



FAGLIG SLUTTRAPPORTERING PROSJEKT 901505

YERSINIOSE- UTREDNING AV ØKENDE FOREKOMST HOS NORSK OPPDRETTSLAKS I SJØFASEN

FINANSIERT AV FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS FORSKNINGSFINANSIERING (FHF)

Dato: 30.08.2022

Forfattet av: Duncan Colquhoun, Andreas Riborg, Anita Rønneseth, Eve Fiskebeck, Jannicke Wiik-Nielsen, Hanne Nilsen, Jinni Gu, David Strand og Snorre Gulla

Sammendrag

Bakgrunnen for prosjektet var det betydelige antall utbrudd av yersiniose blant stor laks, hovedsakelig i Midt-Norge, lang tid etter sjøsetting (ofte andre år i sjøen). Dette var på tidspunktet for etablering av prosjektet et forholdsvis nytt fenomen som eskalerte fra ca. 2015 og økte i omfang fram til man så effekt av stikkvaksinering mot yersiniose, som ble introdusert og tatt i utbredt bruk fra ca. 2016-17. Før ca. 2015 var utbrudd av yersiniose vanligvis begrenset til ferskvannsfasen og kort tid etter sjøsetting. Utbrudd forekommer fortsatt i dag hos stor fisk i sjø men i mindre omfang og stort sett i uvaksinert fisk. Prosjektet ble igangsatt for å undersøke årsaken(e) til yersiniose-tilfellene lang tid etter sjøsetting.

Hovedresultatene fra prosjektet inkludere:

- Det ble påvist kraftig økt utskillelse av *Y. ruckeri* fra latent infiserte laksepopulasjoner under termisk avlusing både i felt og under kontrollerte laboratorieforsøk. Videre ble det påvist betydelig økning i antall bakterier i behandlingsvannet utover behandlingsperioden. Det ble også påvist i laboratorieforsøk at latent infisert fisk skiller ut *Y. ruckeri* bare sporadisk til miljøet under ikke-stressende forhold, noe som vil vanskeliggjør eDNA-basert påvisning av subklinisk infeksjoner under slike 'normale' drifts forhold. Oppkonsentrering av bakterien i behandlingskamre på avlusere, kombinert med økte stress og direkte fysiske skader påført fisken i forbindelse med behandlingen, representerer sannsynligvis betydelige bidragsfaktorer til utvikling av klinisk yersiniose i etterkant av avlusing. Disse funnene kan også ha

implikasjoner for utvikling av andre bakterielle og virale sykdommer. Videre viser dette viktigheten av god oversikt over smittestatus på anlegget, god hygiene, og hyppig vannutskifting i avluseren. Det viser også at avlusning bør gjennomføres med hensyn til smittesituasjon i anlegget, dvs. behandling bør begynne med de 'friskeste' merdene, mens fiskepopulasjoner ansett for å ha 'verre' smittestatus tas til slutt.

- Spesifikke PCR-analyser utviklet mot hhv. *Y. ruckeri* på artsnivå og CC1 (norsk laksepatogenvariant), brukt i forbindelse med eDNA-basert kartlegging av virulent og antatt ikke-virulent *Y. ruckeri*, viser at settefiskanlegg kan være samtidig kolonisert av både virulent og ikke-virulent *Y. ruckeri*. Det viser seg også at vaksinerings mot yersiniose kan resultere i falsk positive PCR-resultater fra miljøprøver i minst 3 uker etter av vaksinerings.
- Molekylærbiologiske analyser viser at virulent CC1 fram til ca. midten av 90-tallet bare var en av flere *Y. ruckeri* genotyper forbundet med fiskesykdom i norsk akvakultur, før den etterhvert begynte å dominere fullstendig. Etter dette kan det se ut som at et slags hovedreservoar for CC1 hele tiden har ligget i Midt-Norge, med flere tilfeller av smittespredning både fra og til denne regionen.
- I samarbeid med NFR Nærings-PhD prosjekt 297312 har WGS-basert kartlegging og screening av virulensgener blitt brukt til å kartlegge tilstedeværelse av anerkjente virulensgener i en stor samling *Y. ruckeri* fra hele verden, isolert både fra miljø og syk fisk, og deretter knytte dette opp mot vertsspesifisitet og virulensstatus. Den ikke-virulente statusen til utvalgte norske miljøisolater ble bekreftet gjennom smitteforsøk. Screeningen påviste en variabel korrelasjon mellom virulens og tilstedeværelse av de fleste anerkjente virulensgener, men for et spesifikt invasin-gen, ble en absolutt korrelasjon påvist, dvs. dette genet finnes i alle kjente virulente stammer men ikke i noen miljøstammer.
- Videre er det generelt påvist flere kopier av det tidligere nevnte spesifikke invasin-genet i CC1-isolater fra senere år sammenlignet med eldre isolater fra 80/90 tallet. Betydning av dette funnet krever fortsatt videre forskning, men det er mulig at dette kan relateres til 1) dominans av *Y. ruckeri* CC1 genotypen blant yersiniose-tilfeller i senere år, 2) den forverrede yersiniose-situasjonen generelt i senere år, og/eller 3) den varierende kliniske manifestasjonen av yersiniose hos laks i sjø (tidlig vs. sent i sjøfasen).

- Vi har utført flere smitteforsøk, og en kohabitant smittemodell for yersiniose i norsk laks er etablert. Latent (subklinisk) *Y. ruckeri*-infeksjon har blitt dokumentert i overlevende kohabitant-fisk. Det er også utført et forsøk som skulle undersøke om eksponering av laks for miljøisolatene av *Y. ruckeri* serotype O1 ga beskyttelse mot påfølgende smitte med virulent *Y. ruckeri* CC1. Eventuell beskyttelse kunne her dessverre ikke bekreftes pga. uforventet lav dødelighet i ett positivt kontrollkar, men fisken som ble immunisert med miljøstammene viste produksjon av antistoffer med betydelig kryss-reaksjon mot *Y. ruckeri* CC1, noe som betyr at dette området bør forskes videre på.
- I samarbeid med NFR Nærings-PhD prosjekt 297312 har biotype 2 (BT2)-fenomenet blitt karakterisert hos norske laksepatogene *Y. ruckeri*. BT2 utvikling (dvs. fremvekst av ikke-bevegelige stammer uten flagell) hos regnbueørret-spesifikke stammer har blitt assosiert med vaksinesvikt og BT2 er nå dominerende blant regnbueørret-spesifikke stammer på verdensbasis. Vi har identifisert to separate tilfeller av BT2 utvikling hos norske *Y. ruckeri*, men det ser ikke ut til at denne typen mutant til nå har lyktes i å etablere seg i Norge, muligens pga. at utviklingen virker å ha oppstått hos fisk i sjøvann, noe som trolig representerer en evolusjonær 'blindvei' for bakterien i laksen som blir slaktet ut og ikke returnerer til ferskvann.

Konklusjon er at resultatene generert i løpet av prosjektet gir oss en betydelig forbedret forståelse av hvordan og hvorfor yersiniose har blitt en såpass viktig sykdom i norsk akvakultur i de senere år. Resultatene er forenlig med (men beviser ikke) hypotesen om at utbrudd i sjø kan kobles til stress-relatert aktivering av latent (skjult) *Y. ruckeri*-infeksjon med opprinnelse fra ferskvannsfasen. De molekylære analysene tyder på at *Y. ruckeri* CC1, som tidligere bare var en av flere sykdomsassosierte stammer på 80/90 tallet, har blitt stadig mer utbredt og dominerende i de senere år. Dette kan sannsynligvis relateres til transport av smittet fisk fra region til region samt amplifisering av et spesifikt invasin-gen. Antall kopier av dette genet ser også ut til å korrelere i noe grad med hvordan yersiniose-utbrudd i sjø utspiller seg (om de kommer tidlig eller sent i sjøfasen).

English summary

The project was initiated against a background of increasing numbers of yersiniosis outbreaks in populations of large sea-farmed salmon, late in the sea-phase of culture, mostly in mid-Norway. At the start of the project period this was a fairly new phenomenon that was first observed ~2015, but which increased in prevalence until effectively mitigated by widespread use of intraperitoneal vaccination ~2016/2017. Prior to 2015, outbreaks of yersiniosis were largely confined to the freshwater phase of culture and a short period after sea-transfer. Outbreaks amongst large sea-farmed fish continue to occur post introduction of intraperitoneal vaccination, but to a much lesser degree, and now involve for the most part unvaccinated fish. The current project was therefore initiated to investigate the cause/s of these outbreaks late in the sea-phase of culture.

The main results generated during the project include:

- Significant shedding of *Y. ruckeri* was identified from latently infected salmon during thermal delousing under field conditions and during controlled, simulated thermal delousing in the laboratory. Further, the number of bacteria in the treatment water increased with the number of fish treated. It was established in laboratory trials that latently infected fish shed *Y. ruckeri* only intermittently under non-stressful conditions, a fact that will make eDNA based screening for the bacterium challenging during normal production. Increasing numbers of bacteria within the delousing treatment chamber combined with increased stress and direct physical injury to the treated fish, likely represent a major contribution towards the recent spate of yersiniosis outbreaks reported following non-medicinal delousing. These findings may also have implications for development of other diseases of both viral and bacterial aetiology, while further highlighting the importance of knowing the infection status in the farm, good general hygiene and regular replacement of treatment water in the delouser. It also demonstrates that delousing should be performed with consideration of the infection status in individual cages, beginning with the 'healthiest' cages and working steadily towards populations of fish considered to have poorer health.
- Specific PCR analyses developed for detection of *Y. ruckeri* at the species, CC1 (Norwegian pathogen) and CC2 (international rainbow trout pathogen) levels respectively, revealed that production farms for juvenile salmon may be colonised by both virulent and avirulent *Y. ruckeri* and that vaccination against yersiniosis may result in false positive PCR results at least 3 weeks after vaccination.
- Molecular biological analyses reveal that prior to ca. the mid-90s, CC1 was only one of several *Y. ruckeri* genotypes associated with fish disease in Norwegian aquaculture, but that this genotype subsequently

became almost completely dominating. It appears that mid-Norway has remained the main geographical reservoir for CC1 with several independent transmissions to and from this area being identified. The analyses show that the isolates found in the outermost (newest) tip in the CC1 phylogenetic tree all originate, without exception, from sea-farmed salmon in Mid- and Western-Norway post-2016.

- In cooperation with NRC Industry-PhD project 297312, WGS-based mapping of virulence genes has shown that fish pathogenic strains of *Y. ruckeri* share specific genomic areas that are not found in putatively avirulent strains. The mapping identified a variable correlation between virulence and many recognised virulence genes, but for one specific invasin gene, an absolute correlation was identified, i.e. it is found in all virulent strains but is not found in any avirulent strain.
- Further, we identified more copies of the previously mentioned specific invasin gene in CC1 strains isolated in later years compared to strains isolated during the 80/90's. The importance of this finding needs further research but it is possible that this gene 'amplification' is related to 1) the dominance of *Y. ruckeri* CC1 genotype in recent years 2) the escalation of yersiniosis in Norwegian aquaculture in recent years and/or 3) clinical manifestation of the disease at sea.
- Several infection trials have been performed and a cohabitant infection model for Atlantic salmon in freshwater has been established. Latent infections have also been documented in surviving cohabitant fish. A trial has also been conducted which aimed at investigating whether exposure to avirulent, environmental strains of *Y. ruckeri* awarded protection against subsequent challenge with virulent *Y. ruckeri* CC1. A significant degree of protection could unfortunately not be confirmed due to unexpected low mortality in one of the positive control groups, but fish inoculated with environmental strains displayed significant antibody production against *Y. ruckeri* CC1, indicating that this phenomenon should be further studied.
- In cooperation with NRC Industry-PhD project 297312, the biotype 2 (BT2) phenomenon, i.e. development of non-motile, non-flagellated strains, has been studied genetically in Norwegian CC1 BT2 isolates. It does not appear that this type of mutation has successfully become established in Norwegian aquaculture, possibly due to the fact that these strains appear to have developed in sea-farmed fish, which represent an evolutionary dead-end for the bacteria as the infected fish are harvested and do not return to freshwater.

In conclusion, the results generated in the course of the project provide us with a considerably improved understanding of how and why yersiniosis has become such an important disease in Norwegian aquaculture in recent years. The results are consistent with (but do not prove) the hypothesis that outbreaks in the marine environment are related to stress-related activation of latent *Y. ruckeri* infections originating from the freshwater phase of culture. Molecular biological studies indicate that *Y. ruckeri* CC1 was originally one of several genotypes associated with yersiniosis in Norway in the 1980'/1990's, but that it subsequently extended its range and became increasingly (almost totally) dominating. This was probably related to transport of infected fish from region to region in addition to the amplification of a specific invasin gene in CC1. To some extent, the copy number of this gene further appears related to how yersiniosis outbreaks at sea manifest (i.e. whether they occur early or late in the sea phase).

Innledning

Faglig bakgrunn

Yersiniose skyldes infeksjon med bakterien *Yersinia ruckeri*. Internasjonalt forårsaker yersiniose økt dødelighet hovedsakelig hos regnbueørret, men er i Norge nesten utelukkende forbundet med sykdom hos laks. Yersiniose er i utgangspunktet å regne som en ferskvannssykdom, men sykdomsutbrudd forekommer både i settefiskefasen og i tidligere år rett etter sjøsetting. Likevel har det i senere år vært en gradvis økning i antall påviste tilfeller registrert hos Veterinærinstituttet (VI), og fra 2015-2017 økte antall utbrudd betraktelig hos stor laks i sjø, lang tid etter sjøsetting, særlig i Midt-Norge. En stor andel av tilfellene kunne ikke kobles til kjent *Y. ruckeri*-problematikk i ferskvannsfasen. Trenden ble verre med tiden inntil stikkvaksinering ble utbredt og utsett av beskyttet fisk etter hvert igjen medførte en tilbakegang i utbrudd fra ca. 2017. Etter dette ble situasjon bedre, men det erfares fortsatt utbrudd hos stor fisk i sjø. Ved oppstart av prosjektet fryktet oppdretterne i Midt-Norge en eskalering av problemet og evt. etablering av et marint reservoar for *Y. ruckeri* i denne landsdelen. Økningen i antibiotikaforbruk fra 201 kg i 2016 til 600 kg i 2017 relatert til behandling av yersiniose i et relativt begrenset geografisk område i Midt-Norge, ga også grunn til bekymring.

Ved prosjektoppstart var årsaken(e) til økningen i antall utbrudd av yersiniose i Midt-Norge sent i sjøfasen ukjent, men vi vurderte det som sannsynlig at situasjonen kunne relateres til en eller flere av følgende scenarier: 1) stressutløst aktivering av latent *Y. ruckeri*-infeksjon med opprinnelse fra ferskvannsfasen 2) sjøbåren smitte fra et marint reservoar/andre infiserte anlegg, 3) smitte via brønnbåt, luseflåte eller lignende. Prosjektet fokuserte derfor på disse hypotesene. Det ble bevisst valgt å ikke fokusere på utvikling av vaksiner eller vaksineringsregimer, siden prosjektet allerede ved oppstart hadde utført forsøk med intraperitoneal (i.p.)-vaksinering mot yersiniose som hadde gitt lovende resultater med beskyttelse under hele sjøfasen. Vårt håp var at det gjennom økt kunnskap om bakterien, smitteveier og smittedynamikk, på lengre sikt kunne bli mulig å unngå behov for vaksiner mot *Y. ruckeri*.

Prosjektets omfang

For å utrede problemstillingen ble prosjektet delt opp i følgende fem arbeidspakker:

Arbeidspakke 1: Diagnostisk undersøkelser

Flere sykdommer og infeksjose agens forekommer i norsk oppdrett og infeksjonsbildet i enkelte populasjoner kan bli komplekst. Denne arbeidspakken ble igangsatt for å undersøke om den observerte dødeligheten koblet til isolering av *Y. ruckeri* fra stor laks i sjø skyldtes denne bakterien alene, eller om andre underliggende infeksjoner

spilte en større rolle. I denne arbeidspakken ble alle innsendelser til VI i 2018 fra laks oppdrettet i sjø hvor det ble rapportert funn av *Yersinia ruckeri*, undersøkt for å finne ut om *Y. ruckeri* var den primære årsaken til den observerte dødeligheten.

Arbeidspakke 2: Utvikling av spesifikk PCR

Gjennom et tidligere prosjekt (FHF 901119) hadde vi kartlagt at yersiniose i norsk laks er relatert til et bestemt klonalt kompleks (CC1) av *Y. ruckeri*, mens mange settefisk og stamfiskanlegg også er kolonisert av antatt ikke-virulente stammer. Både CC1 og de fleste antatt ikke-virulent miljøstammer tilhører serotype O1. Av den grunn har vi ikke gått videre med publisering av to PCR-analyser rettet mot henholdsvis *Y. ruckeri* serotype O1 og O2. Disse PCRene ble utviklet under prosjekt 901119, før vi visste at både virulente og ikke-virulente stammer primært tilhørte serotype O1. Fra før av eksisterte det flere publiserte PCRer for deteksjon av *Y. ruckeri* på artsnivå, men siden spesifisiteten til disse PCRene er kjent som noe usikre ble tre nye PCR-analyser utviklet gjennom inneværende prosjekt i samarbeid med NFR nærings-PhD prosjekt 297312. Disse ble henholdsvis rettet mot *Y. ruckeri* på artsnivå, *Y. ruckeri* CC1 og *Y. ruckeri* CC2 (internasjonalt regnbueørret-spesifikt patogen).

Arbeidspakke 3: miljø-DNA (eDNA) undersøkelser

I denne arbeidspakken ble det utviklet eDNA-metodologi for påvisning av *Y. ruckeri* i settefisk- og matfiskanlegg for laks fra både vann og biofilm. PCRene utviklet i arbeidspakke 2 ble benyttet til dette. 15 settefisk- og 4 matfisk populasjoner med en tidligere historikk av yersinia, men som hvor fisken var klinisk frisk, ble undersøkt under avlusning for tilstedeværelse av *Y. ruckeri* CC1 og *Y. ruckeri* på artsnivå.

Arbeidspakke 4: Molekylærepidemiologi

MLVA-undersøkelser påbegynt under FHF prosjekt 901505 ble utvidet til totalt 886 isolater som dekket alle norske utbrudd registrert ved Veterinærinstituttet i perioden 1985 til 2021. Herfra ble 423 representative isolater fordelt på alle kjente MLVA-profiler, både virulente og antatt ikke-virulente klonalkomplekser og 'singletons', helgenom-sekvensert ved å bruke Illumina 'short-read' teknologi. For å maksimere informasjonen fra genomene ble representative isolater også sekvensert ved bruk av nanopore 'long-read' teknologi. Bioinformatiske analyser ble kjørt med formål om å belyse de evolusjonære mekanismene og kartlegge den norske *Yersinia*-populasjonen over tid og rom.

Både arbeidspakke 3 og arbeidspakke 4 ble utført i nært samarbeid med NFR/Vaxxinoa AS finansiert nærings-PhD prosjekt 297312 med stipendiat Andreas Riborg. Stipendiatprosjektet fokuserte på karakterisering av virulensfaktorer primært basert på 'Genome wide association studies' og eDNA-påvisning av bakterien. Det var åpen informasjonsflyt mellom prosjektene.

Arbeidspakke 5: Smitteforsøk

Det ble utført tre smitteforsøk i forbindelse med prosjektet (FOTS Id: 18792), med mål om å etablere en kohabitant smittemodell for fremtidig evaluering av vaksiner mot yersiniose i laks. Et forsøk ble gjennomført for å dokumentere tilstedeværelse av ikke-klinisk/latente *Y. ruckeri*-infeksjoner i sjøsatt laks, og samtidig bekrefte/avkrefte funn gjort i arbeidspakke 2 relatert til økt utskillelse av bakterien fra latent infisert fisk under termisk lusebehandling. Et tredje forsøk ble utført for å undersøke om antatt ikke-virulente stammer isolert fra miljø (karvegg/rogn) virkelig var ikke-virulente.

Prosjektorganisering

Prosjektgruppen

Duncan Colquhoun, prosjektleder, Veterinærinstituttet (VI)

Jinni Gu, VI (nå Biomar)

Anita Rønneseth, Universitet i Bergen (UiB)

Heidrun Wergeland, UiB

Snorre Gulla, VI

David Strand, VI

Eve Fiskebeck, VI

Jannicke Wiik-Nielsen, VI

Hanne Nilsen, VI

Ed Feil, Univ. Bath, UK

Sion Bayliss, Univ. Bath, UK

Referansegruppen:

Morten Lund, Patogen (erstatning for Magnus Devold)

Andreas Skagøy, Måsøval (erstatning for Arnfinn Aunsmo)

Marianne Halse, Salmar

Farah Manji/Gordon Ritchie, Mowi

FHF observatør: Sven Martin Jørgensen

Problemstilling og formål

Se sammendrag og faglig innledningen.

Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble utført som et samarbeidsprosjekt mellom Veterinærinstitutt, Universitet i Bergen og University of Bath, UK

Prosjektledelse Duncan J. Colquhoun, Veterinærinstituttet i Oslo/Ås.

Arbeidspakke 1 (*Utvidet diagnostikk*) ble først ledet av Jinni Gu, Veterinærinstituttet i Trondheim. Etter at hun gikk over i ny jobb tok Hanne Nilsen, Veterinærinstituttet i Bergen ansvar for dette delprosjektet.

Arbeidspakke 2 (*Spesifikk qPCR utvikling*) ble ledet av Duncan Colquhoun, Veterinærinstituttet i Oslo/Ås.

Arbeidspakke 3 (*Molekylære undersøkelser av smitekilder og sub-kliniske infeksjoner vha. eDNA-metodologi*) ble ledet av Duncan Colquhoun.

Arbeidspakke 4 (*Molekylærepidemiologi*) ble ledet av Snorre Gulla, Veterinærinstituttet i Oslo/Ås.

Arbeidspakke 5 (*Smittemodell-utvikling*) ble ledet av Anita Rønneseth, Universitet i Bergen.

Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

AP1: Diagnostisk undersøkelser

I 2018 ble det i Veterinærinstituttets journalsystem registrert infeksjon med *Y. ruckeri*/yersinose hos laks i forbindelse med 29 diagnostikkutredninger fordelt på 21 anlegg. Av disse ble hele organpakker fra 9 utbrudd i matfiskanlegg grundig undersøkt histologisk i forbindelse med prosjektet. De fleste tilfellene involverte (som i 2017) stor fisk (1,3-4 kg). I ca. 50 % av de undersøkte tilfellene kunne infeksjon med *Yersinia ruckeri* regnes som hovedårsak til sykdom og/eller dødelighet. I de andre sakene ble det også påvist PD, CMS, HSMB, AGD, *Pasteurella* infeksjon eller HSS samtidig og/eller på noen av de samme individene (koinfeksjon). Stress i forbindelse med mekanisk avlusning var nevnt i flere anamneser som en sannsynlig bidragsyter til utløsning av yersinose-utbrudd i sjø. Undersøkelsene bekrefter at *Y. ruckeri* ved mange tilfeller er primærårsak til dødeligheten i sjøanlegg, men at smittesituasjonen ofte er kompleks med andre tilleggsdiagnoser.

AP2: PCR-utvikling

I denne arbeidspakken ble det utviklet tre PCR'er med forskjellig resolusjon. Utviklingen av PCR'ene ble basert på identifisering av unike sekvenser blant de mange helgenom-sekvensene produsert i AP4. PCR'ene som ble utviklet i prosjektet var:

1. En PCR som identifiserer alle *Y. ruckeri*, uansett serotype og virulens-status (dvs. både patogene og ikke-patogene stammer). Det er viktig å påpeke at denne PCR'en ikke gir utslag mot bakterielle arter som er veldig nært beslektet til *Y. ruckeri* (som det finnes mange forskjellige typer av i oppdrettsmiljøer, f.eks. *Serratia* spp. og andre *Yersinia*-arter)
2. En PCR som utelukkende identifiserer *Y. ruckeri* klonalkompleks 1 (CC1) som er den mest alvorlige smittsomme typen i Norge.
3. En PCR som utelukkende identifiserer *Y. ruckeri* klonalkompleks 2 (CC2) som er den mest alvorlige smittsomme typen for regnbueørret i internasjonal oppdrett.

PCR'ene ble videre brukt i forbindelse med eDNA-baserte undersøkelser i arbeidspakke 3 for å kartlegge tilstedeværelse av *Y. ruckeri* generelt og CC1 spesifikt i både settefisk- og sjøanlegg. PCR'ene rettet mot *Y. ruckeri* på artsnivå og CC1-nivå er beskrevet i Journal of Fish Diseases (se vedlegg 1, Riborg et al. 2022a **qPCR screening for *Yersinia ruckeri* clonal complex 1 against a background of putatively avirulent strains in Norwegian aquaculture**, <http://doi.org/10.1111/jfd.13656>). PCR'en som er rettet mot *Y. ruckeri* CC2 (som ikke finnes i Norge) planlegges publisert i samarbeid med en amerikansk samarbeidspartner.

AP3: eDNA undersøkelser

Formålet med denne arbeidspakken var screening for *Y. ruckeri* generelt og for *Y. ruckeri* CC1 spesifikt i settefisk- og sjøanlegg for å undersøke om eDNA-baserte analyser kunne identifisere skjulte, subkliniske infeksjoner. Undersøkelsene og resultatene er beskrevet av Riborg et al. 2022a (vedlegg 1)

eDNA undersøkelser settefiskanlegg

Settefisk-anleggene ble undersøkt for å forsøke å finne ut hvor utbredt *Y. ruckeri* CC1-infeksjon er/var i ferskvannsfasen. I innledningen (metodevalidering) til ferskvannsdelen av studiet ble fire anlegg med kjent, kronisk *Y. ruckeri* CC1-smittetstatus undersøkt. Disse anleggene ble besøkt av prosjektmedlemmer ved VI som samlet grundig fra råvann, karvann og biofilm fra kar og utløpsrør. Det ble kjørt PCR på mellom 70 og 170 prøver per anlegg (forskjellige antall prøver basert på anleggsstørrelse og kompleksitet). Settefiskundersøkelsene ble deretter fokusert på biofilm-prøver, hvor det ble undersøkt 15 settefiskanlegg i Midt-Norge med prøvetaking av ansatte på anleggene etter utsendelse av prøvetakingspakker fra VI. Prøvene ble sendt ekspress overnatt til laboratoriet i Oslo for analyse. Det ble bedt om prøvetaking av biofilm fra:

- Avløp fra kar med største fisk som ikke var vaksinert mot *Y. ruckeri*.
- Avløp fra kar fra største fisk som var vaksinert mot *Y. ruckeri*.

- Avløp/gråvannskum ute.
- Slam (filter, avløpsrenne).
- Evt. andre steder med tydelig biofilmpåslag.

Det ble påvist en sterk korrelasjon mellom vaksinerings mot yersiniose og positiv PCR påvisning av *Y. ruckeri* CC1. Dette ble undersøkt videre på et anlegg uten yersiniose-historikk og som nylig hadde levert negative resultater i løpet av prosjektperioden. Biofilm-prøver ble tatt før vaksinerings og ukentlig i fire uker etter vaksinerings.

Kort oppsummerte resultater fra ferskvannundersøkelsene:

- Under etableringsfasen ble både Sterivex og nitrocellose-filtreringsmetoder identifisert som like godt egnet for vannbasert eDNA prøvetaking for *Y. ruckeri*. Nitrocellulose-filtrene ble vurdert som minst arbeidskrevende og ble brukt utover i prosjektet i forbindelse med vannbasert prøvetaking.
- Prøvetaking fra moden biofilm ble funnet like effektiv som vannbasert prøvetaking for sporing av *Y. ruckeri* i situasjoner hvor moden biofilm er tilgjengelig (for eksempel settefiskanlegg) og hvor et kvalitativt resultat er tilstrekkelig. I situasjoner hvor en moden biofilm er utilgjengelig (for eksempel under kortvarige smitteforsøk i laboratorier), eller dersom man ønsker å kvantifisere utskillelse av bakterien fra fisk, er vannbasert prøvetaking bedre egnet.
- eDNA-baserte undersøkelser er veldig godt egnet til påvisning av *Y. ruckeri*, også skjulte infeksjoner, i deler av settefiskanlegg som ikke er eksponert for yersiniose-vaksiner. Metoden er såpass sensitiv at den detekterer vaksinerester i mer enn tre uker etter vaksinerings.

eDNA undersøkelser matfiskanlegg

Egnethet av eDNA-metoden for påvisning av sub-kliniske *Y. ruckeri*-infeksjoner i sjøsatt laks ble også undersøkt. Prosjektmedlemmer besøkte et matfiskanlegg i Midt-Norge under et akutt utbrudd. Fisken var stor (4 kg+) og dødeligheten betydelig. Det ble tatt overflate-vannprøver fra den affiserte merden og på forskjellige avstander nedstrøms. Etter vurdering av resultatene generert her (se under) ble det bestemt å fokusere på vannprøver tatt under termisk avlusing der høy fisketetthet i det avgrensede vannvolumet vil kunne gi stor oppkonsentrering av smittestoff utskilt fra evt. bærerfisk.

Kort oppsummering av resultatene:

- eDNA-undersøkelser basert på prøver tatt direkte fra sjøvann ble funnet som egnet for påvisning av **aktive** yersiniose-infeksjoner i laks oppdrettet i sjøen. Bakterien ble påvist inntil 100 m nedstrøms for den affiserte merden, men mengden *Y. ruckeri* som ble påvist var lav. Metoden anses derfor som lite egnet for identifisering av sub-kliniske tilfeller hvor mengden bakterier skilt ut fra fisken er vesentlig lavere enn under aktive infeksjoner.
- eDNA-undersøkelser basert på vannprøver tatt fra behandlingskamre under termisk avlusning er svært godt egnet for deteksjon og kvantifisering av *Y. ruckeri* i sjøvann, også fra skjult infisert fisk. Vi har screenet flere termisk avlusningsbåter/-flåter før, under og etter behandling. I tre populasjoner av klinisk frisk fisk som var kjent eksponert for *Y. ruckeri* i en tidligere fase av oppdrettssyklusen påviste vi en stadig økning av *Y. ruckeri* CC1 i behandlingskammeret underveis i behandlingen. Bakterien ble ikke i noen av disse tilfellene påvist i behandlingskammeret i forkant av behandlingen eller i vannprøver tatt fra merdkanten. Resultatene støttes av kontrollerte laboratorieforsøk gjennomført i arbeidspakke 5.

Generelle betraktninger om eDNA påvisning av Y. ruckeri

Prøvetaking fra moden biofilm ble identifisert som like effektivt som vannbasert prøvetaking for påvisning av *Y. ruckeri* i situasjoner hvor moden biofilm er tilgjengelig (for eksempel settefiskanlegg) og hvor et kvalitativt resultat er tilstrekkelig. I situasjoner hvor en moden biofilm er utilgjengelig (for eksempel under kortvarige smitteforsøk i laboratorier), eller om kvantifisering er ønskelig (f.eks. ved utskillelse av bakterien fra fisk), er vannbasert påvisning bedre egnet. eDNA-baserte undersøkelser ble vurdert som godt egnet for påvisning av *Y. ruckeri* (også skjulte infeksjoner) i settefiskanlegg som ikke er eksponert for yersiniose-vaksiner. En mulig ulempe med metoden er at den er såpass sensitiv at den detekterer vaksinerester i mer enn tre uker etter vaksinerings. Dette betyr at det alltid vil være en del usikkerhet rundt påvisning (særlig spormengder) av *Y. ruckeri* i settefiskanlegg som benytter vaksinerings som profylaktisk tiltak. eDNA-undersøkelser ble også funnet svært godt egnet for deteksjon og kvantifisering av *Y. ruckeri* i sjøvann.

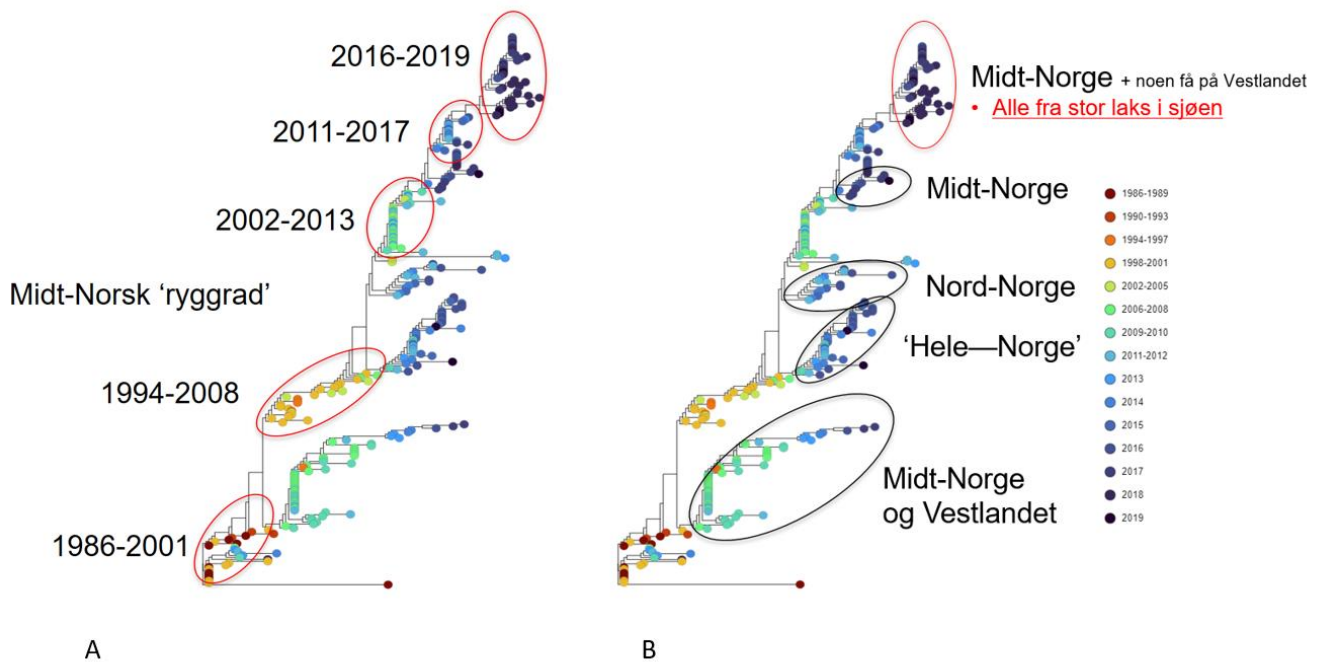
Flere populasjoner av klinisk frisk fisk tidligere eksponert for *Y. ruckeri* ble undersøkt under termisk avlusning med vannprøver tatt fra merden, og fra behandlingskammer i avlusningsmaskin før, under og etter behandlingen. Bakterien ble ikke påvist i merdvann, men ble påvist i stadig økende mengder i behandlingskammeret underveis i behandling, noe som gir støtte til hypotesen om bærerstatus og en stressrelatert reaktivering av skjulte *Y. ruckeri* infeksjoner i sjø. Dette støttes videre av resultater fra smitteforsøk utført i AP5. En del av resultatene er publisert sammen med PCR'ene som ble utviklet under arbeidspakke 2 (vedlegg 1; Riborg et al. 2022a). Det er også publisert en populærvitenskapelig artikkel på

eDNA-kartlegging av *Y. ruckeri* i oppdrettsmiljøer og utskillelse av *Y. ruckeri* fra infisert laks under termisk avlusning (vedlegg 2; Norsk Fiskeoppdrett nr 8-2021 pp. 100-104).

AP4 Molekylærepidemiologi

Analysene viser at CC1 har vært tilstede i norsk akvakultur sannsynligvis siden før 1986, men i 10 år fram til og med 1996 utgjorde CC1 bare én av flere *Y. ruckeri* typer som jevnlig ble isolert fra syk norsk laks, dvs. at den enda ikke var dominerende. Fra ca. 1997-2004 økte CC1 sin dominans og fra 2005 til dags dato har den vist nesten total dominans blant syk laks i både ferskvann og sjøvann i Norge. Nærmeste kjente slektninger utenfor CC1 er den varianten som dominerer hos skotsk oppdrettslaks, samt et isolat fra 1978 i Alaska. ‘Single Nucleotide Polymorphism’ (SNP)-baserte analyser av CC1-isolater resulterte i en ‘logisk’ fylogenetisk topologi med ‘roten’ av dagens utbredte og dominerende CC1 isolert i Midt-Norge i 1986. Analysene indikerer at Midt-Norge helt siden da har vært ‘kjerne’-område for CC1 og isolater derfra utgjør fra 1986 og frem til i dag en slags evolusjonær ‘ryggrad’ i det fylogenetiske treet (Figur 1). Videre indikerer analysen flere uavhengige introduksjoner fra en opprinnelig midt-norsk kilde til nye geografiske områder innen norsk lakseoppdrett, med videre lokal evolusjon her.

Foreløpige analyser basert på hybrid sekvenseringsteknologi (Illumina + Nanopore) indikerer at en eller flere ‘gen-amplifisering’ event(er) har skjedd innen CC1 tidlig på 1990-tallet og at isolater av nyere isoleringsdato har flere kopier av ett spesifikt invasin-gen sammenlignet med isolater fra før ca. 2000 (Figur 2 og 3). Funnene peker også på at antall kopier av dette genet kan ha en innvirkning på det kliniske forløpet dersom fisken har med seg bakterien når den sjøsettes, da estimerte kopitall >2 ser ut til å øke faren for utbrudd kort tid etter sjøsetting mens isolater med kun 1-2 estimerte kopier i større grad forblir subkliniske i lengre tid (Figur 3). Gen-amplifisering er et fenomen hvor antall kopier av et eller flere spesifikke gener øker, noe som kan gi bakterien en selektiv fordel innenfor en bestemt økologisk nisje, men dette er ikke lett å karakterisere basert på Illumina sekvenseringsteknologi, som i hovedsak ble brukt i dette prosjektet. Under assemblering av korte DNA-fragmenter produsert av en Illumina sekvenseringsmaskin har analyseprogrammene problemer med å skille identiske sekvenser som foreligger i flere kopier fra hverandre, noe som kan gi underrapportering av antall. Ved å sammenligne mengden sekvenser som dekker dette invasin-genet med den totale sekvensmengden kunne vi imidlertid estimere sannsynlig antall kopier av genet i hver av de sekvenserte isolatene. Supplering med lange DNA-fragmenter fra Nanopore sekvensering for utvalgte isolater lot oss videre, igjen i tett samarbeid med Nærings-PhD prosjekt 297312, bekrefte ulike kopi-antall av dette invasin-genet i disse isolatene. Arbeidet skal publiseres vitenskapelig i løpet av 2022.

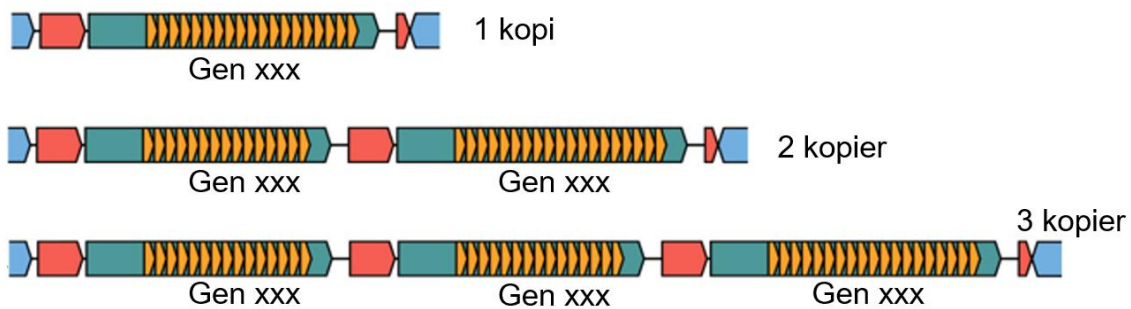


Figur 1: SNP-basert fylogeni av *Y. ruckeri* CC1 i Norge 1986-2019 som indikerer at dagens populasjon først oppsto i Midt-Norge, hvor hoved-reservoaret siden har blitt værende (A). Opp gjennom årene har imidlertid flere sub-populasjoner blitt spredt rundt om i Norge og etablert seg i nye områder med varierende grad av videre spredning (B).

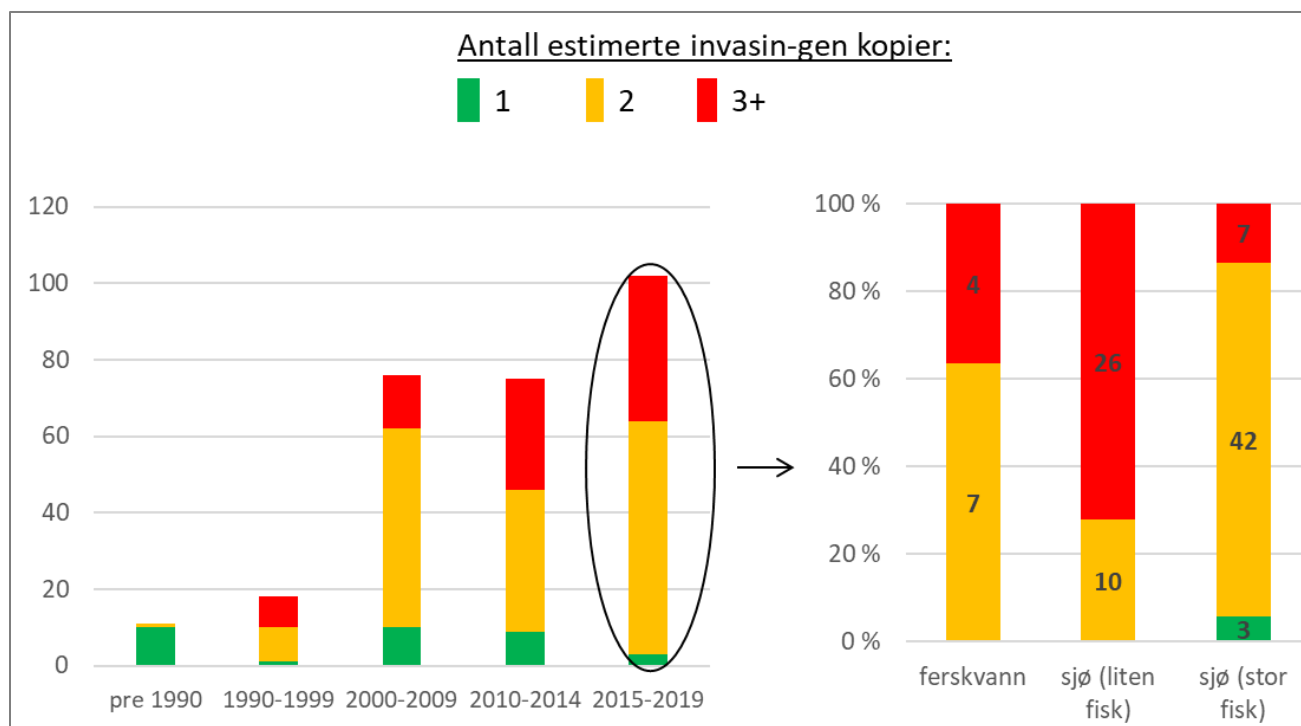
Kort oppsummering av resultater fra molekylærepidemiologi:

- *Y. ruckeri*-stammer internasjonalt, både virulente og antatt ikke-virulente miljøisolater, utgjør en nokså tettbeslektet art, med parvis likhet mellom genomer (Average Nucleotide Identity) på >97.4%.
- Det er bekreftet at CC1, den dominerende laksepatogene klonen som fullstendig har dominert yersiniose-situasjonen hos norsk laks i både ferskvann og sjøvann, har en sær-norsk distribusjon. Nærmeste kjente slektninger utenfor CC1 er den varianten som dominerer blant skotsk laks, samt et isolat fra 1978 i Alaska.
- CC1 (sær-norsk laksepatogen) har vært tilstede i Norge høyst sannsynlig siden lenge før 1986.
 - I 10 år fram til ca. midten av 90-tallet var CC1 bare én av flere *Y. ruckeri* typer som jevnlig ble isolert fra syk norsk laks, dvs. den var enda ikke sterkt dominerende.

- Fra slutten av 90-tallet ble CC1 noe mer dominerende, men fra ca. 2005 til dags dato har den nesten vist total dominans i Norge.
- SNP-basert analyse viser et mønster som støtter eksistens av flere CC1 ‘sub-populasjoner’ som indikerer 4-5 introduksjoner fra en opprinnelig midt-norsk kilde til nye områder i norsk lakseoppdrett, med videre lokal spredning og evolusjon.
 - ‘Roten’ av CC1-treet utgjøres av norske isolater fra 1986.
 - Den nyeste forgreiningen på CC1-treet utgjøres av en gruppe isolater funnet kun fra laks i sjø i Midt- og Vest-Norge etter 2016.
 - Ytterligere øktresolusjon og undersøkelser relatert til kopinummer av et spesifikt invasin-gen (se Figur 2 og 3) viser forskjellige grader av gen-amplifisering av mulig betydning for virulens/’fitness’.



Figur 2: Gen-amplifisering av invasin-genet i *Y. ruckeri* prøvetatt i 1990 (1 kopi) og fra 2005 og senere (2 eller flere kopier).



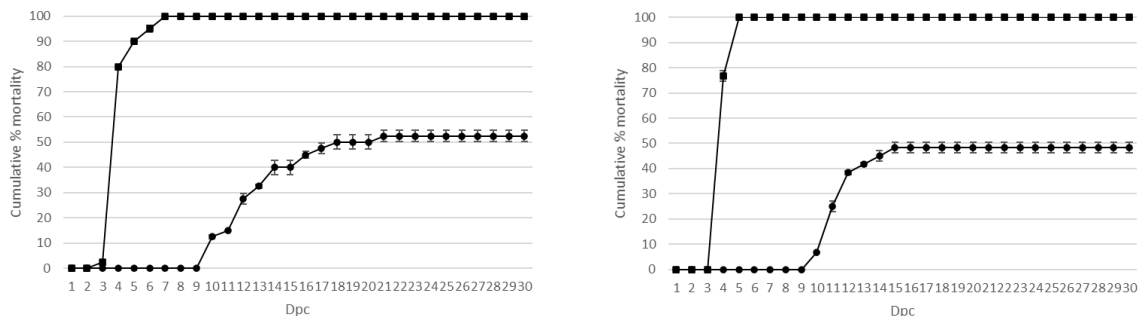
Figur 3: Til venstre vises antall norske *Y. ruckeri* CC1 isolater (fra sent 1980-tall frem til 2019) med hhv. 1, 2 eller 3+ estimerte kopier av invasin-genet (basert på Illumina helgenom sekvensdata). Til høyre vises den relative fordelingen av disse basert på klinisk manifestasjon mellom 2015-2019.

Videre er biotype 2 (BT2)-fenomenet, dvs. fremvekst av ikke-bevegelige stammer uten flagell, studert med utgangspunkt i norske CC1 BT2-isolater. BT2 er nå den dominerende fenotype blant det regnbueørret-spesifikke klonalkomplekset CC2 internasjonalt, og assosieres med utbredt vaksinerings mot den bevegelige fenotypen (BT1). Vi har påvist at BT2 har oppstått uavhengig minst to ganger i norsk akvakultur, én gang på 80-tallet og en gang i 2017 (dvs. i etterkant av utbredt vaksinerings). Det ser ikke ut som om BT2-mutantene til nå har lyktes i å etablere seg i Norge, muligens pga. at utviklingen ser ut som å ha oppstått hos fisk i sjøvann, noe som trolig representerer en evolusjonær 'blindvei' i laksen som blir slaktet ut og ikke returnerer til ferskvann. Dette arbeidet ble publisert i 2022 under tittelen **Biotyping reveals loss of motility in two distinct *Yersinia ruckeri* lineages exclusive to Norwegian aquaculture** (vedlegg 3 Riborg et al 2022b; <https://doi.org/10.1111/jfd.13590>). Colquhoun og Gulla sitt arbeid i forbindelse med denne studien ble finansiert gjennom FHF 901505.

AP5: Smittemodell utvikling

Det ble utført tre smitteforsøk under denne arbeidspakken.

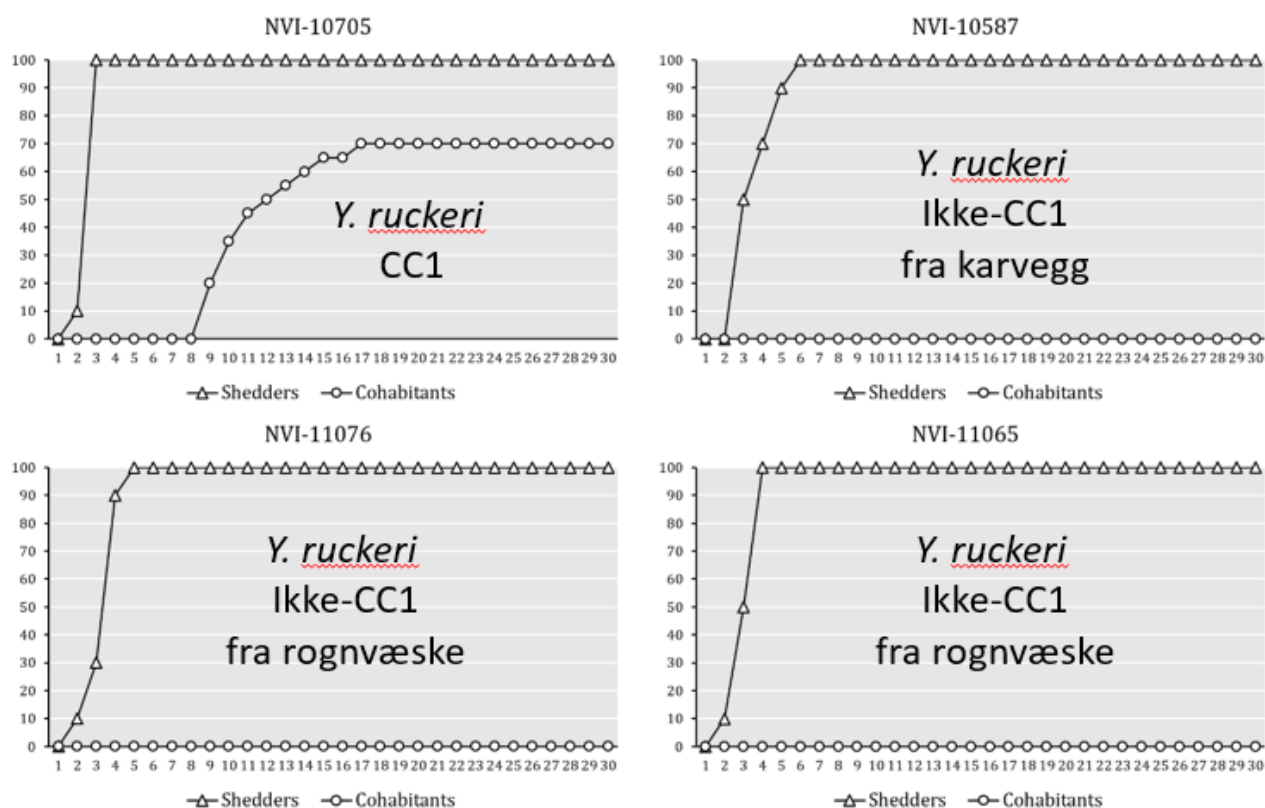
1. En kohabitant smittemodell i lakseparr i ferskvann ble etablert, hvor det ble oppnådd ca. 50% dødelighet blant naiv kohabitant fisk og hvor latent infeksjon ble etablert i overlevende kohabitant fisk. Utskillelse av *Y. ruckeri* fra infisert fisk minsket over tid etter den akutte dødelighetsfasen og kunne bare sporadisk påvises i vannet. To forskjellige blandingsnivåer av kohabitant/naiv fisk ble testet (Figur 4). Dette forsøket har etablert en naturlig kohabitant smittemodell egnet for fremtidig vaksinetesting og evt. videre studie av latente *Y. ruckeri* infeksjoner. Dødeligheten blant naiv fisk ble ikke vesentlig påvirket av innblandingsgrad av i.p. injisert fisk.



Figur 4: Figuren viser kumulativ dødelighet over tid som gjennomsnitt av 2 kar/gruppe. A=1:1 (i.p.:kohab), B=1:2 (i.p.:kohab). Sorte firkanter er i.p. injisert fisk, sorte rundinger er kohabitanter.

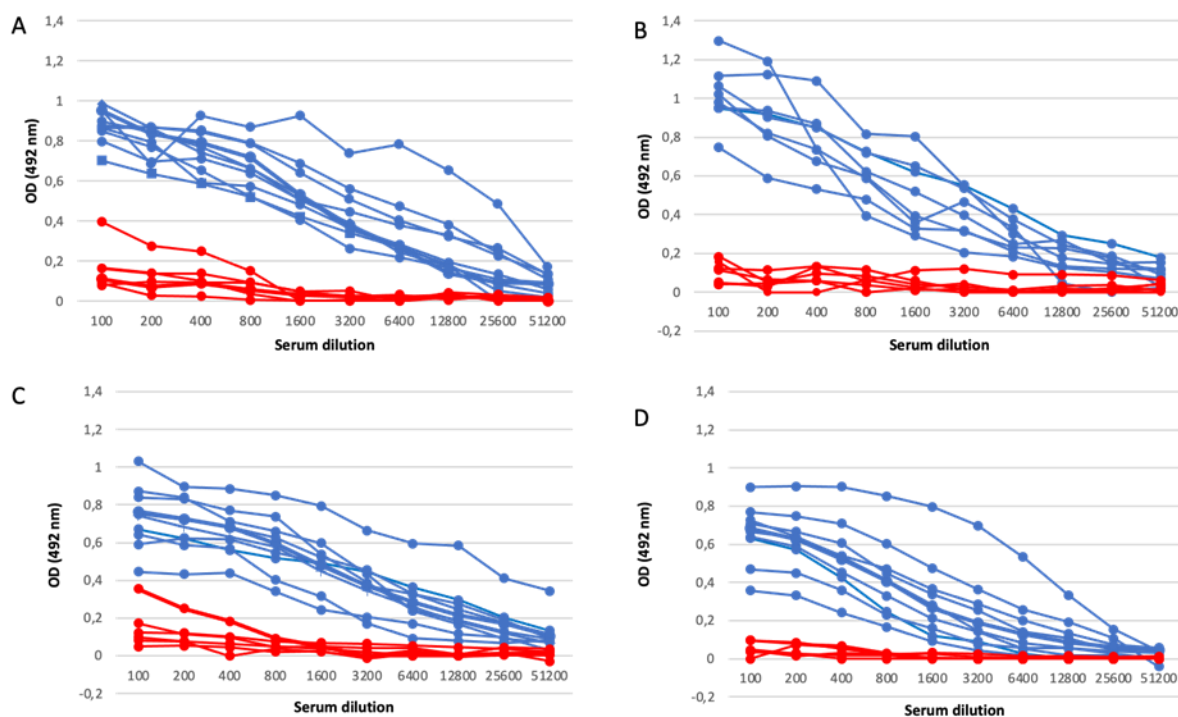
2. En ny kohabitant smitte ble utført basert på modellen utviklet i første forsøk, med lignende dødelighet blant kohabitant fisk. Latent infeksjon blant overlevende fisk ble igjen påvist og bakterien kunne også denne gangen bare påvises sporadisk i vannet. Overlevende fisk ble så, etter smoltifisering, 'sjøsatt' og etter en periode i sjøvann eksponert for simulert termisk avlusning. *Y. ruckeri* ble da påvist i store mengder i avlusningsvann, noe som bekrefter økt utskillelse av bakterien under slik behandling. Se Riborg et al 2022a (vedlegg 1) for presentasjon av resultatene.

3. Det ble også utført en kombinasjon i.p./kohabitant smitteforsøk med formål om å bekrefte/avkrefte antatt 'ikke-virulent' status av ikke-CC1 *Y. ruckeri* dyrket fra miljø (rognvæske og karvegg) og for å teste om eksponering av fisk for disse stammene kunne gi beskyttelse mot senere infeksjon med CC1 *Y. ruckeri*. Det ble testet tre miljøstammer og én CC1-stamme som positiv kontroll. Forsøket (Figur 5) viste at miljøisolatene var virulente når de ble injisert i fisk, med 100% dødelighet, men, i motsetning til CC1 med ca. 70% dødelighet i kohabitantgruppen, ble det ikke observert dødelighet blant kohabitant fisk i miljø-*Y. ruckeri* smittekar. Etter en periode ble overlevende fisk eksponert for CC1 (via injisert shedder fisk), noe som gav forholdsvis lav dødelighet blant fisk tidligere eksponert for miljø-*Y. ruckeri*, men dessverre ble dødeligheten også lav i en kontroll gruppe immunisert med PBS. Det kan derfor enda hverken konkluderes eller utelukkes hvorvidt eksponering for miljø-*Y. ruckeri* gir beskyttelse ved senere eksponering for virulent CC1.



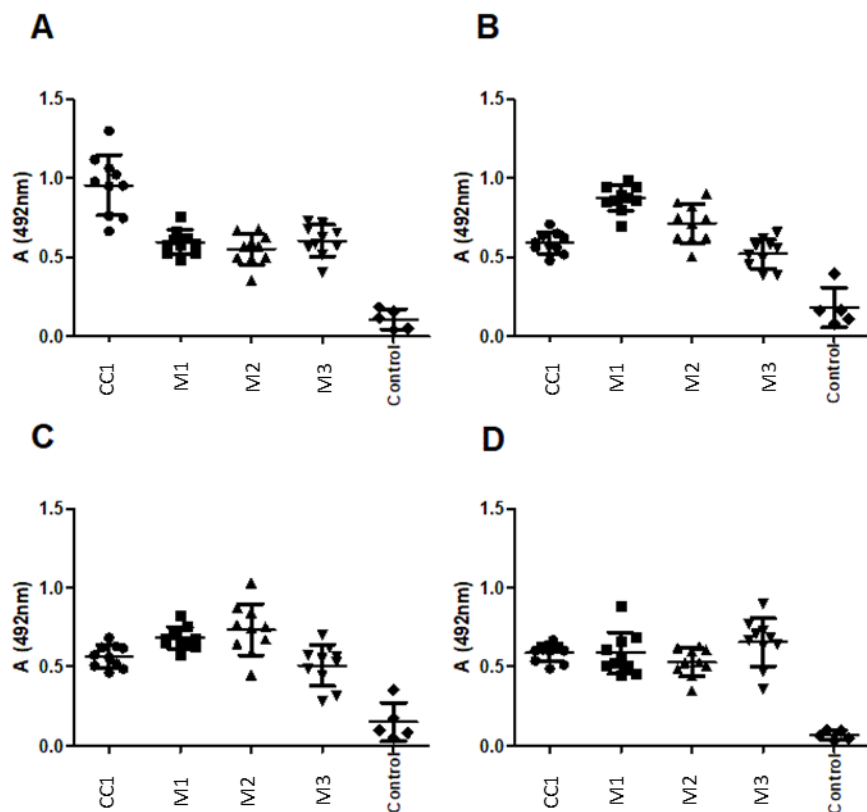
Figur 5: Grafene viser 100% dødelighet etter i.p. smitte med både miljø-*Y. ruckeri* og CC1 isolater, men ingen videre fisk-til-fisk spredning av infeksjon fra fisk i.p. smittet med miljø-*Y. ruckeri* til naiv kohabitant fisk.

For å undersøke kryssreagerende egenskaper mellom antistoffer rettet mot *Y. ruckeri* CC1 og miljøisolater ble det formulert fire vaksiner. Vaksinene inneholdt formalin-drepte bakterier (*Y. ruckeri* CC1 og tre miljø isolater) formulert inn i Freund's Incomplete adjuvans, og 10 fisk ble vaksinert med hver vaksine mens 10 kontrollfisk ble vaksinert med steril PBS. Etter endt immuniseringsperiode ble serum isolert og spesifikk antistoffrespons testet ved ELISA. Resultatene viste at spesifikke antistoffer ble dannet mot alle *Y. ruckeri* isolater etter vaksinasjon (Figur 6).



Figur 6: Fortynningskurver av antisera rettet mot A) miljøisolat 1, B) *Y. ruckeri* CC1, C) miljøisolat 2 D) miljøisolat 3. Blå kurver viser resultater fra vaksinert fisk, røde linjer viser resultater fra fisk injisert med steril PBS.

Videre viste resultatene en høy grad av kryssreaksjon mellom antisera fra fisk vaksinert med *Y. ruckeri* CC1 (CC1) og miljøisolatene (M1, M2 og M3) (Figur 7). Dette kan indikere at fisk som har vært eksponert for avirulente miljøstammer har opparbeidet en grad av immunitet mot virulente stammer. Vi vet ikke om antistoffene har beskyttende effekt etter smitte, men resultatene viser en mulig profylaktisk effekt av eksponering for avirulente miljøstammer.



Figur 7: Kryss-reagerende antistoffer i antisera (1:400 fortyning) analysert ved ELISA. X-aksen viser antisera testet (n=10 pr isolat), y aksen viser absorbans målt ved 492 nm. A) Binding av antisera til antigen NVI 10705; B) binding av antisera til antigen NVI 11076; C) binding av antisera til antigen NVI 10587; D) binding av immunsera til antigen NVI 11065.

Resultatene er beskrevet i masteroppgaven til Magnus Ruland, veiledet av Anita Rønneseth UiB, levert 1. Juni 2022 (se leveranser).

Konklusjon

Resultatene generert i løpet av prosjektet fra både felt- og laboratorieforsøk har gitt oss en betydelig forbedret forståelse av hvordan og hvorfor yersiniose har blitt en såpass viktig sykdom i norsk akvakultur i senere år. Resultatene støtter oppunder, men beviser ikke eksplisitt, hypotesen om at utbrudd i sjø ofte kan kobles til stress-relatert aktivering av latent (skjult) *Y. ruckeri* infeksjoner med opprinnelse fra ferskvannsfasen. Resultatene indikerer også at termisk avlusning representerer en risikofaktor dersom fisk som er latent infisert med *Y. ruckeri* behandles forut for ikke-infiserte fiskegrupper, i den forstand at man kan få en betydelig oppkonsentrering av bakterien i behandlingsvannet. Vannprøver tatt fra behandlingskammer i senere stadier av behandlingene

inneholdt for øvrig i de fleste tilfeller synlige mengder blod, trolig fra åpne skader i behandlet fisk, og dette vil også representere mulige inngangsporter for patogene bakterier.

Smittetest utført i prosjektet bekreftet hypotesen at miljøisolater av *Y. ruckeri* som mangler et spesifikt virulensrelatert gen ikke har evne å smitte horisontalt fra fisk til fisk og derfor kan betraktes som ufarlige i oppdrettssammenheng. Forsøk som skulle undersøke en evt. beskyttende effekt av miljø-isolat eksponering mot senere smitte med CC1 ga ikke konklusive resultater, men det at det ble påvist mange felles antigener mellom miljø- og virulent-isolater kan tyde på en slik mulige effekt. Dette bør undersøkes videre. Som del i dette arbeidet har en smittemodell blitt utviklet som er egnet for testing av vaksiner mot norsk *Y. ruckeri*, noe som manglet ved prosjektets oppstart.

De molekylære analysene tyder videre på at *Y. ruckeri* CC1, som tidligere bare var en av flere sykdomsassosierte *Y. ruckeri* stammer på 80/90 tallet, har blitt stadig mer utbredt og dominerende i Norge i senere år, noe som sannsynligvis kan relateres til transport av smittet fisk fra region til region. Amplifisering av et spesifikt invasin-gen kan også ha spilt en sentral rolle for at CC1 har utkonkurrert øvrige *Y. ruckeri* stammer som dominerende årsak til yersiniose i norsk oppdrettsnæring, og antall kopier av dette genet ser i noen grad ut til å kunne påvirke den kliniske manifestasjonen av sykdommen i sjø.

7. Leveranser

Møtereferater og statusrapporter har blitt levert etter plan.

Vitenskapelig publikasjoner (publisert)

Gulla, S., Mohammad, S., & Colquhoun, D. (2019). Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis of the fish-pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri* by multiplex PCR and capillary electrophoresis. *J. Vis. Exp*, 148, 1-6. <https://www.jove.com/v/59455/multi-locus-variable-number-tandem-repeat-analysis-fish-pathogenic>

Riborg, A., Gulla S., Strand D., Wiik-Nielsen J., Rønneseth A., Welch T., Spilsberg B. and Colquhoun D.J. (2022a) qPCR screening for *Yersinia ruckeri* clonal complex 1 against a background of putatively avirulent strains in Norwegian aquaculture in *Journal of Fish Diseases* <https://doi.org/10.1111/jfd.13656>

Riborg, A., Colquhoun, D. J., & Gulla, S. (2022b) Biotyping reveals loss of motility in two distinct *Yersinia ruckeri* lineages exclusive to Norwegian aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.13590>

Vitenskapelig publikasjoner (under arbeid)

Whole genome based phylogeography of *Yersinia ruckeri* clonal complex 1 in Norway 1985-2021. Fiskebeck E.Z., Riborg A., Welch T., Werner-Jeffreys D., Feil E., Bayliss S Colquhoun D.J. and Gulla S.

Pan-genome survey of the fish pathogen *Yersinia ruckeri* links accessory- and amplified genes to virulence. Andreas Riborg, Snorre Gulla, Eve Zeyl Fiskebeck, David Ryder, David W. Verner-Jeffreys, Duncan J. Colquhoun, Timothy J. Welch

The invasin *yrIIm* is essential for fish to fish transmission of *Y. ruckeri*. Riborg A., Gulla S., Colquhoun D.J. and Welch T.

ALPPACA - A tool for Prokaryotic Phylogeny And Clustering Analysis. H. Kaspersen and E.Z. Fiskebeck. Under review. The Journal of Open Source Software.

Populærvitenskapelig publikasjoner

David Strand, Anita Rønneseth, Andreas Riborg, Snorre Gulla, Saima M. Muhammad, Jannicke Wiik-Nielsen og Duncan J. Colquhoun (2021) Miljø-DNA sporing av *Yersinia ruckeri* hos norsk oppdrettslaks. Norsk Fiskeoppdrett. 8: 100-104.

Masteroppgave

Magnus Ruland (2022) Exposure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to non-virulent strains of *Y. ruckeri* to protect against subsequent infection with virulent *Y. ruckeri*. Oppgaven submitert til Universitet i Bergen 01.06.2022. Veiledet av Anita Rønneseth UiB.

Foredrag

Duncan J. Colquhoun, Andreas Riborg, Jannicke Wiik-Nielsen Jinni Gu, Anita Rønneseth, Anne Ramstad, Heidrun Wergeland, Snorre Gulla. Yersiniose i norsk akvakultur. Frisk Fisk Konferanse, Tromsø 5-6 februar, 2019

Andreas Riborg, Duncan J. Colquhoun, Snorre Gulla, Jannicke Wiik-Nielsen, David A. Strand, Saima N. Mohammad, Øyvind Vågnes. Screening av settefiskanlegg for *Yersinia ruckeri*. Digitalt Havbrukskonferansen 2020.

Snorre Gulla, Eve Marie Zeyl Fiskebeck, Andreas Ekroll Riborg, Saima Mohammad and Duncan John Colquhoun. The ancestral history of yersiniosis in Norwegian salmon farming. European Association of Fish Pathologists conference. Digital 20-21 September 2021.

Eve Zeyl Fiskebeck, Andreas Riborg, Duncan Colquhoun, Snorre Gulla. Hel-genom sekvensering (WGS) og *Yersinia ruckeri*. Frisk Fisk konferanse, Bergen 30-31 mai 2022.