPR analyses of the bacterial fish pathogen Moritella viscosa*. BMC Genomics. 2017 Apr 20;18(1):313. doi: 10.1186/s12864-017-3693-7. PMID: 28427330; PMCID: PMC5399434.

Sørgaard M, Sveinsson K, Patel S, Nilsen HK, Olsen AB, Vaagnes Ø, Colquhoun DJ, Gulla S. *MLVA genotyping of Moritella viscosa reveals serial emergence of novel, host-specific clonal complexes in Norwegian salmon farming*. J Fish Dis. 2023 May;46(5):535-543. doi: 10.1111/jfd.13766. Epub 2023 Feb 14. PMID: 36787245.

Furevik A, Tunheim SH, Heen V, Klevan A, Knutsen LE, Tandberg JI, Tingbo MG. *New vaccination strategies are required for effective control of winter ulcer disease caused by emerging variant strains of Moritella viscosa in Atlantic salmon*. Fish Shellfish Immunol. 2023 Jun;137:108784. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108784. Epub 2023 May 2. PMID: 37141956.