

Ruokaviraston raportti

Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen sekä bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät

Loppuraportti



EUROOPAN MERI- JA KALATALOUSRAHASTO
SUOMEN TOIMINTAOHJELMA
2014-2020



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Päiväys:	28.10.2021
Asianumero:	1507/05.08/2019
	Ruokavirasto
Linja, osasto ja/tai yksikkö:	Laboratorio- ja tutkimuslinja, eläintautibakteriologia ja -patologia
Hyväksyjä:	Yksikön johtaja Sinikka Pelkonen
Laatija/laatijat:	Tiina Korkea-aho (Ruokavirasto), Satu Viljamaa-Dirks (Ruokavirasto), Tom Wiklund (Åbo Akademi), Lotta-Riina Sundberg (Jyväskylän yliopisto)
Lisätietoja:	EMKR hankenumero 87476

TIIVISTELMÄ

Vesihome aiheuttaa suuria taloudellisia tappioita lohikalojen viljelyssä niin Suomessa kuin ulkomailla. Vesihomeita esiintyy makeissa vesissä ympäri maailman ja erityisesti *Saprolegnia parasitica* vesihomelaji on yleisimmin eristetty lohikalojen vesihomeinfektioista. Tässä hankkeessa tutkimme ympäri Suomea kalanviljelylaitoksilta eristettyjä *S. parasitica* kantojen genotyyppejä selvittääksemme, onko Suomessa tietty *S. parasitica* genotyyppi, jota esiintyy kalanviljelylaitoksilla. Suurin osa kalanviljelylaitoksilta kerätyistä *S. parasitica* kannoista kuului samaan kloonikompleksiin, jossa oli näytteitä kerättyinä niin Etelä- kuin Pohjois-Suomesta. Tulokset viittaavat siihen, että sama *S. parasitica* klooni esiintyy Suomen kalanviljelylaitoksissa yleisesti, aiheuttaen tautipurkauksia. Koska *S. parasitica* päägenotyyppi esiintyi kalanviljelylaitoksilla ympäri Suomen, kyseinen klooni on ilmeisesti siirtynyt laitosten välillä, mahdollisesti kalasiirtojen mukana. Tämä vahvistaa käsitystä siitä, että *S. parasitica* leviää helposti kalasta kalaan ja leviää kalojen mukana, jolloin kalojen siirroissa kannattaa noudattaa huolellisuutta ja tarvittaessa tutkia kalat vesihomeen varalta ennen siirtoa. *S. parasitica* kantoja tutkittiin infektiokeissa, mutta mikään tutkittu kanta ei aiheuttanut merkittävää sairastumista. Todennäköistä on, että infektiokeissa ympäristöolosuhteet eivät altistaneet kaloja tartunnoille ja että tutkitut kannat ovat todennäköisesti opportunistisia patogeenejä, jotka aiheuttavat haittaa kalalle vain tietyissä kalalle epäsuotuisissa olosuhteissa. Infektiokeissa kuitenkin osoitettiin, että vesihomeisista kaloista usein eristetty *Iodobacter limnosediminis* bakteeri aiheutti ihovaurioita kaloille, ja hyvin todennäköistä onkin, että ihovaurioita aiheuttavat bakteerit voivat olla yksi vesihometaudille altistava tekijä. Tämän vuoksi on tärkeää tutkia vesihometartunnoissa mahdollisia taustatekijöitä ja tarvittaessa hoitaa myös altistava tekijä, esimerkiksi taustalla oleva bakteeritartunta. Tässä hankkeessa kehiteltiinkin uusia ja nopeampia tunnistusmenetelmiä *S. parasitica* vesihomeelle ja kaloille ihovaurioita aiheuttaville bakteereille, kuten *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* ja *I. limnosediminis*. Kehitetyt PCR-menetelmät mahdollistavat tulevaisuudessa tarkemmat tutkimukset vesihomeen esiintymisestä kaloissa ja kalanviljelylaitoksen vesiympäristössä. *S. parasitica* vesihometta tunnistavaa PCR-menetelmää voidaan käyttää herkkänä menetelmänä tunnistamaan vesihome kalasta ja vedestä jo ennen kuin vesihome näkyy kalassa. Tämä mahdollistaa nopeamman reagoimisen vesihomeen ehkäisyssä. Myös vesihomeen estomenetelmiä voidaan arvioida tarkemmin, kun pystytään arvioimaan *S. parasitica* vesihomeen määrää vedestä, jolloin voidaan arvioida mitkä estomenetelmät vaikuttavat vesihomeen vähenemiseen parhaiten. Bakteereita tunnistavat PCR-menetelmät edistävät bakteerien tunnistamista tarkemmin vesihomeinfektioiden yhteydessä. Bakteereita tunnistavat PCR-menetelmät olivat myös lupaavia tunnistamaan bakteereita vedestä, ja niitä tuleekin kehittää edelleen käytettäväksi kalanviljelylaitoksilla, niin että myös bakteeritartuntojen riskiä pystytään paremmin arvioimaan.

SISÄLLYSLUETTELO

1 Johdanto	4
2 Aineisto ja menetelmät	4
3 Hankkeen tulokset	5
3.1 Suomen kalanviljelylaitosten <i>S. parasitica</i> kantojen genotyyppitys	5
3.2 Bakteeri- ja vesihomekantojen infektiokokeet	6
3.3 Bakteerien ja vesihomeen tunnistusmenetelmien kehittäminen.....	7
4. Hankkeen toteutus	8
4.1 Hankkeen tiedotteet ja uutiset	9
4.2 Hankkeen julkaisut	10
Kiitokset	10
Lähteet	10
Liite 1. <i>Saprolegnia parasitica</i> kantojen genotyyppitys	12
Liite 2. Infektiokokeiden mikrobikantojen tiedot.....	23
Liite 3. PCR-menetelmien alukkeet ja koettimet.....	24
Liite 4. PCR-menetelmien spesifisyys	25
Liite 5. <i>Iodobacter limnosediminis</i> PCR-menetelmän spesifisyys vesinäytteissä	27
Liite 6. <i>S. parasitica</i> PCR-menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys vesinäytteissä	28
Liite 7. Kalanviljelylaitosten vesinäytteet.....	29

1 Johdanto

Vesihome on yleisnimitys makeissa vesissä eläville munasienille (*Oomycetes*). Vesihomelajit voivat aiheuttaa kaloissa vesihometaudin tai tarttua kalojen mätimuniin. Lohikalajien vesihometaudista yleisimmin eristetään *Saprolegnia parasitica* vesihomelajia, mutta myös muita lajeja satunnaisesti [1, 2]. Vesihome on maailmanlaajuinen ongelma erityisesti lohikalajien makeanveden viljelyssä, jossa se tuottaa suuria taloudellisia tappioita vuosittain [3]. Aikaisemmissa tutkimuksissa Suomen kalanviljelylaitoksilla 59 % tutkituista laitoksista oli ongelmia vesihomeen kanssa [4]. Tietyillä lohikalalajeilla, kuten järvilohella ja – taimenella kuolleisuus vesihometautiin saattoi olla 100 %, mikä on aiheuttanut sen, että tietyillä laitoksilla on jouduttu jopa luopumaan vesihomeelle herkkien lohikalajien viljelystä.

Suomessa onkin aikaisemmassa tutkimuksessa kartoitettu kalanviljelylaitoksilla esiintyviä vesihomelajeja [1]. Yleisimmin Suomen kalanviljelylaitosten lohikaloista löydettiin *S. parasitica* vesihometta, kun taas mädistä ja pikkupoikasista löydettiin pääasiassa muita *Saprolegnia* lajeja.

Vesihometartuntaa pidetään usein toissijaisena infektiona, joka tarttuu kalaan yleisimmin muun taudin tai vaurion seurauksena. Useat bakteerit voivat aiheuttaa kaloille ihovaurioita, esimerkiksi *Flavobacterium* suvun ja *Aeromonas* suvun bakteerit. Näitä bakteereita on eristetty myös vesihomeisista kaloista. Lisäksi vesihomeisista kaloista löydetään usein *Iodobacter limnosediminis* bakteeria [5, 6]. Monien kalojen parasiittien, jollaiseksi vesihomeen voi myös lukea, on huomattu pahentavan myös bakteeritartuntoja kaloilla [7]. Ongelma usein on, että bakteeritartunta jää huomaamatta, kun vesihome peittää kalan ihon tai kasvumaljan niin, että bakteeria ei pystytä löytämään vesihomeisista kaloista. Tämän vuoksi herkempiä menetelmiä myös kaloille ihovaurioita aiheuttavien bakteerien tunnistamiseen tulee kehittää, että pystytään luotettavasti arvioimaan, onko vesihometaudin taustalla bakteeri.

Tässä tutkimushankkeessa haluttiin selvittää tarkemmin

- *Saprolegnia parasitica* kantojen geneettisiä eroja suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla
- ihovaurioita aiheuttavien bakteerien merkitystä vesihomeen esiintymisessä kaloilla
- kehittää nopeampia ja herkempiä tunnistusmenetelmiä yleisimmin havaitun *S. parasitica* vesihomeen ja flavobakteereiden ja *Iodobacter* bakteerin tunnistamiseen kalassa ja vedessä geenien polymeerasiketjureaktio (PCR) menetelmän avulla.

2 Aineisto ja menetelmät

Hankkeessa haluttiin tarkemmin selvittää, eroaako Suomen kalanviljelylaitoksilla yleisimmin eristetty *S. parasitica* isäntälajien (siika, Atlantin lohi, kirjolohi, meritaimen, järvitaimen, järvilohi) tai Suomen eri alueiden (Itä-Suomi, Länsi-Suomi, Etelä-Suomi, Pohjois-Suomi) välillä vertaamalla useita eri geenikohtia MLST (Multi Locus Sequence Typing) menetelmän avulla. Menetelmässä sekvensoitiin ja analysoitiin 74 *S. parasitica* kantaa seitsemästä eri geenikohdasta [8] ja sekvenssien perusteella määriteltiin eri genotyypit (sequence type, ST) ja niiden keskinäinen suhde toisiinsa. Genotyyppitysmenetelmien ja tulosten yksityiskohdat löytyvät Liitteestä 1.

Iodobacter sp. ja *Flavobacterium* sp. bakteereita on eristetty usein kaloista, joissa on vesihometartunta. Infektiokokeilla haluttiin tutkia sekä *I. limnosediminis* että *F. psychrophilum* bakteeri kantojen taudinaiheutuskykyä, mutta myös Suomesta eristettyjen *S. parasitica* kantojen tartuttavuutta kaloissa. Lisäksi arvioitiin *S. parasitica* ja *I. limnosediminis* bakteerin yhteisvaikutusta, kun kalat altistuvat molemmille taudinaiheuttajille. Infektiokokeissa testatut kannat on lueteltu liitteessä 2. Infektiokokeita tehtiin hankkeessa neljä:

- KOE A: *Iodobacter limnosediminis* altistus vedessä kortisoli-injektion jälkeen
- KOE B: *Saprolegnia parasitica* altistus vedessä stressikäsittelyn jälkeen
- KOE C: Altistus *I. limnosediminis* ja *Flavobacterium psychrophilum* kannoille lihasinjektiona

- KOE D: Altistukset kokeen C kalasta eristetyille *I. limnosediminis* kannalle lihasinjektiona ja *S. parasitica* kannalle vedessä

Kokeissa käytetyt kalat olivat 0-vuotiaita järvitaimenia. Patogeenisia bakteereita tai *Saprolegnia* sp. vesihometta ei todettu kaloissa ennen kokeen aloitusta. Kokeen aikana kuolleista kaloista ja kokeen lopuksi kaikista kaloista otettiin näytteet mahdollisten patogeenien mikrobien tunnistamiseksi. Infektiokokeet toteutettiin Etelä-Suomen aluehallintoviraston myöntämän luvan (hankelupa ESAVI/16637/2019) alaisuudessa ja koe suoritettiin tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta annetun lain ja asetusten mukaisesti (Laki ja asetus tieteellisiin ja opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 497/2013 ja 564/2013), sekä hankelupalautakunnan ohjeita tarkasti noudattaen.

Yleisimmille kaloissa ihovaurioita aiheuttaville bakteereille ja *S. parasitica* vesihomeelle kehitettiin PCR-menetelmä, jossa PCR alukkeet ja koetin tunnistavat juuri kyseiselle tunnistettavalle mikrobille ominaista geenialueen sekvenssiä (Liite 3). PCR-menetelmän spesifisyyttä eli tarkkuutta tunnistaa vain haluttu organismi arvioitiin vertaamalla alukkeiden ja koettimien vastaavuutta muiden organismien sekvensseihin geenipankissa, sekä testaamalla PCR-menetelmiä tunnistettavan ja muiden mikrobien DNA:lla, sen varmistamiseksi, ettei analyysi tunnista muuta kuin haluttua organismia. Lisäksi testattiin PCR-menetelmien sensitiivisyyttä, eli herkkyyttä tunnistaa pieniäkin määriä tunnistettavan mikrobin DNA:ta näytteessä. Infektiokokeista otettiin vesinäytteitä kala-altaista, joissa altaan veteen oli lisätty tutkittavaa mikrobia tai ei ollut lisätty (kontrolliallas). Näillä vesinäytteillä, joiden tiedettiin olevan joko positiivisia tai negatiivisia tutkittavalle mikrobille, testattiin myös kehitettyjen PCR-menetelmien kykyä tunnistaa haluttu mikrobi vesinäytteestä. *S. parasitica* PCR-menetelmän validointia tehtiin infektiokokeen D vesinäytteillä. Vesinäytteet otettiin jokaisesta altaasta heti *S. parasitica* vesihomeen lisäyksen jälkeen (päivä 0) ja päivinä 2, 6 ja 14 (Liite 5). PCR-menetelmää verrattiin myös muihin mikrobiologisiin menetelmiin, joita on aikaisemmin käytetty *S. parasitica* vesihomeen tunnistukseen vedestä. Lisäksi kerättiin vesi- ja kalanäytteitä neljältä suomalaiselta kalanviljelylaitokselta, sekä Kallaveden Savilahdesta, jossa ei ole lähistöllä kalanviljelylaitoksia. Näytteenottoaltaissa ja -laitoksissa vesihometilanne kaloissa vaihteli (Liite 7). Kalanviljelylaitoksilta otetuista vesinäytteistä määritettiin vesihomeen DNA:n määrä vesinäytteessä ja vertailtiin mikrobiologista viljely- ja PCR-menetelmää *S. parasitica* vesihomeen tunnistamisessa ja sen määrien arvioimisessa kala-altaiden vesistä [9].

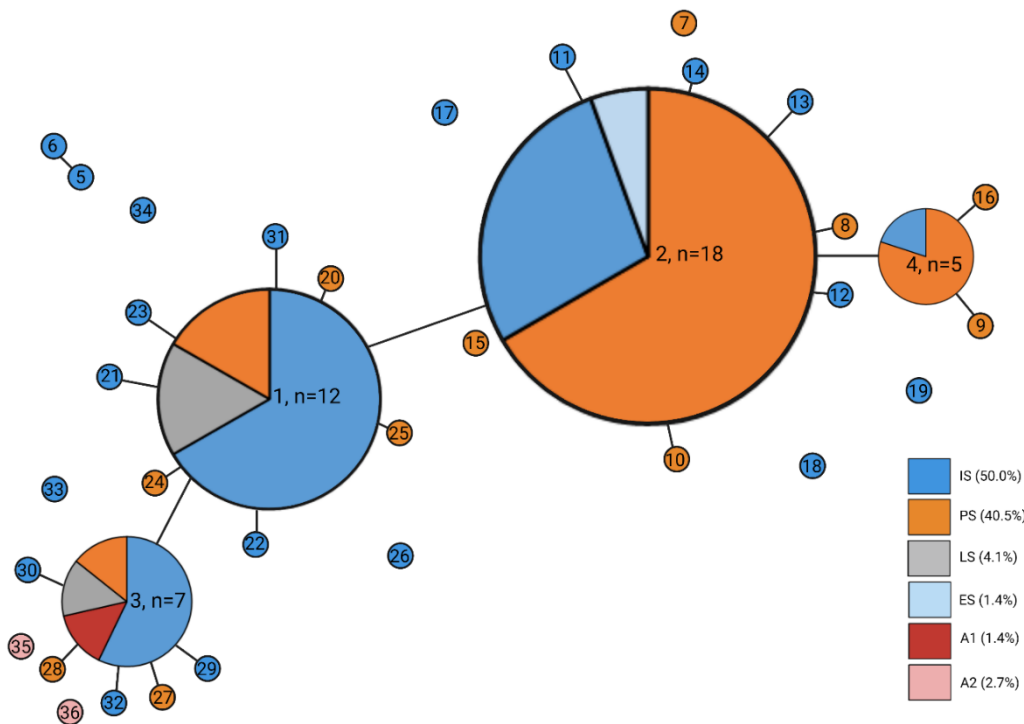
3 Hankkeen tulokset

3.1 Suomen kalanviljelylaitosten *S. parasitica* kantojen genotyyppitys

MLST analyysi tunnsti yhden ison kloonikompleksin (CC) joka sisälsi suurimman osan kaikista tutkituista kannoista (Kuva 1). Tämä kloonikompleksi voidaan jakaa neljään päägenotyyppiin (alaklooneja). Sen lisäksi löydettiin yksi pieni kloonikompleksi, joka sisälsi kantoja ruskuaispussipoikasista ja 9 yksittäistä kloonikompleksista eriytyvää genotyyppiä (singletons). Päägenotyyppien (ST1-4) ohella löydettiin myös 32 (ST5-36) hiukan poikkeavaa genotyyppiä. Kaikki päägenotyyppit (ST1-4) löydettiin kaikista tutkituista kalalajeista, mutta tulokset viittaavat osittain siihen, että tietty kalalaji on pääasiallisesti infektioitunut tietyllä alakloonilla. Kaikki neljä päägenotyyppiä löydettiin Itä-Suomesta ja Pohjois-Suomesta (Kuva 1). Länsi-Suomesta ja Etelä-Suomesta oli niin vähän näytteitä, että on vaikeaa tehdä varmaa johtopäätöstä alueellisesta jakautumasta (Liite 1).

Vaikka Suomen kalanviljelylaitoksilta aikuisilta kaloilta eristetyissä *S. parasitica* kannoissa löytyi eroavaisuuksia genotyyppien välillä, mitään merkittäviä eroja kannoissa ei todettu. Tämä viittaa siihen, että tietty *S. parasitica* klooni esiintyy Suomen kalanviljelylaitoksissa yleisesti, aiheuttaen tautipurkauksia. Koska *S. parasitica* päägenotyyppijä esiintyi kalanviljelylaitoksilla ympäri Suomen, tämä klooni on ilmeisesti siirtynyt laitosten välillä, mahdollisesti kalasiirtojen välityksellä. Tämä vahvistaa käsitystä siitä, että *S.*

parasitica leviää helposti kalasta kalaan ja leviää kalojen mukana, jolloin kalojen siirroissa kannattaa noudattaa huolellisuutta ja tarvittaessa tutkia kalat vesihomeen varalta ennen siirtoa.



Kuva 1. Tutkitut *S. parasitica* genotyypit (Sequence Type = ST 1-36) suomalaisilta kalanviljelylaitoksilta. Kalanviljelylaitoksen maantieteellinen sijainti merkitty eri väreillä. IS = Itä-Suomi, PS = Pohjois-Suomi, LS = Länsi-Suomi, ES = Etelä-Suomi, A1 and A2 = villikalaja. Genotyypin (ST) koko vastaa siihen kuuluvien *S. parasitica* kloonien määrä näyteaineistossa.

3.2 Bakteeri- ja vesihomekantojen infektiokokeet

Tehdyissä infektiokokeissa huomattiin, että *I. limnosediminis* bakteerilla on kyky aiheuttaa ihovaurioita kaloihin (kokeet C ja D). Kalojen ihovauriot yleensä kuitenkin paranivat kokeen loppua kohti [5]. Lisäksi neljä kantaa *I. limnosediminis* bakteerista ja neljä kantaa *S. parasitica* vesihomeesta, jotka oli eristetty kalanviljelylaitosten tautitapauksista (Liite 2), eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevää kuolleisuutta kaloille koeolosuhteissa. Todennäköistä on, että infektiokokeissa ympäristöolosuhteet eivät olleet optimit aiheuttamaan vakavia infektoita ja että tutkitut kannat ovat todennäköisesti opportunistisia patogeenejä, jotka aiheuttavat haittaa kalalle tietyissä olosuhteissa. Kun kaloja altistettiin yhteisaltistuksena sekä bakteerille että vesihomeelle (Koe D), huomattiin *Saprolegnia* tartuntoja yhdessä kalassa sham injektoituja (sham = injektoitu pelkästään liuoksella, jossa ei bakteereita), ja kahdessa kalassa *I. limnosediminis* injektoituja kaloja. Tämä ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkitsevä ero kontrollikaloihin nähden, joissa *Saprolegnia* infektoita ei huomattu kaloissa altistuksesta huolimatta. On mahdollista, että bakteeritartunta, varsinkin sellainen, joka vaurioittaa ihoa, voi altistaa kalan myös vesihomeelle, sillä *Saprolegnia* infektoita ei nähty niissä kontrollikalossa, joita ei injektoitu. Tämän vuoksi onkin tärkeää huomioida vesihometapauksissa myös mahdollisen bakteerien osallisuus tartuntaan ja hoitaa myös bakteeritartuntaa, jos sellainen todetaan.

3.3 Bakteerien ja vesihomeen tunnistusmenetelmien kehittäminen

Tässä hankkeessa suunniteltiin PCR-menetelmiin tarvittavat alukkeet ja koetin *S. parasitica* vesihomeelle ja *F. columnare* ja *I. limnosediminis* bakteereille (Liite 3). Suunniteltujen alukkeiden ja aikaisemmin julkaistujen *F. psychrophilum* alukkeiden [10] PCR-menetelmien spesifisyys oli hyvä, eli ne tunnistivat näytteestä halutun mikrobin (positiivinen testituloks), mutta eivät tunnistanee muita testattuja mikrobikantoja (negatiivinen testituloks), lukuun ottamatta *S. parasitica* alukkeita, jotka monistivat heikosti myös *S. ferax* puhdaskantaa (Liite 4). Kun *S. parasitica* ja *S. ferax* kantoja monistettiin yhtä aikaa, PCR-menetelmä tunnisti ainoastaan *S. parasitica* vesihomeen. Tässä hankkeessa kehitettyä *S. parasitica* PCR-menetelmää voidaan käyttää *S. parasitica* vesihomeen kartoitukseen kalanviljelylaitoksilla, jossa valtalajina lohikalojen vesihomeinfektioissa on *S. parasitica*, mutta jos halutaan varmistaa, onko PCR-menetelmällä tunnistettu vesihome *S. parasitica* vai *S. ferax*, suositellaan jatkotutkimuksena homeviljelyä ja eristetyin vesihomekannan sekvensointia.

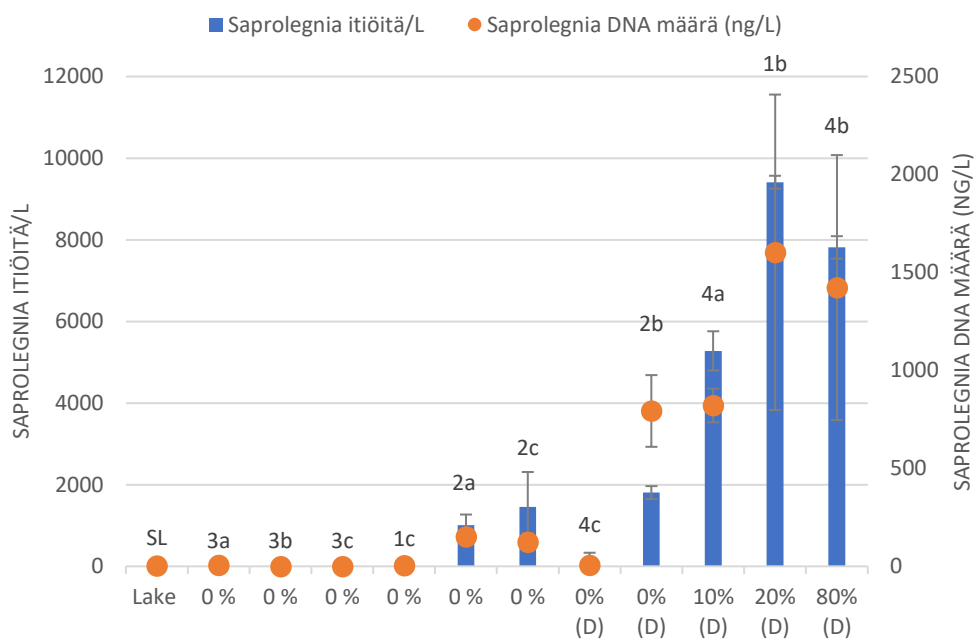
Kehitellyt PCR-menetelmät olivat myös sensitiivisiä, eli ne tunnistivat hyvin pieniä määriä tutkittavan mikrobin puhdasnäyte DNA:ta, tunnistaen luotettavasti näytteestä 200 fg *S. parasitica*, 170 fg *F. psychrophilum*, 130 fg *I. limnosediminis* ja 98 fg *F. columnare* DNA:ta per PCR-reaktio. Nämä ovat teoreettisia arvoja DNA määristä, joiden perusteella voidaan arvioida miten herkkiä PCR-menetelmät ovat tunnistamaan mikrobeja näytteistä. Lisäksi, kun tutkittavista näytteistä tehtiin laimennoksia eri pitoisuuksilla tutkittavan mikrobin DNA:ta, PCR-menetelmien standardisuorista nähtiin, että ne tunnistivat luotettavasti eri DNA pitoisuuksia. Tulokset osoittivat, että kaikki PCR-menetelmät tunnistavat näytteestä myös hyvin pienen määrän tutkittavaa mikrobia ja olivat luotettavia tunnistamaan eri pitoisuuksia DNA:ta. Testattuja PCR-menetelmiä, jotka tunnistavat *F. columnare*, *F. psychrophilum* ja *I. limnosediminis* bakteereita, voidaan käyttää näiden bakteerien nopeampaan ja herkempään tunnistamiseen kaloista eristetyistä bakteereista, esimerkiksi vesihometapausten yhteydessä. Kaikki alukkeet ja koettimet kehitettiin alustavasti niin, että tulevissa tutkimuksissa *S. parasitica* vesihomeen ja bakteerien tunnistusmenetelmiä voidaan validoida käytettäväksi samasta näytteestä yhtä aikaa, eli multiplex-PCR:nä.

Infektiokokeessa A lisättiin *Iodobacter fluviatilis* bakteeria ja kolmea eri kantaa *I. limnosediminis* bakteereita kala-altaisiin ja otettiin vesinäytteet heti altistuksen jälkeen. *I. limnosediminis* tunnistettiin luotettavasti infektiokokeiden vesinäytteistä kehitetyllä PCR-menetelmällä, kuten myös mikrobiologisella viljelymenetelmällä (Liite 5). PCR-menetelmän soveltuvuutta *Flavobacterium columnare* -bakteerin havainnointiin tutkittiin kalanviljelylaitoksilta kesällä 2020 kerätyistä vesinäytteistä. Vesinäytteet (15 ml) kerättiin 0.2 µm suodattimille, joista eristettiin DNA. *F. columnare* bakteeria havaittiin vesinäytteistä aktiivisen infektion aikana. Samoista näytteistä pystyttiin bakteeri havaitsemaan myös viljelymenetelmillä. Tässä hankkeessa kehitetyt PCR-menetelmät ovat lupaavia käytettäväksi *F. columnare* ja *I. limnosediminis* bakteerien tunnistamiseen myös vesinäytteistä. Myös *F. psychrophilum* tunnistamiseen käytettyä PCR-menetelmää on käytetty sekä kala- että vesinäytteille [10]. Lisää menetelmien validointia kuitenkin tarvitaan, että pystytään luotettavasti arvioimaan PCR-menetelmien käytettävyyttä kalanviljelylaitosten vesiympäristössä.

Infektiokokeessa D otettiin vesinäytteitä useana päivänä kala-altaista *S. parasitica* vesihomeen lisäyksen jälkeen. Mikrobiologisilla menetelmillä *S. parasitica* havaittiin heti altistuksen jälkeen ja joskus vielä kahden päivän päästä, mutta ei yleensä sen jälkeen. PCR-menetelmä havaitsi *S. parasitica* vesihomeen vesinäytteissä kahden viikon ajan (Liite 6). Tämän kokeen perusteella lasketut sensitiivisyydet havaitsi *S. parasitica* vesinäytteistä olivat elatusainekasvatuksilla 29 % (agar) ja 25 % (kuoppalevy) ja 0 % hampunsiemenellä, sekä 96 % PCR-menetelmällä [9]. Millään menetelmällä ei saatu vääriä positiivisia tuloksia (Liite 5). Tämä tarkoittaa, että hankkeessa kehitetty PCR-menetelmä oli mikrobiologisilla menetelmillä herkempi havaitsemaan vesinäytteissä *S. parasitica* vesihomeen. Tässä yhteydessä tulee huomioida, että PCR-menetelmä ei erottele onko tunnistettu eliö kuollut vai elävä. Mikrobiologisilla

menetelmillä tunnistetaan vain elävät mikrobit, joten voi olla, että joissakin vesinäytteissä altistuksen loppupuolella oli jäljellä kuolleita itiöitä, jotka vain PCR-menetelmä havaitsi.

Hankkeessa testattiin viljelymenetelmien ja PCR-menetelmän käytettävyyttä ja luotettavuutta arvioimaan *S. parasitica* määriä kalanviljelylaitoksilla ottamalla vesi- ja kalanäytteitä neljältä erilaiselta kalanviljelylaitokselta (Liite 7). Kalanviljelylaitosten altaista otetuissa vesinäytteissä löydettiin vesihometta silloin kun myös kaloissa todettiin vesihometta ja vesihomeen määrä altaan vedessä oli korkealla silloin kun silmämääräisesti arvioitiin kaloissa olevan paljon vesihometta (Kuva 2). Vesihomeen määrä samoissa vesinäytteissä korreloi voimakkaasti menetelmien välillä, eli PCR-menetelmä (DNA-määrä) ja elatusainemenetelmä (itiömäärä) mittasivat samaa asiaa vesinäytteistä, joka antaa luotettavuutta sekä PCR-menetelmien että elatusainemenetelmien käytölle *S. parasitica* vesihomeen seurantaan kalanviljelylaitoksilla.



Kuva 2. *Saprolegnia* itiöiden määrä/L (\pm SD) ja *Saprolegnia* DNA määrä ng/L (\pm SD) Kallavedestä ja kala-altaista otetuista vesinäytteissä. X-akselilla kala-altaassa silmämääräisesti arvioitu vesihomeen määrä kaloissa (%). D = altaan kalanäytteissä todettu *S. parasitica*. Palkkien yläpuolella kala-altaan tunnistet (Liite 7).

S. parasitica vesihometta tunnistava PCR-menetelmä oli yhtä luotettava tuloksissa kuin mikrobiologiset menetelmät havaitsemaan *S. parasitica* vesihomeen määriä vedessä. PCR-menetelmä oli kuitenkin teoriassa herkempi kuin mikrobiologiset menetelmät ja myös vähemmän työläitä ja nopeampia tehdä laboratoriossa, joten PCR-menetelmän käyttäminen on nopeampi ja parempi menetelmä vesihomeiden lukumäärien tutkimisessa tulevaisuudessa.

4. Hankkeen toteutus

Hanke aloitettiin loppuvuodesta 2018 ja se päättyi lokakuussa 2021. Hankkeen aikataulua pidennettiin hiukan alkuperäisestä, osittain covid-19 pandemiasta aiheutuneiden muutosten takia tutkimusaikataulussa. Hanke toteutettiin myönnettyjen määrärahojen puitteissa (Taulukko 1). Hankkeen vetäjä ja koordinaattori oli Ruokavirasto, jossa hankkeen vastuullisena johtajana toimi johtava asiantuntija Satu Viljamaa-Dirks ja

hankevastaavana tutkijana Tiina Korkea-aho. Tutkimusryhmässä mukana tutkimusyhteistyötä tekivät Åbo Akademistä Tom Wiklundin tutkimusryhmä ja Jyväskylän yliopistosta Lotta-Riina Sundbergin tutkimusryhmä. Hankkeen ohjausryhmän jäsenet osallistuivat hankkeen ohjaukseen ja siihen kuului tutkimusryhmän jäsenten lisäksi Petri Heinimaa (Luonnonvarakeskus), Mari Virtanen (Suomen kalankasvattajaliitto ry) ja Markku Tuomainen (Pohjois-Savon ELY-keskus).

Taulukko 1. Hankkeen toteutuneet menot kustannuslajeittain

Kustannuslaji	Myönnetty rahoitus €	Hankkeessa toteutuneet menot €
Henkilöstökustannukset	133 137	134 814
Kone- ja laitehankinnat	24 119,42	23 536
Matkakulut	2 063,4	404,78
Ostopalvelut	2 920,98	2 926,5
Muu kustannus	2 080	1 200,19
Kiinteämääräinen rahoitus	19 970,59	20 222,1
Yhteensä	184 291,7	183 103

4.1 Hankkeen tiedotteet ja uutiset

Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen sekä bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät. Päivitetty 9.7.2019. Katsottu 26.2.2019. <https://www.ruokavirasto.fi/yhteisot/tieteellinen-tutkimus/tutkimushankkeet/kaynnissa/ihmisten-elainten-ja-kasvien-terveys-ja-hyvinvointi/elainten-terveys-ja-hyvinvointi/bakteerien-merkitys-vesihomeen-esiintymisessa-ja-vesihomeen-seka-bakteerien-pcr-tunnistusmenetelmat/>

Saprolegnia infektiot hos fisk i Finland. Katsottu 26.2.2021. <https://www.abo.fi/projekt/saprolegnia-infektioner-hos-fisk-i-finland/>

Ongelmallisen vesihomeen torjuntaan etsitään ratkaisuja. Suomen kalankasvattajat ry Uutiset 12.6.2019. <http://uutiskirje.kalankasvatus.fi/a/s/815057-8b447c579cc581776f6193af839ba8e7/359748>

Vesihometaudin tutkimus etenee suunnitellusti. Suomen kalankasvattajat ry Uutiset 27.11.2019 <http://uutiskirje.kalankasvatus.fi/a/s/815057-4f09c59beae88a8c893b18aabc61cc82/474715>

Vesihomehankkeessa selvitetään tautiongelmia laajasti. Suomen kalankasvattajat ry Uutiset 15.12.2020. <http://uutiskirje.kalankasvatus.fi/a/s/815057-5325d6a22839dc0dadcf56807883d340/789664>

Vesihomeprojektin kuulumisista. Kalaterveyspäivä. Luentokokonaisuus s. 26-27. 18.3.2020.

https://www.kalankasvatus.fi/wp-content/uploads/2020/04/Kalaterveysp%C3%A4iv%C3%A4_Fiskh%C3%A4lsodagen_18_03_2020.pdf

Vesihomeet luonnonvaraisen ja viljellyn lohen riesana. Satu Viljamaa-Dirks, Ruokavirasto. Kansalliset kalatutkimuspäivät. Luento 24.3.2021.

<https://www.jyu.fi/en/congress/kalatutkimus2021/esitykset/vesihomeet-luonnonvaraisen-ja-viljellyn-lohen-riesana.pdf/view>

Vesihomeen tunnistusmenetelmien kehittäminen. Tiina Korkea-aho, Ruokavirasto. Kalaterveyspäivä.

Luento. 25.3.2021. https://www.kalankasvatus.fi/wp-content/uploads/2021/03/1-Korkea-aho_Vesihomeen-tunnistusmenetelmien-kehitt%C3%A4minen_Kalaterveysp%C3%A4iv%C3%A4.pdf

Vesihometartunnat Suomen kalanviljelylaitoksissa. Tom Wiklund, Åbo Akademi. Kalaterveyspäivä. Luento. 25.3.2021. https://www.kalankasvatus.fi/wp-content/uploads/2021/03/1-Saprol_Foredr_TW3.pdf

4.2 Hankkeen julkaisut

Moisio, M. (2021) Kalanviljelylaitoksilla esiintyvien vesihomeiden (*Saprolegnia*) tunnistaminen mikrobiologisilla ja molekyylibiologisilla menetelmillä. Pro gradu -tutkielma 40 s. Itä-Suomen yliopisto. <http://urn.fi/urn:nbn:fi:uef-20210727>

Korkea-aho, T. L., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Kuronen, H. & Tiirola, M. (2021) Genetic diversity and phenotypic characterization of *Iodobacter limnosediminis* associated with skin lesions in freshwater fish. *Journal of Fish Diseases* 44(11), 1711-1724. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfd.13490>

Korkea-aho, T.L., Viljamaa-Dirks, S., Moisio, M., Engblom, C., Landor, L. & Wiklund, T. (2021) Detection and quantification of *Saprolegnia parasitica* in aquaculture environments in Finland. 20th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Book of Abstracts p. 158.

Korkea-aho, T., Viljamaa-Dirks, S., Wiklund, T. & Sundberg, L.-R. (2021) Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen ja bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät. Hankkeen loppuraportti 11 s.

Kiitokset

Haluamme kiittää kaikkia hankkeen työhön osallistuneita, erityisesti kalankasvattajien yhteistyötä tietojen ja näytteiden saamisessa kalanviljelylaitoksilta. Tutkimusryhmissä iso kiitos Ruokaviraston Kuopion toimipisteen tekniselle henkilökunnalle ja tutkijoille, jotka olivat mukana, sekä hankkeessa gradun Itä-Suomen yliopistolle tehneelle Maarit Moisiolle. Kiitos Christine Engblom, Lotta Landor, Conny Sjöqvist, Akvaattisen Patobiologian Laboratorio, Åbo Akademi, Turku, sekä Jyväskylän yliopistossa kiitokset Kati Mäkelälle ja Petri Papposelle. Tämän hankkeen mahdollisti Pohjois-Savon ELY keskuksen myöntämä hankerahoitus Euroopan meri- ja kalatalousrahastosta (Hankenumero 87486).

Lähteet

1. Engblom C, Landor L, Wiklund T. *Saprolegnia* infections in Finnish fish farms, identification of disease agents. Turku: Åbo Akademi University; 2019. p. 8.
2. Sarowar MN, Cusack R, Duston J. *Saprolegnia* molecular phylogeny among farmed teleosts in Nova Scotia, Canada. *Journal of Fish Diseases*. 2019;42(12):1745-60. doi: 10.1111/jfd.13090.
3. van den Berg A, Mclaggan D, Dieguez-Uribeond J, van West P. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*. 2013;27(2):33-42. doi: 10.1016/j.fbr.2013.05.001.
4. Janhunen M, Koski P, Makkonen J. Vesihomeselvitys suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla. http://www.kalankasvatus.fi/wp-content/uploads/2019/02/Vesihomeselvitys2018_hankkeen-loppuraportti_28.2.2019.pdf 2019. p. 20.
5. Korkea-aho TL, Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Kuronen H, Tiirola M. Genetic diversity and phenotypic characterization of *Iodobacter limnosediminis* associated with skin lesions in freshwater fish. *Journal of Fish Diseases*. 2021;44(11):1711-24. doi: <https://doi.org/10.1111/jfd.13490>.
6. Carbajal-Gonzalez MT, Fregeneda-Grandes JM, Suarez-Ramos S, Rodriguez-Cadenas F, Aller-Gancedo JM. Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2011;96(2):125-35. doi: 10.3354/dao02391.
7. Figueroa C, Bustos P, Torrealba D, Dixon B, Soto C, Conejeros P, et al. Coinfection takes its toll: Sea lice override the protective effects of vaccination against a bacterial pathogen in Atlantic salmon. *Scientific Reports*. 2017;7(1):17817. doi: 10.1038/s41598-017-18180-6.
8. Ravasi D, De Respinis S, Wahli T. Multilocus sequence typing reveals clonality in *Saprolegnia parasitica* outbreaks. 2018. *Journal of Fish Diseases*. 41(11):1653-65. doi: 10.1111/jfd.12869
9. Moisio M. Kalanviljelylaitoksilla esiintyvien vesihomeiden (*Saprolegnia*) tunnistaminen mikrobiologisilla ja molekyylibiologisilla menetelmillä. Department of Environmental and Biological

Sciences. University of Eastern Finland: Pro gradu; 2021. p. 41.

10. Strepparava N, Wahli T, Segner H, Petrini O. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. BMC Microbiology. 2014;14(105). doi: 10.1186/1471-2180-14-105.

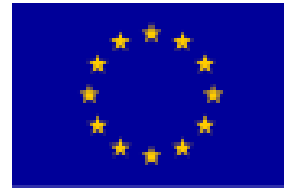
Liite 1. *Saprolegnia parasitica* kantojen genotyypitys



Närings-, trafik- och
miljöcentralen



EUROPEISKA HAVS- OCH FISKERIFONDEN
FINLANDS OPERATIVA PROGRAM
2014-2020



Europeiska unionen

Research report, 87476

Identification and characterization of water mold, *Saprolegnia parasitica*, isolated from fish farms in Finland

Christine Engblom, Lotta Landor, Conny Sjöqvist and Tom Wiklund

Laboratory of Aquatic Pathobiology, Åbo Akademi University, Turku

Background

Saprolegnia is a genus of water moulds, commonly found in fresh water. Current taxonomy puts *Saprolegnia* as a genus of the heterokonts in the order Saprolegniales, class Oomycota. Oomycetes are mycelium-forming organisms that resemble fungi, but are more closely related to brown algae and diatoms (Baldauf et al., 2000).

Some species of the genus *Saprolegnia* are pathogens and cause infections of the skin and gills of fish, forming characteristic white or grey fibrous mesh. The infection usually starts on the head or on the fins and then spreads through branches in circles or curvilinear patterns throughout the body. The infection kills epithelial cells and destroys the skin, which becomes completely wounded due to the invading *Saprolegnia* hyphae. Finally, the infection spreads further through its mycelium deeper into muscle tissue and blood vessels, making the advanced infections difficult to treat. Fish that are not treated die from haemodilution, dilution of the blood, caused by osmotic collapse due to large skin losses. The fish simply cannot maintain its salt balance as too much water is introduced through the sowing surfaces. There is no evidence that *Saprolegnia* causes poisoning or other systematic disease. Only mild inflammation of the tissues has been observed.

Mortality caused by various *Saprolegnia* species has resulted in significant losses in fish farms in Finland and globally since the ban of malachite green. *Saprolegnia* has been involved in mass mortalities of fish, both in aquaculture and in nature (van den Berg et al., 2013). No effective compound against *Saprolegnia* is available for the moment, making the treatment of this disease problematic.

Traditionally, the identification of *Saprolegnia* spp has been based on morphology of sexual structures and zoospores (Stueland et al., 2005, Willoughby 1985). In Finland/Sweden, there is one earlier study where a *Saprolegnia* sp clone has been characterized with both morphology and genetic methods (Bangyeekhun et al., 2003).

In our earlier pilot project we examined the presence of different *Saprolegnia* spp in different Finnish fish farms and different life stages of the fish, by sequencing the ITS region of *Saprolegnia* DNA and comparing the sequences to previously sequenced *Saprolegnia* species in a commonly available data base.

The pilot project described which *Saprolegnia* spp are present in fish of Finnish fish farms and in different life stages of the fish. The study showed that *Saprolegnia parasitica* was the main species infecting 90 % of the adult fish. The main *Saprolegnia* spp infecting eggs were *S. diclina*, while the yolk sac fry samples were too few to draw any conclusions, but there is an indication that the prevailing infection is by *S. parasitica*.

In the present study, using the results from the pilot project, that *Saprolegnia parasitica* is present in the majority of the farms and water mould disease outbreaks, we focused on to analyze the heterogeneity of the obtained *Saprolegnia parasitica* isolates. This was done in order to determine whether there are potential dominant genetic clones of the species, which cause most of the disease outbreaks.

This analysis was done using a genetic analysis of several different genes, a so-called Multi Locus Sequence Typing (MLST) methodology.

The method of MLST is simple; the technique includes PCR amplification of gene fragment followed by sequencing of the amplified DNA. The differences in DNA sequence between strains can be measured at a number of genes and strains characterized by their unique allelic profiles.

The results will then be used to develop a method for fast detection of specific strains/clones of *S. parasitica* in the aquatic environment, and to be able to establish a possible association between specific bacterial infections in the skin of fish and infections with *Saprolegnia*.

Methods

PCR amplifications

Of the isolates that were designed as *Saprolegnia parasitica* in the pilot project, 93 were further analysed with a multilocus sequence typing (MLST) scheme using seven house-keeping genes (Ravasi et al., 2018). The seven housekeeping genes used in the PCR amplifications were: ALTS1 (alanyl-tRNA synthetase), COX1 (cytochrome c oxidase subunit 1), GLUT (glutaminase), NAD1 (NADH dehydrogenase subunit 1), RPB2 (RNA polymerase II subunit B), SHMT (serine hydroxymethyltransferase) and TUBB (beta tubulin). The primer sequences are listed in Table 1.

Each PCR sample (20 µl) contained: 12,4 µl sterile mQ-H₂O; 4 µl 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific, F-; 1 µl of each forward and reverse primers; 0,4 µl dNTP Mix (Thermo Scientific or Fermentas); 0,2 µl Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific); and 1 µl purified DNA. Amplifications were performed with initial denaturation at 98 °C for 30 s, followed by 34 cycles of 98 °C for 10 s, 62 °C for 20 s, 72 °C for 20 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were sent to **DNA Sequencing and Genomics Lab, Institute of Biotechnology, University of Helsinki** where the second PCR:s were done with MiSeq techniques. The fragments were sequenced, and forward and reverse fragments put together. The sequences were then sent to Åbo Akademi University, where they were analyzed and compared with each other using Multilocus Sequence Typing analysis.

Multi locus sequence typing analysis (MLST)

Nucleotide polymorphic sites were identified within multiple alignments for each locus separately in the R-environment (Team et al. 2013) using the match-function comparing each row (as nucleotide sequence) against all other sequences in the data set. Each unique allelic variant of the six genes studied was assigned a different arbitrary number. Subsequently, diploid sequence types (DST) were assigned to each unique combination of alleles (Table 2). Samples with missing sequences for one or several of the genes studied were discarded from the analysis. In total 74 of 93 samples were included in downstream analysis. The DST-data was used as input for creating a minimum spanning tree using the full eBURST analysis in PhyloViz v. 2.0 (Francisco et al. 2012) predicting the most parsimonious patterns of descent of all isolates in each clonal complex (Feil et al. 2004). All isolates included in a ST were identical at the six studied loci. Isolates assigned to STs with a link were single locus variants (SLVs) while unlinked isolates differ at >1 locus.

Results

Initially partly sequences of seven house keeping genes of *S. parasitica* were included in the study. Unfortunately, one of these genes (ALTS1) had to be excluded from the analysis, due to the presence of one intron in the forward sequence and two introns in the reverse sequence. As a consequence of this, a sequence of 100 bp were missing, and the forward and reverse sequences could not be aligned and this gene was therefore excluded.

A grand total of 93 *Saprolegnia parasitica* isolates was initially included in the study. Of these, 74 *Saprolegnia* isolates were included in the final MLST analysis (Table 2) producing four main sequence types (ST1-ST4, n=42) and 32 unique (differ in at least one gene out of the six) STs that were observed only once in this study. The minimum spanning tree visualizes the genetic relatedness between samples and host species (Fig. 1) and their geographic location (Fig. 2). In general, most isolates were included (n=62) in the main clonal complex, suggesting they are closely related. From the 19 isolates that were not included in the analysis, at least one of the gene sequences were missing.

Most of the investigated fish from the Finnish fish farms were infected with *Saprolegnia parasitica*, belonging to the same genetical clone. This clone can be divided into four subclones.

The results also show that fish from the same sample, -place and -time can be infected with different subclones or gene variants of *Saprolegnia parasitica* (Fig. 1 and 2).

From the results (Fig. 1) a small tendency to host specificity can be seen, but the number of isolates are too small for any significant conclusions. Of all lake trout examined 40% were infected with *S. parasitica* belonging to ST3; of all whitefish 41% were infected with ST2; of all salmon 50% were infected with ST2; the two landlocked salmon were infected with ST2; of all rainbow trout 36% were infected with ST1 and all three sea trout were infected with unique genotypes.

Of the three wild fish, *S. parasitica* isolated from lake trout (A1 in Fig. 2) belong to ST3 and *S. parasitica* isolated from the two salmon (A2 in Figure 2) had both unique STs (ST 35 and 36).

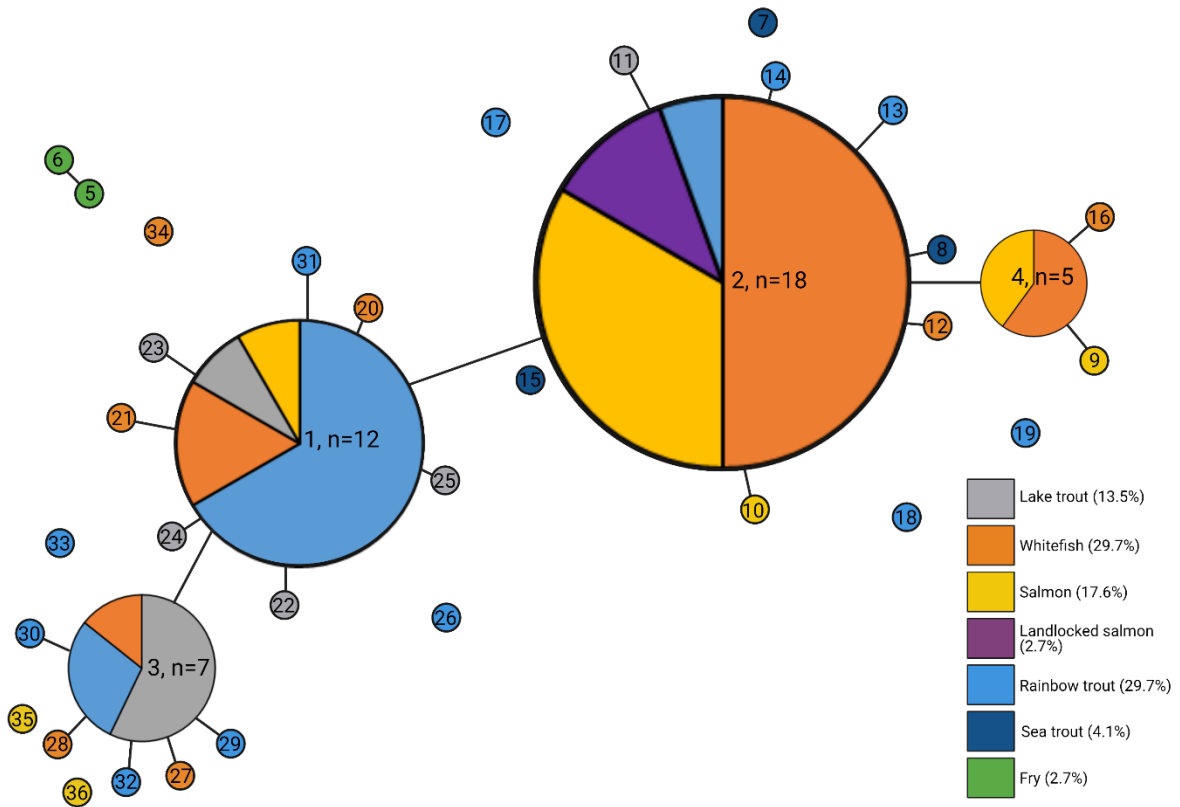


Figure 1. Sequence types (1-36) of *S. parasitica* isolates from different fish farms colored by fish species from which they were isolated. The size of each node represents the number of samples included in the ST. The proportion (%) of samples from different fish species is given within parenthesis.

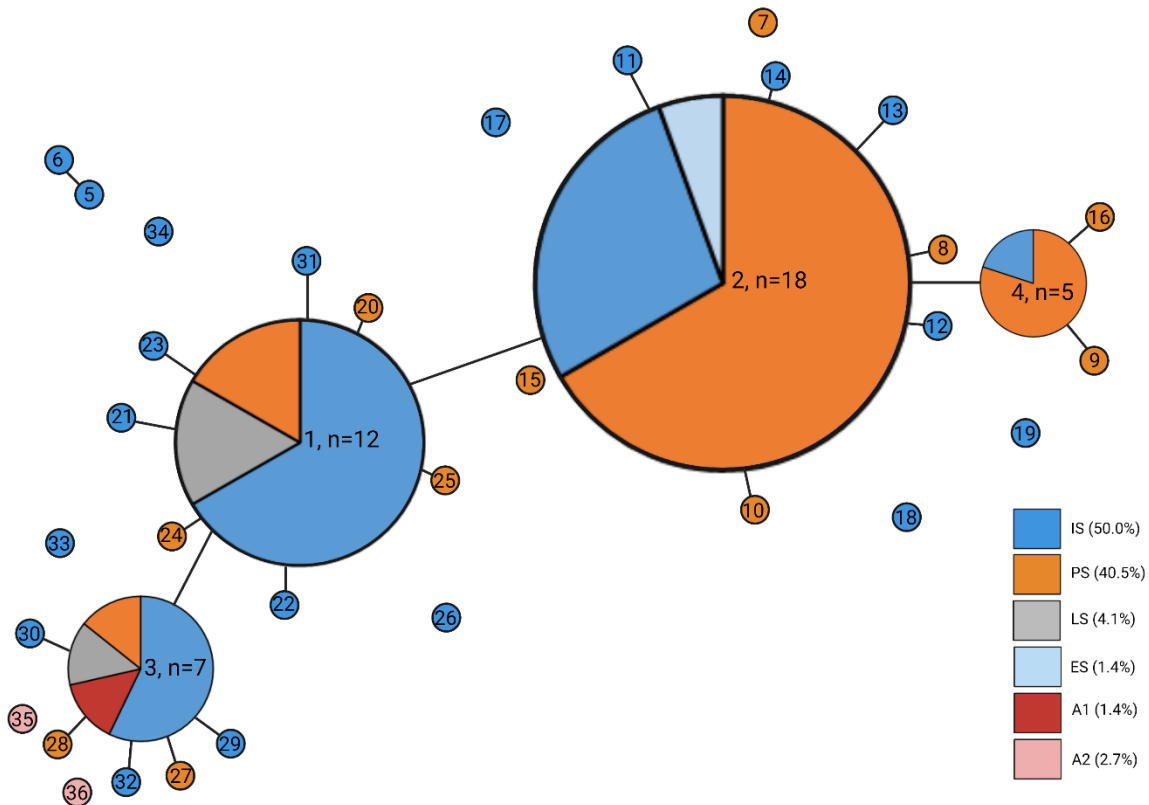


Figure 2. Sequence types of *S. parasitica* samples from different fish farms colored by geographical location. IS = Eastern Finland, PS = Northern Finland, LS = Western Finland, ES = Southern Finland, A1 and A2 = wild fish samples. The size of each node represents the number of samples included in the ST.

Discussion

The current project and the pilot project describe which *Saprolegnia* spp are currently present in Finnish fish farms. The previous pilot project showed that a clear majority (90%) of the *Saprolegnia* species infecting the adult fish was *Saprolegnia parasitica*. The main *Saprolegnia* spp. infecting eggs was *S. diclina*. This is in accordance with earlier studies in Norway and Chile (Sandoval-Sierra et al., 2014, Thoen et al., 2015).

The aim of the current project was to evaluate the presence of different genotypes of *S. parasitica* and their distribution among different farmed fish species and different regions in Finland using a MLST scheme. The MLST scheme identified one large clonal complex containing the main part of the examined *S. parasitica* isolates. This clonal complex can be divided into 4 main genotypes

(sub-clones). In addition, a small clonal complex containing *S. parasitica* isolates obtained from fry, and nine singletons (isolates not related to any other isolate) were observed. In all, four different main genotypes (ST1-4) and additionally 32 unique genotypes (ST5-36) that differed in one or several of the housekeeping genes (isolates from fry diverged in five of the six genes) were obtained. All main genotypes (ST1-4) infected all fish species in this study. However, the results show some indication that fish of a specific species is infected mainly by a specific *S. parasitica* subclone. All subclones were found in eastern and northern Finland. But the number of samples from western and south Finland were rather low to make any firm conclusions. A certain diversity in the *S. parasitica* populations could be concluded, however large differences were not observed in the *S. parasitica* strains obtained from farmed adult fish in Finland. This could suggest that one specific *S. parasitica* clone is present among Finnish fish farms causing disease problems, and that this clone has been transferred between farms, suggestingly together with fish transports.

It can be concluded that *S. parasitica* is involved also in the disease process causing mortality in the wild fish from Kallavesi and Torne River. The *S. parasitica* strain isolated from lake trout from Kallavesi belonged to ST3 and those strains from the two Atlantic salmons from Torne River had unique STs, differing from the main clonal complex associated with infections in farmed salmonids in Finland only in two out of six genes. It cannot be excluded that the examined isolates can also infect farmed fish, or that these isolates could originate from farmed fish.

Acknowledgements

The survey was funded by the ELY center, EU and European Maritime and Fisheries Fund, Finland's Operational Program 2014-2020, and was a collaborative project between the Finnish Food Authority, Jyväskylä University and Åbo Akademi University.

We are grateful to all fish farmers for fish samples.

References

Baldauf S L, Roger A J, Wenk-Siefert I, Doolittle W F 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290, 972-97. DOI: 10.1126/science.290.5493.972

Bangyeekhun E, Pykkö P, Vennerström P, Kuronen H, Cerenius L 2003. Prevalence of a single fish-pathogenic *Saprolegnia* sp. clone in Finland and Sweden. *Dis Aquat Org* 53, 47-53.

- Francisco A P, Vaz C, Monteiro P T, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço J A 2012. PHYLOViZ: Phylogenetic Inference and Data Visualization for Sequence Based Typing Methods. BMC Bioinformatics 13, 87.
- Feil E J, Li B C, Aanensen D M, Hanage W P, Spratt B G 2004. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. J. Bacteriol. doi: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004
- Ravasi D, De Respinis S, Wahli T 2018. Multilocus sequence typing reveals clonality in *Saprolegnia parasitica* outbreaks. J Fish Dis, doi: 10.1111/jfd.12869
- Sandoval-Sierra J V, Latif-Eugenin F, Martín M P, Zaror L, Diéguez-Uribeondo J 2014. *Saprolegnia* species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. Aquaculture 434, 462-469.
- Stueland S, Hatai K, Skaar I 2005. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 28(8), 445-53
- Team, R. Core, and Others 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://cran.microsoft.com/snapshot/2014-09-08/web/packages/dplR/vignettes/xdate-dplR.pdf>.
- Thoen E, Vrålstad T, Rolén E, Kristensen R, Evensen Ø, Skaar I 2015. *Saprolegnia* species in Norwegian salmon hatcheries: field survey identifies *S. diclina* sub-clade IIIB as the dominating taxon. Dis Aquat Org 114, 189-198.
- van den Berg A H, McLaggan D, Diéguez-Uribeondo J, West P 2013. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. Fung Biol Rev 27, 33-42.
- Willoughby L G 1985. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. J Fish Dis 8, 473-476.

Table 1

Illumina TruSeq overhangs:

Overhang added to the forward primers

5' ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT- specific forward primer

Overhang added to the reverse primers

5' GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- specific reverse primer

Gene	Product	Primer 5' – 3'	Fragment length with overhangs in PCR (bp)
ALTS1**	Alanyl-tRNA	Fwd CTA CT TCCAGCAGCAYGAGCA	634
	synthetase	Rev GACAAGGTTCCARAGCTCC	
COX1*	Cytochrome c oxi-	Fwd ACCTGGAAATCAAATTTTTATGGG	626
	dase subunit 1	Rev ATCACCTCCACCTGAAGGATCA	
GLUT*	Glutaminase	Fwd GGAGCGGCAGTCCATCAATC	619
		Rev CGTCGACGGTGACATGGAG	
NAD1*	NADH dehydro-	Fwd CCTAATGTTGTAGGTA CTTTGG	610
	genase subunit 1	Rev GAAACTAATTCAGCTTCAGCTT	
RPB2**	RNA polymerase II	Fwd TCCAAAAGTGCGTCGACGC	590
	subunit B	Rev CGACACTTCGGCGTCAATGT	
SHMT**	Serine hydroxy-	Fwd CAAGCCGCTCAAGGAGAC	563
	methyltransferase	Rev CGTGTCRTAGTCGATCAAGC	
TUBB**	Beta tubulin	Fwd CCAGCTCGTCGAAAACGC	517
		Rev CTTGAACATCTCCTGGATCG	

* Ravasi et al., 2018

**modified from Ravasi et al., 2018

Table 2

Sample	ST	COX1	GLUT	NAD	RPB2	SHMT	TUBB	Host	Area
P13-5	1	2	1	1	1	2	2	Lake trout	PS1
P10-2	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS4
P10-3	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS4
VH15	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS1
VH4	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS1
VH78	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS5
VH79	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS5
VH62	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS7
P4-6	1	2	1	1	1	2	2	Rainbow trout	LS2K
P17-7	1	2	1	1	1	2	2	Salmon	PS6
P11-6	1	2	1	1	1	2	2	Whitefish	IS4
P4-1	1	2	1	1	1	2	2	Whitefish	LS2K
OBAK1080	2	1	1	1	1	2	2	Landlocked salmon	PS2
VH10	2	1	1	1	1	2	2	Landlocked salmon	IS1
VH39	2	1	1	1	1	2	2	Rainbow trout	IS1
P17-3	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS6
P23-10	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS7
P23-2	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS7
P23-5	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS7
P23-6	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS7
P23-7	2	1	1	1	1	2	2	Salmon	PS7
P2-7A	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	ES1
VH82	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	IS1
VH83	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	IS1
VH87	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	IS1
P16-1B	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	PS4
P24-1	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	PS8
P24-3	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	PS8
P24-8	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	PS8
P24-9	2	1	1	1	1	2	2	Whitefish	PS8
VH28	3	2	1	1	1	4	2	Lake trout	A1
P12-8	3	2	1	1	1	4	2	Lake trout	IS12k
VH45	3	2	1	1	1	4	2	Lake trout	IS6
P13-3	3	2	1	1	1	4	2	Lake trout	PS1
P10-7	3	2	1	1	1	4	2	Rainbow trout	IS4
VH46	3	2	1	1	1	4	2	Rainbow trout	IS5
P4-5	3	2	1	1	1	4	2	Whitefish	LS2K
P17-2A	4	1	1	1	1	4	2	Salmon	PS6
P23-4	4	1	1	1	1	4	2	Salmon	PS7
VH86	4	1	1	1	1	4	2	Whitefish	IS1
P24-10	4	1	1	1	1	4	2	Whitefish	PS8
P24-6	4	1	1	1	1	4	2	Whitefish	PS8
VH70	5	4	5	3	5	6	20	Fry	IS2
VH71	6	4	6	3	5	6	20	Fry	IS2

Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen sekä bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät

OBAK1057	7	1	1	1	1	1	1	Sea trout	PS3
OBAK1817	8	1	1	1	1	2	3	Sea trout	PS4
P17-1	9	1	1	1	1	4	12	Salmon	PS6
P17-6	10	1	1	1	1	2	13	Salmon	PS6
P12-4	11	1	1	1	1	2	7	Lake trout	IS12k
VH12	12	1	1	1	1	2	14	Whitefish	IS1
VH59	13	1	1	1	1	2	17	Rainbow trout	IS7
VH31	14	1	1	1	1	2	16	Rainbow trout	IS4
OBAK3255	15	1	1	1	2	2	2	Sea trout	PS3
P24-4	16	1	1	1	4	4	2	Whitefish	PS8
VH80	17	1	1	1	6	2	21	Rainbow trout	IS5
VH61	18	1	1	1	4	2	18	Rainbow trout	IS7
VH81	19	1	7	1	1	1	2	Rainbow trout	IS5
P16-2A	20	2	1	1	1	1	2	Whitefish	PS4
P11-2	21	2	1	1	1	2	5	Whitefish	IS4
P12-1	22	2	1	1	1	2	6	Lake trout	IS12k
P12-7	23	2	1	1	1	2	8	Lake trout	IS12k
P13-4	24	2	1	1	1	2	9	Lake trout	PS1
P13-6	25	2	1	1	1	2	10	Lake trout	PS1
P10-1	26	2	1	1	1	3	4	Rainbow trout	IS4
P16-3	27	2	1	1	1	4	11	Whitefish	PS4
P16-8	28	2	1	1	1	4	10	Whitefish	PS4
VH44	29	2	1	1	1	4	14	Rainbow trout	IS5
VH16	30	2	1	1	1	4	15	Rainbow trout	IS1
VH63	31	2	1	1	1	2	19	Rainbow trout	IS7
VH29	32	2	3	1	1	4	2	Rainbow trout	IS4
VH5	33	2	4	1	1	2	14	Rainbow trout	IS1
P11-4	34	3	2	2	3	5	2	Whitefish	IS4
VH181	35	5	1	4	1	4	2	Salmon	A2
VH182	36	6	1	5	1	4	2	Salmon	A2

PS = northern Finland, ES = southern Finland, IS = eastern Finland, LS = western Finland

A1 = Kallavesi, A2 = Torne River

Liite 2. Infektiokokeiden mikrobikantojen tiedot

Infektiokokeissa käytetyt bakteri- ja vesihomekannat, kalalaji ja elin, josta eristetty, sekä taustatietoja kalaryhmästä, eli kalan yleiset oireet ja sijainti.

Mikrobikanta	Kalalaji	Elin	Oireet	Sijainti
<i>Iodobacter fluviatilis</i> DSM 3764	Tyypikanta	Ei sovellettavissa	Ei sovellettavissa	Ei sovellettavissa
<i>I. limnosediminis</i> 6875/13 ¹	Järvitaimen	Iho	Vesihome ja ihovaurioita	Jänisjoen vesistöalue
<i>I. limnosediminis</i> 2726/06 ¹	Järvitaimen	Kidus	Vesihome ja ihovaurioita	Kymijoen vesistöalue
<i>I. limnosediminis</i> 6114/16 ¹	Järvitaimen	Iho	Vesihome ja ihovaurioita	Vuoksen vesistöalue
<i>I. limnosediminis</i> 8157/04 ¹	Järvitaimen	Iho	Vesihome ja ihovaurioita	Kymijoen vesistöalue
<i>F. psychrophilum</i> FI090 ²	Kirjolohi	Ihovaurio	Ihovaurioita	Suomenlahti
<i>F. psychrophilum</i> FI059 ³	Kirjolohi	Munuainen	Ei tiedossa	Suomenlahti
<i>S. parasitica</i> VH28	Järvitaimen	Iho	Vesihome ja ihovaurioita	Vuoksen vesistöalue
<i>S. parasitica</i> VH45	Järvitaimen	Pyrstö	Vesihome	Kymijoen vesistöalue
<i>S. parasitica</i> VH123	Järvitaimen	Pyrstö	Vesihome	Kemijoen vesistöalue
<i>S. parasitica</i> VH16	Kirjolohi	Pyrstö	Vesihome ja ihovaurioita	Kymijoen vesistöalue

¹[5]

²https://pubmlst.org/bigodb?page=info&db=pubmlst_fpsychrophilum_isolates&id=797

³https://pubmlst.org/bigodb?page=info&db=pubmlst_fpsychrophilum_isolates&id=512

Liite 3. PCR-menetelmien alukkeet ja koettimet

Hankkeessa suunnitellut ja/tai validoidut alukkeet ja koettimet PCR-menetelmiin bakteerien ja *S. parasitica* vesihomeen tunnistamiseksi

Tunnistettava organismi	Monistettava geeni	Alukkeet sekvenssi 5' ->3'	Koetin sekvenssi 5' ->3'
<i>Saprolegnia parasitica</i>	18S	TCGAAAGTCTTGTGTGGCGG	VIC- CACAGCACTCAAAGAGAGA GCAA-MGB
		CCTTGACTTTGACAACAGACTCGCA	
<i>Iodobacter limnosediminis</i>	16S	TGTTGGGGGATTTCGTCCCTTA	Cy5- AAGGGTTCTTGACATGTCA AGGCTAGGTA-BHQ-3
		GCGGCACCCCTCTATCTCTA	
<i>*F. psychrophilum</i>	rpoC	GAAGATGGAGAAGGTAATTTAGTTGA TATT	FAM- AAACGGGTATTCTTCTTGCT ACA -MGB
		CAAATAACATCTCCTTTTTCTACAACCTT GA	
<i>F. columnare</i>	csIA	AGTCCAGGTCTATAACAGCA	FAM- CAAAGATATGCGAAATGT GGA-MGB
		TCCTTCTTACCAGCTACGTCT	

*[10]

Liite 4. PCR-menetelmien spesifisyys

Vesihomeen ja bakteerien tunnistamiseen kehitettyjen PCR-menetelmien spesifisyys testattuna useiden mikrobin puhdaskannoilla

Mikrobikanta	Eristetty	<i>S. parasitica</i> PCR	<i>F. psychrophilum</i> PCR	<i>F. columnare</i> PCR	<i>I. limnosediminis</i> PCR
<i>Aphanomyces astaci</i> Da	Referenssi kanta	-			
<i>A. astaci</i> Si	Referenssi kanta	-			
<i>Leptolegnia</i> sp. VH53	Kirjolohi mäti	-			
<i>Saprolegnia</i> sp. VH27	Järvilohi ruskuaispussipoikanen	-			
<i>S. diclina</i> VH54	Kirjolohi mäti	-			
<i>S. diclina</i> VH48	Kirjolohi mäti	-			
<i>S. torulosa</i> VH40	Kirjolohi	-			
<i>S. australis</i> VH139	Kirjolohi	-			
<i>S. ferax</i> VH67	Kirjolohi ruskuaispussipoikanen	(+)			
<i>S. parasitica</i> VH28	Järvitaimen	+	-		
<i>S. parasitica</i> VH30	Kirjolohi	+			
<i>S. parasitica</i> VH120	Siika	+			
<i>S. parasitica</i> VH10	Järvilohi	+			
<i>S. parasitica</i> VH60	Kirjolohi	+			
<i>F. psychrophilum</i> FI056	Kirjolohi		+		-
<i>F. psychrophilum</i> FI059	Kirjolohi		+		
<i>F. psychrophilum</i> FI090	Kirjolohi		+		
<i>F. psychrophilum</i> 04/1999	Meritaimen		+		
<i>F. columnare</i> KBAK7498/19	Kirjolohi		-		-
<i>F. columnare</i> KBAK7786/19	Kirjolohi		-		
<i>F. branchiophilum</i> ATCC 35035	Tyypikanta		-		
<i>F. aquatile</i> NCIMB 8694	Tyypikanta		-		
<i>I. limnosedimnis</i> 6114	Järvitaimen		-		+
<i>Flavobacterium</i> sp. KBAK3445	Meritaimen		-		
<i>Flavobacterium</i> sp. KBAK3444	Meritaimen		-		
<i>F. psychrophilum</i> KBAK3439	Kirjolohi		+		
<i>F. psychrophilum</i> KBAK3795	Kirjolohi		+		
<i>Flavobacterium</i> sp. 3/9 c	Järvitaimen		-		
<i>I. limnosediminis</i> 6875/13	Järvitaimen				+
<i>I. fluviatilis</i> DSM3764	Tyypikanta				-
<i>F. columnare</i> B185	Allasvesi			+	
<i>F. columnare</i> FCO-F3	Järvitaimen			+	
<i>F. columnare</i> FCO-F11	Kirjolohi			+	
<i>F. columnare</i> FCO-F19	Kirjolohi			+	

Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen sekä bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät

<i>F. columnare</i> FCO-F42	Järvitaimen			+	
<i>Flavobacterium</i> sp. B114	Kevojoki			-	

Liite 5. *Iodobacter limnosediminis* PCR-menetelmän spesifisyys vesinäytteissä

Iodobacter limnosediminis positiiviset ja negatiiviset tulokset kala-altaiden vedestä mikrobiologisella elatusaineviljelyllä (viljely) ja konventionaalisella PCR:llä (PCR) tunnistettuna. Altistuksella tarkoitetaan altaan veteen lisättyä mikrobikantaa. Kontrolli = altaaseen ei lisätty mikrobikantaa.

Altistus	Viljely	PCR
Kontrolli	-	-
<i>Iodobacter fluviatilis</i>	-	-
<i>I. limnosediminis</i> 6875/13	+	+
<i>I. limnosediminis</i> 2726/06	+	+
<i>I. limnosediminis</i> 6114/16	+	+

Liite 6. *S. parasitica* PCR-menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys vesinäytteissä

Saprolegnia parasitica vesihomeen tunnistaminen infektiokokeen D kala-altaiden vedestä neljällä eri tunnistusmenetelmällä: elatusainviljelyt agarilla ja kuoppalevyllä, sekä hampunsiemenellä ja PCR:llä [9]. Altistus tarkoittaa kaloihin injektoitua tai altaiden veteen lisättyä mikrobikantaa. Kontrolli = kalaan tai veteen ei lisätty mikrobikantaa. Sham injektio = kalaan injektoitiin steriiliä liuosta ilman mikrobikantaa. Jokainen altistus ja näytteiden otto tehtiin kahdessa rinnakkaisessa kala-altaassa.

Altistus	Päivä	Agar	Kuoppalevy	Hampunsiemen	PCR
1. Kontrolli	0	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
2. <i>I. limnosediminis</i> 8157/04	0	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
3. <i>S. parasitica</i> VH28	0	+	+	-	+
	2	-	+	-	+
	6	-	-	-	+
	14	-	-	-	+
4. <i>I. limnosediminis</i> 8157/04 + <i>S. parasitica</i> VH28	0	+	+	-	+
	2	-	-	-	+
	6	-	-	-	+
	14	-	+	-	+/-
5. Sham injektio + <i>S. parasitica</i> VH28	0	+	+	-	+
	2	+	+	-	+
	6	-	-	-	+
	14	+	-	-	+

Liite 7. Kalanviljelylaitosten vesinäytteet

Kalanviljelylaitosten näytteenottojen tiedot altaiden veden lämpötilasta, kalalajista, kerättyjen näytteiden määrästä, kalatiheydestä ja silmämääräinen arvio (%) vesihomeisten kalojen osuudesta koko altaan kalamäärästä. (E.T=ei tutkittu) [9].

Kalan viljely laitos	Pvm	Veden lämpötila (°C)	Kalalaji	Kalojen ikä (vuotta)	Kalanäytteet + Vesinäytteet kpl/allas	Allas	Kalatiheys kg/m ³	Vesihomeisten kalojen arvioitu osuus altaassa
1	6.5.2020	5,8	järvilohi	2	5+1	1a	6	50 %
						1b	E.T	20 %
						1c	0,5	0 %
2	18.5.2020	16,3	kirjolohi	0	5+1	2a	32	0 %
						2b	36	0 %
						2c	18	0 %
3	25.5.2020	12,7	taimen	1	5+1	3a	4,4	0 %
						3b	1,2	0 %
						3c	7,4	0 %
4	27.5.2020	14	merilohi	1	5+1	4a	4,3	10 %
						4b	5,1	80 %
						4c	0,5	0 %
Kallavesi	1.6.2020	15,8	ei sovelleta		0+1	Ei sovelleta		