

# Smittemodellutvikling for *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* og *Pasteurella skyensis* hos Atlantisk laks (*Salmo salar*)

Eirik Aamodt Nævdal



Institutt for biovitenskap  
Universitetet i Bergen  
Master i fiskehelse

Duncan J. Colquhoun <sup>1,2</sup>

Sonal J. Patel <sup>2</sup>  
Anne Berit Olsen <sup>2</sup>  
Snorre Gulla <sup>2</sup>  
Bjørn Spilsberg <sup>2</sup>  
Aslaug Ness <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universitetet i Bergen, <sup>2</sup>Veterinærinstituttet, <sup>3</sup>MSD Animal Health Innovation

Våren 2022

©Eirik Aamodt Nævdal

Bergen 2022

Smittemodellutvikling for *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* og *Pasteurella skyensis* hos Atlantisk laks (*Salmo salar*).

## Sammendrag

De siste årene har pasteurellose blitt et tiltakende problem i lakseoppdrett langs vestlandskysten av Norge. Sykdommen er i de fleste tilfellene forårsaket av bakterien med arbeidsnomenklaturen *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*, men det har vært tilfeller der den er forårsaket av *Pasteurella skyensis*, som helst har vært forbundet med pasteurellose i skotsk lakseoppdrett. I dag forebygges sykdommen gjennom gode hygienerutiner, men ved utbrudd er det mulig å bruke behandling med antibakterielle midler for å stoppe dødeligheten. Slik behandling vil ikke hindre sykdommen i å komme tilbake i motsetning til vaksiner, men det finnes i dag ikke kommersielt tilgjengelige vaksiner mot pasteurellose. For å kunne utvikle vaksiner trengs smitte modeller som er replikerbare, og som gir tilstrekkelig dødelighet, noe som ikke finnes for de to artene.

Hovedmålet med denne studien var derfor å etablere smitte modeller for både *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*, og *Pasteurella skyensis* for Atlantisk laks (*Salmo salar*).

Det ble gjennomført to ulike smitte metoder for hvert isolat, hvor fisken enten ble smittet intraperitoneal (*i.p.*) eller intramuskulær (*i.m.*). Sammen med smittet fisk ble det også benyttet kohabitanter, som va upåvirket fisk som stod sammen med injisert fisk. Dødeligheten i middeldosegruppen for *i.m.* smitte med *P. atlantica* gv. *salmonicida* var tilstrekkelig til at smitte modellene kan benyttes for testing av vaksiner. Det oppstod ikke tilstrekkelig dødelighet for noen av smitte metodene for *P. skyensis* for testing av vaksiner.

Gjennom forsøket ble det tatt prøver av fisk til bakteriologisk dyrkning, identifikasjon med MALDI-TOF, Real time PCR (qPCR) analyse, og for histologiske snitt. Det var et tydelig skille mellom fisk som nådde humant endepunkt (HEP) eller døde under forsøket, og overlevende fisk. Tilnærmet alle prøver fra fisk som nådde HEP eller døde underveis, viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier og positive resultat fra qPCR analyse. Overlevende fisk hadde få prøver med vekst og positivt resultat fra qPCR. Det ble gjort histologiske funn av peritonitt og epicarditt i både overlevende fisk, og de som nådde HEP.

I studiet er kriteriene for Koch's postulat oppfylt for begge isolat. Det er også tegn som tyder på at *P. skyensis* opptrer mindre virulent enn *P. atlantica* gv. *salmonicida*.

## Forord

Masteroppgaven er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse ved Universitetet i Bergen (UiB), ved Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet. Forsøket ble utført i MSD Animal Health Innovasjon Bergen sine lokaler, ved Stiftelsen Industrielaboratoriet. Laboratoriearbeidet er utført hos Veterinærinstituttet i Bergen. Forsøket ble finansiert av MSD Animal Health Innovation og laboratoriearbeid ble finansiert gjennom prosjekt FHF 901680 «Pasteurellose hos norsk laks», finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering.

Jeg vil rekke en stor takk til min hovedveileder Duncan J. Colquhoun, ved Veterinærinstituttet og UiB for rettleiing og god rådgivning. Jeg vil også takke mine medveiledere, med en spesiell takk til Sonal J. Patel som har fungert som en daglig hovedveileder med assistanse til både laboratoriearbeid og faglig rettleiing. Jeg må også takke Bjørn Spilsberg ved Veterinærinstituttet i Ås for veiledning i PCR, og Anne Berit Olsen ved Veterinærinstituttet i Bergen for veiledning og opplæring i disseksjon og histologiske vurderinger.

Videre vil jeg takke alle kjekke og hjelpsomme ansatte ved Veterinærinstituttet i Bergen og MSD Animal Health Innovation, Bergen. Tusen takk for all hjelp, opplæring, innspill og rettleiing. Det har vært en kjekk og lærerik tid.

Tusen takk til alle mine medstudenter for fem fine år ved fiskehelse studiet. Spesielt takk til Mathilde for faglig samarbeid på Pasteurella prosjektet det siste året. Videre må jeg også takke samboer, familie, og venner for alle støtte gjennom studiet, men også for å ha holdt ut med meg i innspurtsmånedene.

## Ordforklaringer

AF	Fettfinneklippet
BAM	Blodagar med 2%NaCl
CFU	Kolonidannende enheter
Ct	Threshold syklus
E	Amplifiseringseffektivitet
FCS	Foetal kalveserum
FHF	Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering
HE farging	Hematoksylin- og eosin farging
HEP	Humant endepunkt
<i>i.m.</i>	Intra muskulært
<i>i.p.</i>	Intra peritonalt
ILAB	Stiftelsen Industrielaboratoriet i Bergen
LM	Venstre maxille
m	Masse
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MALDI-TOF MS	Matrix assisted Laser Desorption Time of Flight Masse spektrometer
MS	Masse spektrometer
MTB	Biomasse
PBS	Fosfat buferet saltvann
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PO	Produksjonsområdene
qPCR	Real time Polymerase kjedereaksjon
R <sup>2</sup>	Determinantkoeffisient
RAS	Resirkulerende akvakultursystem
RM	Høyre maxille
TOF	Time of Flight
TSB	Tryptisk soyabuljong
TSSBA	Tryptikase soya agar med 1.5% salt og blod
UiB	Universitetet i Bergen
UM	Kohabitanter, umerket
VI	Veterinærinstituttet
z	Ladning

## Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	III
Forord.....	IV
Ordforklaringer.....	V
Innholdsfortegnelse .....	VI
1 Introduksjon .....	1
1.1 Norsk oppdrettsnæring .....	1
1.2 Sykdomsbildet i Norsk oppdrett i dag .....	2
1.2.1 Virale sykdommer .....	2
1.2.2 Parasitter.....	3
1.2.3 Bakterielle sykdommer .....	3
1.3 Pasteurellose .....	4
1.4 Smittemodeller.....	8
1.5 Prinsipp for metoder i studien .....	10
1.5.1 MALDI-TOF .....	10
1.5.2 Real time PCR.....	10
1.5.3 Histologi.....	13
1.6 Mål med studiet .....	14
2 Material og metode.....	15
2.1 Fisken.....	15
2.1.1 Røkting under forsøket.....	15
2.1.2 Bedøvelse/avlivning .....	16
2.2 Forsøksoppsett .....	16
2.2.1 0-prøvene.....	18
2.3 Smittemateriale .....	19
2.4 Prøvetaking.....	22
2.5 Behandling og analysering av prøvemateriell .....	25

2.5.1	Bakteriologisk dyrkning.....	25
2.5.2	MALDI-TOF.....	25
2.5.3	qPCR.....	26
2.5.4	Histologi.....	29
3	Resultater.....	31
3.1	Atferd.....	31
3.2	Dødelighet.....	32
3.2.1	<i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	32
3.2.2	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	33
3.2.3	<i>P. skyensis</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	34
3.2.4	<i>P. skyensis</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	35
3.3	Obduksjonsfunn.....	36
3.3.1	<i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	36
3.3.2	<i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	38
3.3.3	<i>P. skyensis</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	42
3.3.4	<i>P. skyensis</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	44
3.4	Bakteriologi.....	46
3.4.1	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	47
3.4.2	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	48
3.4.3	<i>P. skyensis</i> , <i>i.p.</i> smittet.....	49
3.4.4	<i>P. skyensis</i> , <i>i.m.</i> smittet.....	50
3.5	MALDI-TOF analyser.....	51
3.6	qPCR.....	52
3.6.1	PCR effektivitet.....	52
3.7	Ct-verdier fra fortynningsrekkene som ble kjørt med primere og probe spesifikk for <i>P. skyensis</i> , er oppgitt som vedlegg i Ct-verdier for fortynningsrekker.....	52
3.7.1	Spesifisitetstesting.....	53

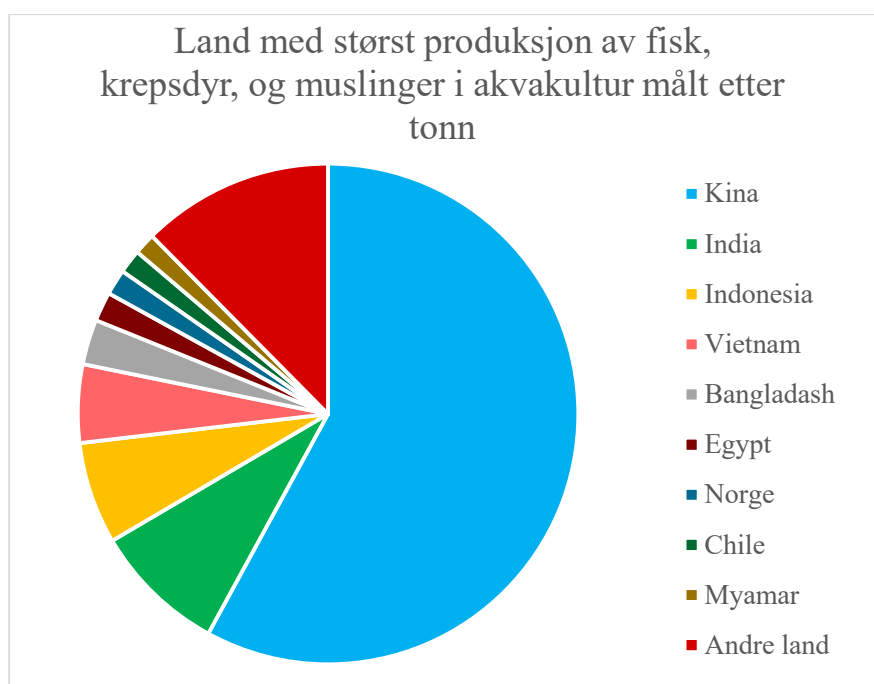
3.7.2	Vannprøver.....	54
3.7.3	Vevsprøver .....	55
3.8	Histologi .....	62
4	Diskusjon.....	64
4.1	Smittemodell for <i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> .....	65
4.2	Smittemodell for <i>P. skyensis</i> .....	67
4.3	Sammenligning av smitte modeller for <i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> og <i>P. skyensis</i> . 69	
4.4	Vurdering av primer og probe til <i>P. skyensis</i> .....	70
4.5	Real time PCR – kontaminering.....	71
5	Konklusjon .....	72
6	Kilder.....	73
7	Vedlegg .....	77
7.1	Protokoll for DNA ekstraksjon fra filter.....	77
7.2	Obduksjonsfunn.....	78
7.3	Ct-verdier for fortynningsrekker .....	80



# 1 Introduksjon

## 1.1 Norsk oppdrettsnæring

Oppdrettsnæringen i Norge har hatt en formidabel vekst siden oppstarten på 70-tallet. Næringen har gått fra å være en attåttnæring for lokale bønder, til en næring verdt milliarder (Steinset, 2017). I 2020 ble det solgt over 1,488 millioner tonn matfisk fra Norsk oppdrett (Fiskeridirektoratet, 2021d). Til tross for økt produksjonsvolum, er Norge kun den sjuende største oppdrettsnasjonen i verden målt i tonn fisk, krepsdyr, og muslinger produsert (FAO, 2020), som vist i Figur 1-1.



Figur 1-1: De ti største oppdrettsnasjonene i verden målt etter tonn produsert. Produksjonen inkluderer fisk, krepsdyr, og muslinger. (FAO, 2020).

I 2020 ble det solgt over 1,388 millioner tonn laks (*Salmo salar*) til en verdi på over 64,6 milliarder kroner (Fiskeridirektoratet, 2021b). I tillegg til laks, ble det blant annet solgt over 96 tusen tonn regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), over 1800 tonn kveite (*Hippoglossus hippoglossus*), litt over 500 tonn røye (*Salvelinus alpinus*), og 162 tonn torsk (*Gadus morhua*) fra norsk oppdrett (Fiskeridirektoratet, 2021b, Fiskeridirektoratet, 2021a). Det ble også solgt over 35 millioner rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*), og 1,3 millioner berggylt (*Labrus bergylta*) til bruk som renseskjell (Fiskeridirektoratet, 2021c).

Norge er også en stor fiskerinasjon, men alt i 1999 var førstehåndsverdien fra oppdrett større enn den fra fiskeri (Steinset, 2017). Den totale mengden som er fisket i norske farvann siden

år 2000 har vært mellom 2,2- 2,7 millioner tonn fangst per år (Fiskeridirektoratet, 2022), mens oppdrett i samme periode gikk fra å produsere i underkant av femhundre tusen tonn i år 2000, til over 1,4 millioner tonn per år (Fiskeridirektoratet, 2021b).

Veksten for oppdrett av laks i Norge har vært formidabel, selv om det blir gitt færre og færre nye konsesjoner (Steinset, 2017). Noe av økningen kommer av muligheten til å utnytte maksimal tillatte biomasse (MTB) (Steinset, 2017), som ble mulig da en startet å sette ut smolt hele året etter at en klarte å styre smoltifiseringen ved bruk av lysstyring (Stefansson et al., 1991). I tillegg kommer ny teknologi som lukkede og semilukkede systemer, samt bruk av resirkulerende akvakultursystem (RAS) for landbasert produksjon (Waagbø, 2021). Selve anleggene i sjø har også blitt større, hvor et gjennomsnittlig anlegg i 2020 bestod av sju merder med en bredde/diameter på 43 meter (McIntosh et al., 2022).

Solberg-regjeringa (2013-2021) satt som mål å femdoble produksjonen i norsk oppdrettsnæring innen 2050 sammenlignet med 2010 (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015). Økningen forutsetter at næringen løser nåværende miljø- og sykdomsutfordringer, at det skjer innovasjon innen fôr, fiskehelse, avl, og annen teknologi for næringen, og at regelverket tillater vekst dersom mulig. Videre legger regjeringen frem at de vil «Benytte miljømessig bærekraft som den viktigste forutsetningen for å regulere videre vekst i oppdrettsnæringen.» (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015).

Innovasjon rettet mot fiskehelse er viktig da infeksjose agens fort blir spredd mellom individ, da det er høy tetthet av individer i oppdrett (Sommerset et al., 2005). Å forbygge, og bekjempe dyresykdommer er formålet med EU sin dyrehelseforordning (2016/429), der tidlig påvisning og kontroll skal redusere tap ved utbrudd (EU, 2016).

## 1.2 Sykdomsbildet i Norsk oppdrett i dag

I 2021 døde det 54 millioner laks i sjøfasen i oppdrett, noe som tilsvarer en dødelighet på 15,5%. Dette er relativt likt tall som tidligere år. Det er variasjon i dødelighet mellom de ulike produksjonsområdene (PO) langs kysten, der PO4 har høyeste dødelighet på 22,5%. Det er ulike sykdommer som gir redusert fiskevelferd og økt dødelighet i norsk oppdrett i dag. Dette inkluderer både virale og bakterielle sykdommer, samt parasitter (Sommerset et al., 2021).

### 1.2.1 Virale sykdommer

Det er i dag tre dominerende virale sykdommer i norsk oppdrett. Dette er kardiomyopatisyndrom (CMS) som er forårsaka av piscint myokardittvirus (PMCV), pankreassykdom (PD) som er forårsaket av Salmonid alfavirus (SAV), og hjerte- og

skjelettmuskelbetennelse (HSMB) som er forårsaket av Piscine orthoreovirus (PRV). I tillegg har det vært en økning av påviste tilfeller med infeksjøs lakseanemi (ILA), forårsaket av infeksjøs lakseanemi virus (ILAV). Både PD og ILA er listeførte sykdommer henholdsvis liste 3 og liste 2. De viktigste listeførte eksotiske sykdommene (liste 2) er Infeksjøs hematopoetisk nekrose (IHN) forårsaket av Infeksjøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV), og viral hemoragisk septikemi (VHS) forårsaket av VHS-virus. De er enda ikke påvist i Norge (Sommerset et al., 2021).

### 1.2.2 Parasitter

Det finnes flere parasitter som gir problemer i norsk oppdrett, blant annet amøben *Paramoeba perurans* som forårsaker amøbegjellesykdom (AGD), og bendelmark som *Eubothrium*. Det som er den mest problematiske parasitten, er derimot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Lakselusa lever av hud, slim, og blod fra fisken, der høy tetthet av lus kan gi sårskader som åpner for at fisken lettere får sekundærinfeksjoner (Sommerset et al., 2021). Mengde tillatt lus på en lokalitet er definert i Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg, der øvre grense for kjønnsmodne hunnlus er 0,5 eller 0,2 i snitt per fisk, og varierer etter hvor i landet anlegget er, og tid på året (fiskeridepartementet, 2013).

For å kunne holde seg innenfor disse grensene, blir fisken stadig behandlet mot lus. De siste årene har medikamentfrie behandlinger erstattet medikamentelle behandlinger på grunn av resistens oppbygging hos lusa. Medikamentfrie behandlinger som benyttes er ferskvannsbehandlinger, termiske behandlinger og mekanisk avlusning som spyling og børsting. I tillegg blir det brukt preventive tiltak som rensefisk og luseskjørt (Sommerset et al., 2021). Det er vist at termiskbehandling over 28°C oppleves smertefullt for fisken (Nilsson et al., 2019), og behandlinger mellom 34°C og 38°C gir vevsskader, samt stresser fisken (Gismervik et al., 2019). Skader etter behandling av lus er sett på som den viktigste årsaken til redusert velferd (Sommerset et al., 2021).

### 1.2.3 Bakterielle sykdommer

For bakteriesykdommer i norsk oppdrett, har situasjonen vært relativt stabil i lengre tid, men de siste årene har det vært en økning for enkelte bakteriesykdommer. I 2021 ble det blant annet påvist et tilfelle med systemisk infeksjon med *Flavobacterium psychrophilium* i regnbueørret, og fem tilfeller av klassisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), som begge er meldepliktige (liste 3) sykdommer (Wiik-Nielsen et al., 2022). Furunkulose sammen med kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida*) var blant grunnene til en svært stor økning i bruk av antibakterielle midler gjennom 1980-tallet, og gav svært negativt

omdømme for oppdrettsnæringen. Det ble innført flere tiltak for å redusere bruken av antibakterielle midler, men det viktigste tiltaket som ble innført, var vaksiner av oppdrettsfisken. Vaksinen mot kaldtvannsvibriose ble lansert i 1987, og samme år var et topp år i forbruk av antibakterielle midler i oppdrett. I 1989 var forbruket redusert 60% sammenlignet med 1987. På grunn av at fisken ikke ble tilstrekkelig beskyttet med de første vaksinene mot klassisk furunkulose, ble de videreutviklet. Dette førte til introduksjon av vaksiner med oljeadjuvans, som gav tilstrekkelig beskyttelse (Grave and Hektoen, 2022). I dag er forbruket av antibakterielle midler i Norsk oppdrett svært lavt (Wiik-Nielsen et al., 2022).

Andre bakteriologiske sykdommer som forekommer i norsk lakseoppdrett er «vintersår», forårsaket av *Moritella viscosa*, og tenacibaculose forårsaket av *Tenacibaculum spp.*. Dette er bakteriesykdommer som normalt opptrer på høst- og vinter halvåret, og forårsaker sårutvikling som reduserer fiskehelsen, og øker dødeligheten. Nesten all laks i norsk oppdrett blir vaksinert mot *M. viscosa*, men det finnes ikke mot *Tenacibaculum*-infeksjoner. Ved alvorlige tilfeller kan antibakterielle midler brukes for behandling, men effekten er variabel og usikker. Det er anbefalt å forebygge sykdom med fjerning av fisk med sår, redusere ikke-medikamentell behandling på høst- og vinter halvåret og ha god smoltkvalitet og gode forhold omkring sjøsetting (Wiik-Nielsen et al., 2022).

I tillegg er det kommet mange tilfeller av Pasteurellose på Vestlandet de siste årene. I 2021 ble det påvist i alt 45 tilfeller, og sykdommen er av fiskehelsepersonell karakterisert som et alvorlig tiltagende problem for laks i matfiskanlegg på Vestlandet (Wiik-Nielsen et al., 2022).

### 1.3 Pasteurellose

Betegnelsen «pasteurellose» ble først brukt til å beskrive en sykdom hos hvit havabbor (*Morone americana*) og Stripet havabbor (*Morone saxatilis*) i de nordligste regionene av Chesapeake Bay, USA, (Snieszko, 1964). Bakterien som forårsaket sykdommen ble først navngitt som *Pasteurella piscicida* ut ifra morfologi, fysiologiske, og serologiske egenskaper (Janssen and Surgalla, 1968). Det ble senere vist at *P. piscicida* ikke tilhører familien *Pasteurellaceae*, men er nærmere beslektet *Photobacterium damsela*, og navnet ble endret til *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (Gauthier et al., 1995).

De første tilfellene av sykdom i fisk forårsaket av sanne medlemmer av familien *Pasteurellaceae*, ble identifisert mellom 1989 og 1992 da det ble rapportert om utbrudd av bakteriell sykdom i oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar*) i Nord-Norge. Sykdommen ble

navngitt *Varracambi*, som er det samiske navnet for blod øyne, ettersom blødning i øynene var karakteristisk for sykdommen. Bakterien som forårsaket sykdommen ble ikke umiddelbart taksonomisk plassert, men det var foreslått at bakterien hørte til *Vibrionaceae* eller *Pasteurellaceae* (Valheim et al., 2000).

Det er senere beskrevet fire ulike sykdomsutbrudd i Skottland mellom 1995 og 2001, forårsaket av en bakterie som ble navngitt som *Pasteurella skyensis* (Birkbeck et al., 2002). Navnet ble gitt på bakgrunn av biokjemiske, og fysiologiske egenskaper, samt 16S rRNA sekvensering. Bakterien er beskrevet som en pleomorfisk, gram negativ, stav formet, og fakultativ anaerob. Den ble dyrket på Tryptikase soya agar med 1,5% salt og blod (TSSBA), inkubert på 22°C aerobt i 48 timer, og veksten bestod av hele konvekse, grå sirkler med diameter på 0,5 mm, som var ikke hemolytiske, eller svakt hemolytiske (Birkbeck et al., 2002).

Patologiske forandringer i død, og moribund fisk som var smittet med *P. skyensis* ble beskrevet av Jones og Cox (Jones and Cox, 1999), der fisk med tidlige stadier ble observert til å ikke ha fôr i magen. Indre organ hadde petekier i fett rundt tarmen, og peritoneale overflater. Det ble funnet distinkte hvite fokale lesjoner i nyre, milt og hjerte. Fisk med lengre sykdomsforløp hadde mer kronisk patologi, med peritonitt og falsk membrandannelse på bukhinneorganer og svømmeblære. Histologisk ble det observert blant annet koagulativ nekrose i nyre, lever og milt med økende utvikling over tid. I histologiske snitt fra fisk med lengre sykdomsforløp var peritonitt et dominerende funn. Det er verdt å merke at fisk brukt til disse beskrivelsene hadde mye skottelus (*Caligus elongatus*), og for fisk undersøkt senere var det oppstått skader etter en oljebasert vaksine.

Det har blitt utført smitteforsøk med *i.p.* smitte med stammer isolert fra utbrudd i Skottland der en oppnådde dødelighet blant halvparten av smittet fisk i løpet av fire uker. Fisken viste positiv vekst fra nyrer, og histologiske prøver viste kliniske tegn som karakterisert hos naturlig smittet fisk. Virulensen til *P. skyensis* ble omtalt som lav (Birkbeck et al., 2002). Senere er det karakterisert to nært beslektede serotyper av *P. skyensis*, kalt O1 og O2, der isolater brukt i smitteforsøk av Birkbeck et al. (2002) er forbundet med serotype O1 (Reid and Birkbeck, 2015). Det er også vist at utbrudd med serotype O2 har et annet opphav enn utbrudd med serotype O1, fremfor å være endemisk i et lokalt område (Reid and Birkbeck, 2015).

*P. skyensis* var kun assosiert med sykdom i oppdrettsfisk i Skottland, frem til det i 2020 ble påvist et tilfelle i norsk oppdrett (Nilsen et al., 2021) som er assosiert med serotype O1 av *P. skyensis* (Gulla et al., 2020). I tillegg til tilfellet med *P. skyensis*, har det blitt påvist pasteurellose i norsk oppdrett siden 1989 (Nilsen et al., 2021). Tilfellene har vært sporadiske frem til de siste årene da det har vært en stor økning i antall påvisninger, primært langs Vestlandet. I 2020 ble det påvist 57 tilfeller og 45 tilfeller i 2021 (Wiik-Nielsen et al., 2022). Veterinærinstituttet (VI) har helgenomsekvensert over 80 isolater av *Pasteurella* fra både laks og rognkjeks, og vist at isolater forbundet med sykdom i norsk laks danner en egen gruppe som skiller seg fra den navngitte *P. skyensis*. Gruppen er assosiert med varracalmbi-assosierte isolater som ble beskrevet på slutten av 90-tallet, men en ser også at isolater fra 2018 og frem til i dag danner en egen eksklusiv klynge, som indikerer et nylig felles opphav. Det er ikke publisert offisielt nomenklatur for denne gruppen enda, da genetiske og fysiologiske egenskaper ikke ennå er tilstrekkelig beskrevet, men det er foreslått å bruke arbeidsnomenklaturen *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* for gruppen som er forbundet med sykdom i norsk laks (Gulla et al., 2020).

*P. atlantica* gv. *salmonicida* er en ikke-bevegelig, gram negativ, stavbakterie, og ved dyrking på blodagar med 2% NaCl (BAM) er det saktevoksende små (1mm) store fargeløse kolonier som kan være alfa hemolytisk etter lengre inkubering. Bakterien blir helst funnet i fisk over 3 kg og er ikke direkte forbundet med økt dødelighet, men det er en økning i kliniske tegn blant dødfisk. Hos smittet fisk er det funnet epicarditt, og bakterien er funnet i blodkar i histologiske snitt. Obduksjonsfunn fra fisk med påvist *P. atlantica* gv. *salmonicida* er blakket veske i hjertehulen, purulent materiale på hjerte, lever, og andre indre organ, bukhinnebetennelse (peritonitt), hjertesekkbetennelse (epicarditt), sår ved finne basis, og byller i lever, hjerte, og muskulatur. Det er i noen tilfeller også funnet sår på snute, ved øyne, og ved basis av halefinne. Det er tenkt at disse sårene er mulige inngangsporter for bakterien. Det er også foreslått at *P. atlantica* gv. *salmonicida* kan smitte via behandlingsbåter, og at smitte kan komme fra rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) infisert med *Pasteurella* (Legård and Strøm, 2019). Ved helgenomsekvenseringen av de 80 isolatene av *Pasteurella* fra laks og rognkjeks gjort av VI er det vist at bakterien som forårsaker *Pasteurella* hos rognkjeks (med unntak av to tilfeller) er forårsaket av en svært homogen gruppe som er forskjellig fra *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men tilhører samme art (Gulla et al., 2020).

*Pasteurella* i rognkjeks ble først rapportert i Norge i 2013 (Alarcón et al., 2016), og har senere blitt påvist både på Færøyene og i Skottland (Gulla et al., 2020). Det er vist at *Pasteurella*

isolert fra Rognkjeks i Norge er genetisk og serologisk forskjellig fra *P. skyensis*, og *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Alarcón et al., 2016). Det er foreslått å bruke arbeidsnomenklatur *Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri* for *pasteurella*-isolater fra rognkjeks. Dette skiller seg fra *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men ikke så mye at det er ulike arter. *P. atlantica* gv. *salmonicida* er funnet i enkelte tilfeller hos rognkjeks (Gulla et al., 2020).

Makropatologiske funn i rognkjeks som er funnet inkluderer finneråte, hudskader, og blødning i gjeller og ved base av finner. Det er også observert noder i indre organ. Histologisk er det påvist bakteriologisk sepsis, med mikrokolonier av stavebakterier i indre organ, gjeller, og hud (Alarcón et al., 2016). *P. atlantica* gv. *cyclopteri* har også blitt dyrket i flytende medium, tryptisk soyabuljong (TSB) med 10% foetal kalveserum (FCS) med god vekst, noe som gjør det lettere å lage smittemateriell til smittetest. Det er også gjennomført smittetest med *P. atlantica* gv. *cyclopteri* med både intraperitonalt (*i.p.*), og intramuskulært (*i.m.*) smittet fisk sammen med kohabitanter og badsmitte. For *i.p.* og *i.m.* smittet fisk kom dødeligheten før utvikling av karakteristiske kliniske tegn, i tillegg til at det ble observert store vevsskader nær stikkpunktet for *i.m.* smittet fisk. Lavere smittedoser gav langsommere dødelighetsutvikling, men det var ikke redusert total dødelighet. For kohabitanter ble dødeligheten redusert dersom *i.p.* og *i.m.* smittet fisk hadde høye smittedoser, som mistenkt kommer av lavere utskillelse ettersom stikksmittet fisk døde fortere. For badsmittet fisk var smitteutviklingen mer gradvis, som gav større muligheter for å studere sykdomsutvikling (Ellul et al., 2019b). Badesmitte er brukt videre i vaksineringsforsøk i Rognkjeks med en monovalent inaktivert *P. atlantica* gv. *cyclopteri* vaksine. Det ble påvist antistoffproduksjon, men vaksinen hadde likevel lav beskyttelsesgrad (Ellul et al., 2019a).

Det er også blitt utført smittetest med isolater av *Pasteurella* sp. isolert fra rognkjeks, og isolert fra laks av Sandlund et al. (2021). Isolatene ville med arbeidsnomenklatur bli kalt *P. atlantica* gv. *cyclopteri* for isolat fra rognkjeks, og *P. atlantica* gv. *salmonicida* for isolater fra laks. I forsøket ble laks badsmittet med de to isolatene, eller kohabitant smittet med badsmittet rognkjeks. Det oppstod dødelighet blant kohabitant laks, men disse viste ikke obduksjonsfunn forenlig med pasteurellose. Det døde ikke badsmittet laks. Det ble ikke re-isolert bakterie fra laks, og Koch's postulat ble ikke oppfylt for hverken *P. atlantica* gv. *cyclopteri* eller *P. atlantica* gv. *salmonicida* for laks. Postulatet ble oppfylt for begge isolat hos rognkjeks.

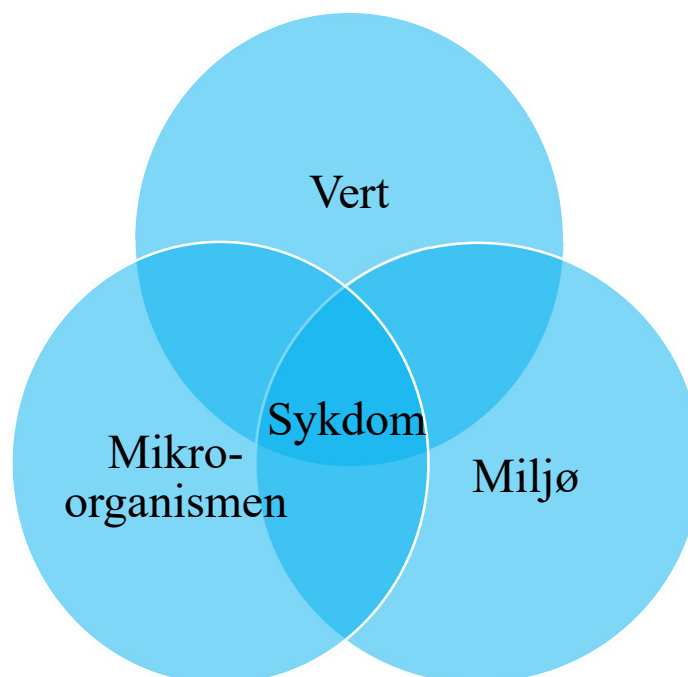
Koch's postulat er kriterier som må oppfylles for å vise at en mikroorganisme er årsaken til en sykdom. Kriteriene sier at en skal kunne isolere mikroorganismen fra syke individer, og at de

ikke skal finnes ved andre sykdommer. Mikroorganismen skal videre kunne dyrkes til ren kultur, og brukes til å smitte friske individer som utvikler sykdommen. Til slutt skal mikroorganismen reisoleres fra smittede individer (Koch, 1890).

Det er i dag ingen kommersielle vaksiner tilgjengelig mot pasteurellose, og det mangler kunnskap om smitteveier og reservoarer. Det mistenkes at sykdommen blir spredd horisontalt, og en må forebygge smitte med hygieniske tiltak (Wiik-Nielsen et al., 2022). Utvikling av vaksiner avhenger av å ha standardiserte smitte modeller som kan gjenskapes for testing av vaksiner (Nordmo, 1997).

#### 1.4 Smittemodeller

En smitte modell bør så godt det lar seg gjøre etterligne en naturlig smitte, slik at både spesifikke og ikke spesifikke immunresponser reagerer som det ville naturlig (Ingram, 1980). Virulensen til bakterier kommer fra flere ulike faktorer, og det er viktig at en vurderer alle faktorer ved utforming av en smitte modell (Ingram, 1980). Sykdom oppstår ikke tilfeldig, men ut ifra interaksjon mellom agens, verten og miljøet de befinner seg i (Figur 1-2). Man er i oppdrett avhengig av fiskens medfødte og adaptive immunforsvar, ettersom patogene mikroorganismer kan smitte via vann der man har liten mulighet til å påvirke (Snieszko, 1974).



Figur 1-2: Sykdom oppstår som et resultat av interaksjon mellom vert, mikroorganismen, og miljøet de befinner seg i. Figuren er laget med inspirasjon fra (Snieszko, 1974).



Smittematerialet som benyttes bør være nylig isolert fra syk fisk, da det er vist for blant annet smitteforsøk med bakterien *Lawsonia intracellularis*, som forårsaker proliferativ enteropati hos griser, at virulensen reduseres etter gjentatt *in vitro* dyrking (Vannucci et al., 2013). Det finnes flere smittemetoder for fisk i forsøk, med både injeksjon som *i.p.* og *i.m.*, via kohabitanter eller via badsmitte. De to sistnevnte er nærmest naturlig smitte, men er vanskeligere å standardisere og kontrollere enn smitte med injeksjon (Adams, 2019).

For smitte med injeksjon er det mulig å smitte hvert individ med samme dose hver gang, og forsøkene kan gjenskapes. Det er viktig at forskjellige doser blir testet ut, da smittemetoden ikke er naturlig (Nordmo, 1997). Etersom naturlige barrierer omgås, og immunologiske responser ikke aktiveres på samme måte som naturlig smitte, kan konsentrasjonen av smittemateriell bli for stor (Ingram, 1980). Ved *i.p.* vaksinerings vil en få en kraftig lokal immunrespons i buken, og dersom en smitter fisken *i.p.* etterpå kan det fremstå som at vaksinen har høyere beskyttelsesevne enn den reelt har (Nordmo, 1997).

Ved bruk av kohabitanter blir fisk satt i kar sammen med fisk som er smittet med badsmitte eller injisert smitte. Smittet fisk vil da skille ut mikroorganismen, og dersom den er overførbart kunne smitte kohabitantene. Dette er ansett som smittemetoden som ligner mest på naturlig smitte, men faktorer som forhold mellom smittede fisk og kohabitanter, biomasse tetthet, vannutskifting i kar, og volum på kar kan påvirke hvor stor smitte det blir blant kohabitantene. I motsetning til kohabitant smitte kan badsmitte standardiseres med tanke på smittedose og eksponeringstid (Nordmo, 1997).

Det er vist i forsøk med både kohabitant og badsmitte for *A. salmonicida* at paralleller i samme forsøk gir ulik dødelighet (Bricknell, 1995). Dette kan kompenseres for med flere paralleller av hvert forsøk, og at en tar hensyn til eventuell variasjon i smitte ved statistisk analyse (Nordmo, 1997).

Det finnes i dag ingen felles anerkjent standard for smitte modeller, men det er innarbeidet enkelte standarder for testing av vaksiner. For kontrollgrupper i vaksinetester, altså smittet fisk uten vaksiner, skal dødelighet overstige 60%, forskjell mellom paralleller av kontroller skal ikke være mer enn 20%, og uspesifikk dødelighet i kontroller skal ikke overstige 10% (Nordmo, 1997). Den akkumulerte dødeligheten bør ikke bli høyere enn 90% da en slik dødelighet kan overvelde beskyttelsen til vaksinen, og vil ikke være representativ for forhold fra felt (Nordmo et al., 1997).

## 1.5 Prinsipp for metoder i studien

Det ble under forsøket tatt prøver til bearbeidelse og analyse. Under er prinsippene for analysemetoder beskrevet.

### 1.5.1 MALDI-TOF

Matrix assisted Laser Desorption Time of Flight Massespektrometri (MALDI-TOF MS) er en masse spektrometrisk (MS) metode som kan brukes til blant annet å detektere molekylmassen til proteinfragment fra mikroorganismer, og videre sammenlignes proteinmønsteret opp mot en database av proteinmønster fra kjente mikroorganismer (Nyber et al., 2015). Bruk av MALDI-TOF for å identifisere bakterier ut ifra kjente unike mønster i opparbeidet database er sett på som svært nyttig da prøvene krever lite for-, og etterbehandling av prøven (Dare, 2006).

Alle former for MS bygger på fire trinn der peptid, eller fragment av peptid i prøven først blir tilført ladning (normalt i form av protoner) fra en kilde til ioner. Ioniseringen av peptidet vil skje i et elektrisk felt som leder ionene videre til neste trinn, som er masse analyse. Dette vil skje i et vakuumkammer og ionene blir fysisk skilt ut ifra deres forhold ( $m/z$ ) mellom masse ( $m$ ) og ladning ( $z$ ). Deretter vil ionene treffe en detektor som er det tredje trinnet. Her blir den relative massen av hvert ion i prøven målt. Det fjerde trinnet er dataanalyse av resultatene (Lodish et al., 2016b).

MALDI-TOF består av Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) som brukes til å generere ioner ut ifra proteiner, og proteinfragmenter, og Time of Flight (TOF) for masse analyse. Ved analyse med MALDI-TOF blandes prøven med en matrix som har en organisk syre, med lav-molekyl-vekt, og som er UV-absorberende. Prøven og matrixen tørkes på en metallplate, før platen legges i et kammer. Der vil en laser ionisere, og fordampe prøven slik at det produseres ladde ioner fra de opprinnelige molekylene. Videre detekteres molekylmassen i et vakuum. Prøven analyseres ut ifra at tiden det tar for ionet å passere gjennom masse analysatoren, og treffe deteksjonsplaten er proporsjonal med kvadratroten av  $m/z$ . Mindre ioner vil gå fortere gjennom enn større ioner (Lodish et al., 2016b).

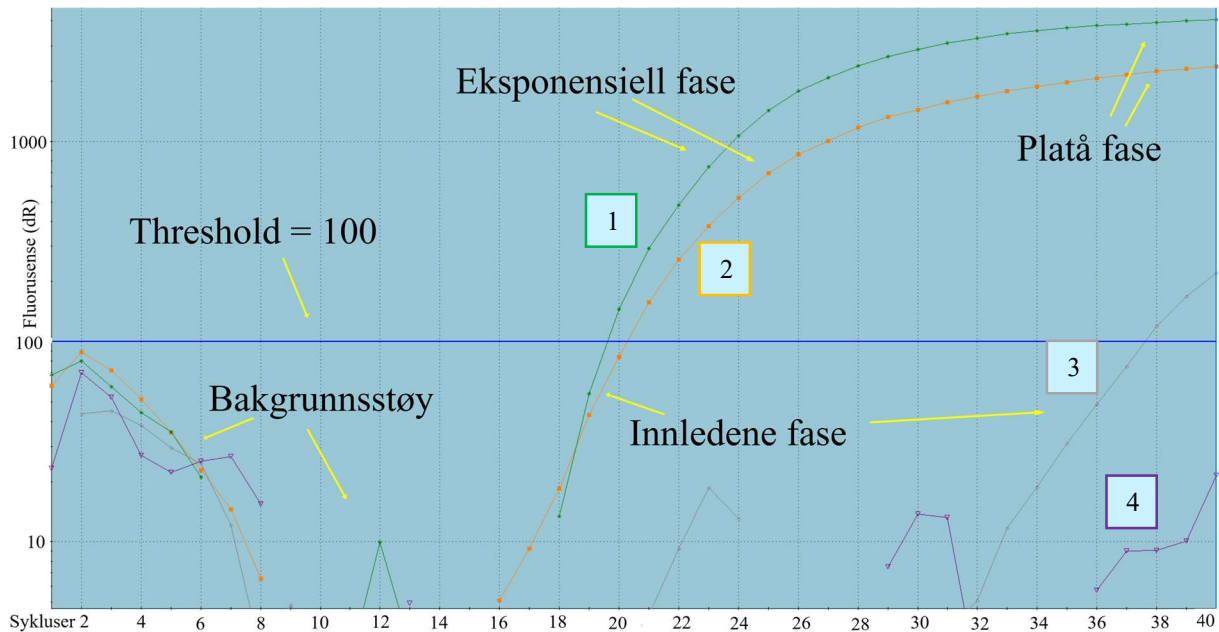
### 1.5.2 Real time PCR

Polymerase kjedereaksjon (PCR), er en molekylærbiologisk metode for amplifisering av spesifikk DNA fragmenter, dersom man kjenner sekvensene på endene av DNAet man ønsker å amplifisere. Amplifiseringen skjer i sykluser som består av denaturering av dobbelttrådet DNA til enkelttråder, og hybridisering av komplementære enkelt tråder gjennom binding av

primere til enkeltrådet DNA (Annealing), og polyrimisering av enkeltrådet DNA til dobbeltråda DNA (Extention) (Lodish et al., 2016a).

Ved bruk av fluorescens teknikk, kan amplifiseringen overvåkes under hele kvantifiseringen (Wilhelm and Pingoud, 2003). Dette kalles Real time PCR, også referert til som qPCR (Bustin et al., 2009). Det finnes ulike deteksjonsmetoder for fluorescens, blant annet hydrolyse prober som TaqMan prober, som er en oligonukletid probe med et fluorofor i 5' ende, og en quencher i 3' enden. Proben binder seg til det enkeltrådede PCR produktet slik som primerene. Quencheren stopper fluoroforet i å fluoresere frem til til Taq DNApolymerase når proben, og kutter den endonukleolytisk løst. Quencheren blir frigjort fra fluoroforen, og det kan nå fluoresere (Wilhelm and Pingoud, 2003).

Målt fluorofor blir plottet mot syklusen, og det lages en amplifikasjonskurve som vist i Figur 1-3. Hver kurve for positive resultat består av tre ulike faser der den første er en innledende fase, der det ikke er akkumulert noe produkt som kan måles. Den andre fasen er en eksponentiell fase, og til slutt kommer platå fasen der det ikke er mer materiale til å amplifisere mer produkt. Den eksponentielle fasen kan egentlig sies å starte alt før 1. syklus er fullført, da mengden amplifisert produkt vil øke, men det er ikke mulig å skille dette fra bakgrunnsstøy. Derfor settes et threshold som definerer når en med sikkerhet kan si at fluoreseringen ikke kommer fra bakgrunnsstøy. Thresholdet skal helst settes slik at det krysser amplifiseringskurven i den eksponentielle fasen. Thresholdet kan kalkuleres av programvarer eller settes manuelt ut fra vurdering av kurvene. Skjæringspunktet mellom thresholdet og amplifiseringskurven kalles threshold syklus (Ct) (Wilhelm and Pingoud, 2003).



Figur 1-3: Eksempler på fire ulike amplifikasjonskurver. Kurve nr. 1 og 2 når den eksponentielle fasen tidlig, og nærmer seg platå fasen mot slutten. Kurve nr. 3 når så vidt eksponentiell fase på slutten. Kurve nr. 4 er ikke positiv. Resultatene fram til syklus 14 er kun bakgrunnsstøy. Thresholdet er satt til 100 for denne kjøringen.

Ved utvikling av nye primere og prober kan spesifisiteten testes ut *in silico*, men verktøy som for eksempel BLAST. Det er viktig at spesifisiteten senere valideres empirisk med eksperimentelle resultater (Bustin et al., 2009). For å kunne beskrive effekten til primere og probe bør PCR effektiviteten, den lineære dynamikken, nedre påvisningsgrense, og presisjon beskrives. Den vanligste måten å beskrive PCR effektiviteten er ved å teste amplifiserings effektiviteten med bruk av fortynningsrekker. Resultatene fra qPCR av fortynningsrekkene plottes med konsentrasjonen i fortynningen på x-aksen, og Ct-verdien for fortynningen på y-aksen. Ut ifra dette kan det lages en trendlinje der amplifiseringseffektiviteten ( $E$ ) kan regnes ut med  $E = 10^{(-1/Stigningstal)} - 1$ , der svingningstallet er hentet fra trendlinjen (Bustin et al., 2009).  $E$  viser til hvor mye DNA som blir amplifisert i hver syklus, og ligger normalt mellom 90% og 105% (Johnson et al., 2013).

Den lineære dynamikken kan også beskrives ut ifra fortynningsrekker, og beskriver det høyeste til det laveste kvantifiserbare amplifikasjonen. For å kunne beskrive den lineære dynamikken kreves det minst tre fortynninger i fortynningsrekkene, men ideelt bør den inneholde fem til seks størrelsesordener. Kurven sin determinantkoeffisient ( $R^2$ ) bør oppgis ettersom den viser hvor godt kurven passer til resultatene (Bustin et al., 2009).  $R^2$  ligger på en skala mellom 0 og 1, og bør ikke være lavere enn 0,98 (Johnson et al., 2013).

Nedre påvisningsgrense er den laveste konsentrasjonen der minst 95% av positive prøver detekteres. Dersom reaksjoner med samme fortykning gjentas, kan den nedre påvisningsgrensen bli funnet med digital PCR. Presisjonen beskriver variasjoner i qPCR resultat og kan beskrives ved å finne standardavviket for fortynningsrekkene. Variasjonene kan komme av for eksempel temperaturforskjeller som påvirker annealing og/eller denatureringen (Bustin et al., 2009).

### 1.5.3 Histologi

Histologi er mikroskopisk undersøkelse av tynne, fargede, snitt av fiksert vev for å kunne forstå sammenhengen mellom strukturer og funksjon. Med kjennskap til normalstrukturer for arten i samme stadiet, kan en tolke og finne patologiske endringer (Bruno et al., 2013). Det er viktig å fikserte vev som skal gjøres histologiske vurderinger av for å unngå naturlig destruksjon (autolyse) av vevet (Holck, 2021). Ved fremstilling blir vevet dehydrert ved bruk av etanol, og xylen, for så å støpes inn i parafinvoks. Deretter lages det snitt av vevet i voksen ved hjelp av et mikrotom, og snittet overføres til et objektglass. Parafinvoksen fjernes fra snittet, og det rehydreres for så å farges med ønsket fargemetode (Holck, 2020).

#### Farging med hematoksylin og eosin.

Hematoksylin og eosin farging (HE-farging) er blant de mest brukte fargemetodene i dag, og er basert på å farge histologiske preparater med hematoksylin og eosin. Hematoksylin er et naturlig fargestoff som brukes i oksidert form, og er basisk. Det vil farge sure, eller negativt ladde strukturer som DNA, kjernelegeme i cellekjernen, RNA, ru endoplasmatiske retikulum, karbohydrater i brusk, og bakterier mørkeblått. Eosin er et syntetisk fargestoff, som er surt/negativt ladd, og farger basiske cellestrukturer som protein i cytoplasma, mitokondrier, sarkoplasmatiske retikulum og kollagen rosa. (Holck, 2021).

## 1.6 Mål med studiet

Ettersom det per i dag ikke finnes smitte modeller av *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. skyensis* isolert i Norge for laks, er det ikke mulig å teste vaksiner som blir utviklet mot Pasteurellose. Hovedmålet med studiet er derfor å utvikle smitte modeller for laks med bakterieisolatene *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. skyensis*.

Som delmål i studiet skal Koch's postulat gjennomføres for begge isolater for å vise at de begge kan være opphav til Pasteurellose i laks. Selv om Koch's postulat er gjennomført for *P. skyensis* isolert i Skottland av Birkbeck et al. (2002), er det ikke gjennomført for isolater funnet i Norge.

Videre skal sykdomsbildet, og virulensen for de to isolatene sammenlignes for å beskrive eventuelle forskjeller eller likheter. Funn skal sammenlignes med tidligere forsøk samt beskrivelser fra felt.

Til slutt skal nyutviklede primere og probe for qPCR analyse av *P. skyensis* testes med fortynningsrekker, og bredde test for å kunne beskrive deres spesifisitet.

## 2 Material og metode

Studien baserer seg på smitteforsøket som ble utført hos Stiftelsen Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB) for MSD Animal Health Innovation, fra oktober – november 2021. Atlantisk laks ble smittet av enten *P. skyensis* eller *P. atlantica* *gv. salmonicida*, hvor smittedosen baserte seg på erfaringer fra tidligere smitteforsøk utført av MSD Animal Health Innovation, og forsøk utført av VI og Veso Vikan Akvavet. Denne studien var godkjent av mattilsynet med referanse nummer 26543.

### 2.1 Fisken

I forsøket ble det benyttet Atlantisk laks fra stammen Stofnfiskur, som ble kjøpt fra ILAB med batch nummer MSD/21/036b. Fisken var smoltifisert, og klimatisert til 15°C og 35‰ salinitet en uke før oppstart av forsøket. Under forsøket ble fisken holdt i sjøvann ved 15°C og 35‰ salinitet, lysregime 12:12, og oksygen nivå mellom 65% og 100%. De 20 første fiskene satt ut i hvert kar ble veid ved forsøksoppstart, og snittvekten for hvert kar ved oppstart er oppgitt i Tabell 2-1. Det var en tilfeldig blanding av hunn- og hannfisk. Fisken ble føret etter appetitt to ganger til dagen av personalet på ILAB.

Tabell 2-1: Gjennomsnittlig vekt ved oppstart for hvert kar. *i.p.* står for intraperitoneal injeksjon av smitemateriale, og *i.m.* for intramuskulær injeksjon.

Kar	Bakterieisolat	Smittemetode	Snittvekt ved oppstart (g)
1	<i>P. atlantica</i> <i>gv. Salmonicida</i>	<i>i.p.</i>	59,4
2	<i>P. atlantica</i> <i>gv. Salmonicida</i>	<i>i.m.</i>	59,4
3	<i>P. skyensis</i>	<i>i.p.</i>	58,2
4	<i>P. skyensis</i>	<i>i.m.</i>	58,2

#### 2.1.1 Røkting under forsøket

Fisk ble sjekket for dødelighet og fisk som har nådd humant endepunkt (HEP) kl. 09:00, og kl. 14:00 hver dag av forsøket. Her ble fisken sin atferd notert, død fisk fjernet, og fisk som hadde nådd HEP tatt ut av forsøket for å minimere påkjennelsen og avlivet. HEP var definert til når fisken ikke lengre klarte holde en naturlig posisjon i vannet, og ville trolig dødd innen kort tid. Det ble benyttet egen håv til hver tank, som ble dypet i Virkon og hengt til tørk etter bruk, og skylt i rent vann før bruk.

### 2.1.2 Bedøvelse/avlivning

Fisken ble bedøvet før all håndtering som merking og smitte, og avlivet ved nådd HEP og ved avslutning av forsøket. Det ble brukt Finquel vet. fra MSD Animal Health utblandet i vann fra karet fisken stod i til både bedøving og avliving. Finquel vet. påvirker Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup>-kanaler for å depolarisere cellemembraner, som fører til at impulsoverføringer i nervesystemet blokkeres.

For anestesi ble det benyttet en konsentrasjon på 100 mg/L sjøvann med Finquel vet., som er innenfor anbefalt konsentrasjon for rask anestesi i veterinærkatalogen. For avliving ble dosen doblet til 200 mg/L Finquel vet., dette er ikke beskrevet i veterinærkatalogen, men er regnet som en dødelig dose basert på erfaringer fra MSD Animal Health.

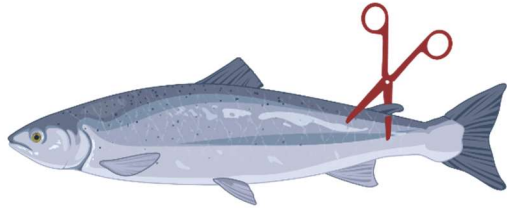
Ved bedøvelse måtte fisken ikke være unødvendig lenge i bedøvelsesvannet. Når fisken ikke responderte på berøring, var fisken klar for håndtering. Fisken ble holdt kortest mulig utenfor vannet, og ble satt ut i karet etter håndtering. Det ble kontrollert at fisken respirerte normalt igjen.

Ved avliving var fisken i bedøvelsesoppløsningen i minst 5 minutter, og det ble undersøkt at det ikke var noen refleksbevegelse før de ble ansett som død. Fisken ble lagt i poser merket med karnummer, før de ble tatt inn på patologi laboratoriet på ILAB for prøvetakning. For å minimere autolyse av prøvematerialet, ble fisken oppbevart i posen maksimalt 1 time før disseksjon. Ved mye død fisk og/eller fisk ved HEP, ble det derfor tatt ut fisk i flere omganger.

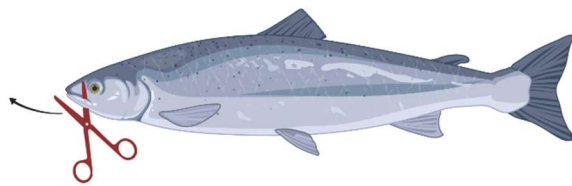
## 2.2 Forsøksoppsett

Forsøksoppsettet er vist i Tabell 2-2. Fisken ble sultet i 24 timer før forsøksstart. Før fisk ble satt ut i karene, ble den bedøvd, merket, og smittet. De tjue første fiskene satt ut i hvert kar ble veid før utsetting for å angi snittvekt til fisken i karet ved oppstart. For å skille gruppene fra hverandre, ble fisken merket ved å klippe av fettfinne, eller maxillen på venstre eller høyre side. Høydose gruppene ble fettfinneklippet (AF), som vist i Figur 2-1. Middeldose gruppene ble klippet av venstre maxille (LM), og lavdosegruppene ble klippet av høyre maxille (RM). Maxilleklipping er vist i Figur 2-2. Kohabitantene (UM) ble ikke merket for å påvirke de minst mulig.





Figur 2-1: Fettfinneklipping av laks. En bøyd saks med butte ender ble lagt helt inntil basis av fettfinnen for så å klippe den av. Figuren er laget med BioRender.com.



Figur 2-2: Klipp av maxillen på laks. En bøyd saks med butte ender ble ført langs kjeven til laksen, og maxillen ble presset mellom bladene, før biten ble klippet av. Klippet ble utført likt på venstre og høyre side. Figuren er laget med BioRender.com.

Laksen ble tilfeldig fordelt i 4 kar på 150 L, med 4 grupper i hvert kar. Det var to kar der fisken ble smittet med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, og to kar der fisken ble smittet med *P. skyensis*. Det ble brukt *i.p.* smitte i et kar av hvert bakterieisolat, og *i.m.* smitte i det andre karet av hvert bakterieisolat.

Kar 1 ble smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, fordelt på 3 behandlingsgrupper som var henholdsvis høy, middels, og lav dose, og en upåvirket kohabitant gruppe. Kar 2 ble smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, fordelt på 3 behandlings grupper som var henholdsvis høy, middels, og lav dose, og en upåvirket kohabitant gruppe. Kar 3 ble smittet *i.p.* med *P. skyensis*, fordelt på 3 behandlingsgrupper som var henholdsvis høy, middels, og lav dose, og en upåvirket kohabitant gruppe. Kar 4 ble smittet *i.m.* med *P. skyensis*, fordelt på 3 behandlings grupper som var henholdsvis høy, middels, og lav dose, og en upåvirket kohabitant gruppe.

Det blir brukt tre ulike smittedoser for hvert kar for å kartlegge forskjell i smitte avhengig av dose responsen og smittemåte. De tre dosene varierte mellom bakteriestammene og smitteметoden.

Tabell 2-2: Førsøksoppsett for smitteinjisering i de 4 ulike karene. *I.p.* står for intraperitoneal injeksjon av smittemateriale, og *i.m.* for intramuskulær injeksjon. Kolonidannende enheter (CFU) per fisk er også oppgitt.

Kar	Bakterie stamme	Behandlingsgruppe	Antall fisk	Smitte metode	Dose (ml)	Smittedose (CFU/fisk)
1	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> VIO11639	Høy	20		0.1	$5.0 \times 10^6$
		Middels	20	<i>i.p.</i>	0.1	$1.0 \times 10^6$
		Lav	20		0.1	$2.0 \times 10^5$
		Kohabitanter	20	-	-	-
2	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> VIO11639	Høy	20		0.05	$1.0 \times 10^5$
		Middels	20	<i>i.m.</i>	0.05	$1.0 \times 10^4$
		Lav	20		0.05	$1.0 \times 10^3$
		Kohabitanter	20	-	-	-
3	<i>P. skyensis</i> VIO11850	Høy	20		0.1	$1.0 \times 10^7$
		Middels	20	<i>i.p.</i>	0.1	$1.0 \times 10^6$
		Lav	20		0.1	$1.0 \times 10^5$
		Kohabitanter	20	-	-	-
4	<i>P. skyensis</i> VIO11850	Høy	20		0.05	$1.0 \times 10^5$
		Middels	20	<i>i.m.</i>	0.05	$1.0 \times 10^4$
		Lav	20		0.05	$1.0 \times 10^3$
		Kohabitanter	20	-	-	-

### 2.2.1 0-prøvene

Dagen før smitteforsøket startet ble det tatt 0-prøver av 5 tilfeldige fisk fra populasjon som ble nyttet i smitteforsøket. Det ble tatt et fullstendig prøvesett av fisken, likt det som ble tatt gjennom forsøket som er beskrevet nærmere under punkt 2.4. Slik fikk man et sammenligningsgrunnlag for å kunne se forskjeller mellom upåvirket fisk og fisk som har gjennomgått smitte i forsøksperioden. På grunn av mistenkt kontaminering av 0-prøver ved senere qPCR-analyse ble det besluttet å ta nye 0-prøver fra 6 nye fisk etter forsøket var avsluttet. Dette var fisk fra same batch, som stod upåvirket i en annen hall på ILAB, med samme miljø. Prøvene ble tatt for å undersøke at batchen var fri for begge bakterieisolatene.

## 2.3 Smittemateriale

Smittematerialet brukt i forsøket var *Pasteurella atlantica* gv. *Salmonicida* VIO11639 og *Pasteurella skyensis* VIO11850, som var isolert fra syk laks i norsk oppdrett i henholdsvis 2019 og 2020. Bakteriestammene ble levert fra VI i Ås som utstryk på BAM til MSD Animal Health Innovation. Det ble laget en stamløsning ved å dyrke kolonier fra tilsendt materiale på TSB tilsatt 10% FCS og inkubert i risteinkubator på 20°C med 200 rpm i 20 timer som beskrevet av Ellul (Ellul et al., 2019b). Deretter ble det tilsatt 20% glyserol for kryobeskyttelse, før 1ml av løsningen ble fryst ned på rør med skrukork. Bakteriekulturen ble tint og sådd ut for å sjekke renhet, og antall kolonidannende enheter (CFU) ble telt av MSD Animal Health innovation. Kimtall per ml til *P. atlantica* var 2.9E+08 CFU/ml, og 1.9E+09 CFU/ml for *P. skyensis*.

Bruksløsningene av smittematerialet bestod av stamløsningen fortynnet til rett konsentrasjon med fosfatbufferet saltvann (PBS) med 1,5% NaCl. Det ble laget 5ml smittemateriell til hver gruppe med *i.p.* smitte, og 10ml smittemateriell til hver gruppe med *i.m.* smitte. Det ble lagd mer smittemateriell enn nødvendig for å lette oppmåling av materiell, og for å kunne bruke noe til å fortynne smittemateriell til høydosegrupper fra middels- og lavdosegrupper.

Bruksløsningene til høydosegruppene ble laget til først, der mengden stamløsning som skulle benyttes ble funnet med formel 1, og mengden PBS ble funnet med formel 2. Bruksløsning til middeldosegruppene ble laget ved å fortynne bruksløsningen til høydosegruppen med PBS, og for lavdosegruppene ble bruksløsningen til middeldosegruppene fortynnet. Unntaket her er *P. atlantica* gv. *Salmonicida* (*i.p.*) der bruksløsningen til middeldosegruppen som ikke ble fortynnes direkte fra bruksløsningen til høydosegruppen for å vise manuell utrekning og oppmåling sammenlignet med å fortynne høyere doser. I Tabell 2-3 vises utregning av hvor mye av stamløsning og PBS som ble brukt for å lage bruksløsning til hver gruppe.

Formel 1: Mengde stamløsning brukt i bruksløsning (ml)

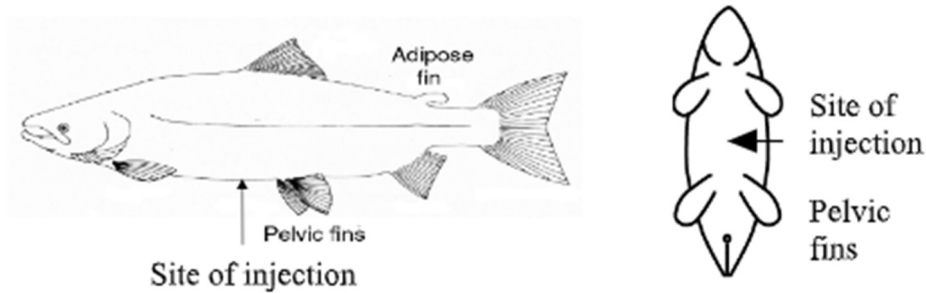
$$= \frac{\text{Smittedose pr ml bruksløsning} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) * \text{mengde bruksløsning tilaget (ml)}}{\text{smittekonsentrasjon pr ml for stamløsning} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)}$$

Formel 2: Mengde PBS til fortynning (ml)

= Mengde bruksløsning som skal lages (ml)

– mengde stamløsning som skal nyttes (ml)

Fisken ble merket og injisert med bruksløsning etter bestemte behandlingsgrupper, for så å bli satt ut i karet. Metoden er lik for begge bakteriestammene. Stikksted for *i.p.* smitte er vist i Figur 2-3. Stikket ble satt med en vinkel på 45° mot anterior ende og det ble injisert 0,1 ml smittemateriell per fisk. Stikksted for *i.m.* smitte er vist i Figur 2-4. Stikket ble satt med en vinkel mellom 30° og 45° slik at stikket fulgte ryggfinnen anteriort, og at nålen ikke traff ryggraden. Det ble injisert 0,05 ml smittemateriell per fisk.



Figur 2-3: Til venstre vises stikksted for intraperitoneal smitte sett fra siden, og til høyre vises stikksted sett ventral side. Stikket ble satt midt på ventralside, 1/2 - 1 finne lengde anteriort for base av bukfinner. Figur er gjengitt med tillatelse fra MSD Animal Health.



Figur 2-4: Stikksted for intramuskulær smitte. Stikket ble satt i siden av fisken under ryggfinnen med vinkel på 30°-45°. Nålen skulle ikke treffe ryggraden, men følge muskulaturen. Figuren er gjengitt med tillatelse fra MSD Animal Health.

Tabell 2-3: Utrekning av hvor mye stamløsning og PBS som ble brukt til å lage bruksløsning for hver gruppe. Mengde stamløsning som ble brukt ble funnet med formel 1. Mengden PBS som skulle nyttes ble funnet med formel 2. For noen grupper var det kun nødvendig å fortynne smittemateriell fra andre grupper.

Bakterie stamme	Smitte metode	Smitte gruppe	Smittedose per fisk (cfu/fisk)	Smittedose per ml bruksløsning (cfu/ml)	Mengde bruksløsning som lages (ml)	Smittekonentrasjon per ml stamløsning (cfu/ml)	Mengde stamløsning til fortynning (ml)	Mengde stamløsning til fortynning (µl)	Mengde PBS til fortynning (ml)
<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	<i>i.p.</i>	Høy	5,00E+06	5,00E+07	5	2,90E+08	0,8621	862	4,138
		Middels	1,00E+06	1,00E+07	5		0,1724	172	4,828
		Lav	2,00E+05	2,00E+06	5		Bruksløsning fra middeldose fortynnes 1:4 med PBS		
<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	<i>i.m.</i>	Høy	1,00E+05	2,00E+06	10	2,90E+08	0,0690	69	9,931
		Middels	1,00E+04	2,00E+05	10		Bruksløsning fra høydose fortynnes 1:10 med PBS		
		Lav	1,00E+03	2,00E+04	10		Bruksløsning fra middeldose fortynnes 1:10 med PBS		
<i>P. skyensis</i>	<i>i.p.</i>	Høy	1,00E+07	1,00E+08	5	1,90E+09	0,2632	263	4,737
		Middels	1,00E+06	1,00E+07	5		Bruksløsning fra høydose fortynnes 1:10 med PBS		
		Lav	1,00E+05	1,00E+06	5		Bruksløsning fra middeldose fortynnes 1:10 med PBS		
<i>P. skyensis</i>	<i>i.m.</i>	Høy	1,00E+05	2,00E+06	10	1,90E+09	0,0105	11	9,989
		Middels	1,00E+04	2,00E+05	10		Bruksløsning fra høydose fortynnes 1:10 med PBS		
		Lav	1,00E+03	2,00E+04	10		Bruksløsning fra middeldose fortynnes 1:10 med PBS		

## 2.4 Prøvetaking

Prøvetaking av fisken ble delt i fullstendig prøveuttak og redusert prøveuttak. Fullstendig prøveuttak ble tatt av nullprøver, fisk som nådde HEP, og for fem overlevende fisk i hver gruppe ved avslutningen av forsøket. Redusert prøveuttak ble kun tatt av død fisk, og fisk som nådde HEP dersom det alt var tatt fullstendig prøveuttak fra fem fisk i samme gruppe. Tabell 2-4 viser hvilke prøver som ble tatt ved fullstendig, og redusertprøveuttak. Alle prøver til bakteriologi ble strøket ut på BAM, og inkubert ved 22°C. Vevsbiter til PCR analyse ble lagt på individuelle 1.5ml eppendorfrør med RNA-later, og oppbevart ved 4°C i 24 timer, før de ble flyttet til -20°C for videre oppbevaring. Vevsbiter til histologi ble lagt på glass med 10% formalin og oppbevart i romtemperatur (~20°C).

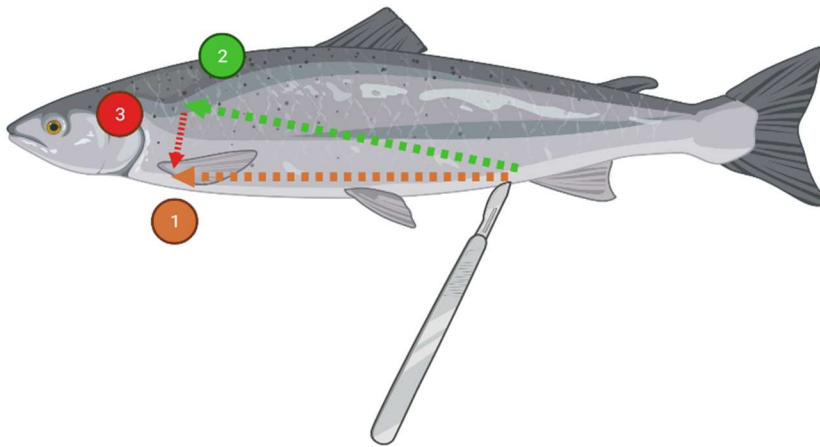
Alt disseksjonsutstyr ble rengjort desinfisert mellom hver fisk, og før organer som det ble prøvetatt til bakteriologisk dyrkning, eller PCR. Alt utstyr ble skylt i vann, og eventuelt materiale som satt fast, ble fjernet og utstyret tørket før det ble desinfisert i 96% etanol. Etanolen ble tørket vekk med nytt papir før utstyret ble brukt.

Tabell 2-4: Prøver tatt av fisken i fullstendig og redusert prøveuttak. H=Vev tatt ut til histologisk vurdering, P=vev tatt ut til PCR analyse, B=prøve tatt til bakteriologisk dyrkning. Dersom det var sår, ble det også tatt dyrkningsprøver av disse.

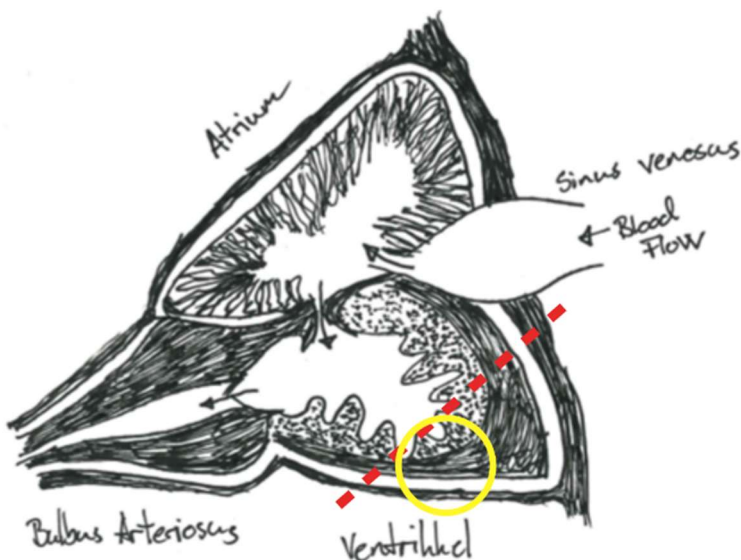
Prøvesett	Gjeller	Pseudo-branch	Hjerte	Milt	Lever	Pankreas/ Pylorus	Tarm	Nyre	Muskulatur (Sår)	Øye	Hjerne
Fullstendig	H	H	P, H	H	H	H	B, H	B, P, H	H,(B)	B,H	H
Redusert	-	-	-	-	-	-	-	B	(B)	-	-

Disseksjonen ble utført på MSD Animal Health Innovation sitt patologilaboratorium ved ILAB. Etter at fisken ble tatt ut fra karet, og eventuelt avlivet, fikk hver fisk tildelt et individnummer som bestod av tre siffer, der det første sifferet viste til tank nr., og de to neste viste til individet. Eksempelvis ville individ nr. 235 være fisk nr. 35 som ble tatt ut fra tank nr. 2. Dette nummeret ble også brukt til å merke prøvene tatt fra fisken. Fisk ble veid, målt gaffellengde på, vurdert for ytre kliniske tegn og fotografert. Alle funn og kommentarer til disseksjonen ble notert i egne skjema, se vedlegg 1 for skjema benyttet ved fullstendig prøveuttak, og vedlegg 2 for skjema benyttet ved redusert prøveuttak.

Videre ble en finger strøket over buken til fisken for å tømme ytterste del av baktarmen for innhold. Gattet ble spritet, og en podenål ble ført 1 cm inn og rotert for å ta dyrkningsprøve fra tarm. Dersom fisken hadde sår, ble det laget et snitt i ytterkant av det, og en podenål ble ført inn for dyrkningsprøve av såret. Operculum ble så klippet vekk på venstre side for å lettere komme til gjeller og pseudobranch. Gjellene ble sjekket på venstre side ved å bla gjennom buene, for så å klippe ut andre gjellebuen. Pseudobranchen ble tatt ut ved å skjære rundt den med skalpell og løfte den ut.



Figur 2-5: Hvordan buken til fisken ble åpnet under disseksjon. Første snitt lages fra gattet frem til brystfinnen. Andre snitt går fra gattet opp mot toppen av hodet. Siste snitt går mellom slutt punktet til første og andre snitt for å fjerne muskulaturen helt. Figuren er laget med BioRender.com.



Figur 2-6: Tilskjæring av hjertet. Ventrikkelen ble skåret langs den røde linja, og en vevsbit ble kuttet av til qPCR analyse (gul sirkel). Figuren er tegnet med inspirasjon fra tegning av Trygve T. Poppe.

Buken ble åpnet ved å skjære med skalpell som vist i Figur 2-5. Buken ble sjekket for ascites, og hjertehulen for veske. Hjertet ble skjært løs, og løftes ut med pinsett og legges på sterilt underlag. Hjertet ble beskåret som vist i Figur 2-6. Det ble skjært ut en liten bit til PCR, mens resten av hjerte ble bruk til histologi. Hele milten og en skive av leveren ble skåret ut til histologi. Baktarmen ble kuttet helt inn til gattet, og oesophagus ble kuttet slik at hele fordøyelses kanalen kunne løftes ut. Magen og tarmen ble sjekket for innhold. Tarmen brettes ut, og en del av midttarm, baktarm, og en bit av pylorussekkene ble tatt ut til histologi som beskrevet i Moldal et. al (Moldal et al., 2014).

Svømmeblæren ble fjernet, og et snitt ble laget helt anteriort i hinnen over nyren. En podenål ble ført inn i snittet for å ta dyrkningsprøve fra hodenyren. Et nytt snitt ble lagt litt posterior for første snitt i hinnen over nyren. Her ble det skåret ut ca. 2 cm av nyren som ble løftet ut og lagt på sterilt underlag. En bit tilnærmet 0,5 cm ble skåret av til PCR, mens det resterende vevet ble brukt til histologi. To parallelle snitt med 1 cm mellomrom ble skåret fra ryggfinnen mot ventral side i muskulaturen midt under ryggfinnen, og en tynn skive ble skåret ut til histologi. Rundt venstre øye føres et skalpellblad slik at øyet løsnet, og kunne løftes ut til histologi. En liten skalk av øyet ble snittet av slik at formalin kunne trenge lettere inn. I høyre øye ble det laget et snitt i øyet, og en podenål ble ført inn for å ta dyrkningsprøver av øyet.

Fisken ble så holdt fast, mens en skalpell ble brukt til å høvle av hodeskallen slik at hjernen ble synlig. Det ble laget et snitt i forkant og bakkant av hjernen for å løsne den før den ble løftet ut og brukt til histologi. Det som var igjen av fisken ble lagt i en pose, og oppbevart ved -20°C i påvente av å bli sendt til forbrenning.

På dag 11, 13 og 17 etter smitte, ble det tatt ut 500 ml vannprøve fra hvert kar for PCR analyse. Prøvene ble tatt kl. 14:00 hver av dagene, og filtrert med en gang gjennom Analytical Test Filter Funnel, Nalgene M fra Sigma-Aldrich (Mexico) med pumpe V6-3L fra Baoding Shenchen Precision Pump CO., LTD. (Baoding, Kina). Filtrene ble lagt i sterile rør, og oppbevart på -20°C frem til videre analyse.



## 2.5 Behandling og analysering av prøvemateriell

All videre behandling og analysering av prøver fra forsøket ble gjort ved laboratoriet til VI avdeling Bergen.

### 2.5.1 Bakteriologisk dyrkning

Det ble tatt dyrkningsprøver for å reisolere bakterieisolatene. Det ble tatt prøver fra ulike organ for å se om det var variasjon og kartlegge hvilke organ bakterien kunne reisoleres fra. Etter inkubering av bakterieskåler på 22°C i 5 til 14 dager, ble det gjort en vurdering av skålene. Skålene ble scoret med en kode som bestod av en bokstav og et tall. Bokstaven viste til generell vekst på skålen, og tallet til hvor ren veksten var. Bokstavene var R (rikelig), M (moderat), og S (sparsom). Tallene var 1 (ren kultur), 2 (tilnærmet ren kultur), 3 (blandingskultur med 1 dominerende type), 4 (blandingskultur), og 5 (uspesifikk). Dersom det ikke var vekst på skålen, ble scoren 0. I tillegg ble det skrevet en kommentar som beskrev utseende til kolonien. Om skålen representerte flere bakterietyper, ble de beskrevet fra mest dominerende vekst til minst dominerende. Et utvalg av skålene ble fotografert, og et utvalg av bakterieisolater ble frosset ned med glyserol og oppbevaringsmedium med saltvann.

### 2.5.2 MALDI-TOF

Et selektivt utvalg av representative isolater ble analysert med MALDI-TOF, for identifikasjon og bekreftelse av bakterie isolat. Isolatene som ble testet var først sådd om, for å sikre renkultur. Bakteriene ble sådd ut på BAM, og inkubert på 22°C i 5 dager. Disse skålene ble merket med en A på slutten av opprinnelig navn for å kunne skille de fra opprinnelig prøve. Hver kjøring inneholder også prøver fra arbeidskulturene CCUG 17621, og CCUG 17620 som kontroll prøver. Disse er fra kultursamlingen til Universitetet i Göteborg, Sverige, og er henholdsvis *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, og *Escherichia coli*. En koloni ble løftet fra skålen med en tannpirker, og strøket ut på merket felt på en målplate. Det ble kjørt to paralleller av hver prøve. Prøven ble så tørket i 9 minutter, før det ble lagt på 1µl matrix av typen Matrix for MALDI-TOF-MS fra Bruker Daltonics GmbH & Co (Bremen, Tyskland). Målplaten ble deretter tørket i 10 minutter, før den ble lagt i analysekammeret til maskinen. Maskinen som ble brukt var en Bruker Microflex LT/SH Bruker Daltonics GmbH & Co, Billerica, Massachusetts, USA). Prøvene ble analysert, og sammenlignet med MALDI databasen til VI av maskinen. En tallverdi viste til hvor sikkert resultatet var, 2-3 er høy sikkerhet i identifikasjon 1,70-1,99 var lav sikkerhet identifikasjon, og <1,7 var identifikasjon ikke mulig.

### 2.5.3 qPCR

Vevsprøver ble rensset med kittet High pure PCR Template Preparation Kit fra Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland) som beskrevet i medfølgende prosedyre. Kortfattet ble vevsbiter hakket opp i mindre biter med en steril skalpell for å øke reaksjonsoverflaten til vevet. Deretter ble vevet varmet opp til 55°C i en time med tissue lysis buffer, og proteinase K. Etter oppvarming av prøven ble den filtrert gjennom et high pure filter i en kolonne ved bruk av sentrifuge på 8000g i et minutt. Filteret ble deretter vasket i to sykluser, ved å tilsette vaskebuffer til kolonnen og sentrifugere den på 8000g i et minutt. Kolonnen ble tørket ved å sentrifugere den på 16 000g i ti sekunder, før DNA ble ekstrahert fra filteret ved å tilsette elution buffer til kolonnen, og sentrifugere den på 8000g i et minutt. Det ekstraherte DNAet ble oppbevart på -20°C frem til analyse.

Bakteriekolonier fra renkulturer av *P. atlantica* gv. *Salmonicida* og *P. skyensis* ble rensset for positivkontroll. Det ble også rensset andre bakterieisolater til spesifisitetstesting av primer til *P. skyensis* på samme måte. Bakteriekolonier ble også rensset med High pure PCR Template Preparation Kit fra Roche, men ikke helt etter medfølgende prosedyre. Et fyrstikkhode med bakteriekolonier ble blandet ut i 200µl PBS med vortex. Prøven ble tatt fra bakteriologisk laboratorium til prøvebehandlingsrom, der suspensjonen ble sentrifugert i 5 minutter på 3000 g. Supernatanten ble helt av og kastes, og cellepelletten resuspendert i 200µl PBS. Deretter ble kittet's medfølgende protokoll fulgt fra punkt 2 under «Isolation of Nucleic Acids from Bacteria og yeast». Da ble den resuspenderte cellepelletten inkubert med lysozym. Dette ble igjen inkubert med Binding buffer, og proteinase K. Isopropanol ble tilsatt, før det ble filtrert gjennom et high pure filter. Filteret ble så behandlet på samme måte videre som for vevsbiter.

Vannprøver ble rensset med kittet DNAeasy® Blood & Tissue Kit fra Qiagen (QIAGEN GmbH, Hilden, Tyskland) som beskrevet i vedlegg 1. Filtrene ble inkubert sammen med ATL buffer, og proteinase K i risteinkubator på 56°C, 200 rpm i 24 timer. Etter inkubering ble lysatet blandet med etanol og AI lysis buffer i forholdet 1:1:1. Blandingen ble så kjørt gjennom kolonne som bestod av filter og oppsamlingsrør med sentrifuge. Filteret ble vasket med buffer i to runder, før DNAet ble ekstrahert fra kolonnen med elution buffer. Det ekstraherte DNAet ble oppbevart på -20°C frem til analyse.

Det ble i alle runder med DNA ekstraksjon fra vev, bakterie, og filter inkludert en ekstraksjonsbuffer kontroll (EBK). EBK-en inneholdt ikke prøvemateriell, og benyttes som kontroll for kontaminering under ekstraksjonen.

Ekstrahert DNA ble målt med Nanodrop 2000 fra Thermo Scientific (USA), for å måle absorbans (A). Maskinen ble nullstilt ved å kjøre nukleasefritt vann før prøver ble analysert. 1,6µl fra prøven ble pipettert til målområdet, og analysen startet. Det ble sett på µg/ml, og ratio mellom absorbans ved 260 nm, og 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Ratioet  $A_{260}/A_{280}$  brukes for å beskrive DNA renhet for protein kontaminering, og et ratio mellom 1,8 og 1,9 indikerer at prøven er ren (Sambrook et al., 1989). Etter analysen ble materialet tørket bort med linsepapir.

Primere og probe til *P. atlantica* gv. *Salmonicida* som ble brukt er beskrevet av Sandlund et al. (2021). Forward primer var 5'- TCTAATATTGATGATCTTGTTTG-3', revers primer var 5'- ATTCCTAAATTAGGAAAGATAC-3', og proben var 5'- FAM- ACTTGATGAAGCTACACAACGTG-3'-BHQ-1.

Primere, prober, og PCR oppsett for *P. skyensis* er utviklet som en del av prosjektet «Pasteurellose hos norsk laks», finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF) og ledet av VI. Utviklingen av primere og probe er under ledelse av Bjørn Spilsberg ved Veterinær instituttet Ås. Forward primer var 5'- CAACTGCGTGTYGCTGATT-3', revers primer var 5'-GCCATTTGGAGACCACGTT-3', og probe var TaqMan probe med fargemerking (FAM) med sekvens 5'-FAM-TGAYGGACACAATGCTTTTACTG-3'-BHQ-1-3'. Primere og prober til begge isolat ble fremstilt av TAG Copenhagen AS (Fredriksberg, Danmark). Dette studiet var del i uttesting av primere for *P. skyensis*, så det ble kjørt fortynningsrekker med rensset bakterie av *P. skyensis*. Resultatene fra fortynningsrekken ble lagt inn i et punktdiagram, og trendlinjen ble beregnet. Videre ble E, og  $R^2$  ble funnet. E ble regnet ut med  $E = 10^{(-1/Stigningst)} - 1$ , der svingningstallet er hentet fra formelen for trendlinjen.

Det ble også gjennomført en spesifisitetstesting for primere og probe til *P. skyensis* der det ble kjørt qPCR mot et utvalg andre bakterie isolater. Primere og probe ble testet mot totalt 12 andre arter og genotyper, som blant annet inkluderer *P. atlantica* gv. *salmonicida*, *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, og *Yersinia ruckeri*. Fullstendig liste over isolater er oppgitt i Tabell 2.5, og alle isolater ble rensset som beskrevet over.

Tabell 2-5: Alle isolater som er brukt til breddelest av primere og probe til *P. skyensis*, og fryse nummer for isolatene.

Bakterie isolat	Frysenummer
<i>Vibrio anguillarum</i>	50-1161
<i>Yersinia ruckeri</i>	VIB- 5363
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	VIB- 4007
<i>Aliivibrio logei</i>	50- 1575
<i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>	50- 3457
<i>Moritella viscosa</i>	VIB- 5591
<i>Pasteurella skyensis</i> (Skottland)	VIB- 8301
<i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	VIB- 4344
<i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i>	VIB- 5284
<i>Phoecenobacter uteri</i>	VIB- 5283
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	50- 3219
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	VIB- 5182
<i>Tenacibaculum finnmarkense</i> subsp. <i>finnmarkense</i>	50- 756

Det ble kjørt qPCR av prøvene. Først ble mastermiksen laget til på rentrom ved å blande, revers primer, probe, Brilliant III Ultra-Fast Q-PCR Master Mix fra Agilent Technologies (Cedar Creek, Teksas, USA), og nukleasefritt vann, med mengder oppgitt i Tabell 2-6 i et eppendorfrør, og blande den med vortex. Hver enkelt komponent ble ganget opp med antall prøver som skulle kjøres pluss fem ekstra for å sikre at det var nok. Seksten  $\mu\text{L}$  master miks per rør ble fordelt på strips som ble oppbevart på kjøleblokk, og flyttet til pre-PCR rommet hvor 4 $\mu\text{L}$  rensed DNA ble tilsatt. Stripsene ble lukket, sentrifugert, og flyttet videre til PCR-rom. Her ble prøvene plassert i PCR maskinen, og qPCR ble kjørt etter programmet vist i Tabell 2-7, det ble nyttet FAM for å måle mengde arvestoff som ble laget. Det ble nyttet en Agilent Stratagene MX3005P Quantative PCR System model 401513 (Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland) for analysen. Oppsettet for temperatur, tid, og sykluser er vist i Tabell 2-7, og var likt for kjøring for vev, bakterie kolonier, og vann. Oppsettet var likt for begge bakterieisolatene. Threshold ble satt til 100 for alle Real time kjøring etter vurdering av alle amplifikasjonskurver.

Tabell 2-6: Mengder av hver komponent i mastermiks, og hvilken konsentrasjon de hadde i reaksjonsmiksen.

Komponent	Mengde ( $\mu\text{L}$ ) per prøve	Konsentrasjon i reaksjonsmiks (nM)
Nukleasefritt vann	1,2	-
Brilliant III Ultra-Fast Q-PCR Master Mix	10	-
Reverse primer	1,8	900
Forward primer	1,8	900
Probe	1,2	600
Totalt	16	-

Tabell 2-7: Oppsett for real time qPCR.

Stadiet	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tid (mm:ss)	Sykluser
Revers transkripsjon	50	15:00	-
Enzym aktivering	95	02:00	-
Denaturering	95	00:05	40
Primer binding, og polymerisering (Annealing og Extention)	57	00:45	

#### 2.5.4 Histologi

Vevsbiter for histologisk undersøkelse ble oppbevart på 10 % bufret formalin ved romtemperatur frem til videre behandling. Formalinen ble silt av organene, før organene ble skåret til slik at de passet i kassetene. Organene til hvert individ ble så lagt i merkede kassetter der organene fordeles som beskrevet i Tabell 2-8. Kassetene ble lukket, og oppbevart på formalin frem til prøvene ble dehydrert med fremføringsmaskinen Excelsior AS fra Thermo Fisher Scientific Instruments co. Ltd. (Cheshire, UK). Vevsbitene ble så lagt i former hvor de ble støpt til blokker i parafinvoks. Overflødig voks på sidene ble fjernet. Blokkene ble oppbevart på  $-20^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter før snitting. Blokkene ble snittet rundt  $3\mu\text{m}$ , med mikrotom HM355S fra Thermo Fisher Scientific Instruments co. Ltd. (Shanghai, Kina) og snittene ble overført til objektivglass.

Snittene som ble HE-farget, ble farget automatisk i Tissue-Tek® Prisma™ fra Sakura CO. Ltd. (Nagano Japan). Etter farging ble det lagt plastfilm over snittene automatisk av maskinen Tissue-Tek® Film™ fra Sakura CO. Ltd. (Nagano Japan).

Tabell 2-8: Hvert individ sine organ ble fordelt på seks kassetter som vist i tabellen. Kassetten ble merket med saksnummer fra VI, individ nummer, og forkortelsen for kassetten vist i i tabellen.

Kassett nummer:	Organ:	Kassett forkortelse:
1	Hjerte	OR
	Milt	
	Nyre	
2	Muskulatur	MU
3	Midttarm	T
	Baktarm	
4	Øye	OH
	Hjerne	
5	Lever	PL
	Pankreas/Pylorusblindsekker	
6	Gjelle	GP
	Pseudobranch	

## 3 Resultater

### 3.1 Atferd

Vurderingen er kun en generell beskrivelse av observert atferd i karene.

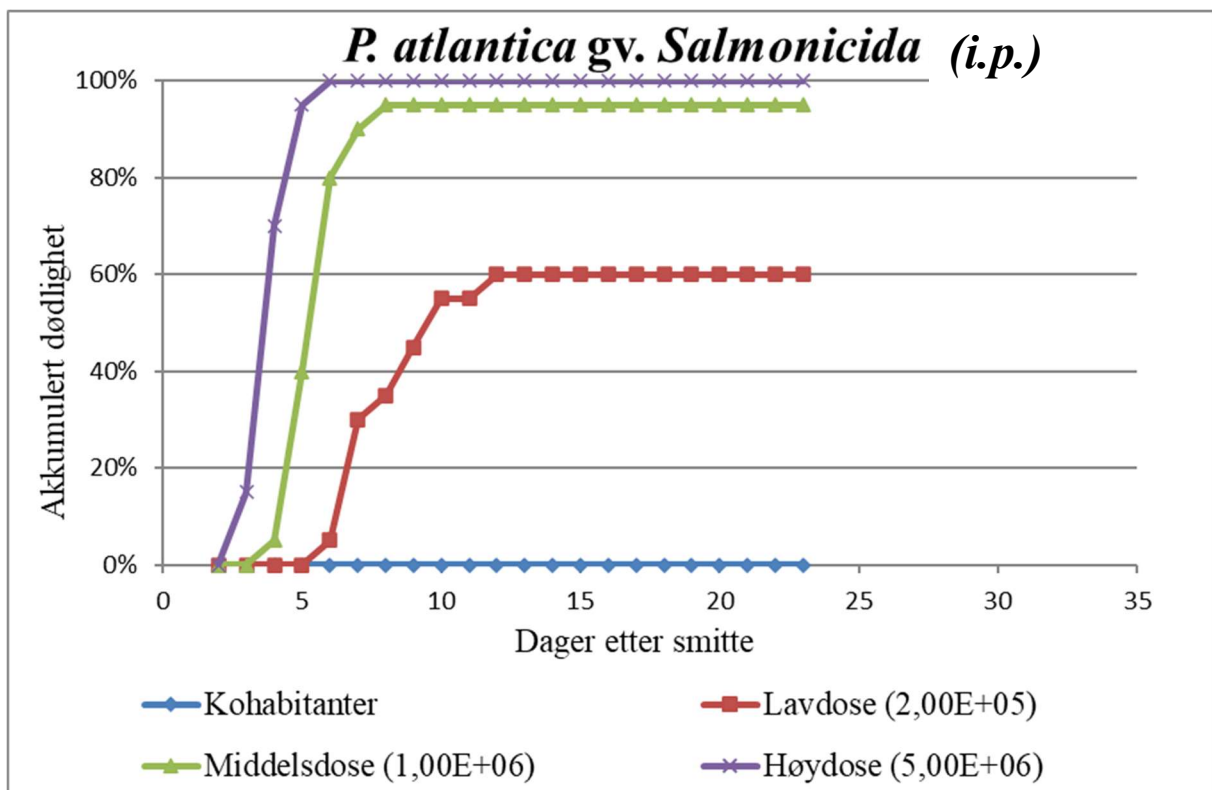
Fisk i alle grupper i alle kar var svært urolige de første dagene etter smitte, og ekstremt skvetne når lokkene over karene ble løftet forsiktig. Fisken svømte da med høy hastighet i tilfeldige retninger, også inn mot sidene av karet. Dette fortsatte til tross for at lokket ble lagt på igjen, og en kunne høre at fisken svømte med stor kraft inn mot sidene på karet. Fisk smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* ble rolig fem dager etter smitte, og fisk smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* ble rolig 6 dager etter smitte. Generelt sett var fisk smittet med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* roligere enn fisk smittet med *P. skyensis*. Fisk smittet *i.p.* med *P. skyensis* ble rolige 9 dager etter smitte, mens fisk smittet *i.m.* med *P. skyensis* ikke ble rolige i løpet av forsøket. Med rolig menes det at fisken svømmer langsomt, og samlet i nedre halvdel av karet uten plutselige bevegelser når lokket på karet ble løftet.

Fisk som nærmet seg HEP begynte generelt å svømme i øvre halvdel av karet i tilfeldig retning til fisken traff sidene av karet, for så å endre retning. Fisken ble også mørkere i fargen sammenlignet med resten av fisken i karet. Dette ble ofte observert ca. 24-48 timer før fisken begynte å svømme oppover, for videre å stivne til og synke loddrett ned med halen først. Etter noen sekunder «våknet» den igjen og svømte rett opp igjen for så å stivne på nytt. Dette fortsatte til fisken ikke lengre klarte å svømme og ble liggende på bunnen, der den etter hvert tippet over på sidene. Fisk som var død lå på siden, eller opp ned på bunnen i karet.

## 3.2 Dødelighet

### 3.2.1 *P. atlantica* gv. *salmonicida*, i.p. smittet

Akkumulert dødelighet for grupper i kar smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er vist i Figur 3-1. I høydosegruppen døde alle individene i gruppen relativt fort, hvor hele gruppen var død 6 dager etter smitte. I middeldosegruppen begynte dødeligheten 4 dager etter smitte, og nådde 95% ved dag 8. I lavdosegruppen døde 60% av gruppen ved dag 12, der dødeligheten begynte dag 6. Det var ingen dødelighet blant kohabitant gruppe.



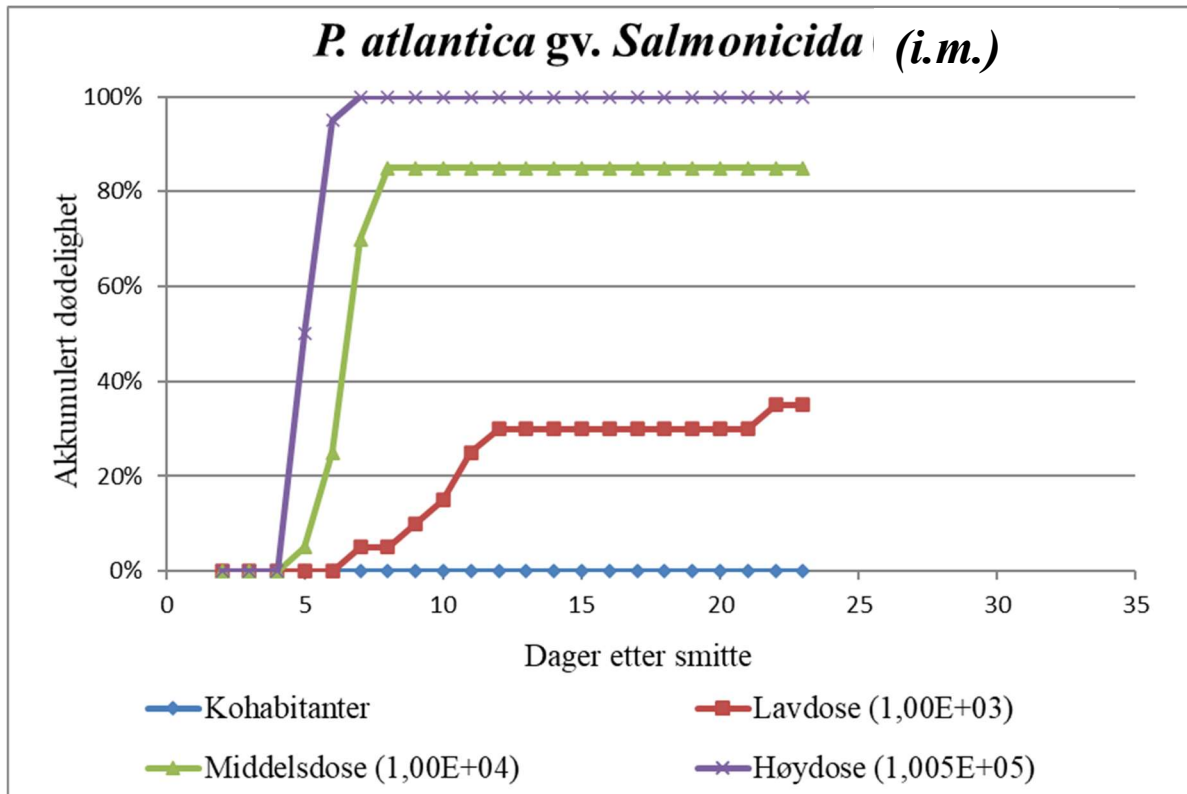
Figur 3-1: Akkumulert dødelighet for grupper i kar der fisken var smittet intraperitonalt (i.p.) med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Karet ble avsluttet 23 dager etter smitte.



### 3.2.2 *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, i.m. smittet

Akkumulert dødelighet for grupper i kar smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er vist i Figur 3-2. Hele høydosegruppen var død 7 dager etter smitte, og dødeligheten startet dag 5. I middeldosegruppen startet dødeligheten ved dag 6, og nådde 85% ved dag 9.

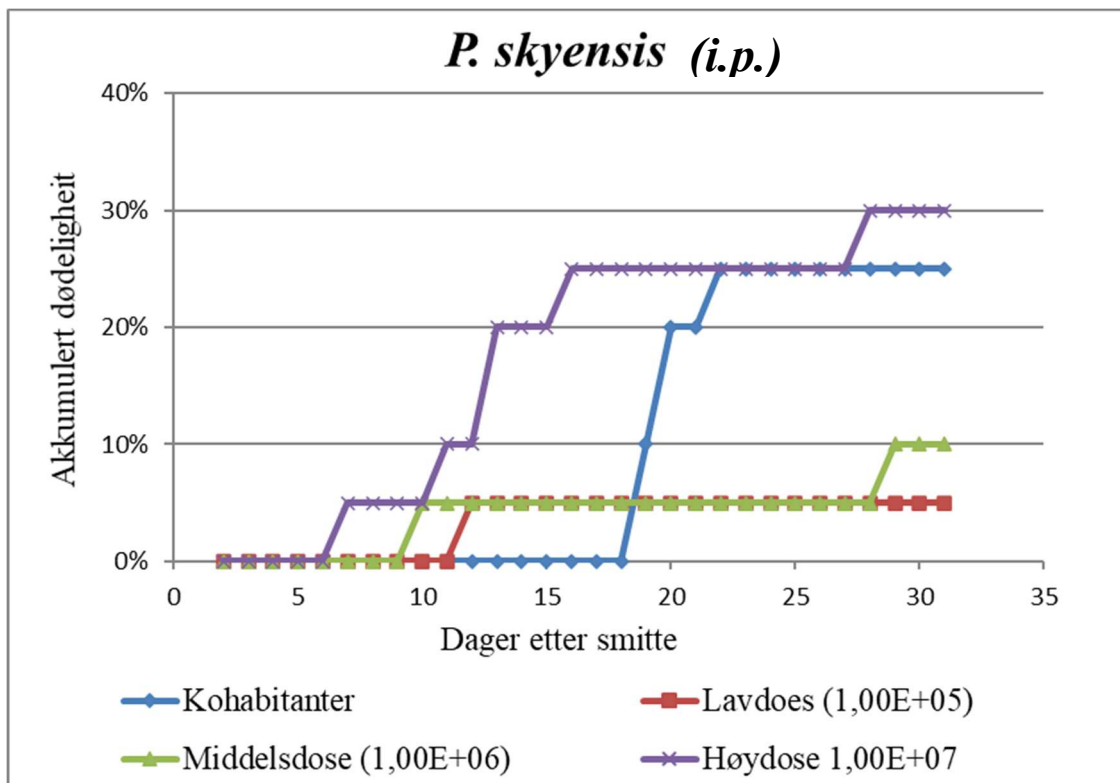
Lavdosegruppen startet å dø på dag 7, og nådde en dødelighet på 35% ved dag 22. Ingen fisk i kohabitant gruppe døde under forsøket.



Figur 3-2: Akkumulert dødelighet for grupper i kar der fisken var smittet intramuskulært (*i.m.*) med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Karet ble avsluttet 23 dager etter smitte.

### 3.2.3 *P. skyensis*, i.p. smittet

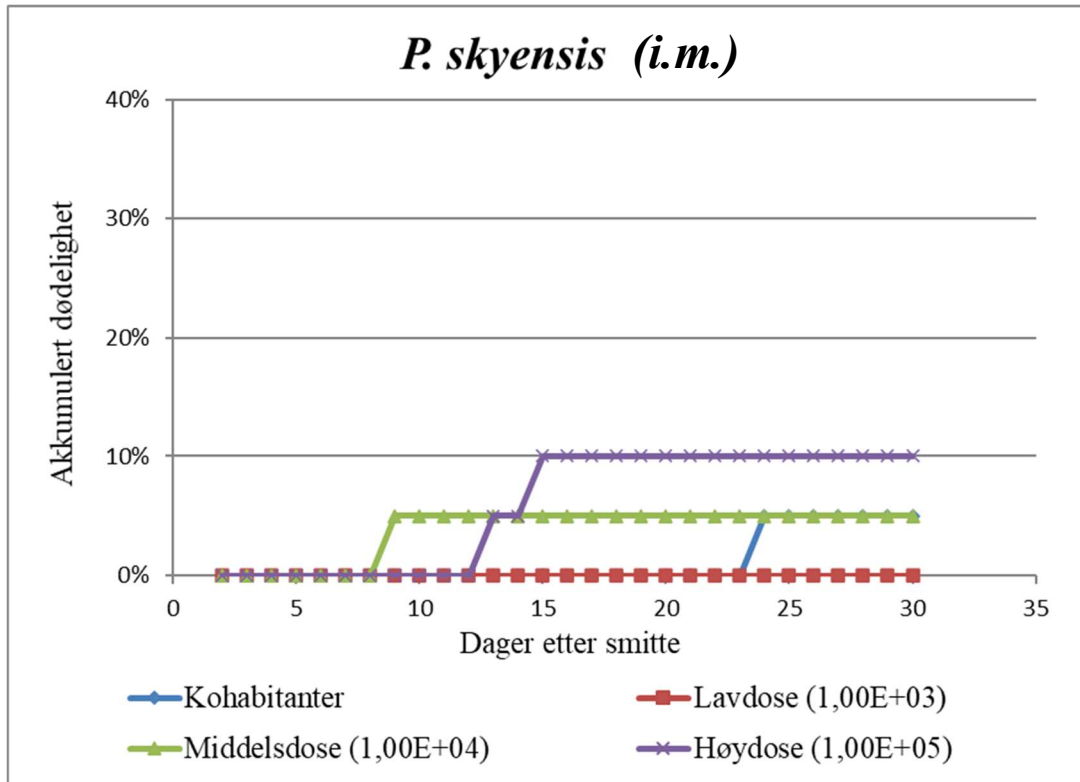
Akkumulert dødelighet for grupper i kar smittet *i.p.* med *P. skyensis* er vist i Figur 3-3. Dødeligheten var generelt svært lav i alle grupper. Høydosegruppen startet dødelighet 7 dager etter smitte, og nådde 30% dødelighet ved dag 28. I middeldosegruppen startet dødeligheten ved dag 10, og nådde 10% ved dag 29. Lavdosegruppen fikk kun 5% dødelighet, som kom dag 12, mens kohabitantene nådde en dødelighet på 25% fra dag 19 til dag 22. På grunn av dødeligheten blant kohabitantgruppe som begynte dag 19, ble forsøket avsluttet 8 dager senere enn opprinnelig planlagt for å se om dødeligheten fortsatt å øke.



Figur 3-3: Akkumulert dødelighet for grupper i kar der fisken ble smittet intraperitonalt (*i.p.*) med *P. skyensis*. Karet ble avsluttet 31 dager etter smitte. Skala for y-akse er justert til 40% som maksimal verdi.

### 3.2.4 *P. skyensis*, *i.m.* smittet

Prosentvis dødelighet for grupper i kar smittet *i.m.* med *P. skyensis* er vist i Figur 3-4. Det var generelt svært lite dødelighet i alle gruppene i karet. Middeldosegruppen fikk 5% dødelighet ved dag 9 etter smitte. I høydosegruppen startet dødeligheten ved dag 13, og nådde 10% ved dag 15. Kohabitantene fikk 5% dødelighet på dag 24. Det var ingen dødelighet i lavdosegruppen. Ettersom det døde en fisk dag 24, som var dagen før planlagt avslutning, ble forsøket utvidet med 6 dager for å se om det døde ytterlige fisk, noe det ikke gjorde.

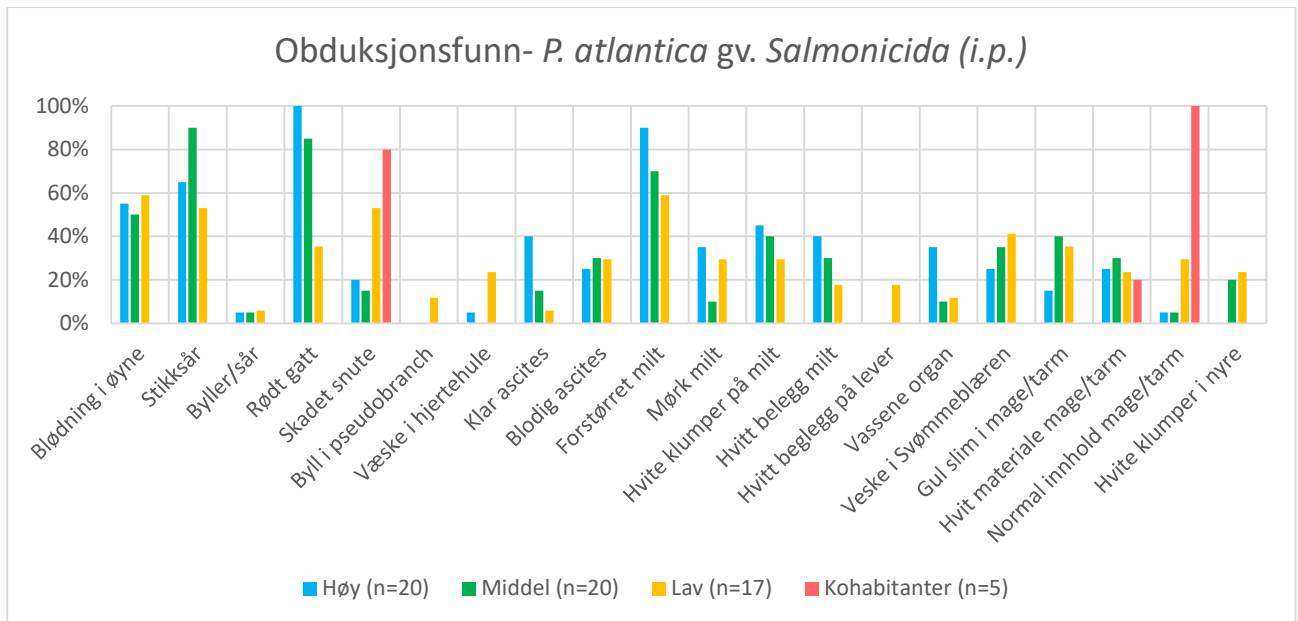


Figur 3-4: Akkumulert dødelighet for grupper i kar der fisken ble smittet intramuskulært (*i.m.*) med *P. skyensis*. Karet ble avsluttet 30 dager etter smitte. Y-akse er justert til 40% som maksimal verdi.

### 3.3 Obduksjonsfunn

Kliniske tegn ble observert under disseksjon, og fullstendig oversikt over funn for hver kar og for hver behandlingsgruppe er oppgitt i vedlegg 7.2. Under er de viktigste funnene for hvert isolat og smittemetode beskrevet.

#### 3.3.1 *P. atlantica* gv. *salmonicida*, i.p. smittet



Figur 3-5: Obduksjonsfunn i fisk smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* oppgitt i prosent, fordelt på smittedosegruppene høydose, middeldose, lavdose, og kohabitanter. Funnene er beskrevet fra fisk som døde, eller nådde humant endepunkt under forsøket, og overlevende fisk.

Det ble funnet flere obduksjonsfunn i alle grupper i kar smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *salmonicida*, der de viktigste er vist i Figur 3-5. Hovedfunnene for alle injiserte grupper var blodige øyne lik de vist i Figur 3-7, stikksår etter injeksjon som vist i Figur 3-8 og Figur 3-9, og røde gatt som vist i Figur 3-9. I tillegg var det ulike funn på milten som hvite prikker, hvitt belegg, mørkere farge, og økt størrelse som vist i Figur 3-13.

#### Høydose

Høydosegruppen hadde høyeste andel med funn i milt for alle kategorier. Det ble også funnet røde gatt hos alle individer, og 55% av individene hadde blødning i øynene. Mage og tarm var for det meste tom, men flere individ hadde gult slim, og/eller hvitt materiale enn det var individer som hadde normalt innhold. Eksempel på gult slim og hvitt materiale er vist i Figur 3-12. 20% av individene hadde også sår på snuten lik vist i Figur 3-10.

### Middelsdose

I middeldose gruppen ble det funnet blødninger i øyne hos 50% av individene lik vist i Figur 3-7. Det ble også funnet sikkisår lik de i Figur 3-8, og Figur 3-9 i 90% av individene som er noe høyere enn for høydosegruppen. Det ble også funnet rødt gatt som vist i Figur 3-9 blant 85%, og skadet snute lik de i Figur 3-10 blant 15% av individene. Det ble gjort ulike funn i milten, men noe svakere enn høydosegruppen. Svært få individer hadde mørk milt sammenlignet med høydosegruppen. Det ble gjort funn av gult slim, og/eller hvitt materiale likt det i Figur 3-12 i mage og tarm i under halvparten av individene. Det ble funnet hvite flekker i nyren som vist i Figur 3-11 hos 20% av individene.

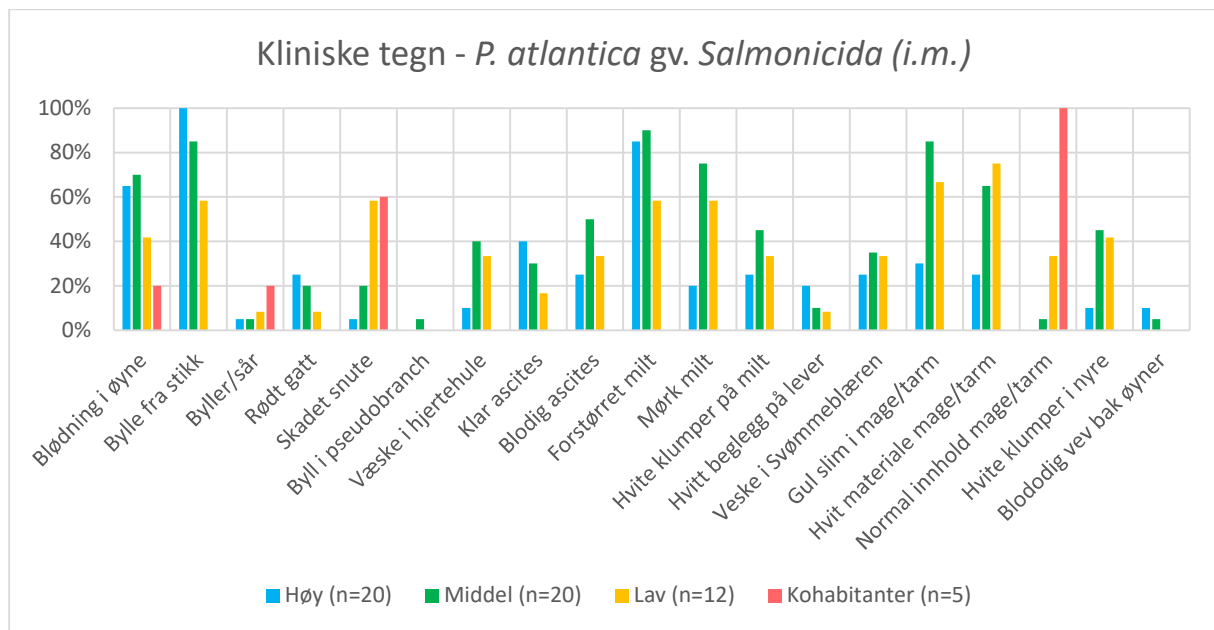
### Lavdose

Det ble generelt funnet færre tilfeller av hvert obduksjonsfunn sammenlignet med høy og middeldose gruppene, men det ble gjort lignende funn av blødning i øynene, stikkisår etter injeksjon, rødt gatt, funn i milt, og funn av gult slim og hvitt materiale i mage og/eller tarm. Det var noe høyere forekomst av skadede snuter der 55% av individene hadde det. I tillegg ble det gjort funn som ikke var gjort i høy- og middeldosegruppen som funn av en byll på rundt 1mm i diameter i pseudobranchen hos et individ. Dataen inkluderer også funn fra overlevende individer, og alle de fem overlevende individene som ble undersøkt hadde normalt innhold i mage og eller tarm.

### Kohabitanter

Det døde ingen kohabitanter under forsøket, så alle observasjoner er fra avlivet fisk på slutten av forsøket. Det ble observert en del skader på snutene lignende de vist i Figur 3-10, og hvitt materiale i mage og tarm til et individ. Det ble funnet normalinnhold i magen og tarmen i alle kohabitanter noe som kun ble funnet i enkelte tilfeller i høy og middeldose gruppen der alle eller tilnærmet alle individene døde under forsøket.

### 3.3.2 *P. atlantica* gv. *salmonicida*, i.m. smittet



Figur 3-6: Obduksjonsfunn i fisk smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* oppgitt i prosent, fordelt på smittedosegruppene høydose, middeldose, lavdose, og kohabitanter. Funnene er beskrevet fra fisk som døde, eller nådde humant endepunkt under forsøket, og overlevende fisk.

De viktigste obduksjonsfunn fra alle grupper i kar smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *salmonicida* er vist i Figur 3-6. Det ble funnet blodige øyne som vist i Figur 3-7 i alle grupper. Det ble også observert at det utviklet seg en byll i muskulaturen rundt injeksjonsstedet for gruppene som fikk injisert smitemateriell, og eksempel på byller er vist i Figur 3-8. Det ble funnet forstørrede, mørke milter med hvite flekker som vist i Figur 3-13 i de fleste individer i høy, middels, og lav gruppe.

#### Høydose

For høydosegruppen ble det funnet byller etter stikk lik den vist i Figur 3-8 i alle individer. Det ble også funnet forstørrede milter i over 80% av individene, men noe mindre tilfeller av mørk milt, hvite flekker, og hvitt belegg på den. Det ble ikke funnet normalinnhold i mage eller tarm, men det ble funnet gult slim, og hvitt innhold i mindre enn 1/3 av individene. Det ble også funnet individer med blodig vev bak øynene i 10% av individene.

#### Middeldose

Middeldose grupper hadde også en høy andel individer med byller lik den i Figur 3-8 fra stikk, samt blødning i øynene lik de vist i Figur 3-7. 90% av individene hadde forstørret milt, og hos 75% hadde den også blitt mørkere. 45% av individene hadde også fått hvite

flekker i milten. Det ble gjort funn av gult slim i mage og eller tarm blant 80% av individene og hvitt innhold i mage og/eller tarm blant 65%.

### Lavdose

I lavdosegruppen var det det færre tilfeller av byller rundt injeksjonspunktet, der under 60% av individene hadde dette. Ingen av de overlevende individene på slutten av forsøket hadde slike byller. Rundt 60% av individene hadde fått skader på snuten lik de vist i Figur 3-10. Det ble funnet gult slim og hvitt innhold i mage og/eller tarm hos rundt 70% av individene, og like under 40% hadde normalinnhold i mage og/eller tarm. Kun overlevende individer hadde normalinnhold i mage og tarm, men noen hadde også litt gult slim og hvitt materiale.

### Kohabitanter

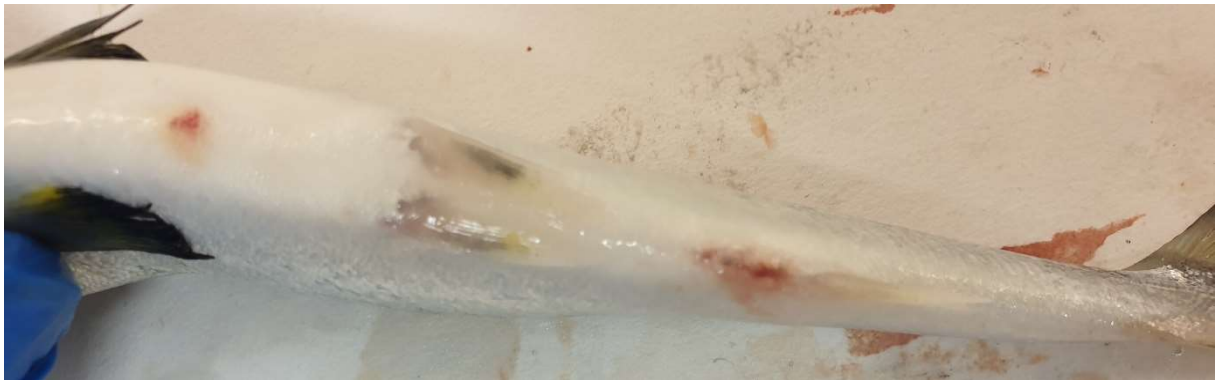
Ingen kohabitanter nådde HEP eller døde under forsøket, så observasjonene bygger kun på individer avlivet ved avslutning av forsøket. Det ble kun observert blodige øyne hos 20%, noe som tilsvarer et individ. Det ble funnet skadede snuter lik de i Figur 3-10 hos 60% av individene som tilsvarer tre fisk. Alle kohabitanter hadde normalinnhold i mage og tarm.



Figur 3-7: Eksempel på blødning i øyet.



Figur 3-8: Til venstre er stikksåret synlig som en tydelig rød prikk. Til høyre ser vi tydelig en byll i området der fisken ble stukket.



Figur 3-9: En ser tydelig stikksår til venstre (anterior), og rødt gatt til høyre (posterior).

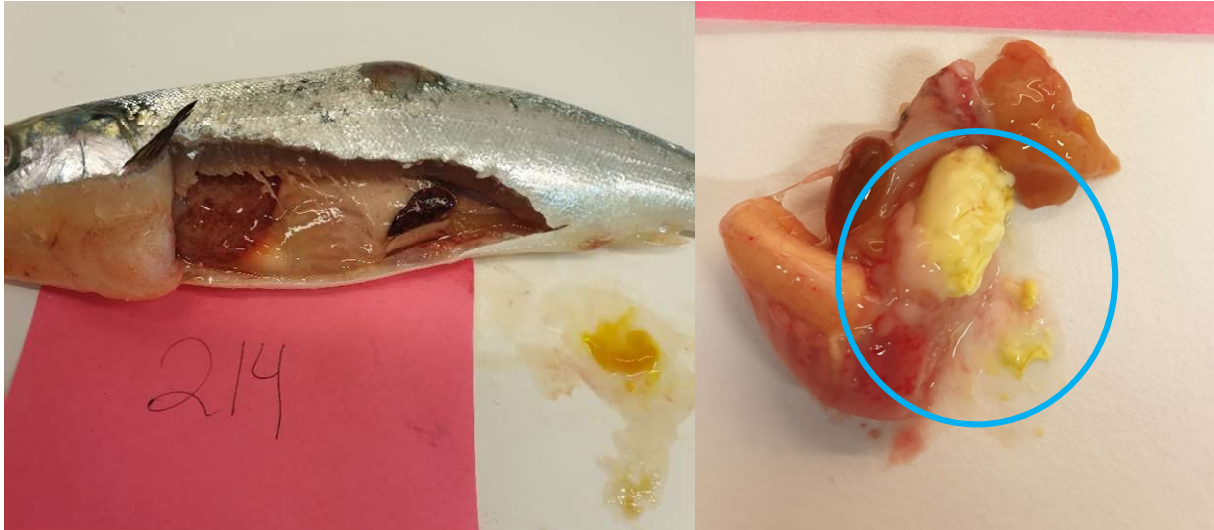


Figur 3-10: Eksempel på sår snute.

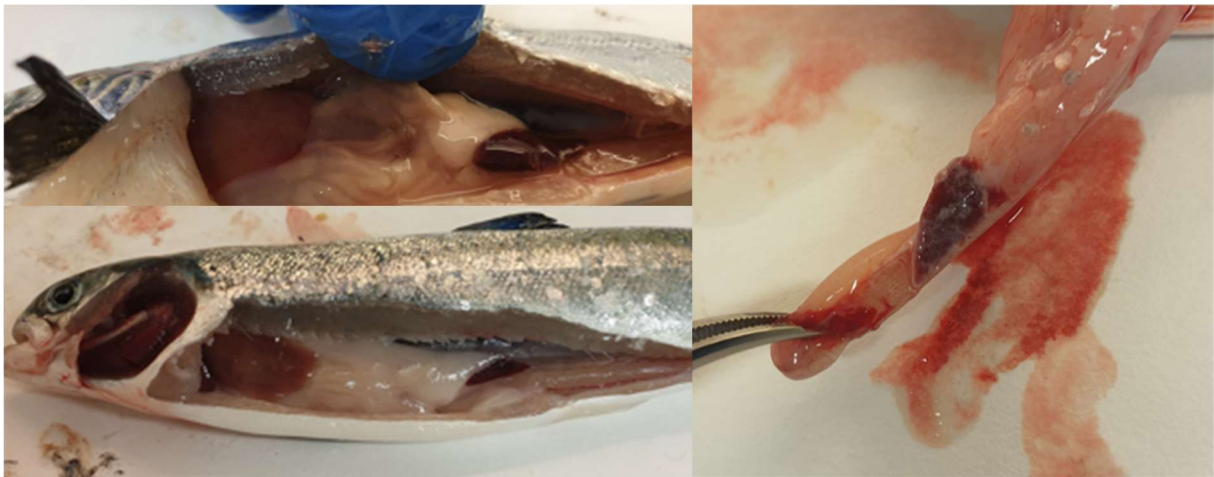


Figur 3-11: Eksempel på hvite prikker i nyre.



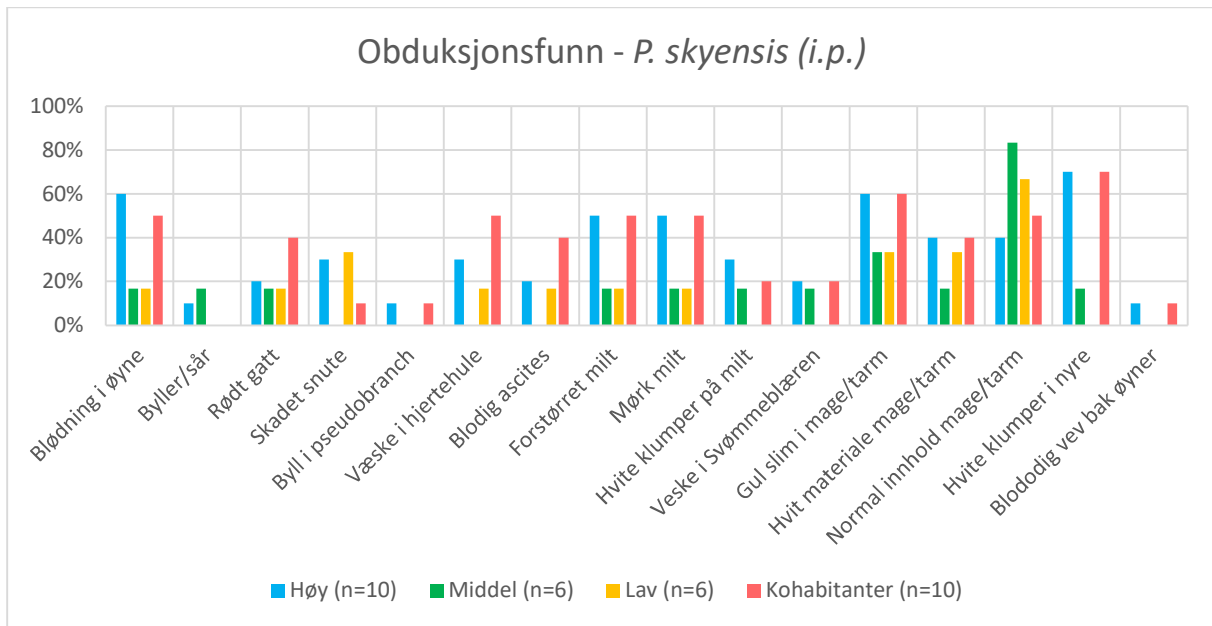


Figur 3-12: Eksempel på gult slim, og hvitt i tarm. Til venstre kan en se gult slim som er kommet ut tarmen etter å ha pressa på buken før den ble åpnet. Til høyre er pylorussekkene snittet, og hvitt materiale kommet ut.



Figur 3-13: Svullen milt liggende i buk vist oppe til venstre, mot milt fra nullprøve nede til venstre. Til høyre er svullen milt med hvite flekker, og hvitt belegg vist.

### 3.3.3 *P. skyensis*, *i.p.* smittet



Figur 3-14: Obduksjonsfunn i fisk smittet *i.p.* med *P. skyensis* oppgitt i prosent, fordelt på smittedosegruppene Høydose, middeldose, lavdose, og kohabitanter.

De viktigste obduksjonsfunnene for fisk i kar smittet *i.p.* med *P. skyensis* er vist i Figur 3-14. I dette karet var det kun fem fisk fra høydosegruppen, fem fra kohabitant gruppe, og en fisk fra middeldosegruppen, og lavdose gruppen som nådde HEP eller døde under forsøket. Det var generelt i disse fiskene det ble gjort obduksjonsfunn.

#### Høydose

I høydosegruppen hadde 60% av individene blødninger øyne lik de i Figur 3-7. Det ble også funnet en byll i muskulaturen hos et individ som ikke var nær stikkpunktet, og det ble funnet rødt gatt hos 20% av individene. Et individ hadde også byll som var rundt 1mm i diameter i pseudobranchen. Det var også funn av forstørret mørk milt hos 50% av individene, og 20% hadde hvite prikker i milten. Funn i milt ble kun gjort på individer som hadde nådd HEP eller døde under forsøket. Individer som nådde HEP og døde under forsøket hadde også gult slim og hvitt innhold i mage og tarm, mens overlevende hadde normalinnhold. To overlevende hadde også litt gult slim i tarm.

### Middelsdose

Kun et individ døde under forsøket, og dette individet hadde blødning i øynene lik de i Figur 3-7, byll som ikke var nær stikkstedet, rødt gatt som vist i Figur 3-9, forstørret mørk milt med hvite flekker lignende det vist i Figur 3-13, rød lever, og veske i svømmeblæren. Det ble funnet gult slim og hvitt innhold som vist i Figur 3-12 i mage og tarm. For overlevende individer ble det kun funnet normalinnhold i mage og tarm med unntak av et individ som hadde litt gult slim i tarm.

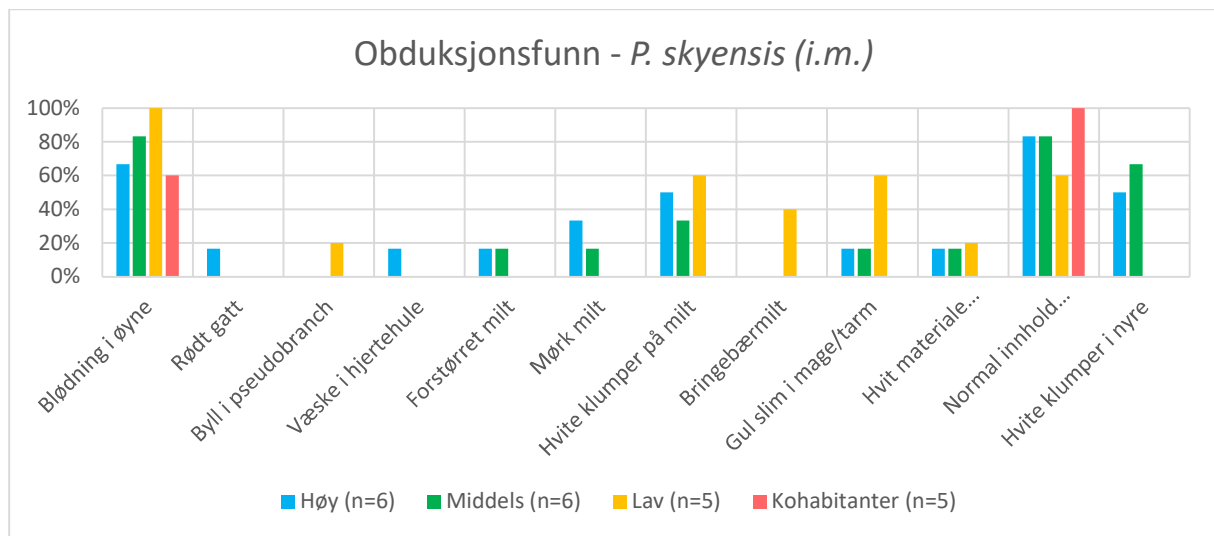
### Lavdose

Kun et individ fra lavdosegruppen døde under forsøket, og dette individet hadde blødning i øynene, rødt gatt, forstørret mørk milt som vist i Figur 3-13, og rød lever. Det ble funnet gult slim og hvitt innhold likt det i Figur 3-12 i mage og tarm. For overlevende individer ble det funnet normalinnhold.

### Kohabitanter

Halvparten av kohabitantene hadde blødning i øyne som vist i Figur 3-7. Det ble også funnet rødt gatt som vist i Figur 3-9 hos 40% av individene, og skadet snute lik de vist i Figur 3-10 hos 30%. Et individ (5%) hadde en byll i pseudobranchen som var tilnærmet 1mm i diameter. For individer som nådde HEP eller døde under forsøket ble det funnet forstørret og mørk milt hos alle individene. Innhold i mage og tarm var ulikt for individene som døde eller nådde HEP, og overlevende. Overlevende hadde normalinnhold mens individer som nådde HEP eller døde hadde gult slim og hvitt innhold. I tillegg ble det funnet litt gult slim i en overlevende.

### 3.3.4 *P. skyensis*, i.m. smittet



Figur 3-15: Obduksjonsfunn i fisk smittet *i.m.* med *P. skyensis* oppgitt i prosent, fordelt på smittedosegruppene Høydose, middeldose, lavdose, og kohabitanter.

De viktigste obduksjonsfunnene funnet i individer fra kar smittet *i.m.* med *P. skyensis* er vist i Figur 3-15. Det var kun fire fisk som døde under forsøket, og kun to av disse ble dissekert. De to fiskene var fra høydosegruppen og middeldosegruppen. De resterende individene som ble obdusert var overlevende fisk. Det ble funnet blødninger i øynene som vist i Figur 3-7, og normalinnhold i mage og tarm i alle grupper.

#### Høydose

For det ene individet som døde under forsøket ble det funnet rødt gatt likt det vist i Figur 3-9, veske i hjertehulen, forstørret mørk milt med hvite flekker likt det vist i Figur 3-13, gult slim og hvitt innhold som vist i Figur 3-12 i mage og tarm. For overlevende individer ble det funnet blødninger i øynene som vist i Figur 3-7, hos fire av fem individer. Det ble funnet forstørret milt med hvite flekker i et individ, og mørk milt i to individer. Det ble funnet normalinnhold i mage og tarm hos alle overlevende individer.

#### Middeldose

I middeldosegruppen døde det også kun en fisk. Den hadde mørk milt med hvite flekker lik det vist i Figur 3-13, og gult slim og hvitt innhold likt det vist i Figur 3-12 i mage og tarm. For overlevende individer ble det funnet blødninger i øynene lik de vist i Figur 3-7 hos fire av fem individer. Det ble funnet to tilfeller av hvite flekker i milten, og fire tilfeller av hvite prikker i nyren likt de vist i Figur 3-11. Alle overlevende individer hadde normalinnhold i mage og tarm.

### Lavdose

Alle individene som ble undersøkt i lavdosegruppen var avlivet på slutten av forsøket. Det ble funnet blødninger i øynene lik de vist i Figur 3-7 i alle individer. Det ble også funnet en byll som var rundt 1mm i diameter i pseudobranchen hos et individ. Det var tre tilfeller av hvite flekker i milten, og to tilfeller med bringebærmilt. Med bringebærmilt menes det at milten var rødlig, klumpete, og da lignet på et bringebær. Det ble funnet normalinnhold i tre av fiskene, og gult slim og hvitt materiale i en. Et individ hadde rester av gult slim i tillegg til normalinnhold.

### Kohabitanter

Alle kohabitanter som er undersøkt, er avlivet ved avslutningen av forsøket. Det ble funnet blødning i øyne lik de vist i Figur 3-7 hos tre av fem individ. Det ble funnet normalinnhold i mage og tarm på alle individene.

### 3.4 Bakteriologi

Alle bakteriologiske prøver som ble tatt ble vurdert og beskrevet. Under fokuseres det på vekst av *pasteurella*-lignende kolonier, men det forekom også vekst av ikke-*pasteurella*-lignende kolonier i enkelte prøver. Et utvalg av både *pasteurella*-lignende, og ikke-*pasteurella*-lignende kolonier ble identifisert ved bruk av MALDI-TOF. Resultat fra dette er under punktet 3.5 MALDI-TOF. Med *Pasteurella*-lignende vekst menes hvite eller grå runde konvekse kolonier med en diameter på rundt 1 mm, og eksempel på skål med slik vekst er vist i Figur 3-16. Prøvetaking av øye og tarm ble bestemt at skulle bli tatt underveis i forsøket, og disse prøvene er derfor ikke tatt av all fisk. Det ble kun tatt prøver fra sår dersom fisken hadde dette.



Figur 3-16: Eksempel på bakteriologisk prøve med *pasteurella*-lignende vekst.

### 3.4.1 *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, i.p. smittet

Resultater for bakteriologiske prøver fra kar der fisk ble smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er vist i Tabell 3-1.

Alle prøver fra fisk smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* som nådde HEP eller døde med unntak av en prøve, viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Prøven som ikke viste vekst, var fra øye, men prøver fra nyre av samme fisk viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Det døde ingen kohabitanter i karet, og det ble derfor ikke tatt noen prøver av disse under forsøket. Ingen av prøvene som ble tatt ved avslutningen av forsøket fra overlevende fisk viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier.

Tabell 3-1: Resultat fra dyrkningsprøver tatt i kar smittet intraperitonalt med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Tabellen viser antall prøver som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier av antall prøver undersøkt. Resultatene er delt mellom prøver tatt under forsøket som viser til fisk som døde eller nådde humant endepunkt under forsøket, og prøver tatt ved avslutning som viser til overlevende fisk som ble prøvetatt ved avslutningen av forsøket. Dersom det ikke ble tatt noen prøver er feltet merket med -. Det var ingen dødelighet blant kohabitanter under forsøket, og alle individer i høydosegruppen døde før forsøket ble avsluttet.

Smittedose	Organ	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt under forsøk/ antall prøver tatt under forsøk	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt ved avslutning/ antall prøver tatt ved avslutning
Høy	Nyre	20/20	-
	Sår	2/2	-
Høy Totalt		22/22	-
Middels	Nyre	19/19	0/1
	Sår	1/1	-
	Tarm	1/1	0/1
	Øye	-	0/1
Middels Totalt		21/21	0/3
Lav	Nyre	12/12	0/5
	Tarm	-	0/5
	Øye	0/1	0/5
Lav Totalt		12/13	0/15
Kohabitant	Nyre	-	0/5
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
Kohabitant Totalt		-	0/15

### 3.4.2 *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, i.m. smittet

Resultater for bakteriologiske prøver fra kar der fisk ble smittet i.m. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er vist i Tabell 3-2.

Alle prøver sådd ut fra fisk smittet i.m. med *Pasteurella atlantica* gv. *Salmonicida* som hadde nådd HEP eller døde under forsøket, viste vekst med *Pasteurella*, med unntak av en prøve fra tarm. Fisken som ikke viste vekst fra tarm, viste vekst av *Pasteurella*-lignende kolonier i prøver fra nyre og sår. For overlevende fisk var det totalt tre prøver med vekst av *Pasteurella*-lignende kolonier. Prøvene stammer fra to ulike fisk, der en var fra middeldosegruppen, og en fra kohabitant gruppe. Kohabitanten viste vekst i prøven fra sår, men ikke fra andre organ. Fisken fra middeldosegruppen hadde vekst i prøven fra nyre og øye, men ikke i prøven fra tarm.

Tabell 3-2: Resultat fra dyrkningsprøver tatt i kar smittet intramuskulært med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Tabellen viser antall prøver som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier av antall prøver undersøkt. Resultatene er delt mellom prøver tatt under forsøket som viser til fisk som døde eller nådde humant endepunkt under forsøket, og prøver tatt ved avslutning som viser til overlevende fisk som ble prøvetatt ved avslutningen av forsøket. Dersom det ikke ble tatt noen prøver er feltet merket med -.

Smittedose	Organ	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt under forsøk/ antall prøver tatt under forsøk	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt ved avslutning/ antall prøver tatt ved avslutning
Høy	Nyre	20/20	-
	Sår	8/8	-
Høy Totalt		28/28	-
Middels	Nyre	17/17	1/3
	Sår	8/8	-
	Tarm	-	0/3
	Øye	-	1/3
Middels Totalt		25/25	2/9
Lav	Nyre	7/7	0/5
	Sår	7/7	-
	Tarm	0/1	0/5
	Øye	-	0/5
Lav Totalt		14/15	0/15
Kohabitant	Nyre	-	0/5
	Sår	-	1/1
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
Kohabitant Totalt		-	1/16



### 3.4.3 *P. skyensis, i.p. smittet*

Resultater for bakteriologiske prøver fra kar der fisk ble smittet *i.p.* med *P. skyensis* er vist i Tabell 3-3.

Det ble tatt tretten prøver av fisk som døde eller nådde HEP under forsøket, og 22 av disse viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. De 8 prøvene som ikke viste vekst, er fra fisk i høydosegruppen. Alle prøvene som ikke viste vekst kommer fra samme fisk, der det ikke var vekst i prøven fra nyre, øye, tarm, eller noen av de fem prøvene fra sår på fisken. Det var ikke vekst i noen av prøvene tatt ved avslutning av forsøket.

Tabell 3-3: Resultat fra dyrkningsprøver tatt i kar smittet intraperitonalt. med *P. skyensis*. Tabellen viser antall prøver som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier av antall prøver undersøkt. Resultatene er delt mellom prøver tatt under forsøket som viser til fisk som døde eller nådde humant endepunkt under forsøket, og prøver tatt ved avslutning som viser til overlevende fisk som ble prøvetatt ved avslutningen av forsøket. Dersom det ikke ble tatt noen prøver er feltet merket med -.

Smittedose	Organ	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt under forsøk/ antall prøver tatt under forsøk	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt ved avslutning/ antall prøver tatt ved avslutning
Høy	Nyre	4/5	0/5
	Sår	0/5	-
	Tarm	0/1	0/5
	Øye	0/1	0/5
Høy Totalt		4/12	0/15
Middels	Nyre	1/1	0/5
	Sår	1/1	-
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
Middels Totalt		2/2	0/15
Lav	Nyre	1/1	0/5
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
Lav Totalt		1/1	0/15
Kohabitant	Nyre	5/5	0/5
	Tarm	5/5	0/5
	Øye	5/5	0/5
Kohabitant Totalt		15/15	0/15

### 3.4.4 *P. skyensis*, i.m. smittet

Resultater for bakteriologiske prøver fra kar der fisk ble smittet i.m. med *P. skyensis* er vist i Tabell 3-4. Svært få prøver ble tatt under dette forsøket da dødeligheten var svært lav, men alle fire prøver tatt under forsøket viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Det var 3 prøver fra overlevende fisk som ble prøvetatt ved avslutningen av forsøket som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Alle de tre prøvene er fra same fisk som tilhørte lavdosegruppen.

Tabell 3-4: Resultat fra dyrkningsprøver tatt i kar smittet intramuskulært med *P. skyensis*. Tabellen viser antall prøver som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier av antall prøver undersøkt. Resultatene er delt mellom prøver tatt under forsøket som viser til fisk som døde eller nådde humant endepunkt under forsøket, og prøver tatt ved avslutning som viser til overlevende fisk som ble prøvetatt ved avslutningen av forsøket. Dersom det ikke ble tatt noen prøver er feltet merket med -. Det var ingen dødelighet blant lavdose gruppen eller kohabitanter under forsøket.

Smittedose	Organ	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt under forsøk/ antall prøver tatt under forsøk	Skåler som viste vekst av <i>pasteurella</i> -lignende kolonier i prøver tatt ved avslutning/ antall prøver tatt ved avslutning
Høy	Nyre	1/1	0/5
	Sår	1/1	-
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
<b>Høy Totalt</b>		<b>2/2</b>	<b>0/15</b>
Middels	Nyre	1/1	0/5
	Sår	1/1	-
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
<b>Middels Totalt</b>		<b>2/2</b>	<b>0/15</b>
Lav	Nyre	-	1/5
	Tarm	-	1/5
	Øye	-	1/5
<b>Lav Totalt</b>		<b>-</b>	<b>3/15</b>
Kohabitant	Nyre	-	0/5
	Tarm	-	0/5
	Øye	-	0/5
<b>Kohabitant Totalt</b>		<b>-</b>	<b>0/15</b>

### 3.5 MALDI-TOF analyser

Et selektivt utvalg av representative isolater av *pasteurella*-lignende kolonier, og ikke-*pasteurella*-lignende kolonier ble sådd om for så å identifiseres med MALDI-TOF. Det ble kjørt to paralleller av alle prøver, samt kontroller. Kontrollisolatene blir identifisert riktig i alle forsøk med høy sikkerhet.

Elleve av tolv isolat fra kar smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *salmonicida* ble identifisert med høysikkerhet som *Pasteurella sp.*. Dette kommer av at *P. atlantica* gv. *Salmonicida* nylig er navngitt, og navnet er ikke lagt inn i databasen til VI, men isolatet som referansnummeret i resultatet viste til ville i dag kalt *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Prøven som ikke ble identifisert, ble kjørt igjen, men ble fortsatt ingen match i VI sin database.

Fem av åtte prøver fra nyre, og åtte av åtte prøver fra sår fra kar smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *salmonicida* ble identifisert med høy sikkerhet til *Pasteurella sp.*. Også her viste referansenummeret i resultatet til isolater som i dag ville karakteriseres som *P. atlantica* gv. *salmonicida*. De tre andre prøvene ble også identifiser som *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men med middels sikkerhet.

For fisk smittet *i.p.* med *P. skyensis* ble det testet åtte kolonier dyrket fra nyre, og en fra tarm. Alle ble identifisert som *P. skyensis* med høy sikkerhet med unntak av en prøve fra nyre som kun ble identifisert med middels sikkerhet. For fisk smittet *i.m.* med *P. skyensis* ble det testet to prøver fra sår, og en prøve fra nyre. Sårene ble identifisert med høy sikkerhet til *P. skyensis*, men isolatet fra nyre ble ikke identifisert.

Det ble også testet en tilfeldig koloni av ikke-*pasteurella*-lignende koloni fra hvert kar der alle fire prøver ble identifisert med høy sikkerhet til *Vibrio splendidus*.

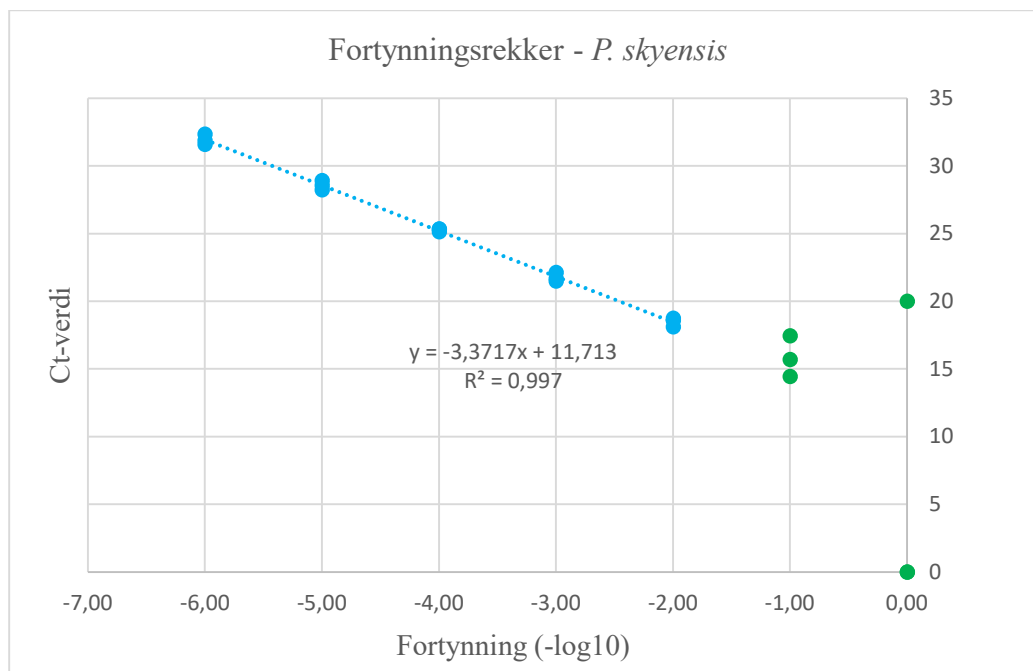
### 3.6 qPCR

Etter vurdering av amplifikasjonskurver fra alle kjøringene av qPCR ble threshold satt til 100 på alle kjøringene.

#### 3.6.1 PCR effektivitet

### 3.7 Ct-verdier fra fortynningsrekkene som ble kjørt med primere og probe spesifikk for *P. skyensis*, er oppgitt som vedlegg i Ct-verdier for fortynningsrekker

Tabell 7-3. Negativ kontroll var negativ, og siden prøvematerialet var kjent ble det ikke kjørt positivkontroll. Ct-verdier ble plottet som punkt mot fortynning i  $-\log_{10}$ , og det ble lagt til trendlinje. Plottet er vist i Figur 3-17, der E er regnet ut til å være 0,9796 altså 97,96%, og  $R^2$  er funnet til å være 0,9970. På grunn av stort avvik mellom Ct-verdier ble 10x-fortynning ekskludert, og 1x-fortynning ekskluderes siden to av tre paralleller ikke fikk Ct-verdi.



Figur 3-17: Plot av Ct-verdi mot fortynning -2 til -6 ( $-\log_{10}$ ) fra qPCR av *P. skyensis*. Det ble lagt til trendlinje for målinger fra -2 til -6 fortynning med formel, og determinantkoeffisienten ( $R^2$ ). Ufortynnede og -1 fortynnede prøver er merket i grønn, og utelatt fra trendlinjen på grunn av stor variasjon i resultat. Thresholdet for kjøringen ble satt til 100.

### 3.7.1 Spesifisitetstesting

Det ble kjørt spesifisitetstest mot et utvalg av bakterier for å teste spesifiteten til primere og probe for *P. skyensis*. Kun tre av de tretten isolatene fikk negativt resultat som vist i Tabell 3-5. Dette var *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas anguilliseptica*, og *Tenacibaculum finnmarkense* subsp. *Finnmarkense*. De resterende isolatene gav positivt resultat, der *Pasteurella skyensis* isolert i laks fra Skottland som fikk Ct verdi på 13,06, men de resterende prøvene med positivt resultat fikk Ct verdier over 31. EBK-er fra rensing ble ikke kjørt.

Tabell 3-5: Ct verdier for alle isolat benyttet i breddelest av primere og probe til *Pasteurella skyensis*, og konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl) målt av hvert isolat. Positiv kontroll var 1/1000 fortykning av *P. skyensis* isolert i Norge.

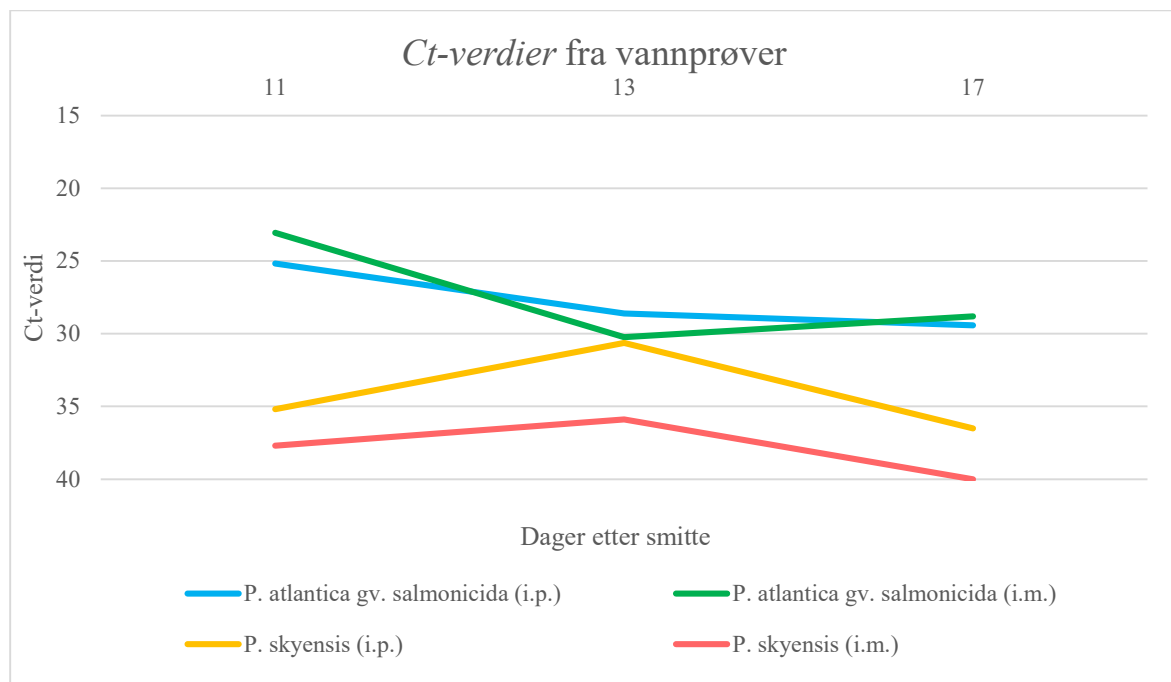
Bakterie isolat	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl)	Ct-verdi
<i>Vibrio anguillarum</i>	281,1	33,93
<i>Yersinia ruckeri</i>	47,2	No Ct
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	144,9	35,58
<i>Aliivibrio logei</i>	202,9	32,34
<i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>	190,0	32,74
<i>Moritella viscosa</i>	500,5	37,89
<i>Pasteurella skyensis</i> (Skottland)	120,9	13,06
<i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	72,0	37,60
<i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i>	173,6	31,81
<i>Phoecenobacter uteri</i>	132,4	35,74
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	685,5	35,74
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	105,4	No Ct
<i>Tenacibaculum finnmarkense</i> subsp. <i>finnmarkense</i>	158,8	No Ct
Positiv kontroll	-	24,42
Negativ kontroll	-	No Ct

### 3.7.2 Vannprøver

Ct-verdier for vannprøvene som ble tatt 11, 13, og 17 dager etter smitte er vist i Figur 3-18. For kar smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* ble Ct-verdiene målt til 25,17, 28,61 og 29,41 der laveste verdi ble målt dag 11, og høyeste verdi målt dag 17. For fisk smittet *i.m.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* ble Ct-verdiene målt til 23,06, 30,24, og 28,82 der laveste C-verdi ble funnet dag 11, og høyeste dag 13. I karet med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* smittet *i.m.* var Ct-verdien lavere dag 11 og 17 sammenlignet med karet smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, men dag 15 var det motsatt.

I kar smittet *i.p.* med *P. skyensis* ble Ct-verdiene målt til 35,20, 30,62 og 36,51 der laveste verdi ble målt 13 dager etter smitte, og høyeste dag 17. For kar smittet *i.m.* med *P. skyensis* ble Ct-verdiene målt til 37,70 for dag 11, og 35,88 for dag 15. For dag 17 ble prøven negativ, altså ingen Ct-verdi.

Positive kontroller fikk positivt resultat. EBK-er, og negative kontroller fikk negativt resultat fra kjøringene.



Figur 3-18: Ct-verdier fra vannprøver tatt 11, 13, og 17 dager etter smitte i de fire karene fra forsøket. Resultatet for *P. skyensis* (*i.m.*) for dag 17 ble ingen Ct, men er oppgitt som 40 i grafen, da verdier over 40 er regnet som ingen Ct. Thresholdet for qPCR av prøvene var satt til 100. EBK, og negativ kontroll var negativ, og positivkontroll var positiv.

### 3.7.3 Vevsprøver

Alle forsøk med qPCR fikk positivt resultat for positivkontroll, og negativt resultat for negativ kontroll. Det er kun ekstrahert DNA fra nyre vev, og ratio for  $A_{260}/A_{280}$  ble målt mellom 1,8 og 2,1, og  $A_{260}/A_{230}$  ble målt mellom 1,9 og 2,3.

Det ble ekstrahert DNA fra vev i ti omganger, og for hver omgang ble det også tatt med en EBK. EBK-ene ble kjørt for både *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, og *P. skyensis* med qPCR, og noen fikk positivt resultat for isolatene med Ct-verdier fra 31,79 og høyere. Runde A, B, C, og D fikk positivt resultat for *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, og Runde C, og E fikk positivt utslag for *P. skyensis*. Amplifiseringskurvene ble vurdert, og de tyder på at resultatene er positive. I Tabell 3-6 er det oversikt over hvilke rensinger som har fått positivt resultat.

Tabell 3-6: Hver runde DNA-ekstrahering av vev er gitt en bokstavkode og EBK-en ble kjørt qPCR av for *P. atlantica* gv. *Salmonicida* og *P. skyensis*. Tabellen viser resultat fra qPCR av EBK-er. Dersom det kun ble ekstrahert DNA fra fisk smittet med et av isolatene ble EBK-en kun testet mot dette isolatet.

DNA ekstrahering	Ct - verdi <i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	Ct - verdi <i>P. skyensis</i>
A	35,34	Ikke testet
B	33,16	No Ct
C	31,79	34,44
D	38,23	No Ct
E	No Ct	35,75
F	No Ct	Ikke testet
G	No Ct	No Ct
H	Ikke testet	No Ct
I	Ikke testet	No Ct
J	No Ct	No Ct

## Nullprøver

Ct-verdier fra nullprøver for *P. atlantica* gv. *Salmonicida* og *P. skyensis* er oppgitt i Tabell 3-7. Tre av de fem nullprøvene som ble tatt før forsøkstart fikk positivt utslag for *P. atlantica* gv. *Salmonicida* med Ct-verdier på 37,35 til 37,62. Vurdering av amplifiseringskurver kan tyde på at prøvene er positive. De seks nullprøvene tatt etter forsøket fikk negativt resultat for *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Ingen av de elleve nullprøvene fikk positivt resultat for *P. skyensis*.

Tabell 3-7: Ct-verdier og konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl) for nullprøver testet for *P. atlantica* gv. *Salmonicida* og *P. skyensis* med qPCR.

Individ nr	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl)	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i>	<i>P. skyensis</i>	Runde DNA ekstrahering
001	71.3	37,58	No Ct	B
002	129.0	No Ct	No Ct	B
003	88.4	37,35	No Ct	B
004	39.1	37,62	No Ct	B
005	73.2	No Ct	No Ct	B
006	123.8	No Ct	No Ct	J
007	98.5	No Ct	No Ct	J
008	101.9	No Ct	No Ct	J
009	195.7	No Ct	No Ct	J
010	101.9	No Ct	No Ct	J
011	110.9	No Ct	No Ct	J



*P. atlantica* gv. *Salmonicida* (i.p.)

Ct-verdier for qPCR av fisk smittet i.p. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er oppgitt i

Tabell 3-8. Alle prøver fra fisk som døde eller nådde HEP under forsøket fikk positivt resultat med Ct-verdier mellom 17,97 og 34,70. Det var et unntak fra en fisk i middeldosegruppen som fikk negativt resultat. For fisk som ble avlivet på slutten av forsøket, var det kun fire fisk som fikk positivt resultat med Ct-verdier mellom 36,68 og 39,69. De fire fiskene kom fra både middeldosegruppen, lavdosegruppen, og kohabitant gruppe.

*P. atlantica* gv. *Salmonicida* (i.m.)

Ct-verdier fra fisk smittet i.m. med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* er vist i Tabell 3-9. Alle fisk som nådde HEP eller døde fikk positivt resultat med Ct-verdier mellom 17,46 og 27,13. For overlevende fisk som ble avlivet var fem av tretten prøver positive med Ct-verdier mellom 36,21 og 39,93. Det var positive prøver fra overlevende fisk i både middeldosegruppen, lavdosegruppen, og kohabitantgruppe.

*P. skyensis* (i.p.)

Alle prøver fra fisk som nådde HEP, eller døde under forsøket fikk positivt resultat med Ct-verdier mellom 19,98 og 37,70. Ingen av de overlevende fiskene i noen av gruppene fikk positivt resultat. Oversikt over Ct-verdier for fisk smittet i.p. med *Pasteurella sp.* er oppgitt i Tabell 3-10

*P. skyensis* (i.m.)

Resultat fra qPCR av fisk smittet i.m. med *P. skyensis* er oppgitt i

Tabell 3-11. Det var kun fire fisk som døde under forsøket i karet der fisk ble smittet i.m. med *P. skyensis*, og kun to ble tatt prøver av. Begge de to prøvene fikk positivt resultat med Ct-verdier på 18,81 og 24,08. Kun en av de overlevende fiskene fikk positivt resultat fra qPCR med en Ct-verdi på 29,53 og fisken hørte til lavdosegruppen.

Tabell 3-8: Ct-verdier og konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl) for prøver av fisk smittet intraperitonalt med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Individnummer til fisken, hvilken smitte gruppe fisken hørte til, hvordan fisken døde, og hvilken runder DNAet ble ekstrahert er oppgitt. DNA ekstrahering oppgitt i rødt viser at ekstraksjonsbuffer kontrollen til den DNA ekstraheringsrunden fikk positivt utslag mot *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. HEP står for humant endepunkt.

Individ nr	Gruppe	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl)	HEP/død/avlivet	Ct-verdi	DNA ekstrahering
101	Høy	56.7	HEP	21,43	A
102	Høy	71.9	HEP	20,68	A
104	Høy	20.3	HEP	22,94	A
112	Høy	16.8	HEP	27,25	A
123	Høy	72.8	HEP	25,83	A
113	Middels	24.3	HEP	No Ct	A
116	Middels	31.4	HEP	20,91	A
124	Middels	79.1	HEP	25,45	A
129	Middels	148.8	Død	17,97	A
137	Middels	88.7	HEP	23,61	A
146	Middels	98.7	HEP	34,7	D
162	Middels	112.3	Avlivet	37,55	F
128	Lav	48.1	Død	26,09	A
138	Lav	84.5	Død	25,97	D
143	Lav	86.4	HEP	21,06	D
149	Lav	139.7	HEP	21,94	C
150	Lav	101.7	HEP	26,21	C
151	Lav	69.8	HEP	25,18	C
152	Lav	115.2	Avlivet	39,69	F
154	Lav	114.9	Avlivet	No Ct	F
158	Lav	97.9	Avlivet	No Ct	F
153	Kohabitant	85.5	Avlivet	36,68	F
155	Kohabitant	261.0	Avlivet	No Ct	F
156	Kohabitant	80.1	Avlivet	No Ct	F
157	Kohabitant	95.1	Avlivet	No Ct	F
159	Kohabitant	56.5	Avlivet	36,57	F
160	Kohabitant	98.5	Avlivet	No Ct	F
161	Kohabitant	66.4	Avlivet	No Ct	F

Tabell 3-9: Ct-verdier konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl) for prøver av fisk smittet intramuskulært med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. Individnummer til fisken, hvilken smitte gruppe fisken hørte til, hvordan fisken døde, og hvilken runder DNAet ble ekstrahert er oppgitt. DNA ekstrahering oppgitt i rødt viser at ekstraksjonsbuffer kontrollen til den DNA ekstraheringsrunden fikk positivt utslag mot *P. atlantica* gv. *Salmonicida*. HEP står for humant endepunkt.

Individ nr	Gruppe	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl)	HEP/død/avlivet	Ct-verdi	DNA ekstrahering
201	Høy	74.3	HEP	19,96	B
205	Høy	33.7	HEP	20,28	B
213	Høy	77.3	Død	19,40	B
223	Høy	80.6	HEP	18,62	D
226	Høy	137.5	Død	19,65	D
202	Middels	37.0	HEP	21,50	B
212	Middels	102.0	HEP	19,84	B
225	Middels	88.7	HEP	21,41	D
235	Middels	70.1	HEP	24,66	D
236	Middels	74.3	HEP	19,85	D
245	Middels	121.2	Avlivet	No Ct	G
254	Middels	102.0	Avlivet	36,21	G
257	Middels	98.8	Avlivet	No Ct	G
234	Lav	60.2	Død	19,89	B
239	Lav	70.5	Død	17,46	D
240	Lav	67.6	Død	19,13	C
241	Lav	77.1	HEP	22,57	C
242	Lav	76.0	HEP	19,20	C
243	Lav	98.1	HEP	21,40	C
244	Lav	84.8	HEP	27,13	C
246	Lav	49.3	Avlivet	39,75	G
248	Lav	100.3	Avlivet	No Ct	G
250	Lav	124.0	Avlivet	No Ct	G
253	Lav	122.4	Avlivet	No Ct	G
256	Lav	91.3	Avlivet	No Ct	G
247	Kohabitant	109.7	Avlivet	No Ct	G
249	Kohabitant	118.8	Avlivet	39,93	G
251	Kohabitant	62.1	Avlivet	No Ct	G
252	Kohabitant	171.5	Avlivet	39,00	G
255	Kohabitant	115.7	Avlivet	36,23	G

Tabell 3-10: Ct-verdier og konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/ $\mu$ l) for prøver av fisk smittet intraperitonalt med *P. skyensis*. Individnummer til fisken, hvilken smitte gruppe fisken hørte til, hvordan fisken døde, og hvilken runder DNAet ble ekstrahert er oppgitt. DNA ekstrahering oppgitt i rødt viser at ekstraksjonsbuffer kontrollen til den DNA ekstraheringsrunden fikk positivt utslag mot *P. skyensis*. HEP står for humant endepunkt.

Individ nr	Gruppe	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/ $\mu$ l)	HEP/død/avlivet	Ct-verdi	DNA ekstrahering
301	Høy	102.0	Død	20,21	D
303	Høy	50.6	Død	20,14	E
305	Høy	97.2	Død	20,13	E
306	Høy	162.6	HEP	37,26	E
312	Høy	44.5	Død	36,67	E
314	Høy	225.5	Avlivet	No Ct	G
327	Høy	201.1	Avlivet	No Ct	H
328	Høy	114.2	Avlivet	No Ct	H
330	Høy	75.0	Avlivet	No Ct	H
331	Høy	90.2	Avlivet	No Ct	H
302	Middels	74.8	Død	20,52	C
315	Middels	98.0	Avlivet	No Ct	G
318	Middels	138.2	Avlivet	No Ct	G
319	Middels	114.6	Avlivet	No Ct	G
320	Middels	176.4	Avlivet	No Ct	G
321	Middels	156.0	Avlivet	No Ct	G
304	Lav	73.6	Død	20,28	E
313	Lav	98.5	Avlivet	No Ct	G
316	Lav	105.0	Avlivet	No Ct	G
317	Lav	122.2	Avlivet	No Ct	G
323	Lav	126.7	Avlivet	No Ct	G
324	Lav	133.2	Avlivet	No Ct	H
307	Kohabitant	87.6	Død	37,70	E
308	Kohabitant	75.9	HEP	22,03	E
309	Kohabitant	53.1	HEP	19,98	E
310	Kohabitant	94.4	HEP	25,36	E
311	Kohabitant	89.4	Død	20,34	E
322	Kohabitant	85.6	Avlivet	No Ct	G
325	Kohabitant	119.9	Avlivet	No Ct	H
326	Kohabitant	103.0	Avlivet	No Ct	H
329	Kohabitant	98.5	Avlivet	No Ct	H
332	Kohabitant	123.4	Avlivet	No Ct	H

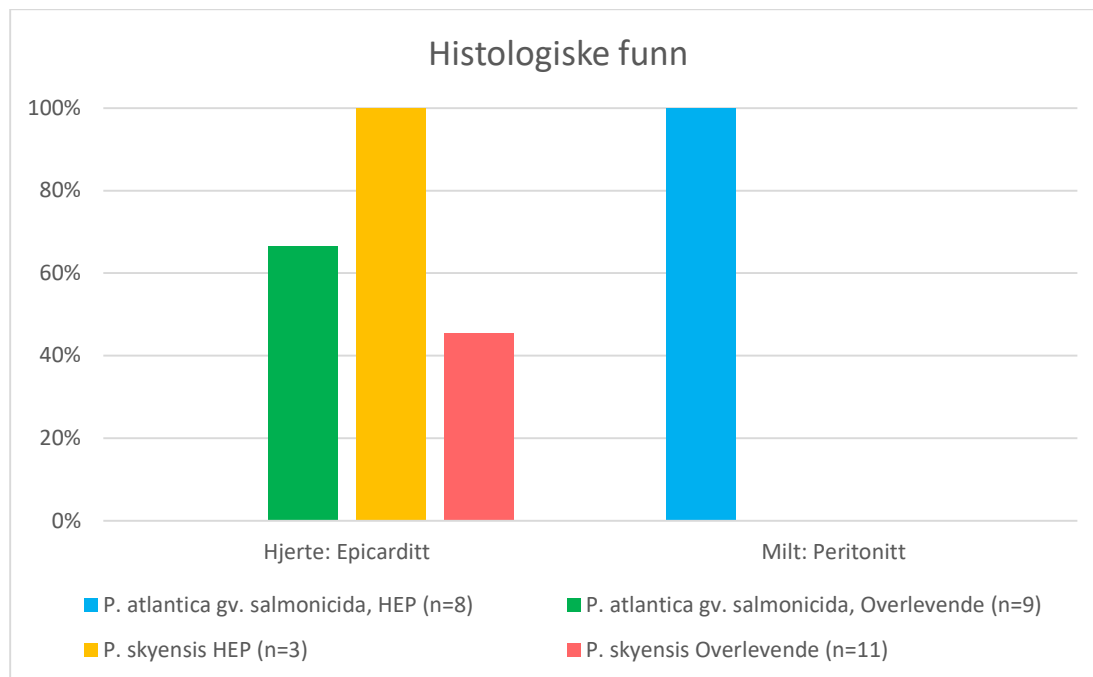
Tabell 3-11: Ct-verdier og konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl) for prøver av fisk smittet intramuskulært med *P. skyensis*. Individnummer til fisken, hvilken smitte gruppe fisken hørte til, hvordan fisken døde, og hvilken runder DNAet ble ekstrahert er oppgitt. DNA ekstrahering oppgitt i rødt viser at ekstraksjonsbuffer kontrollen til den DNA ekstraheringsrunden fikk positivt utslag mot *P. skyensis*. HEP står for humant endepunkt.

Individ nr	Gruppe	Konsentrasjon av nukleinsyrer (ng/μl)	HEP/død/avlivet	Ct-verdi	DNA ekstrahering
402	Høy	57.1	Død	18,81	C
409	Høy	75.8	Avlivet	No Ct	H
412	Høy	178.0	Avlivet	No Ct	I
415	Høy	114.5	Avlivet	No Ct	I
419	Høy	128.3	Avlivet	No Ct	I
420	Høy	92.3	Avlivet	No Ct	I
401	Middels	73.6	Død	24,08	C
407	Middels	102.9	Avlivet	No Ct	H
411	Middels	169.1	Avlivet	No Ct	H
417	Middels	94.1	Avlivet	No Ct	I
421	Middels	141.5	Avlivet	No Ct	I
422	Middels	93.4	Avlivet	No Ct	I
404	Lav	83.4	Avlivet	No Ct	H
405	Lav	92.9	Avlivet	No Ct	H
410	Lav	98.7	Avlivet	No Ct	H
413	Lav	139.1	Avlivet	No Ct	I
416	Lav	92.6	Avlivet	29,53	I
403	Kohabitant	94.7	Avlivet	No Ct	H
406	Kohabitant	96.1	Avlivet	No Ct	H
408	Kohabitant	103.7	Avlivet	No Ct	H
414	Kohabitant	150.5	Avlivet	No Ct	I
418	Kohabitant	92.7	Avlivet	No Ct	I

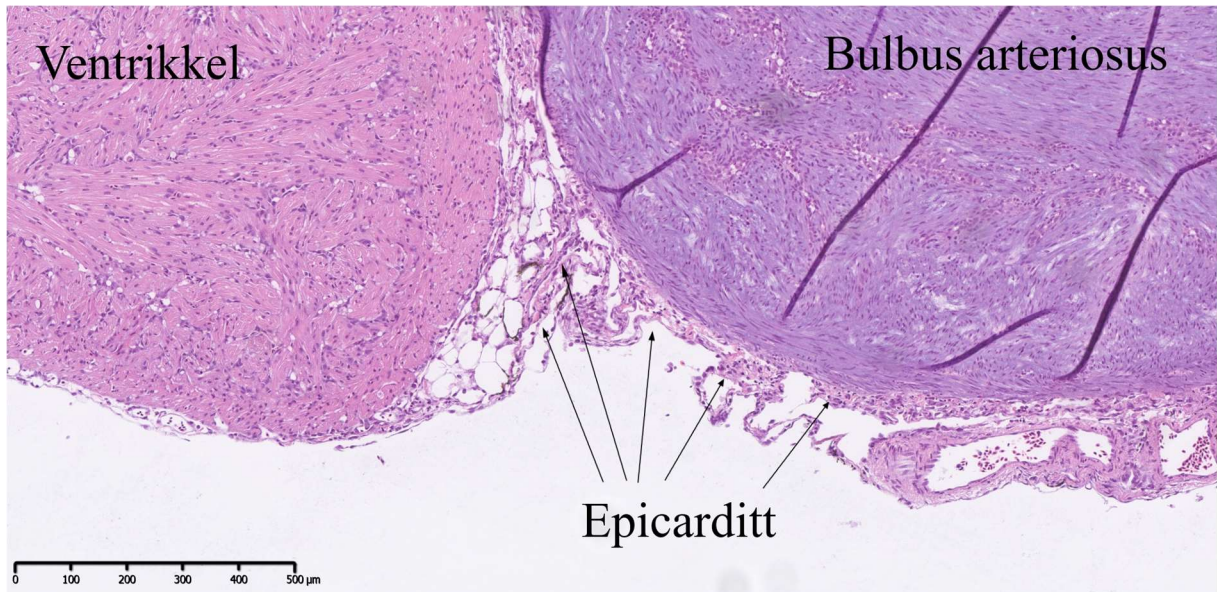
### 3.8 Histologi

Histologiske snitt ble vurdert hos et utvalg av individer som nådde HEP under forsøket, og overlevende individer fra avslutning av forsøket. Utvalget bestod av 17 fisk smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *salmonicida* og 14 fisk smittet *i.p.* med *P. skyensis*. Av de 17 fisk fra karet smittet *i.p.* med *P. atlantica* gv. *salmonicida* var det fire prøver fra middeldosegruppen som hadde nådd HEP og fire fra lavdosegruppen som hadde nådd HEP, en overlevende fra middeldosegruppen, tre overlevende fra lavdosegruppen, og fem overlevende kohabitanter som ble vurdert. Av de 14 fisk fra karet smittet *i.p.* med *P. skyensis* var det tre kohabitanter som nådde HEP, tre overlevende fra høydosegruppen, tre overlevende fra middeldosegruppen, og fem overlevende kohabitanter som ble vurdert. Nullprøver ble også vurdert. Organene som ble vurdert var hjerte, milt, nyre, lever, pylorusblindsekker/pankreas, øye, hjerne, tarm, gjeller og pseudobranch.

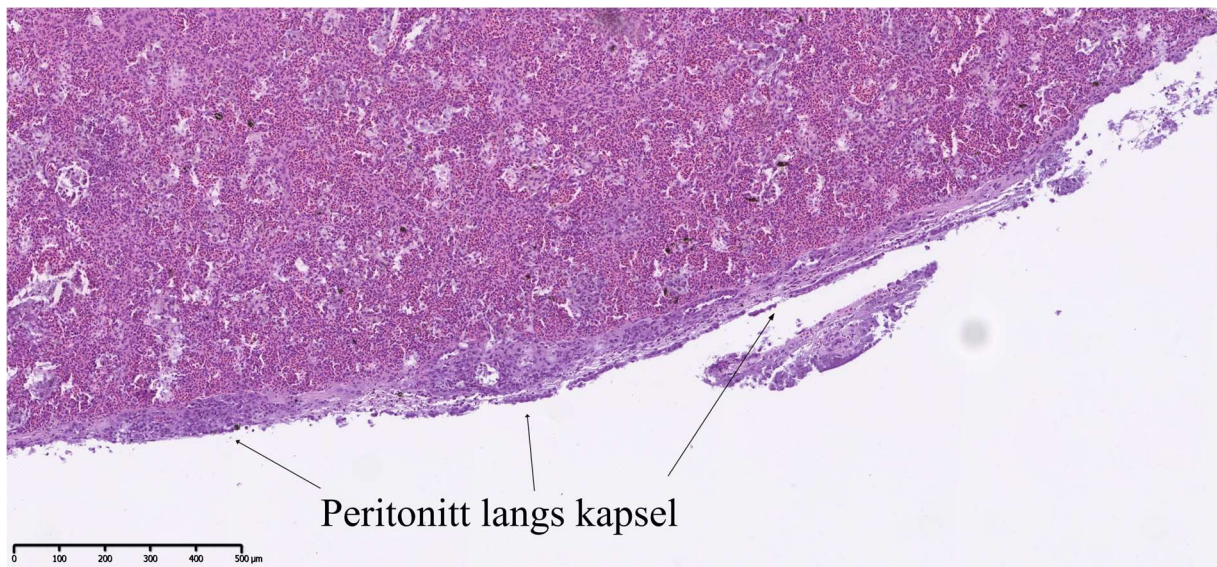
Funn fra histologiske vurderinger er vist i Figur 3-19. Det var generelt få histopatologiske funn, men all undersøkt fisk som var smittet med *P. atlantica* gv. *Salmonicida*, og hadde nådd HEP hadde peritonitt i kapselen rundt milten som vist i **Feil! Fant ikke referansekilden..** Det ble funnet epicarditt langs ventrikkelen og/eller langs bulbus arteriosus i fisk smittet med *P. atlantica* gv. *Salmonicida* som var overlevende, og fisk smittet med *P. skyensis* som hadde overlevd og nådd HEP. Eksempel på epicarditt er vist i **Feil! Fant ikke referansekilden..**



Figur 3-19: Histologiske funn fra forsøket. Funn er delt etter bakterieisolat fisken ble smittet med, og om fisken nådde humant endepunkt (HEP), eller var overlevende.



Figur 3-20: Epicarditt funnet i fisk i kohabitantgruppe i kar smittet intraperitonalt med *P. skyensis* som nådde humant endepunkt. Bildet er tatt med 10x forstørrelse av scannet snitt. Skalaen nede til venstre går fra 0 til 500  $\mu\text{m}$ , med markering for hver 100  $\mu\text{m}$ .



Figur 3-21: Peritonitt langs kapsel til milt. Bildet er fra fisk i lavdosegruppen i kar smittet intraperitonalt med *P. atlantica* gv. *salmonicida*, og nådde humant endepunkt. Bildet er tatt med 10x forstørrelse av scannet snitt. Skalaen nede til venstre går fra 0 til 500  $\mu\text{m}$ , med markering for hver 100  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskusjon

I denne studien ble det gjennomført smitteforsøk med både *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. skyensis* i laks med svært ulike resultat. Fisken fra smitteforsøket ble obdusert, og obduksjonsfunn sammen med prøver til bakteriologi, qPCR analyse, og histologiske vurderinger ble tatt. Det ble også tatt vannprøver fra karene til qPCR analyse. Dødeligheten i forsøkene skiller seg ved at det for *P. atlantica* gv. *salmonicida* var tilstrekkelig dødelighet i middeldosegrupper for både *i.p.* smitte og *i.m.* smittet fisk, til at modellen kan brukes til å teste vaksiner sin beskyttelsesevne. For *P. skyensis* var det ikke tilstrekkelig dødelighet i noen av gruppene for hverken *i.p.* eller *i.m.* smitte til at de kan brukes som en smittemodell til testing av vaksiner sin beskyttelsesevne.

Generelt var det et tydelig skille mellom fisk som nådde HEP eller døde, og overlevende fisk i forsøket. All fisk utviklet obduksjonsfunn lignende de fra tidligere publisert materiale, men funnene var tydeligere, og oftere blant fisk som nådde HEP, eller døde. Det var et skille på appetitt der overlevende fisk tydelig spiste frem til avslutningen av forsøket i motsetning til fisk som nådde HEP eller døde. Det samme ble funnet ved dyrking av bakteriologiske prøver der svært få overlevende fisk viste vekst av *pasteurella*-lignende isolater, og ved qPCR analyse der svært få overlevende fisk fikk positivt resultat. Fisk som nådde HEP eller døde viste i all hovedsak vekst av *pasteurella*-lignende kolonier og fikk positivt utslag ved qPCR analyse. Det er usikkert om fisken har kvittet seg helt med bakteriene, eller om de ligger latent i fisken.

Tilnærmet alle prøver av *pasteurella*-lignende kolonier ble identifisert som *P. atlantica* gv. *salmonicida* og som *P. skyensis* med høy eller middels sikkerhet med MALDI-TOF analyse. Bakteriene ble kun funnet i prøver fra kar smittet med samme bakterie, det ble altså ikke funnet kontaminering av bakteriene mellom karene. De få prøvene som ikke ble identifisert hadde svært svak vekst når kolonien ble dyrket om, og det kan mistenkes at kolonien nærmest har dødd ut. Dersom kolonien hadde blitt sådd om før kunne den hatt sterkere vekst, og MALDI-TOF kunne ha identifisert kolonien.

Det var også andre ting som burde vært gjort annerledes i forsøket. Det ble blant annet lagt til flere prøver underveis i forsøket enn det som var planlagt i utgangspunktet. Dette inkluderer bakteriologiske prøver av øye og tarm, vannprøver for qPCR, og prøver av tarm til histologi. Dette var en økt arbeidsmengde, men gav flere resultater fra studiet som er nyttige for fremtidige studier. Kontaminering av prøvemateriell var også et problem i studien, og førte til



økt tidsbruk ved prøveanalyse, og er ytterligere kommentert i diskusjonen under punkt 4.5 Real time PCR – kontaminering. Det ble generelt for liten tid til prøveanalyse på grunn av mye prøvemateriale. Det ble tatt fullt prøvesett av 123 fisk, og redusert prøvesett av 61 fisk. Over 440 agarskåler er vurdert for vekst, og det har blitt ekstrahert DNA fra 123 prøver av nyrevev, som det også er kjørt qPCR på. Alle organ tatt ut til histologi med unntak av muskulatur er vurdert for 42 fisk. Det ble tatt flere prøver som ikke ble tid til å vurdere, dette inkluderer 123 prøver av hjerte for qPCR analyse, histologiske snitt av muskulatur for de 42 fiskene som ikke ble vurdert, og histologiske snitt av alle organ til de resterende 82 fisk som det ikke er laget snitt av. Alle disse prøvene er lagret hos VI, og det anbefales at alt prøvemateriell vurderes undersøkt for å øke kunnskapen rundt de to bakteriene.

#### 4.1 Smittemodell for *P. atlantica* gv. *salmonicida*

Et av hovedmålene for studiet var å etablere en smittemodell for *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Det ble nyttet kohabitanter sammen med tre grupper som fikk injisert smitte. Smitten ble injisert *i.p.* eller *i.m.*, og det ble nyttet tre ulike doser. Dødeligheten utviklet seg relativt likt for begge smittemetoder, der *i.p.* smittet fisk fikk dødelighet noen dager før *i.m.* smittet. Begge smittemetoder gav en tydelig dose respons, der høydosegruppene døde fullstendig ut for begge smittemetoder, og tilnærmet hele middeldosegruppen døde ut. Det var noe lavere dødelighet i lavdosegruppen for *i.m.* smittet fisk sammenlignet med *i.p.* smittet, men det var også lavere smittedoser for grupper smittet *i.m.* sammenlignet med *i.p.* smitte. Kun høydosegruppene, og middeldosegruppene fyller kravet om over 60% dødelighet for å teste vaksiner som er beskrevet av Nordmo (1997). Fullstendig og tilnærmet fullstendig dødelighet er heller ikke ønskelig som beskrive av Nordmo et al. (1997), og høydosegruppene for *i.p.* og *i.m.* smitte bør da ikke vurderes for videre forsøk. Middeldosegruppen for *i.p.* smitte har en tilnærmet fullstendig dødelighet, og bør ut ifra dette heller ikke nyttes som smittemodell.

Det ble gjort obduksjonsfunn på fisk som nådde HEP eller døde under forsøket som er forenlig med tidligere beskrivelser fra felt av Legård and Strøm (2019). Funnene inkluderer sår på snuter, og enkelt tilfeller av byller i pseudobranch. I tillegg til dette fikk mye av fisken reaksjoner i, og rundt stikkstedet i form av røde områder, og byller for henholdsvis *i.p.* og *i.m.* smitte. De store byllene som kom blant *i.m.* smittet fisk kan sees på som smertefulle for fisken, men det er usikkert om dette oppleves mer smertefullt enn en injeksjon i buken. Hva som er mest smertefullt for fisken bør vurderes for videre forsøk. Dersom vaksiner injiseres *i.p.* bør det vurderes å bruke *i.m.* smitte for å redusere påvirkning den lokale immunresponsen en får fra vaksineringsen som anbefalt av Nordmo (1997).

Det ble også observert endringer i milt, både i størrelse, farge, og i form av hvite flekker og hvitt belegg. Det ble også gjort funn av hvitt materiale i mage og tarm, noe som skilte seg svært mye fra overlevende fisk der en for det meste fant normalt innhold. Overlevende fisk hadde altså spist fram til avslutning av forsøket, mens fisk som nådde HEP eller døde ikke hadde spist.

Tilnærmet alle bakteriologiske prøver tatt fra fisk som nådde HEP eller døde under forsøket hadde vekst av *Pasteurella*-lignende kolonier, og alle kriterier for Koch's postulat er da oppfylt. Unntakene uten vekst var en prøve av øye (*i.p.*) og en fra tarm (*i.m.*), men det var vekst fra nyre av samme individer. Det ble tatt en prøve til av tarm fra fisk som nådde HEP eller døde som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier i tillegg til prøven uten vekst, men igjen er det for få prøver til å sikkert kunne si at *P. atlantica* *gv. salmonicida* kan isoleres fra tarm. Det ble ikke tatt flere prøver fra øyne for fisk som nådde HEP eller døde, og det er derfor ikke mulig å si om dette var et enkelt tilfelle uten vekst eller om *P. atlantica* *gv. salmonicida* ikke er mulig å isolere fra øyne. Blant prøvene for bakteriologisk dyrkning tatt av overlevende fisk var en av de få prøvene som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier tatt av øye, men på samme måte som for tarm er det ikke mulig å si om dette er et enkelt tilfelle eller ikke. Det ble tatt flere prøver fra både tarm og øyne fra overlevende fisk, men disse viste ikke vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Manglende vekst på bakteriologiske prøver fra overlevende fisk kan tyde på at fisken ikke lenger er smittet, eller at bakterien kun finnes i små mengder igjen i fisken.

*P. atlantica* *gv. salmonicida* ble påvist i all fisk som nådde HEP eller døde med qPCR, med unntak av en middeldose fisk smittet *i.p.* Det kan argumenteres at prøvene er kontaminert under DNA ekstraksjonen, men alle prøver utenom en middeldose *i.p.* smittet fisk har Ct-verdier som er lave nok til å anta at fisken er positiv. Det ble også gjort histologiske vurderinger av *i.p.* smittet fisk som nådde HEP fra middeldosegruppen og lavdosegruppen.

Blant fisk som nådde HEP ble det gjort funn av peritonitt i milt, noe som også er beskrevet fra felt av (Legård and Strøm, 2019). Om peritonitten har oppstått som følger av sykdomsutvikling er usikkert da fisken ble *i.p.* smittet og bakterien har vært i store mengder i buken. Funnet ble ikke gjort blant overlevende fisk som hadde stått lengre og hatt tid til å bekjempe smitten. Vurdering av fisk *i.m.* ville kunne vært med på å vise om dette kommer av sykdomsutvikling, men som nevnt tidligere var det ikke nok tid til vurdering av disse prøvene. Det ble også funnet epicarditt i litt over 60% av overlevende individ, et funn som også er beskrevet fra felt av Legård og Strøm (2019). Epicarditt kan også være et generelt funn, men

ettersom det ikke ble funnet epicarditt i nullprøvene er det rimelig å anta at dette har oppstått som følge av smitte. Dette ble ikke funnet i fisk som nådde HEP, men mye av fisken som nådde HEP døde tidlig og dette ikke hadde hatt tid til å utvikles enda.

Det var ingen dødelighet blant kohabitantene i noen av karene med *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men det var tegn som kan tyde på at de var smittet med bakterien.

Normalinnholdet i mage og tarm viste at fisken spiste frem til avslutningen av forsøket. Fisk som nådde HEP eller døde i forsøket hadde ikke normalinnhold i mage og tarm, men heller gult slim og hvitt innhold. Dette kan tyde på at kohabitantene ikke var syke. Det ble gjort andre obduksjonsfunn på kohabitantene som også ble funnet på syk fisk i forsøket. Dette var sår på snuter, men opphavet er usikkert. Det finnes beskrivelser fra felt at fisk med pasteurellose har sår på snuten (Legård and Strøm, 2019), men dette kan også komme av atferden i begynnelsen av forsøket der fisken ofte svømte inn i sidene av karet med høy hastighet. Selv om opphavet til sårene er ukjent, er det sikkert at små sår kan bli inngangsporter for bakterien. Dette ble vist med at det var vekst av *pasteurella*-lignende isolater fra et sår hos en kohabitant. Det var ingen andre bakteriologiske prøver eller resultat fra qPCR som tyder på at fisken var smittet annet enn prøven av såret. Det er altså funn som tyder på at kohabitantene er smittet, men det kan virke som de ikke har utviklet sykdom.

Dette kan komme av at fisken sitt immunforsvar hindrer smitte, men kan også komme av at det tidlig var høy dødelighet i høy-, og middeldose gruppene og det dermed ble mindre utskillelse av bakterier til vannet. Vannprøvene som ble tatt viste at det var *P. atlantica* gv. *salmonicida* i vannet i begge kar selv om det alt hadde vært stor dødelighet. Hvorfor kohabitantene ikke ble smittet kan komme av lite bakterier i vannet som følge av lite utskilling, redusert smittetrykk når mye fisk døde fort, eller for at fisken sitt immunforsvar klarer å motvirke bakterier i små konsentrasjoner. Smitte i felt blir ofte funnet i fisk som alt er syk med andre sykdommer som har svekket fisken, og det kan hende kohabitanter må svekkes for å bli mottakelige for smitte. Det kan være vanskelig å gjøre slike forsøk replikerbare, noe som gjør at en muligens bør fokusere på smitte via injeksjon.

#### 4.2 Smittemodell for *P. skyensis*

Det andre hovedmålet med studien var å etablere en smittemodell for *P. skyensis*, og på samme måte som for *P. atlantica* gv. *salmonicida* ble det nyttet *i.p.* og *i.m.* smitte sammen med kohabitanter. Generelt var dødeligheten lav for begge smittemetoder, men spesielt lav var den for *i.m.* smittet fisk der kun fire fisk totalt nådde HEP eller døde under forsøket. Ingen

av gruppene for både *i.p.* og *i.m.* smitte fikk over 60% dødelighet beskrevet av Nordmo (1997) som er nødvendig for å kunne teste en vaksine.

Den lave dødeligheten kan skyldes for lave konsentrasjoner i smittedoser for *i.m.* smitte sammenlignet med *i.p.* smitte. Smittedosene for *i.p.* smitte med *P. skyensis* høyere i høydosegruppen enn *i.p.* smitte med *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men lavere i lavdosegruppen. Med unntak av disse to gruppene er smittedosen lik mellom de to bakteriene. For kohabitanter oppstod det dødelighet i karet med *i.p.* smitte, og totalt fem kohabitanter nådde HEP eller døde under forsøket. De fem fiskene som nådde HEP eller døde viste lignende obduksjonsfunn som injisert fisk som nådde HEP eller døde. Dette inkluderer gult slim, og hvitt innhold i mage og tarm, samt forstørret mørk milt. Det var vekst i bakteriologiske prøver fra både nyre, tarm, og øyne, positive resultat fra qPCR av nyrevev, samt histologiske funn. På bakgrunn av dette er det rimelig å anta at fisken døde somfølger av smitte med *P. skyensis*.

Hvorfor kohabitanter døde i dette karet etter smitte, men ikke i andre kar i forsøket er usikkert. Sammenlignet med karet med *i.m.* smitte av både *P. atlantica* gv. *salmonicida*, og *P. skyensis* var konsentrasjonene i smittedosene som ble injisert større, og det er da skilt ut mindre bakterier i disse karene. Det ble vist med vannprøver at det var mer bakterier til stede i karet med *i.p.* smitte sammenlignet med *i.m.* smitte for *P. skyensis*, men det ble også vist at det var mer bakterie i begge karene med *P. atlantica* gv. *salmonicida* likevel døde det ikke kohabitanter i de karene. Det er verdt å merke at vannprøvene kun reflekterer en øyeblikks oversikt, og mengden bakterier varierer over tid. Vannprøver burde derfor bli tatt mer regelmessig. Den tidlig høye dødeligheten i karene med *P. atlantica* gv. *salmonicida* kan ha ført til at det var for få fisk som skilte ut bakterier, og at de gjenværende fiskene hadde for lave smittedoser til å skille ut nok bakterier nok til å smitte kohabitantene.

Det ble gjort obduksjonsfunn lignende de for *P. atlantica* gv. *salmonicida* for all fisk som nådde HEP, eller døde under forsøket. Figurene vist i resultatene skiller ikke fisk som nådde HEP, eller døde fra overlevende, men overlevende fisk hadde generelt lite obduksjonsfunn. Bakteriologiske prøver for fisk som nådde HEP eller døde viste i de fleste tilfeller vekst av *pasteurella*-lignende kolonier, men et unntak var en fisk fra høydosegruppen som ikke viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier fra noen av åtte prøvene for bakteriologisk dyrkning som ble tatt. Fisken hadde store skader i finnene, og mange sår og det ble totalt tatt fem bakteriologiske prøver fra sår. qPCR analyse av nyrevev viste at fisken var smittet. Blant

kohabitantene som nådde HEP, eller døde viste prøver fra både nyre, øye, og tarm vekst av *pasteurella*-lignende kolonier.

For overlevende fisk var det kun et individ fra lavdosegruppen smittet *i.m.* som viste vekst av *pasteurella*-lignende kolonier. Dette var også den eneste overlevende fisken som fikk positivt resultat fra qPCR, mens de resterende overlevende fiskene fikk negativt resultat fra qPCR analyse. All fisk som nådde HEP, eller døde fikk positivt resultat fra qPCR. Det ble gjort funn av epicarditt blant alle undersøkte fisk som nådde HEP, men under halvparten av overlevende fisk. I motsetning til fisk smittet med *P. atlantica* gv. *salmonicida* som nådde HEP, hadde overlevende fisk fra kar smittet med *P. skyensis* tilstrekkelig med tid til å utvikle dette.

At ikke all overlevende fisk hadde utviklet epicarditt, at bakteriologiske prøver ikke viste vekst *pasteurella*-lignende kolonier, at qPCR prøver var negative for all overlevende fisk, sammen med få obduksjonsfunn tyder på at overlevende fisk ikke er smittet med bakterien lengre. Isolatet av *P. skyensis* som ble brukt til smittemateriell i studien er isolert i Norge, og er assosiert med serotype O1 av *P. skyensis* isolert i Skottland. Serotype O1 ble beskrevet av Birkbeck et al. (2002) som lite virulent, og denne studien tyder på det samme for *P. skyensis* isolert i Norge.

#### 4.3 Sammenligning av smitte modeller for *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. skyensis*

Det var generelt høyere dødelighet for både *i.p.* og *i.m.* smitte med *P. atlantica* gv. *salmonicida* sammenlignet med både *i.p.* og *i.m.* smitte med *P. skyensis*. Kun middeldosegrupper *i.m.* smitte med *P. atlantica* gv. *salmonicida* kan brukes til testing av vaksiner ut ifra akkumulert dødelighet i denne studien. Hvorfor det ikke kom tilstrekkelig dødelighet blant noen av gruppene for *P. skyensis* kan komme av at denne bakterien er mindre virulent og derfor krever høyere konsentrasjon av bakterie i smittematerialet. Det bør også vurderes om isolatene som er brukt i smittematerialet har fått redusert virulens på grunn av gjentatt *in vitro* dyrking, og at et nytt smitteforsøk med isolater som nylig har gått gjennom en fisk vil gi et annet resultat. Det kan være forskjell i hvor mye de to bakteriene er blitt dyrket *in vitro*, og at forskjellen i virulens kommer av dette. Forsøkene bør vurderes å gjenta forsøket med isolater som nylig har gått gjennom en fisk for å minimere sannsynligheten for laboriebaseret minking i virulens. I tillegg til konsentrasjonen i smittedosene, kan faktorer som miljø eller stress gjøre at en ikke oppnår naturlig smitte. Fisken i felt er ofte stor, og har vært utsatt for større påkjennelser, og økt dødelighet på grunn av pasteurellose kan komme av at fisken alt er svekket.

Obduksjonsfunnene har vært relativt like for alle smittegrupper, og funnene er forenelige med tidligere beskrivelse av Legård and Strøm (2019) og av Jones and Cox (1999).

Smittegruppene har også hatt lignende atferd, og resultater fra bakteriologiske prøve, og qPCR. De to sist nevnte har vist at overlevende fisk i alle smittegrupper kan ha kvittet seg med bakterien. Prøvene har vist at fisk som døde eller nådde HEP under forsøket er forenelig med dødelighet forårsaket av henholdsvis *P. atlantica* gv. *salmonicida* og *P. skyensis*.

#### 4.4 Vurdering av primer og probe til *P. skyensis*

I studien ble det gjennomført tester av primere og prober for *P. skyensis* til qPCR analyse, utviklet under ledelse av Bjørn Spilsberg ved VI Ås som del av Pasteurella prosjektet. Testene bestod av fortynningsrekker av *P. skyensis*, der E og R<sup>2</sup> ble funnet, samt en breddelest for å teste spesifisiteten. E ble funnet til i være 97,96%, som er innenfor normalområde definert av Jonsen et. al. (2013), og viser at det er en tilnærmet dobling i mengde amplifisert DNA i hver syklus av qPCR. R<sup>2</sup> ble funnet til å være 0,997 og er over anbefalt nedre grense på 0,98 definert av Johnset et. al. (2013). Etersom R<sup>2</sup> er tilnærmet lik 1, er den lineære grafen svært godt tilpasset datapunktene (Ct-verdiene for fortynningene). Det er verdt å merke her at resultater fra uforynnet prøve og 10<sup>-2</sup> er utelatt fra trendlinjen siden resultatene hadde stor variasjon mellom parallellene. Uforynnet prøve ble også ekskludert på grunn av negativt resultat i flere av parallellene. Dette kan bety at proben eller primeren er mindre egnet ved store konsentrasjoner av DNA, og at prøver bør fortynnes før analyse dersom konsentrasjon er høy.

Spesifisitetstesten gav positivt resultat for flere av bakterieisolatene, noe som kan tyde på lite spesifisitet for primere og prober. Dette kan også skyldes forurensing under DNA ekstrahering fra bakterie isolatene, eller ved tillaging av prøver til kjøring av qPCR. Etersom negativ templat kontroll for kjøringen var negativ, er det mindre sannsynlig at det har oppstått kontaminering ved tillaging av prøvene. Videre ble bakteriekoloniene rensert uten noen *pasteurella*-isolater i laboratoriet, som gjorde det lite sannsynlig at det har vært kontaminering av ikke-*pasteurella* isolatene. For å utelukke dette fullstendig kunne det også blitt kjørt qPCR av EBK-er fra DNA ekstrahering.

Lite spesifisitet kan som sagt være en mulig grunn til utslag mot flere ulike isolater i breddelesten. På grunn av dette er breddelesten replikert av Bjørn Spilsberg med lignende resultater. Her ble kontaminering under DNA ekstraheringen utelukket som feilkilde. Det mistenkes at konsentrasjonen av nukleinsyre i hver prøve (ng/μl) påvirker resultatet, og at

prøvene burde vært fortynnet til 1 ng/μl. Positiv templat kontroll ville da fått en kalkulert Ct-verdi på 20, og ingen isolater med unntak av skotsk *P. skyensis* ville da fått negativt resultat. Det ble også gjennomført *in silico* analyser av primere og prober mot andre *pasteurella*-isolater med BLAST av Bjørn Spilsberg. Nærmeste match var *P. atlantica* gv. *salmonicida* med maks score på ~75%, og 15 miss matcher for primere. Dette viser at det er svært lite sannsynlig at primeren skal slå ut for annet enn *P. skyensis* (Spilsberg, 2022). Breddetesten burde derfor gjennomføres på nytt med fortynnede prøver for å bekrefte spesifisiteten. EBK-er bør også kjøres for å minske mistanke om kontaminering under DNA ekstraksjonen.

#### 4.5 Real time PCR – kontaminering

Flere av nullprøvene og EBK-ene fikk svakt positive resultater fra qPCR for *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Det var også enkelte EBK-er som fikk positivt resultat fra qPCR for *P. skyensis*. Dette tyder på at det har oppstått kontaminering av prøver under DNA ekstraksjon fra vevet, og enkelte negative prøver kan da gi positivt resultat i qPCR, altså en falsk positiv. Ct-verdier fra nullprøver var rundt 37, og for EBK-er mellom 31 og 38 for begge isolat. Dette er svakt positive resultat, men, DNA ekstraheringen burde blitt gjort på nytt. Dessverre var det tatt ut lite vev til qPCR, og dermed kunne ikke ny isolering og real time PCR gjentas for de gjeldende prøver.

For å fjerne eventuell mistanke om at nullprøvene hadde vært utsatt for *P. atlantica* gv. *salmonicida* før forsøket, ble det bestemt å ta «nye» nullprøver. Disse ble tatt fra fisk som stod upåvirket i et annet kar, og kom fra samme batch. Disse prøvene fikk negativt resultat ved qPCR, og ingen andre prøver tydet på smitte. Det er derfor mulig å anta at de opprinnelige nullprøvene fikk positivt resultat fra qPCR på grunn av kontaminering under DNA ekstraksjonen.

Det er mulig prøver ble kontaminert under DNA ekstraksjon der EBK har fått positivt utslag, og hvilke prøver dette gjeld ble merket i resultatene. Det er altså mulig at disse prøvene er falsk positive, men de fleste positive prøver fra kontaminerte DNA ekstraksjonsrunder hadde en CT-verdi mellom 20 og 26. Til sammenligning hadde nullprøver og EBK-er som skulle vært negative en Ct-verdi på 31 og opp, og det er mulig å anta at prøver som kan være kontaminert og falsk positiv ikke ville hatt lavere Ct-verdi enn dette. Til tross for at resultatene er forbundet med usikkerhet, kan vevsprøver med Ct-verdi mellom 20 og 26 ansees som positiv ettersom eventuell kontaminering ikke kunne gi så lav Ct-verdi. Dette gjør at resultater ikke kan sammenlignes direkte, men kun brukes til vurdering om fisken var

smittet eller ikke. Tre prøver med positiv EBK hadde en Ct-verdi fra 34 og opp, og en kan ikke anta at prøven var positiv i utgangspunktet. Resultatet fra disse prøvene bør ikke bli tatt hensyn til, og fisken kan ikke regnes som positiv. Til fremtidige forsøk bør det bli tatt ut nok vev ved prøvetaking for å gi mulighet til gjentakelse av ekstra runde med isolering, og etterbehandling bør gjennomføres med mer hensyn til mulig kontaminering av prøvene.

## 5 Konklusjon

Det oppstod tilstrekkelig dødelighet for middeldosegruppen for *i.m.* smitte for *P. atlantica* gv. *salmonicida* til at det kan brukes som smittemodell for testing av vaksiner. Det må vurderes om smitteметoden er smertefull for forsøksdyret da det ble utviklet store byller i området smitten ble injisert. Smitte modellen må testes ut videre for å se hvordan ulike miljøfaktorer som temperatur, salinitet og oksygenivå, og fisk i ulike stadier påvirker modellen. Kohabitant smitte er ikke antatt å være en god smitte metode for *P. atlantica* gv. *salmonicida* selv om dette ligner mest naturlig smitte.

Det oppstod ikke tilstrekkelig dødelighet for *P. skyensis* i noen av smittegruppene til at dette kan brukes som smitte modell for å teste vaksiner. Verken grupper med injisert smitte, eller kohabitant smitte fikk tilstrekkelig dødelighet. Det bør gjennomføres nye forsøk med justerte smittedoser, med andre smitteметoder, eller med andre miljøfaktorer for å finne en god smitte modell for *P. skyensis*. Den lave dødeligheten for *P. skyensis* tyder på redusert virulens, noe som først ble antydnet av Birkbeck et al. (2002).

Det ble reisolert bakterier fra fisk smittet med begge isolat, og Koch's postulat er oppfylt for både *P. atlantica* gv. *salmonicida*, og for *P. skyensis* isolert i Norge.

Primer og probe utviklet for *P. skyensis* ble vist å ha en god PCR effektivitet, men breddetesen bør gjennomføres på nytt for å bekrefte spesifisiteten.



## 6 Kilder

- ADAMS, A. 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214.
- ALARCÓN, M., GULLA, S., RØSÆG, M. V., RØNNESETH, A., WERGELAND, H., POPPE, T. T., NILSEN, H. & COLQUHOUN, D. J. 2016. Pasteurellosis in lumpsucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *J Fish Dis*, 39, 489-495.
- BIRKBECK, T. H., LAIDLER, L. A., GRANT, A. N. & COX, D. I. 2002. *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 699-704.
- BRICKNELL, I. R. 1995. A reliable method for the induction of experimental furunculosis. *Journal of fish diseases*, 18, 127-133.
- BRUNO, D. W., NOGUERA, P. A. & POPPE, T. T. 2013. *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*, Dordrecht, Springer Netherlands : Imprint: Springer.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITWER, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, 55, 611-622.
- DARE, D. 2006. Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: TANG, Y.-W. & STRATTON, C. W. (eds.) *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Boston, MA: Springer US.
- ELLUL, R. M., BULLA, J., BRUDAL, E., COLQUHOUN, D., WERGELAND, H. & RØNNESETH, A. 2019a. Protection and antibody reactivity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) following vaccination against *Pasteurella* sp. *Fish Shellfish Immunol*, 95, 650-658.
- ELLUL, R. M., WALDE, C., HAUGLAND, G. T., WERGELAND, H. & RØNNESETH, A. 2019b. Pathogenicity of *Pasteurella* sp. in lumpsuckers (*Cyclopterus lumpus* L.). *J Fish Dis*, 42, 35-46.
- EU 2016. Europaparlamentet Og Rådsforordning om smittsomme dyresykdommer og om endring og oppheving av visse rettsakter på dyrehelseområdet («dyrehelseforordningen»). In: EUROPAPARLAMENTET & EURÅDET (eds.) 429/2016. Lovdata.
- FAO 2020. *FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2018/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2018*, Rome/Roma.
- FISKERIDEPARTEMENTET, N.-O. 2013. Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg.
- FISKERIDIREKTORATET 2021a. Akvakulturstatistikk: andre fiskearter, Salg 2007-2020. fiskeridir.no.
- FISKERIDIREKTORATET 2021b. Akvakulturstatistikk: matfiskproduksjon av laks, regnbueørret og ørret, Salg 1994-2020. In: FISKERIDIREKTORATET (ed.). fiskeridir.no.

- FISKERIDIREKTORATET 2021c. Akvakulturstatistikk: rensefisk, Salg av oppdrettet rensefisk 2012-2020. fiskeridir.no.
- FISKERIDIREKTORATET 2021d. Akvakulturstatistikk: totalt for hele næringen, Salg 1998-2020. fiskeridir.no.
- FISKERIDIREKTORATET 2022. Rundvekt (tonn) fordelt på landingsmåned Norske fartøy 2000-2021. 01.03.2022 ed.
- GAUTHIER, G., LAFAY, B., RUIMY, R., BREITTMAYER, V., NICOLAS, J. L., GAUTHIER, M. & CHRISTEN, R. 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 139-44.
- GISMERVIK, K., GÅSNES, S. K., GU, J., STIEN, L. H., MADARO, A. & NILSSON, J. 2019. Thermal injuries in Atlantic salmon in a pilot laboratory trial. *Veterinary and Animal Science*, 8, 100081.
- GRAVE, K. & HEKTOEN, H. 2022. Antibiotikabruk til husdyr og oppdrettsfisk i Norge. *Norsk Veterinær Tidsskrift*, 1.
- GULLA, S., NILSEN, H., OLSEN, A. B. & COLQUHON, D. 2020. Fiskepatogenene *Pasteurella* i Norge. *Norsk fiskeoppdrett*, 11, 46-47.
- HOLCK, P. 2020. *Histologi* [Online]. Store medisinske leksikon på snl.no. Available: <https://sml.snl.no/histologi> [Accessed 12.05.2022 2022].
- HOLCK, P. 2021. *Histologiske fargemetoder* [Online]. Store Medisinske leksikon: Store Norske Leksikon. Available: [https://sml.snl.no/histologiske\\_fargemetoder](https://sml.snl.no/histologiske_fargemetoder) [Accessed 16,3,2022 2022].
- INGRAM, G. A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection-A review. London :.
- JANSSEN, W. A. & SURGALLA, M. J. 1968. Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *J Bacteriol*, 96, 1606-10.
- JOHNSON, G., NOLAN, T. & BUSTIN, S. A. 2013. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *PCR detection of microbial pathogens*. Springer.
- JONES, M. W. & COX, D. I. 1999. Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family pasteurellaceae - A case history. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 19, 75-78.
- KOCH, R. 1890. Ueber bakteriologische Forschung. 1. *allgemeinen Sitzung des X. Internationalen Medicinischen*. Berlin.
- LEGÅRD, B. K. & STRØM, S. B. 2019. Pasteurellose hos laks på vestlandet. *Norsk Fiskeoppdrett*, 9, 34-41.
- LODISH, H., BERK, A., KAISER, C. A., KRIGER, M., BRETSCHER, A., PLORGH, H., AMON, A. & MARTIN, K. C. 2016a. Molecular Genetic Techniques. *DNA Cloning and Characterization*. 8th ed. ed. New York: Freeman.
- LODISH, H., BERK, A., KAISER, C. A., KRIGER, M., BRETSCHER, A., PLORGH, H., AMON, A. & MARTIN, K. C. 2016b. Purifying, Detecting, and Characterizing Proteins. *Molecular cell biology*. 8th ed. ed. New York: Freeman.

- MCINTOSH, P., BARRETT, L. T., WARREN-MYERS, F., COATES, A., MACAULAY, G., SZETEY, A., ROBINSON, N., WHITE, C., SAMSING, F., OPPELAL, F., FOLKEDAL, O., KLEBERT, P. & DEMPSTER, T. 2022. Supersizing salmon farms in the coastal zone: A global analysis of changes in farm technology and location from 2005 to 2020. *Aquaculture*, 553, 738046.
- MOLDAL, T., LØKKA, G., WIIK-NIELSEN, J., AUSTBØ, L., TORSTENSEN, B. E., ROSENLUND, G., DALE, O. B., KALDHUSDAL, M. & KOPPANG, E. O. 2014. Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Vet Res*, 10, 60-60.
- NILSEN, H., COLQUHOUN, D. & GULLA, S. 2021. Pasteurella infeksjon hos laks. *Fiskehelserapporten 2020*. Veterinærinstituttet.
- NILSSON, J., MOLTUMYR, L., MADARO, A., KRISTIENSEN, T. S., GÅSNES, S. K., MEJDELL, C. M., GISMERVIK, K. & STIEN, L. H. 2019. Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon. *Veterinary and Animal Science*, 8, 100076.
- NORDMO, R. 1997. Strengths and weaknesses of different challenge methods. *Developments in biological standardization*, 90, 303-309.
- NORDMO, R., SEVATDAL, S. & RAMSTAD, A. 1997. Experimental infection with *Vibrio salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) : an evaluation of three different challenge methods. *Aquaculture*, 158, 23-32.
- NYBER, E., NYBORG, K., MARGITT, A. & MOGHEN, A. 2015. MALDI-TOF MS: En mikrobiologisk revolusjon. *Bioingeniøren*, 7, 23-26.
- NÆRINGS- OG FISKERIDEPARTEMENTET 2015. Forutsigbarhet og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett.
- REID, H. I. & BIRKBECK, T. H. 2015. Characterization of two groups of *Pasteurella skyensis* isolates from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., based on serotype and 16S rRNA and rpoB gene partial sequences. *J Fish Dis*, 38, 405-408.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Press.
- SANDBLUND, N., RØNNESETH, A., ELLUL, R. M., NYLUND, S. & SANDBLUND, L. 2021. *Pasteurella* spp. Infections in Atlantic salmon and lumpsucker.
- SNIESZKO, S. F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes\*. London :.
- SNIESZKO, S. F. B., G.L.; HOLLIS, E.; BOONE, J.G. 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88, 1814-1815.
- SOMMERSET, I., JENSEN, B. B., BORNØ, G., HAUKAAS, A. & BRUN, E. 2021. *Fiskehelserapporten 2020*, Veterinærinstituttet.
- SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E. & FROST, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4, 89-101.
- SPILSBERG, B. 13.5.22 2022. RE: *Vurdering av breddelest for Real time PCR for P. skyensis*.

- STEFANSSON, S. O., BJÖMSSON, B. T., HANSEN, T., HAUX, C., TARANGER, G. L. & SAUNDERS, R. L. 1991. Growth, Parr–Smolt Transformation, and Changes in Growth Hormone of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Reared under Different Photoperiods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 2100-2108.
- STEINSET, T. A. 2017. *Frå attåttnæring til milliardindustri* [Online]. Statistisk sentralbyrå. Available: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/fra-attatnaering-til-milliardindustri> [Accessed 01.03.2022 2022].
- VALHEIM, M., HÅSTEIN, T., MYHR, E., SPEILBERG, L. & FERGUSON, H. W. 2000. Varracalbmi: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 23, 61-70.
- VANNUCCI, F. A., BECKLER, D., PUSTERLA, N., MAPES, S. M. & GEBHART, C. J. 2013. Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, 162, 265-9.
- WIIK-NIELSEN, J., COLQUHOUN, D., NILSEN, H. K., OLSEN, A. B., GULLA, S., FURNESVIK, L. & ERKINHARJU, T. 2022. Bakteriesykdommer hos laksefisk i oppdrett. *Fiskehelserapporten 2021*. Veterinærinstituttet.
- WILHELM, J. & PINGOUD, A. 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, 4, 1120-1128.
- WAAGBØ, R. 2021. *Tema: Landbaserte oppdrettsanlegg/lukkede anlegg* [Online]. hi.no: Havforskningsinstituttet. Available: <https://www.hi.no/hi/temasider/akvakultur/landbaserte-oppdrettsanlegg-lukkede-anlegg> [Accessed 22,03,22 2022].

## 7 Vedlegg

### 7.1 Protokoll for DNA ekstraksjon fra filter

Protokoll er utviklet av Veterinærinstituttet

1. Overfør filteret til et 5ml rør.
2. Tilsett miks av 720 $\mu$ L ATL buffer og 80  $\mu$ L protinase K, bland med vortex i femten sekunder.
3. Forsegle logget med parafilm, og inkuber på 56°C i 24 timer med rotasjon på 200rpm.
4. Vortex røret i femten sekunder.
5. Pipetter av all veske over i et 5ml LoBind rør, noter volum.
6. Tilsett AL buffer, og iskald etanol i forholdet 1:1:1 i LoBind røret.
7. Tilsett 650 $\mu$ L av blandingen til en DNeasy Mini spinn kolonne med et 2ml oppsamlingsrør, og sentrifuger 1 minutt på 8000g. Kast vesken i oppsamlingsrøret.
8. Gjenta punkt sju til alt lysat har passert gjennom kolonnen. Oppsamlingsrøret tømmes mellom hver gang.
9. Vask filteret ved å tilsette 500 $\mu$ L AW1 i kolonnen, og sentrifuger i 1 minutt på 8000g. Kast vesken i oppsamlingsrøret.
10. Vask filteret ved å tilsette 500 $\mu$ L AW2 i kolonnen, og sentrifuger i 1 minutt på 8000g. Kast vesken i oppsamlingsrøret.
11. Plasser kolonnen i et nytt oppsamlingsrør, og sentrifuger må 20 000g i 3 minutter for å tørke kolonnen.
12. Plasser kolonnen i et merket eppendorfrør.
13. Tilsett 100 $\mu$ L AE buffer til kolonnen, og inkuber i romtemperatur i 5 minutter.
14. Sentrifuger i et minutt ved 6000g.
15. Kast kolonnen, og oppbevar prøven på -20°C.

## 7.2 Obduksjonsfunn

Tabell 7-1: (Del 1 av 2) Obduksjonsfunn for hver smitte metode, og hvert isolat, fordelt på grupper, og for nullprøver. Funnt er oppgitt i prosent av individ undersøkt i gruppen. Antall individer undersøkt i hver gruppe er oppgitt under navn på gruppe

	Nullprøver (n=11)	<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> (ip)				<i>P. atlantica</i> gv. <i>Salmonicida</i> (im)			
		Høy (n=20)	Middel (n=20)	Lav (n=17)	Kohabitanter (n=5)	Høy (n=20)	Middel (n=20)	Lav (n=12)	Kohabitanter (n=5)
Blødning i øyner	0 %	55 %	50 %	59 %	0 %	65 %	70 %	42 %	20 %
Stikksår	0 %	65 %	90 %	53 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Bylle fra stikk	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	100 %	85 %	58 %	0 %
Byller/sår	0 %	5 %	5 %	6 %	0 %	5 %	5 %	8 %	20 %
Rødt gatt	0 %	100 %	85 %	35 %	0 %	25 %	20 %	8 %	0 %
Skadet snute	0 %	20 %	15 %	53 %	80 %	5 %	20 %	58 %	60 %
Skadete finner	9 %	40 %	20 %	12 %	0 %	30 %	25 %	25 %	0 %
Byll i pseudobranch	0 %	0 %	0 %	12 %	0 %	0 %	5 %	0 %	0 %
Væske i hjertehule	0 %	5 %	0 %	24 %	0 %	10 %	40 %	33 %	0 %
Klar ascites	0 %	40 %	15 %	6 %	0 %	40 %	30 %	17 %	0 %
Blodig ascites	0 %	25 %	30 %	29 %	0 %	25 %	50 %	33 %	0 %
Forstørret mit	0 %	90 %	70 %	59 %	0 %	85 %	90 %	58 %	0 %
Mørk mit	0 %	35 %	10 %	29 %	0 %	20 %	75 %	58 %	0 %
Hvite klumper på mit	9 %	45 %	40 %	29 %	0 %	25 %	45 %	33 %	0 %
Bringebernit	9 %	0 %	0 %	0 %	0 %	5 %	0 %	0 %	0 %
Hvitt belegg mit	0 %	40 %	30 %	18 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Hvitt belegg på lever	0 %	0 %	0 %	18 %	0 %	20 %	10 %	8 %	0 %
Vassene organ	0 %	35 %	10 %	12 %	0 %	5 %	0 %	0 %	0 %
Veske i Svømmeblæren	0 %	25 %	35 %	41 %	0 %	25 %	35 %	33 %	0 %
Gul slim i mage	0 %	15 %	20 %	18 %	0 %	25 %	70 %	58 %	0 %
Kvit i mage	0 %	10 %	20 %	24 %	0 %	10 %	55 %	58 %	0 %
Gul slim i mage/tarm	18 %	15 %	40 %	35 %	0 %	30 %	85 %	67 %	0 %
Hvit materiale mage/tarm	9 %	25 %	30 %	18 %	20 %	25 %	65 %	75 %	0 %
For i mage	45 %	5 %	5 %	29 %	80 %	0 %	5 %	33 %	100 %
Normal innhold mage/tarm	55 %	0 %	5 %	29 %	100 %	0 %	5 %	33 %	100 %
Hvite klumper i nyre	0 %	0 %	20 %	24 %	0 %	10 %	45 %	42 %	0 %
Bloddig vev bak øyner	0 %	5 %	5 %	0 %	0 %	10 %	5 %	0 %	0 %

Tabell 7-2: (Del 2 av 2) Obduksjonsfunn for hver smittemetode, og hvert isolat, fordel på grupper, og for nullprøver. Funnt er oppgitt i prosent av individ undersøkt i gruppen. Antall individer undersøkt i hver gruppe er oppgitt under navn på gruppe

	<i>P. skyensis</i> (i.p.)				<i>P. skyensis</i> (i.m.)			
	Høy (n=10)	Middel (n=6)	Lav (n=6)	Kohabitanter (n=10)	Høy (n=6)	Middels (n=6)	Lav (n=5)	Kohabitanter (n=5)
Blødning i øyner	60 %	17 %	17 %	50 %	67 %	83 %	100 %	60 %
Stikksår	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Bylle fra stikk	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Byller/sår	10 %	17 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Rødt gatt	20 %	17 %	17 %	40 %	17 %	0 %	0 %	0 %
Skadet snute	30 %	0 %	33 %	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Skadete finner	60 %	83 %	83 %	70 %	50 %	83 %	0 %	20 %
Byll i pseudobranch	10 %	0 %	0 %	10 %	0 %	0 %	20 %	0 %
Væske i hjertehule	30 %	0 %	17 %	50 %	17 %	0 %	0 %	0 %
Klar ascites	10 %	0 %	0 %	0 %	17 %	0 %	0 %	0 %
Blodig ascites	20 %	0 %	17 %	40 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Forstørret milt	50 %	17 %	17 %	50 %	17 %	17 %	0 %	0 %
Mørk milt	50 %	17 %	17 %	50 %	33 %	17 %	0 %	0 %
Hvite klumper på milt	30 %	17 %	0 %	20 %	50 %	33 %	60 %	0 %
Bringebermilt	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	40 %	0 %
Hvitt belegg milt	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Hvitt belegg på lever	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Vassene organ	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	17 %	0 %	0 %
Veske i Svømmeblæren	20 %	17 %	0 %	20 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Gul slim i mage	50 %	33 %	33 %	60 %	17 %	17 %	20 %	0 %
Kvit i mage	40 %	17 %	17 %	40 %	17 %	17 %	20 %	0 %
Gul slim i mage/tarm	60 %	33 %	33 %	60 %	17 %	17 %	60 %	0 %
Hvit materiale mage/tarm	40 %	17 %	33 %	40 %	17 %	17 %	20 %	0 %
For i mage	40 %	83 %	67 %	50 %	83 %	83 %	60 %	100 %
Normal innhold mage/tarm	40 %	83 %	67 %	50 %	83 %	83 %	60 %	100 %
Hvite klumper i nyre	70 %	17 %	0 %	70 %	50 %	67 %	0 %	0 %
Bloddig vev bak øyner	10 %	0 %	0 %	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %

### 7.3 Ct-verdier for fortynningsrekker

Tabell 7-3: Ct-verdier fra qPCR av fortynninger av *P. skyensis* med threshold satt til 100.

Fortynning	Ct (dR)
1	No Ct
1	19,99
1	No Ct
1/10	14,44
1/10	17,44
1/10	15,69
1/100	18,57
1/100	18,75
1/100	18,10
1/1000	21,48
1/1000	21,68
1/1000	22,12
1/10000	25,14
1/10000	25,32
1/10000	25,35
1/100000	28,55
1/100000	28,91
1/100000	28,23
1/1000000	31,58
1/1000000	32,34
1/1000000	31,87
Negativ kontroll	No Ct
Negativ kontroll	No Ct
Negativ kontroll	No Ct